



THAÍS GARCIAS MOREIRA

**EFEITOS IMUNO-MODULADORES DO ÁCIDO
LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) NA COLITE E
NO ADENOCARCINOMA DE CÓLON MURINO**

TESE DE DOUTORADO

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
JULHO, 2015**

M838e Moreira, Thaís Garcias.
Efeitos imuno-moduladores do Ácido Linoléico Conjugado (CLA) na colite e no adenocarcinoma de cólon murino / Thaís Garcias Moreira. – 2015.
165 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria.
Coorientadora: Ana Cristina Gomes Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Intestino – Doenças – Teses. 2. Colite – Teses. 3. Cólon – Câncer – Teses. 4. Ácido linoléico conjugado – Teses. 5. Sulfato de sódio dextrano – Teses. 6. Azoximetano – Teses. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Santos, Ana Cristina Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.34



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

THAÍS GARCIAS MOREIRA

**Efeitos Imuno-moduladores do ácido linoleico conjugado (CLA) na colite
e no adenocarcinoma murinos**

TESE APROVADA EM 31 DE JULHO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Anamaria@faria

Profa. Dra. ANA MARIA CAETANO DE FARIA
Orientadora e Presidente da Comissão

Ana Cristina Gomes Santos

Profa. Dra. ANA CRISTINA GOMES SANTOS
Coorientadora

denise@carmona

Profa. Dra. DENISE CARMONA CARA MACHADO

Maria Isabel Toulson Davisson Correia

Profa. Dra. MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON CORREIA

Marcelo Torres Bozza

Prof. Dr. MARCELO TORRES BOZZA

Niels Olsen Saraiva Câmara

Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA



THAÍS GARCIAS MOREIRA

**EFEITOS IMUNO-MODULADORES DO ÁCIDO
LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) NA COLITE E NO
ADENOCARCINOMA DE CÓLON MURINO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção de título

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria
Co-orientadora: Ana Cristina Gomes-Santos

TESE DE DOUTORADO

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
JULHO, 2015**

Mestranda: _____
Thaís Garcias Moreira

Orientadora: _____
Profa. Dra. Ana Maria Caetano faria

Co- Orientadora: _____
Dra. Ana Cristina Gomes-Santos

Linha de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos-
PPGCA

NAS- Nutrição, alimentação e saúde

Áreas de Conhecimento

5.07.01.00-2 – CIÊNCIA DE ALIMENTOS

5.07.01.01-0 – valor nutritivo de alimentos

5.07.02.00-9 TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

5.07.02.01-7 tecnologia de produtos de origem animal

5.07.03.00-5 ENGENHARIA DE ALIMENTOS

4.05.00.00-4 – Nutrição

Instituições participantes

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Departamento de Bioquímica e
Imunologia.

Universidade de Debrecen, Hungria. Departamento de Imunologia

A ciência é orgulhosa porque sabe muito, mas a sabedoria é humilde porque não sabe tudo. O mundo de hoje, muito se ufana da sua tecnologia e dos inegáveis progressos científicos. Só falta aos nossos gênios modernos o mais importante de todos os progressos, aquele do aperfeiçoamento do mundo interior de cada um, na descoberta da grande inefável verdade: tudo quanto conseguimos é muito pouco, é nada ou quase nada diante do muito ou quase tudo que rege os verdadeiros valores da existência (Teresinha- a menina que escolheu tudo)

Aos meus pais Hécio e Bete e aos meus irmãos Rennan e Aline, dedico.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de imensamente agradecer à minha professora e orientadora Dra Ana Maria Caetano de Faria que além de me tornar uma profissional melhor me torna uma pessoa melhor. Ana fez muito além do que precisava para ser uma grande orientadora. Aprendi a ser muito mais que pesquisadora apaixonada pela pesquisa, aprendi que é possível ser um pesquisador brilhante e completo quando se é humano, e com ela aprendi a encarar todos os desafios com muito otimismo, com caráter, bondade e persistência. O grande e nobre coração de Ana me doa cuidado, confiança e carinho diariamente e isso me faz feliz e confiante. Sem palavras, para expressar meu sentimento eterno de gratidão pelo incentivo e companheirismo de sempre. Meu muito obrigada será sempre pouco;

Gostaria de agradecer também a minha co-orientadora e amiga Dra Ana Cristina Gomes pelo encorajamento e suporte em tudo! Da bancada à escrita, dos dias difíceis aos dias felizes, sempre estive ao meu lado. Por quase tudo do que aprendi, meu muito obrigada.

A aluna Laila Horta, em especial, pela ajuda em todo o projeto.

Minha gratidão também ao amigo de todas as horas e questionamentos infinitos Dr. Rafael Pires, pela ajuda de “todo santo dia”. Aos amigos que se não estão mais no laboratório mas que deixaram marcas importantes, Bernardo Horta, Archimedes Barbosa e Ana Cecília de Castro;

Agradeço a todos os amigos e funcionários do laboratório de Imunobiologia;

Agradeço também aos amigos do departamento da Imunologia Nina Gual, Daniela Reis, Juliana Lauar, Erike Roma e Angélica Thomaz.

Gostaria de agradecer também aos colaboradores desse trabalho Dr. Rafael Rezezende e Dr. Howard Weiner da Universidade de Harvard em Boston nos EUA;

Ao professor Dr. Dawidsson Gomes e Michele Rodrigues e professora Dra Maria F. Horta Maria do departamento de Imunologia.

Ao professor Dr. Enio Ferreira e a aluna Bruna Cássia do departamento de Patologia;

À professora Denise Carmona do departamento de Morfologia, sempre, o meu muito obrigada.

À professora Sônia Jancar e à Marlise Montes da faculdade de São Paulo (USP)

À Vany Ferraz do departamento de Química da UFMG

À professora Cláudia Rodriguez e prof. Joana Amaral da Universidade de Ouro Preto

À professora Raquel Linhares e colegas da bromatologia da faculdade de farmácia.

À professora Dra. Beatriz Fontoura e colegas da UTSouthwestern em Dallas, USA;

Ao professor Dr. Laszlo Nagy, à aluna Ixchelt Cuaranta, Daniel Bencé e Andreas Pastlos, e ao diretor de biotério Atila Pap da Universidade de Debrecen na Hungria;

Ao Prof. Dezso Balazs do Departamento de patologia da Universidade de Debrecen na Hungria.

Ao prof. Roberto Junqueira e aos funcionários do PPGCA

Em memória, à prof. Daniela Fialho.

Obrigada imensamente a todos por tudo!

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. ESTADO DA ARTE	19
2.1 A mucosa intestinal	19
2.2 Homeostase x inflamação na mucosa intestinal	22
2.3 As Doenças Inflamatórias Intestinais	25
2.3.1 Patogênese das DII	26
2.4 Modelos Experimentais para indução das DII.....	30
2.5 Macrófagos e colite: paradigma M1/M2	33
2.6 Adenocarcinoma de cólon	37
2.6.1 Patôgenese de adenomas e adenocarcinomas	38
2.6.2 Imunidade e Câncer	40
2.6.3 Células T reguladoras no Câncer	42
2.6.4 A TGF-beta	43
2.7 Modelos Experimentais de adenocarcinoma de cólon	43
2.7.1 Azoximetano Dimetilhidrazina e DSS	44
2.8 Proposta terapêutica : Ácido Linoléico Conjugado	46
2.9 CLA na função imune e o fator de transcrição PPAR.....	51
2.10 CLA nas DIIs	56
2.11 CLA no adenocarcinoma	63
2.11.1 CLA no adenocarcinoma de cólon.....	63
3. OBJETIVOS	66
3.1 Objetivo geral	66
3.2 Objetivos específicos	66
4. MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 MATERIAL	67
4.1.1 animais experimentais	67
4.1.2 Ácido Linoléico Conjugado	67
4.1.2.1 Escolha da dose utilizada	67
4.1.3 Dieta AIN-G e suplementações.....	68
4.2 MÉTODOS.....	69
4.2.1 Composição bromatológica da dieta e análise incorporação do CLA nos tecidos	69
4.2.2 Quantificação das concentrações de lipídes hepáticos pela técnica FOLCH	69
4.2.3 Cromatografia Gasosa e Preparo da amostra	70
4.2.4 Eutanásia e coleta de sangue/soro	71
4.2.5 Recrutamento de macrófagos e lavado peritoneal.....	71
4.2.6 Macrófagos derivados de medula	71
4.2.7 Cultura celular	72
4.2.8 Remoção intestino	72
4.2.9 Separação de leucócitos da Lâmina Própria.....	73

4.2.10 Citometria de fluxo	73
4.2.11 Dosagem de citocinas intracelular	74
4.2.12 Lise para obtenção de proteínas.....	75
4.2.13 SDS-PAGE e Western-Blot	75
4.2.14 Ensaio Luciferase	76
4.2.15 PCR em tempo real (RT-PCR)	76
4.2.16 Indução de colite (DSS)	78
4.2.17 Caracterização macroscópica e microscópica da colite	78
4.2.18 Teste de permeabilidade intestinal.....	80
4.2.19 Preparação de extrato de tecido	80
4.2.20 Dosagem de citocinas por ELISA.....	80
4.2.21 Atividade das enzimas NAG, MPO e EPO	81
4.2.22 Histologia das amostras de colon: inclusão e coloração H&E.....	83
4.2.23 Avaliação quantitativa de degeneração hepática	84
4.2.24 Determinação da concentração de prostaglandina PGE2.....	84
4.2.25 Ensaio anti-COX2	84
4.2.26 Ensaio fagocitose de <i>beads</i> fluorescentes	85
4.2.27 Imunohistoquímica	85
4.2.28 Co-focal.....	86
4.2.29 Indução do adenocarcinoma de colon	87
4.2.30 Análise macroscópica e microscópica do adenocarcinoma.....	87
4.2.31 Ensaio anti-LAP <i>in vivo</i>	88
4.2.32 Ensaio proliferação de célula T e geração de Treg.....	88
4.2.33 Ensaios Bioquímicos	89
4.2.34 Calorimetra indireta	89
5 RESULTADOS	91
SEÇÃO I: Efeitos da suplementação com CLA na colite experimental...	93
SEÇÃO II: Viabilidade do uso do CLA como Terapia para DII.....	107
SEÇÃO III : Efeitos do CLA no adenocarcinoma de cólon	111
6 DISCUSSÃO	125
7 CONCLUSÃO	134
8 FIGURAS SUPLEMENTARES	135
9 REFERÊNCIAS	148
10ANEXOS	165

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Fig 1: O tecido linfóide associado a mucosa intestinal.....	21
Fig 2: Balanço entre células T efectoras x T reguladoras	24
Fig 3: Defeitos na mucosa gerando inflamação	24
Fig 4: Etiologia multifatorial das DII	29
Fig 5: Ativação e Polarização de macrófagos	35
Quadro 1: Diferenças entre tumores benignos e malignos	39
Fig 6: Alterações histopatológicas no Câncer	39
Fig 7: Imunidade e Câncer	41
Fig 8: Estrutura dos Isômeros biológicos do CLA	47
Fig 9: Efeitos no organismo da ativação de PPAR- γ	53
Quadro 2: Propriedades anti-inflamatórias de PPAR- γ em modelos experimentais de inflamação intestinal	55
Quadro 3: Resumo dos trabalhos publicados que correlacionam o CLA com as DII	59
Tabela 1: Dieta AIN-93G e dietas usadas para intervenção	67
Fig. 10 Modelo experimental indução de colite	78
Tabela 2: Sistema de Score DAI	79
Tabela 3: Score microscópico da colite	79
Fig 11: Modelo experimental de indução de adenocarcinoma	87
Tabela 4: Análise microscópica do adenocarcinoma de colon	87
Fig 12 Modelo experimental de indução de adenocarcinoma com administração de anti-LAP	88
Fig 13: Quantificação do conteúdo de CLA na dieta e em amostras de fígado de animais suplementados e controle	92
Fig 14. Efeitos da suplementação com CLA sobre a colite experimental: aspectos micro e macroscópicos	93
Fig 15: Comprimento do cólon na colite induzida por DSS	95
Fig 16: Efeitos da suplementação sobre a permeabilidade intestinal na colite induzida por DSS.	96
Fig 17: Análise fenotípica das células da imunidade inata da lâmina própria colônica durante o desenvolvimento da colite ulcerativa experimental (3 e 7 dias).	98
Fig 18: Efeito da suplementação CLA sobre a atividade das enzimas NAG, MPO e EPO em tecidos colonicos na colite experimental.....	99
Fig 19: Efeitos da suplementação CLA sobre o perfil macrófagos M1 e M2 na Lâmina Própria colônica na colite experimental.....	101
Fig 20: Efeitos do CLA sobre a ativação de PPAR- γ	102
Fig 21: Efeito do CLA sobre o PPAR- γ em macrófagos <i>in vitro</i>	103
Fig 22: Efeitos da suplementação de CLA sobre a colite experimental em camundongos C57BL/6 e LysMCre PPAR γ ^{flox/flox}	105
Fig 23: Efeitos do CLA sobre o perfil bioquímico e suas repercussões no fígado	108

Fig 24: Efeitos do CLA sobre o metabolismo	109
Fig 25: Efeitos do CLA sobre o adenocarcinoma de cólon.....	112
Fig 26: Efeitos do CLA sobre o peso corpóreo no adenocarcinoma de cólon.....	112
Fig 27: Efeito do CLA sobre o score histológico e sobre a proliferação celular no adenocarcinoma de cólon.....	113
Fig 28: Cortes histológicos corados em H&E no adenocarcinoma.....	114
Fig 29: Efeito da suplementação de CLA na produção de TGF- β na mucosa intestinal.....	115
Fig 30: Efeito da suplementação de CLA sobre células reguladoras expressando TGF- β de membrana (LAP) em tumores no adenocarcinoma de cólon.....	116
Fig 31: Efeito da administração de anticorpo anti-LAP no adenocarcinoma de cólon.	118
Fig 32: Efeito da suplementação de CLA em cultura de células T sobre a geração de células Treg LAP+ e a participação de antagonistas de PPAR- γ (GW9662).....	119
Fig 33: Efeito do CLA sobre a produção de TGF- β em macrófagos	121
Fig 34: Efeitos do CLA no adenocarcinoma de cólon em camundongos LysMCre PPAR γ ^{flox/flox}	122

RESUMO

O tecido linfóide associado à mucosa intestinal está separado do lúmen do intestino por uma única camada de células epiteliais e convive em uma relação equilibrada com os vários componentes da dieta. Vitaminas, Carboidratos, Proteínas e Lipídeos são reconhecidos por diferentes células do sistema imune e, por isso, além do seu papel nutritivo, desempenham função antigênica importante. As diferentes formas lipídicas presentes nos alimentos podem afetar o sistema imune diretamente através da modulação gênica. Neste trabalho, estudamos os efeitos imunológicos do Ácido Linoléico Conjugado (CLA), um isômero posicional e geométrico do Ácido Linoléico, capaz de ativar o fator de transcrição proliferador de peroxissoma PPAR- γ e de realizar várias funções no organismo. Devido à suas propriedades anti-carcinogênica e anti-inflamatória já descritas, o CLA foi testado, neste trabalho, como agente modulador da Doença Inflamatória Intestinal (DII) (colite ulcerativa) que está fortemente relacionada ao desenvolvimento do câncer de cólon. Constatamos que a suplementação dietética com CLA foi capaz de prevenir a Doença Inflamatória Intestinal, diminuindo o dano na mucosa e o infiltrado inflamatório em um modelo experimental de colite induzida por Sulfato de Sódio Dextrano (DSS). Macrófagos com perfil M2 (anti-inflamatório) participaram desse efeito. Por outro lado, camundongos LysMCre PPAR γ ^{flox/flox}, seletivamente deficientes em PPAR- γ nas células mielóides, suplementados com dieta CLA não foram protegidos da colite. Assim, os efeitos do CLA sobre a colite são dependentes de PPAR- γ . Utilizando o modelo de colite por DSS, observamos ainda que a esteatose hepática causada pela suplementação de CLA no estado naíve é revertida nos animais com colite devido às alterações metabólicas causadas pela doença inflamatória, o que viabiliza a utilização do CLA como terapia alternativa na DII. Apesar de eficiente na prevenção da colite, a suplementação de CLA piorou significativamente os processos tumorais encontrados em modelo de adenocarcinoma induzido por DSS e Azoximetano. Esse efeito foi acompanhado da geração de células T reguladoras LAP+ (expressando TGF- β de membrana) e de macrófagos produtores de TGF- β na lâmina própria do intestino de camundongos suplementados com dieta contendo CLA. Mostramos, em sistema *in vitro* utilizando agonistas de PPAR- γ , que a indução de TGF- β em linfócitos e macrófagos é dependente de PPAR- γ . A neutralização do efeito pro-tumoral do CLA pela administração *in vivo* de anticorpos anti-TGF- β e a utilização de camundongos deficientes em PPAR- γ nas células mielóides mostra a importância da citocina TGF- β e do fator de transcrição do PPAR- γ no efeito pro-tumoral do CLA. Concluimos, portanto, que as propriedades anti-inflamatórias do CLA se associam à prevenção da colite induzida por DSS, mas contribuem para o desenvolvimento de adenocarcinoma de cólon.

Palavras-chave: Ácido Linoléico Conjugado, Doença Inflamatória Intestinal, suplementação, Câncer coloretal, Azoximetano, Sulfato de Sódio Dextrano.

ABSTRACT

The lymphoid tissue associated with the intestinal mucosa is separated from the gut lumen by a single layer of epithelial cells and coexists adjusted in a relationship with the different components of dietary food. Vitamins, Carbohydrates, Proteins and Lipids are recognized by different immune cells. Therefore, these dietary components play an important antigenic function beyond their nutritional role. Different lipid forms present in food can affect the immune system directly through modulation of gene expression. In this work, we studied the immunological effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA), the geometric and positional isomer of Linoleic acid that activates the transcriptional factor peroxisome proliferator PPAR- γ and modulates several functions of the body. Due to its already described anti-carcinogenic and anti-inflammatory effects, CLA was chosen as modulating agent of Inflammatory Bowel Diseases (DII) that are strongly correlated with the development of colon cancer. We demonstrated that dietary supplementation with CLA was able to prevent DII, reducing the mucosal damage and inflammatory infiltrates in an experimental model of colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). Macrophages with M2 profile (anti-inflammatory) were players in this effect. In the other hand, LysMCre PPAR $\gamma^{flox/flox}$ mice PPAR- γ deficient in myeloid cells supplemented with CLA diet was not protected from colitis. Thus, the CLA effect over the colitis is PPAR- γ dependent. By using the DSS model, we also observed that the steatosis process in CLA-supplemented naïve mice is reverted on colitis due the metabolic alteration caused by the inflammatory disease, that enables the CLA use as therapeutic tool on DII. Although effective in preventing DSS-induced colitis, CLA supplementation significantly worsened the tumor processes found in colorectal cancer (CRC) induced by a combination of DSS and azoxymethane. This effect was associated with the generation of CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells (membrane-bound TGF- β) and TGF- β producer macrophages in the gut lamina propria of CLA-supplemented mice. We showed, *in vitro*, by using the PPAR- γ agonist, that the TGF- β induction on lymphocytes and macrophages is PPAR- γ dependent. Neutralization of the pro-tumor effect of CLA by *in vivo* administration of anti-TGF- β antibodies and the use of LysMCre PPAR $\gamma^{flox/flox}$ mice show the role of the cytokine TGF- β and the transcriptional factor PPAR- γ over CLA pro-tumoral effect. We conclude, therefore, the anti-inflammatory properties of CLA are positively associated with prevention of DSS-induced colitis but also with development of colon tumors.

Key-words: Conjugated Linoleic Acids, Inflammatory Bowel Disease, supplementation, Colorectal cancer, Azoxymethane, Dextran Sulfate Sodium.

1. Introdução

A descoberta de que o intestino convive harmonicamente com milhões de bactérias comensais moduladas pela dieta e pelo consumo de probióticos delineou uma nova trajetória científica que define o alimento, para além do seu papel nutricional, como fonte antigênica e imunomoduladora (Faria, Gomes-Santos et al. 2013). É possível encontrar hoje várias evidências que demonstram efeitos robustos de componentes dos alimentos (vitaminas, carboidratos, proteínas e lipídeos) que extrapolam o conceito alimento-energia (Bruce, Strobel et al. 1987, Faria and Weiner 2005, Gill, Pop et al. 2006, Berin and Mayer 2009). Porcelli e colaboradores (1993) demonstraram, por exemplo, que o intestino possui um subtipo de linfócitos T com TCR específicos para o reconhecimento de vitaminas do complexo B (Porcelli, Yockey et al. 1993, Tilloy, Treiner et al. 1999, Treiner, Duban et al. 2003). Outro exemplo, é a expressão de enzimas convertoras de vitamina A em células dendríticas tolerogênicas que produzem e ativam o metabolito da vitamina A (ácido retinóico) essencial a homeostase intestinal (Molenaar, Knippenberg et al. 2011). Alguns trabalhos pioneiros também demonstram que assim como a vitaminas A, a vitamina D e o ácido fólico participam efetivamente na geração e manutenção de células T reguladoras fundamentais para manter a homeostase intestinal através de receptores próprios presentes em células imune (Treiner, Duban et al. 2003, Mucida, Park et al. 2007, Yamaguchi, Hirota et al. 2007). Nosso grupo mostrou também que o consumo de proteínas intactas no período pós-aleitamento é essencial para a maturação do sistema imune (Menezes, Mucida et al. 2003) (ver artigo em anexo).

Pouco se sabe ainda sobre os efeitos dos lipídeos no sistema imune. Lipídeos e glicolipídeos podem ser apresentados por moléculas CD1 presentes em várias populações celulares. Ao contrário das moléculas de MHC clássicas que se ligam a proteínas, a molécula CD1 se liga a porções de ácidos graxos e os apresentam a células NKT, um subtipo linfocitário abundante na mucosa intestinal (Jayawardena-Wolf and Bendelac 2001). Avanços expressivos também

têm ocorrido na elucidação dos produtos da metabolização dos lipídeos. Os lipídeos consumidos na alimentação são incorporados nas membranas celulares, incluindo as células do sistema imune. A composição lipídica da estrutura celular afeta a fluidez e a formação das plataformas de sinalização intracitoplasmática, os *lipids rafts*, influenciando os processos de sinalização celular e de apresentação de antígenos. Sabe-se que diferentes tipos de lipídeos incorporam-se diferentemente na membrana determinando a bioatividade (Williams, Batten et al. 2012).

Lipídeos metabolizados geram eicosanóides essenciais a várias funções que envolvem inflamação e imunidade (Kelley, Taylor et al. 1999). Os eicosanóides exercem efeitos na proliferação dos linfócitos (Shapiro, Wu et al. 1993, Jeffery, Sanderson et al. 1996, Peterson, Thies et al. 1999), na produção de citocinas (Rappaport and Dodge 1982, Rola-Pleszczynski and Stankova 1992) dentre outros.

Recentemente, estudos de nutrigênica têm demonstrado que os lipídeos conseguem exercer várias funções sobre o organismo através da modulação gênica (Wang, Waltenberger et al. 2014). Um importante gene modulado por lipídeos são os receptores ativado por proliferador de peroxissoma, ou *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPAR), um membro da superfamília de receptores nucleares cujos ligantes são ácido graxos poliinsaturados (PUFAS). Agonistas de PPAR induzem a diminuição da resistência insulínica e um perfil anti-inflamatório em células imunes, principalmente em macrófagos. A ativação de um subtipo de PPAR, o gama, em macrófagos bloqueia a indução de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (Yu, Correll et al. 2002, Choi, Banks et al. 2010, Wang, Waltenberger et al. 2014).

Além dos macrófagos, a expressão de PPAR- γ em células do intestino de camundongos é extremamente alta (Mansen, Guardiola-Diaz et al. 1996). Numerosos estudos correlacionam o efeito de agonistas de PPAR em doenças intestinais como as Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) (Katayama, Wada et al. 2003, Adachi, Kurotani et al. 2006, Dubuquoy, Rousseaux et al. 2006,

Celinski, Dworzanski et al. 2011). Segundo Adachi e colaboradores (2006), a ausência de PPAR- γ em células epiteliais colônicas aumenta a susceptibilidade à colite experimental induzida quimicamente pela sulfato de sódio dextrano (DSS) (Adachi, Kurotani et al. 2006).

No entanto, a grande maioria dos trabalhos utilizam agentes farmacológicos agonistas de PPAR- γ como agentes reguladores na mucosa intestinal enquanto que o potencial dos lipídeos com tal propriedade têm sido negligenciado. Neste trabalho, estudamos os efeitos de um lipídio agonista de PPAR- γ com capacidade ativadora equivalente àquela produzida por fármacos, o Ácido Linoléico Conjugado (CLA).

Segundo Dubuquoy e colaboradores (2006), o CLA teria capacidade igual aos demais ligantes sintéticos de PPAR- γ em ativar esse receptor e seria igualmente eficaz no tratamento da colite (Dubuquoy, Rousseaux et al. 2006). Bassaganya-Rivera e colaboradores têm demonstrado que o CLA tem a capacidade de prevenir a DII e que esse efeito é dependente de PPAR- γ (Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004, Bassaganya-Riera, DiGuardo et al. 2011).

O Acido Linoléico Conjugado é o nome genérico utilizado para todas as isomerias posicionais geométricas do ácido linoléico. O ácido linoléico, ou o *cis*-9 e *cis*-12 ácido octadecadienóico é um ácido graxo de 18 carbonos contendo duas duplas ligações nas posições 9 e 12 (Pariza, Park et al. 2001). O Ácido Linoléico pode ser convertido a CLA quando reações microbiológicas ou reações químicas deslocam a dupla ligação para formar alternadas ligações duplas e simples, por isso, então, denominados conjugados. As duplas ligações do CLA podem estar nas posições 7,9-, 8,10-, 9,11-, 10,12- e 11,13 e geométricos (*cis* ou *trans*) (Rainer and Heiss 2004). Os dois isômeros, *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12 são conhecidos como os responsáveis pelas ações biológicas do CLA (Pariza, Park et al. 2001).

Numerosas propriedades fisiológicas atribuídas ao CLA já foram comprovadas, incluindo funções anticarcinogênicas (Pariza and Ha 1990, Ip, Dong et al. 2002), antiaterogênicas (Hassan Eftekhari, Aliasghari et al. 2013),

modificações na composição corporal (Park, Albright et al. 1997, Blankson, Stakkestad et al. 2000), modulação na função imune (Tricon, Burdge et al. 2004, Mandir and Goodlad 2008, Hassan Eftekhari, Aliasghari et al. 2013) formação óssea (Park, Pariza et al. 2008), dentre outras.

Mesmo que a ingestão de CLA ocorra de forma natural pelos alimentos, tais como carne e derivados do leite, alguns autores sugerem que o consumo desse ácido graxo é insuficiente na alimentação usual para que se obtenham as ações específicas de promoção da saúde. Portanto, assim como para a suplementação de ômega-3 na dieta ocidental, a suplementação de CLA também seria necessária (Turpeinen, Mutanen et al. 2002, Burdge, Lupoli et al. 2004, Schmid, Collomb et al. 2006, Nishizaki, Shimada et al. 2014).

A propriedade do CLA como agonista de PPAR- γ expresso principalmente nos enterócitos do cólon e em macrófagos representa um cenário promissor à utilização da suplementação de CLA como ferramenta preventiva na DII. As doenças inflamatórias intestinais (DII) incluem a colite ulcerativa e a doença de Crohn e são caracterizadas por intensa resposta inflamatória no trato gastrointestinal (Fiocchi 1998). Existem fortes evidências de que as DII sejam o resultado do desequilíbrio entre a microbiota intestinal e as células imunes presentes na mucosa intestinal subsidiada pela propensão genética do indivíduo (Strober, Fuss et al. 2007).

A etiopatologia da colite ulcerativa envolve diversos aspectos da imunidade inata e da resposta inflamatória e tem como principal consequência o desenvolvimento do câncer de cólon. Cerca de 5% das pessoas com colite ulcerativa desenvolvem o câncer coloretal (Munkholm 2003, Johnson, Wei et al. 2013).

Apesar das variações epidemiológicas encontradas entre os trabalhos publicados e das mudanças significantivas na epidemiologia da colite ulcerativa nas últimas décadas, a incidência dessas doenças continua a aumentar ou a se estabilizar na maioria dos países desenvolvidos, enquanto que a sua incidência tem crescido em países como o Brasil (Russel 2000). Além disso, crianças

passaram a ser acometidas pela doença com maior frequência (Benchimol, Mack et al. 2014).

O tratamento da colite ulcerativa ainda se baseia no uso de corticóides e drogas anti-inflamatórias. Por outro lado, terapias alternativas e complementares auto-prescritas são utilizadas por metade dos pacientes acometidos pela doença, devido à pouca satisfação com os tratamentos convencionais e aos efeitos colaterais associados a eles (Quattropani, Ausfeld et al. 2003, Opheim, Hoivik et al. 2012). Sendo assim, a suplementação com CLA seria uma ferramenta útil na prevenção das DIIs, além de ser um tratamento de baixo custo e pouco invasivo.

Alguns trabalhos, incluindo estudos em humanos, que correlacionam a suplementação de CLA com as DIIs já demonstraram que a suplementação com este ácido graxo é eficiente na modulação dessas doenças (Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004, Evans, Misyak et al. 2010). Contudo, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos pelos quais o CLA promoveria essa ação anti-inflamatória e os tipos celulares envolvidos nessa proteção. Bassaganya e colaboradores (2004) demonstraram que esse efeito protetor do CLA é dependente do fator de transcrição PPAR- γ (Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004). Já em relação ao desenvolvimento do câncer colorretal, os resultados são contraditórios. Enquanto alguns trabalhos demonstram que o CLA diminui o número de tumores (Evans, Misyak et al. 2010, Shiraishi, Iwakiri et al. 2010), outros demonstram que o tamanho dos tumores é maior (Mandir and Goodlad 2008).

Estudos adicionais, que utilizem classificações mais claras de avaliação de tumor e que possuam um delineamento experimental associado a um microambiente inflamatório são necessários para ampliar o entendimento dos efeitos do CLA sobre o cancer colorretal (CRC) associado à colite ulcerativa.

2. Estado da Arte

2.1 A mucosa intestinal

O trato gastrointestinal interage, além dos alimentos, com mais de 15.000 espécies diferentes de bactérias comensais. Uma única camada de células epiteliais separa esse volume de bactérias e os alimentos do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (Nell, Suerbaum et al. 2010). Esse tecido contém um número de macrófagos, plasmócitos e células T maior que qualquer outro tecido linfóide do corpo (Mowat 2003). A estrutura do tecido linfóide associado ao intestino, o GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), é composta pelos linfócitos intraepiteliais, pela lâmina própria e por aglomerados linfóides chamados de placas de Peyer (Bienenstock and Befus 1980, Strobel 1993).

A camada epitelial desempenha função importante de barreira física da mucosa e ainda sustenta células responsáveis pela secreção de peptídeos antimicrobianos e pela secreção de citocinas. Além disto, a camada epitelial aloja glândulas produtoras de muco, que formam barreira física importante à invasão microbiana (Bienenstock and Befus 1980). As células epiteliais intestinais se conectam a linfócitos intraepiteliais (IEL) (linfócitos T interpostos entre células do epitélio), que possuem atividade citotóxica e secretam citocinas importantes como IL-2, IL-6, TNF- α e TGF- β (Cruz, Sydora et al. 1998, Dalton, Cruickshank et al. 2006)

A lâmina própria da camada da mucosa é reconhecida pela riqueza de células do sistema imune como mastócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos, e desempenha importante papel na parte do processamento e apresentação de antígenos, além de alojar plasmócitos produtores de IgA (imunoglobulina anti-inflamatória) (Elmore 2006).

Com relação aos tecidos linfóide constituintes do GALT, (Figura 1) há ainda as placas de Peyer, os folículos linfóides isolados e os linfonodos mesentéricos, contendo linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos B (Calich e Vaz, 2009).

Os folículos linfóides, também ricos em células B e T, participam do processo de maturação desses tipos celulares e representam também locais de captação de antígenos. Os linfonodos mesentéricos (MLN) drenam antígenos e células dendríticas da lâmina própria do trato intestinal por via linfática (Janeway, 2002).

O material antigênico proveniente de células epiteliais, alimentos ou bactérias comensais é apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (APC), as células dendríticas e os macrófagos às células T presentes no GALT, gerando respostas imunes não inflamatórias como a produção de IgA secretória e a tolerância oral (Faria and Weiner 2005).

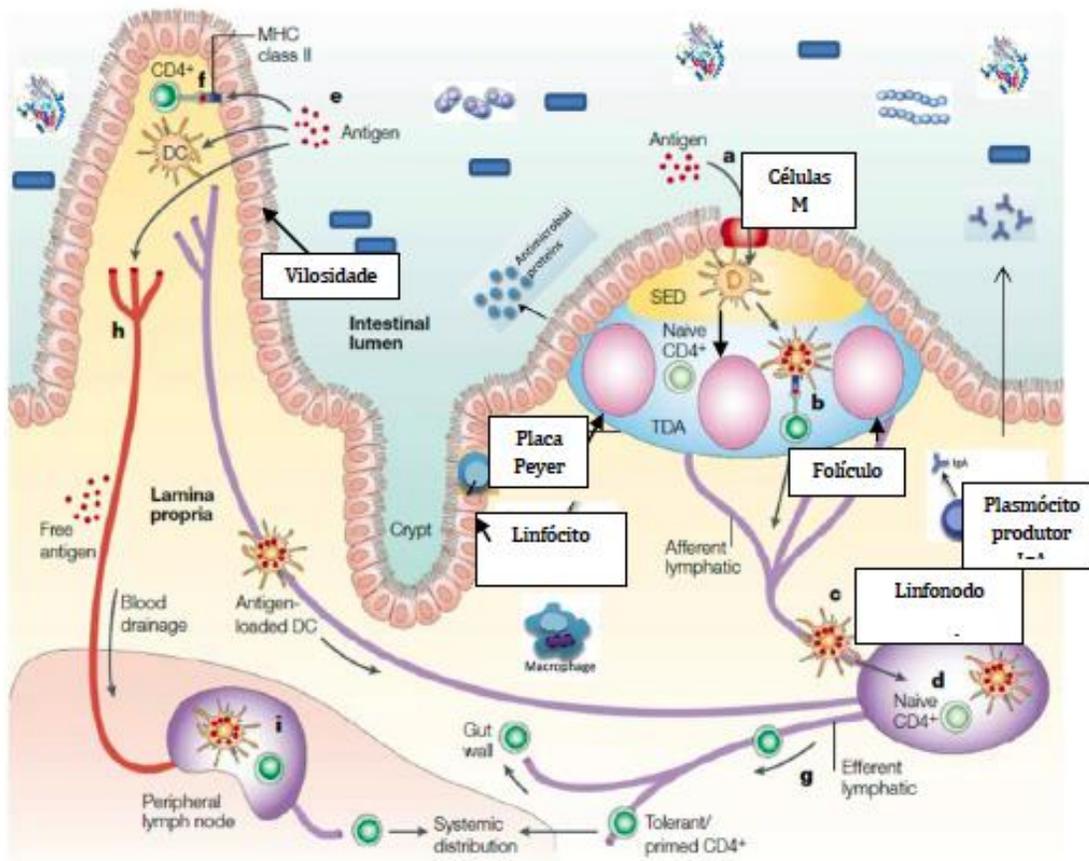


Figura 1: O tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT). A mucosa intestinal é composta por uma camada epitelial, lâmina própria e tecidos linfóides. Uma fina camada de muco se sobrepõe ao epitélio intestinal. As bactérias são abundantes sobre esse muco. Células epiteliais (enterócitos, células de paneth e células calciformes) formam uma barreira física contra a invasão bacteriana e secretam proteínas antimicrobianas que atingem a parede bacteriana, auxiliando na eliminação das bactérias que penetraram sobre o muco intestinal. Plasmócitos diferenciadas a partir de linfócitos B secretam moléculas de S-IgA que são transportadas via transcitose pela camada epitelial e secretadas pela superfície apical das células epiteliais limitando o número de bactérias associadas à mucosa e prevenindo sua penetração. Linfócitos intraepiteliais se localizam na parte basolateral das *tight junctions* epiteliais e respondem à injúria epitelial secretando fatores de crescimento, promovendo reparo tecidual e produzindo fatores pro-inflamatórios e antimicrobianos. Macrófagos e células dendríticas da lâmina própria processam e apresentam as antígenos internalizadas via célula M ou captados diretamente por células dendríticas para células TCD4+ virgens que se diferenciam em células T efectoras e reguladoras. Adaptado de (Mowat 2003).

2.2 Homeostase x inflamação na mucosa intestinal

O contato do tecido linfóide da mucosa com antígenos da dieta e da microbiota leva, em condições fisiológicas, a resposta não inflamatória conhecida como tolerância oral. A tolerância oral é descrita classicamente como a supressão das respostas inflamatórias a um antígeno que tenha sido administrado pela via oral (Faria e Weiner, 2005). Entre os mecanismos propostos para explicar a tolerância oral, o mais importante tem sido a geração de linfócitos T reguladores (Treg) na mucosa intestinal que seriam capazes de inibir a diferenciação, a proliferação e a atividade de outras células T efetoras inflamatórias, ou seja, criando um balanço positivo entre células Tregs e T efetoras na mucosa intestinal (Faria e Weiner 2005; Faria e Weiner, 2006).

Várias subpopulações de linfócitos T com fenótipo regulador induzido na periferia já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ (Faria e Weiner, 2005). Essas células exercem papel supressivo pela secreção de citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, respectivamente (Faria e Weiner, 2006). Outras células T reguladoras, tais como as células T CD4⁺LAP⁺ agem pela presença na membrana da forma latente do TGF- β (associado ao peptídeo LAP – *latent associated peptide*). O TGF- β de membrana é capaz de se ligar ao seu respectivo receptor e mediar a supressão da célula que o expressa da mesma forma que a citocina solúvel. Acredita-se que as células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ geradas na mucosa intestinal também medeiam sua função supressora pela secreção de TGF- β e IL-10 (Faria e Weiner, 2005).

Evidências científicas sugerem que as Doenças Inflamatórias Intestinais ou *Inflammatory Bowel Diseases* (DII) seriam o resultado de dois princípios iniciais: da excessiva função de células T efetoras ou função deficiente das células T reguladoras (Figura 2). O desenvolvimento da DII experimental utilizando-se modelos animais geneticamente deficientes para elementos reguladores da mucosa intestinal como a IL-10 confirma essa hipótese (Gomes-Santos 2012).

Em suma, observamos na DII o desencadeamento de uma cascata de respostas imunes inflamatórias inapropriadas a antígenos luminais que resulta na entrada destes através da barreira epitelial. Macrófagos e células dendríticas (DCs) apresentam os antígenos a células T CD4⁺ induzindo a diferenciação de células T pro-inflamatórias, em detrimento das células reguladoras (Tr1, Th3 e células Treg) (Figura 3). O componente genético é muito importante no desencadeamento dos eventos iniciais inflamatórios. A grande maioria dos genes de susceptibilidade para as DIIs descritos até hoje codificam elementos envolvidos na homeostase imune na mucosa (Liu, van Sommeren et al. 2015). Células T ativadas produtoras de IFN- γ e de TNF- α agem sinergicamente modificando a morfologia das células endoteliais dos vasos sanguíneos próximos ao sítio inflamatório, permitindo um aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, da expressão de moléculas de adesão (ICAMs) e da migração de leucócitos e proteínas para o foco inflamatório (Schreiber, 1998; Marini, 2003).

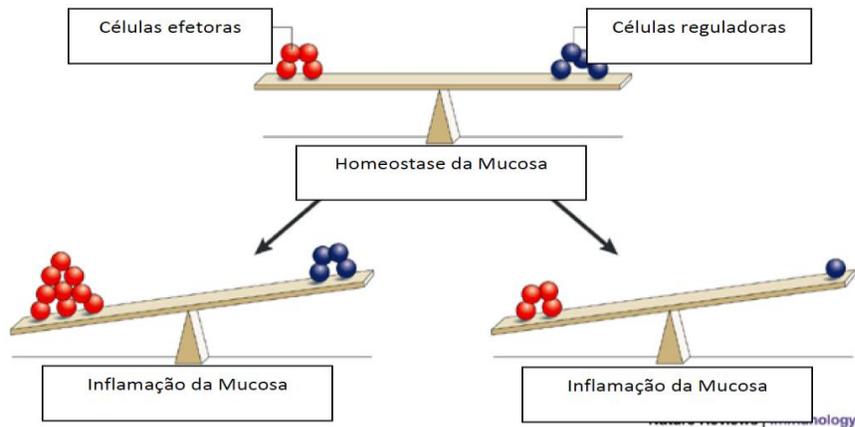


Figura 2: Balanço entre células T efetoras x Células T reguladoras. Na imagem superior da figura, a resposta efetora, Th1 e Th2, é normal e garante a homeostase. Alternativamente, a resposta celular efetora é normal, mas a resposta reguladora é “insuficiente” resultando em inflamação (direita). À esquerda a resposta efetora está anormal resultando também na inflamação. Adaptado de (Bouma and Strober 2003).

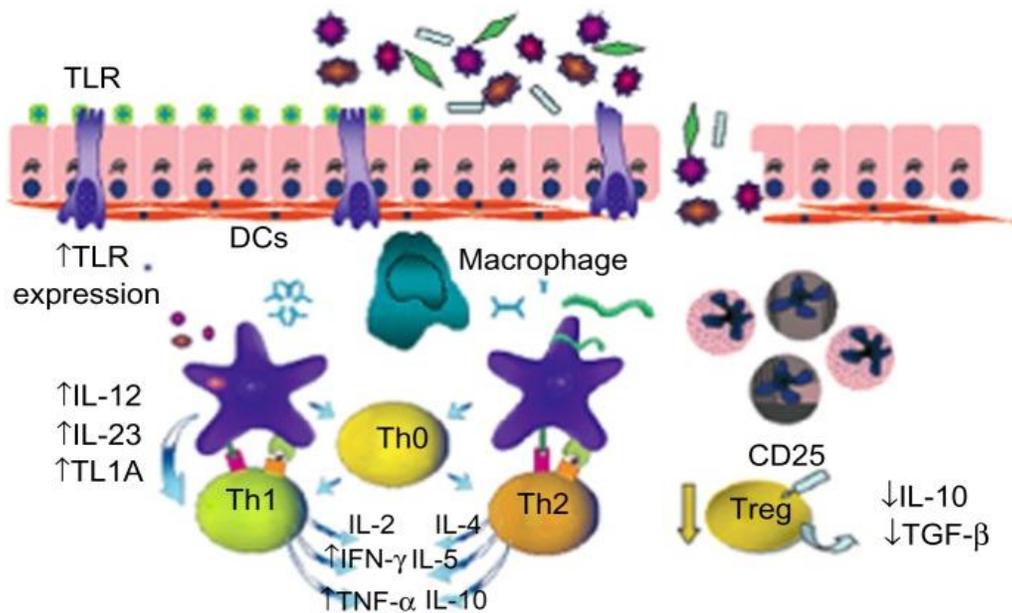


Figura 3: Defeitos na mucosa gerando inflamação. Diferenciação preferencial de células T naíve em linfócitos efetores com secreção de citocinas pro-inflamatórias associado a redução da geração de linfócitos Treg com consequente redução da secreção de citocinas anti-inflamatórias, ocasionando em inflamação, aumento da permeabilidade intestinal. Adaptado de (Fakhoury, Negrulj et al. 2014).

2.3 As Doenças Inflamatórias Intestinais

São descritas duas principais formas de *Inflammatory Bowel disease* (IBD) ou Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs): a colite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DCh) (de Campos and Kotze 2013). A CU e a DCh apresentam muitas similiaridades, mas diferem entre si em alguns aspectos clínicos e patológicos (Danese and Fiocchi 2006). A colite ulcerativa se caracteriza por inflamação e ulceração da camada mais superficial do cólon, a inflamação é máxima no reto e estende-se até o cólon de modo contínuo. Os sintomas característicos são diarréia com muco, com ou sem sangramento retal. A colite ulcerativa afeta apenas o cólon, já a doença de Crohn pode afetar qualquer área do trato gastrointestinal, incluindo o intestino delgado, e podem haver áreas de intestino íntegras entre as áreas de intestino doente, as chamadas áreas "poupadas" (Strober, Fuss et al. 2007). Segundo Bouma e Strober (2003), apesar da possibilidade de que toda a extensão do TGI possa ser afetada na doença de Crohn, o íleo terminal, o ceco, a área peri-anal e o colón são os mais acometidos (Bouma and Strober 2003). Pacientes com DIi podem também apresentar complicações extraintestinais que incluem anemia, fadiga, perda de peso, perda de apetite, doenças hepáticas, inflamação nos olhos, perda de fluídos e nutrientes, lesões na pele e *déficit* de crescimento quando crianças (Ott and Scholmerich 2013).

Estudos epidemiológicos recentes consensuam que a incidência de DIi continua a aumentar ou a se estabilizar na maioria dos países desenvolvidos como nos Estados Unidos e países da Europa (Molodecky, Soon et al. 2012) além da Ásia e do Brasil (Gismera and Aladren 2008, Ng 2014).

Alguns estudos epidemiológicos já foram conduzidos em nosso país (Gaburri, Chebli et al. 1998, Souza, Troncon et al. 2002, Faria 2004, Souza and Aguilar-Nascimento 2008, Victoria, Sassak et al. 2009). Em suma, os resultados obtidos nos trabalhos sugerem aumento gradual da sua freqüência das DIIs nos últimos 20 anos, com inflexão mais acentuada no início dos anos 1980.

2.3.1 Patogênese da Doença Inflamatória Intestinal

Fatores imunológicos, ambientais e genéticos têm sido descritos como contribuintes para a etiologia da doença. A evidência científica mais bem aceita é a de que a genética promova subsídio inicial ao desenvolvimento da doença e correlações genéticas específicas têm sido identificadas na DII. Gêmeos homozigóticos possuem concordância entre 50-75% para o desenvolvimento de doença de Crohn e o risco da doença é 800 vezes maior quando comparado ao risco médio da população normal. Na retocolite ulcerativa, a concordância genética entre gêmeos é bem menor, 10-22% (Van Limbergen, Radford-Smith et al. 2014).

Vários genes associados com a doença já foram identificados, como mutações diretas em genes relacionados a apresentação de antígenos como os receptores do tipo *Toll* -TLR (*toll like receptors*) e MHC (complexo de histocompatibilidade maior), produção de citocinas e defensinas (peptídeos antimicrobianos), dentre outros (van Heel, Fisher et al. 2004). No entanto, o primeiro gene correlacionado com a DII foi descrito em 2001, o CARD15, responsável pela codificação da proteína NOD-2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*), uma proteína envolvida na sinalização do fator de transcrição NF-KB. Este é o principal representante dos genes envolvidos na etiopatogênese das DIIs (Hugot, Chamaillard et al. 2001, Ogura, Bonen et al. 2001). Estima-se que entre 20-30% dos portadores da doença de Crohn apresentem alguma mutação no gene NOD-2/CARD15, e risco duas vezes aumentado para DCh em indivíduos heterozigotos e aproximadamente 20 vezes maior em condição de homozigoze (Rivas, Beaudoin et al. 2011, Lu, Waugh et al. 2012, Chen, Wang et al. 2013).

É importante ressaltar que um indivíduo geneticamente propenso a desenvolver DII pode ou não desenvolver a doença. O papel dos fatores ambientais é de extrema relevância (O'Toole and Korzenik 2014). Dentre os principais fatores ambientais envolvidos na DII temos o cigarro, a dieta, as drogas, o estresse, a apendicectomia, a permeabilidade intestinal e o uso de

anticoncepcivo oral (Koutroubakis, Vlachonikolis et al. 1999, Sakamoto, Kono et al. 2005, Richman and Rhodes 2013, Spooren, Pierik et al. 2013).

Hollander e colaboradores (1986) estudando a permeabilidade intestinal como evento etiológico e iniciador da doença de Crohn, observaram que familiares diretos de pacientes acometidos pela doença de Crohn, que não apresentavam sintomas da doença, apresentavam alteração da permeabilidade intestinal. Pacientes e seus parentes teriam permeabilidade intestinal duas vezes maior que indivíduos sem qualquer relação genética e sintomas da doença, sugerindo que alterações na permeabilidade intestinal não sejam um evento secundário à inflamação e sim um fator primário importante contribuidor da etiologia da DII (Hollander, Vadheim et al. 1986). Por outro lado, como já mencionamos, não parece ser este o único fator iniciador da doença já que os genes ligados à suscetibilidade para a DII se relacionam com fatores importantes na regulação da inflamação intestinal (Liu, van Sommeren et al. 2015)

Com relação à associação da dieta com a DII, alguns estudos têm buscado correlacionar o consumo de doces, gorduras, vitaminas, frutas, vegetais e fibras com o desenvolvimento da DII. O consumo de frutas, vegetais e fibra parece diminuir o risco do desenvolvimento da DII e o alto consumo de ácidos graxos e doces estaria relacionado de forma inversa ao desenvolvimento das duas formas principais de doença inflamatória intestinal (Sakamoto, Kono et al. 2005, Spooren, Pierik et al. 2013). Além disso, o alto consumo de carnes e margarina esta associado a CU e a reincidiva (Richman and Rhodes 2013). Segundo metanálise realizada por Massironi e colaboradores (2013), é possível constatar a má nutrição proteica e energética acompanhada de baixa ingestão de micronutrientes em pacientes com DII (Massironi, Rossi et al. 2013). Contata-se má digestão e má absorção de nutrientes específicos, principalmente na absorção de gorduras (Murch and Walker-Smith 1998). Cerca de 20 a 75% dos pacientes adultos apresentam perda de peso exacerbada. Todavia, podemos considerar os trabalhos como inconclusivos e ainda não há recomendação dietética segura que substitua uma dieta restritiva para pacientes com DII. Novos

estudos que evidenciem a co-relação entre os diferentes alimentos e tipos de dieta são necessários (Hou, Lee et al. 2013).

A composição da microbiota intestinal desempenha outro fator importante no desencadeamento das DIIs. Algumas evidências para essa inferência são: 1) o sucesso do uso terapêutico de antibióticos e ou probióticos na DII; 2) o não desenvolvimento da DII em camundongos IL-10^{-/-} (que desenvolvem espontaneamente a colite) quando mantidos em condições isentas de germes e 3) camundongos sem a colite mantidos na mesma gaiola com camundongos com DII desenvolvem colite similar acompanhada de disbiose (Linskens, Huijsdens et al. 2001, Haller 2006, Kanai, Matsuoka et al. 2014).

Em humanos, estudos que analisaram a microbiota fecal de pacientes com DCh identificaram espécies de bactérias correlacionadas com a disbiose (Joossens, Huys et al. 2011, Kostic, Xavier et al. 2014). No entanto, o preciso mecanismo por qual estas bactérias contribuem para o desenvolvimento da DII e a ordem em que a disbiose se instala, ou seja, causa ou consequência, ainda é um desafio. Uma vez que a composição da microbiota se diversifica de acordo com etnias, dieta e composição corporal, fica difícil estabelecer a microbiota saudável padrão que possa prevenir o surgimento de doenças, incluindo a DII (Kanai, Matsuoka et al. 2014).

A utilização de probióticos tem surgido efeitos benéficos na DII. O mecanismo pelo qual essas bactérias auxiliam na prevenção e no tratamento da DII são muito variáveis incluindo alteração da permeabilidade intestinal, secreção de S-IgA, ativação de fatores de transcrição como PPAR- γ e produção de importantes metabólitos como bacteriocinas (Park, Heo et al. 2011, O'Shea, Cotter et al. 2012, Nebot-Vivinus, Harkat et al. 2014, Santos Rocha, Gomes-Santos et al. 2014).

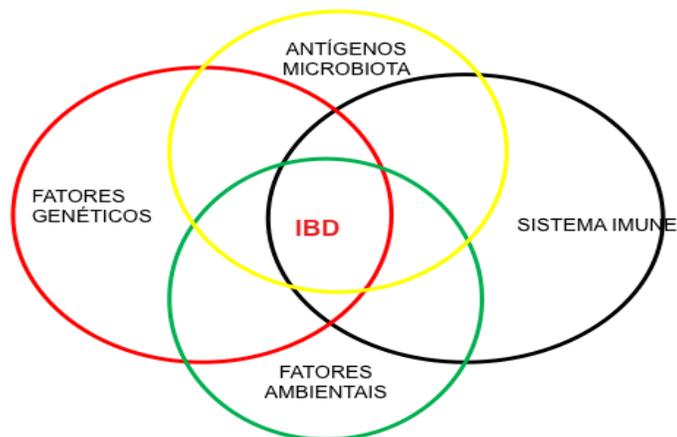


Figura 4: Etiologia Multifatorial das Doenças Inflamatórias Intestinais.

O tratamento medicamentoso das DIIs varia de acordo com a intensidade e tipo da doença (CU ou DCh). Esse tratamento inclui anti-inflamatórios, analgésicos, e imunossupressores como anti-TNF (imunossupressor). As DIIs estão fortemente associadas com o aumento da morbidade, representando diminuição significativa da qualidade de vida dos portadores da doença. A consequência de maior malignidade das DIIs, em especial a CU, é a propensão ao desenvolvimento do cancer (Bouma and Strober 2003).

A colite ulcerative é considerada como a terceira maior causa de câncer colorectal (CRC), perdendo somente para o pólipo adenomatoso familiar e para a síndrome hereditária de câncer colorectal não polipóide. O CRC é responsável por um em cada seis mortes relacionadas a colite ulcerativa e por isso, a associação entre a DII e o câncer de colon tem sido a maior preocupação para os pacientes que vivenciam as inflamações constantes observadas na doença inflamatória do intestino (Kim and Chang 2014).

Herrinton e colaboradores (2012), acompanharam pacientes com DII de 1998 a 2010 e observaram que a incidência de CRC nesses pacientes foi 60% superior àquela observada na população geral (Herrinton, Liu et al. 2012).

O fator de risco mais importante identificado na DII associada ao CRC é a duração e a extensão da doença. Eaden e colaboradores (2001) observaram, em sua meta-análise, que o risco do desenvolvimento de CRC é acumulativo, sendo 1.6% com 10 anos pós diagnóstico de CU, 8.3% com 20 anos e 18.4%

após 30 anos do estabelecimento da CU. Além disso, o risco do desenvolvimento do câncer está relacionado à dimensão da lesão (Eaden, Abrams et al. 2001).

A inflamação crônica, intercalada, acompanhada da resolução subótima com lesões regeneradas de forma frequentemente incompleta, associada à presença de moléculas inflamatórias representa um dos motivos pelos quais a DII estão associadas ao CRC (Sanduleanu and Rutter 2014).

2.4 Modelos experimentais de Doença Inflamatória Intestinal

Os modelos animais de inflamação intestinal são indispensáveis para o entendimento da patogênese das DIIs e têm sido amplamente utilizados. Durante a última década, mais de 30 modelos de doenças inflamatórias intestinais foram desenvolvidos (Melgar, Karlsson et al. 2008).

Os modelos de DII são basicamente divididos em dois grupos: os que desenvolvem espontaneamente a doença e os que necessitam de indução. Desta forma, temos os animais geneticamente modificados através da inserção ou deleção de genes como os camundongos deficientes para IL-10; animais tratados com agentes farmacológicos que promovem a inflamação intestinal, como o sulfato de sódio dextrano (DSS) e ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico TNBS e animais imunodeficientes submetidos a co-transferência de células CD4+CD45RB^{high} (Kuhn, Lohler et al. 1993, Powrie, Leach et al. 1993, Wirtz and Neurath 2007).

Em nosso estudo, utilizamos a administração de DSS via oral, em água, para indução da colite. Estudos demonstram que a administração contínua de 5% de DSS induz colite em camundongos, ratos e hamsters (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990, Elson, Sartor et al. 1995). O DSS é um fármaco (glicosaminoglicano sulfatado), um polissacarídeo contendo mais de três grupos de sulfato por molécula de glicose (Kitajima, Takuma et al. 1999).

O modelo de colite por DSS originalmente relatado por Ohkusa (1985) em hamster e Okayasu (1990) em camundongos, é caracterizado pela indução de

uma colite aguda acompanhada de perda de peso, sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e estrutura glandular do intestino e infiltrado inflamatório composto principalmente por neutrófilos, macrófagos e eosinófilos acometendo diretamente a base das criptas intestinais, principalmente cripta basal, afetando assim, a estabilidade da barreira epitelial (Ohkusa 1985, Okayasu, Hatakeyama et al. 1990, Kitajima, Takuma et al. 1999, Kitajima, Takuma et al. 1999).

Um dos mecanismos pelo qual o DSS teria a propriedade de induzir a doença em animais seria por meio do efeito tóxico diretamente nas células epiteliais da mucosa (Ni, Chen et al. 1996). Ni e colaboradores (1996) demonstraram *in vitro* que, após 30 minutos de incubação com DSS a 2.5%, há uma significativa atividade citotóxica do DSS nas células do espítelio (Ni, Chen et al. 1996). Sendo assim, as ações tóxicas do DSS aconteceriam diretamente sobre as células constituintes da barreira intestinal, como os linfócitos intraepiteliais, as células de paneth, células caliciformes produtoras de muco e os enterócitos.

Contudo, Laroui e colaboradores (2012), demonstraram recentemente que o DSS consegue formar complexos com ácidos graxos de cadeia media (MCFAs) no lúmen do intestino colônico. Esses complexos formam um nanoveículo capaz de ser absorvido na membrana no enterócito (Laroui, Ingersoll et al. 2012). No citoplasma, o DSS reproduziria efeitos inibitórios sobre a atividade da transcriptase reversa e sobre a ribonuclease, ativando a sinalização da cascata inflamatória e alterando a permeabilidade intestinal (Fellig and Wiley 1959, Miyazawa, Olijnyk et al. 1967).

Na colite aguda por DSS, os sinais típicos da doença aparecem no dia 3 e são máximos no dia 7. A expressão de citocinas como IL-1, IL-6, KC e TNF- α estão reguladas positivamente. Ocorre ainda uma elevação nos níveis de mieloperoxidase, refletindo a migração de neutrófilos para o local (Laroui, Ingersoll et al. 2012)

Segundo Wirtz e colaboradores (2007) o sistema imune adaptativo não participaria na fase inicial do desenvolvimento da colite (Wirtz and Neurath

2007). As evidências que corroboram com esse fato são: 1) camundongos SCID, deficientes em linfócitos B e T, são capazes de desenvolver colite por DSS (Dieleman, Ridwan et al. 1994) e 2) a deficiência da quimiona CXCR2 envolvida na migração neutrófilos e a neutralização da migração de macrófagos com anti-MIF (Spehlmann, Dann et al. 2009) inibem a cascata inflamatória e a colite (Nishihira 2012). É importante ressaltar que, apesar da frequente migração de granulócitos (CD11b+ Ly-6C+) na lâmina própria de camundongos submetidos a colite experimental por DSS (Zindl, Lai et al. 2013), todas células do tecido linfóide da mucosa do intestino participam da etiogênese da doença e, portanto, não se pode excluir os efeitos de linfócitos (na maioria já ativados) e de outros tipos celulares na doença (Shintani, Nakajima et al. 1998) (Hall, Faivre et al. 2011).

Sabe-se que os neutrófilos migram rapidamente para os tecidos inflamados e constituem as primeiras células a chegarem ao sítio inflamado desempenhando papel significativo na amplificação da inflamação e na destruição tecidual (Figura 6). Essas células estão presentes em grande número na lâmina própria e nas criptas onde formam micro-abscessos na colite ulcerativa pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO catalisa reações de peróxido de hidrogênio com íon cloreto produzindo ácido hipocloroso, que é utilizado para matar microrganismos por células fagocitárias (Aratani 2006, Malle, Marsche et al. 2006). Modelos de colite ulcerativa em camundongos induzidos por DSS e TNBS são caracterizados por grande migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (Wirtz and Neurath 2007). Além dos neutrófilos, os eosinófilos também são recrutados para o local da inflamação. Mais tarde, grande número de macrófagos também chegam ao local da inflamação (Zindl, Lai et al. 2013). Uma das conseqüências dessas respostas de ativação seria a destruição tissular localizada, com perda da barreira epitelial intestinal, resultante da liberação de medidores antimicrobianos, tais como radicais de oxigênio, óxido nítrico (NO), e proteases pelos macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Sepulveda, Beltran et al. 2008).

Todavia, o papel exclusivamente inflamatório e destruidor destes tipos

célulares na DII tem sido questionado. Neutrófilos produtores de IL-22 foram descritos como importantes células responsáveis pela regeneração/cicatrização que ocorre na DII (Zindl, Lai et al. 2013). O mesmo acontece com os macrófagos. Recentemente, alguns perfis de macrófagos têm sido propostos: inflamatórios (M1), outros reguladores (M2) outros resolutivos (Mres) (Ariel and Serhan 2012).

2.5 Macrófagos na colite: paradigma M1/M2

Apesar de serem considerados os mais abundantes fagócitos mononucleados do intestino e representarem cerca de 15% de todos os leucócitos no cólon, pouco ainda é conhecido sobre a imunobiologia dos macrófagos intestinais. Os impasses existentes no estudo desses macrófagos se devem a dificuldades de isolamento e classificação destes. Acredita-se que, por muitos anos, muitos trabalhos classificaram de forma equivocada os macrófagos intestinais, utilizando a expressão de MHC de classe II e CD11c como moléculas determinantes para a classificação (Geissmann, Gordon et al. 2010). Sabe-se, no entanto, que esses marcadores estão expressos por múltiplos tipos celulares, incluindo as células dendríticas, e não podem ser utilizados para distinguir subtipos de células mielóides (Bain and Mowat 2011) .

Neste cenário, muitos trabalhos ao longo dos anos, tentaram classificar essas células pelas características funcionais e de ativação dos macrófagos. Foi neste contexto que Stein e colaboradores (1992) demonstraram dois distintos estados de polarização de macrófagos: os classicamente ativados (M1) e os alternativamente ativados (M2). A estimulação *in vitro* com lipopolissáride (LPS) e interferon-gama (IFN- γ) polarizaria macrófagos para o perfil M1 enquanto que a estimulação com IL-4 levaria ao perfil M2 (Stein, Keshav et al. 1992, Mills, Kincaid et al. 2000, Mowat 2003, Gordon and Taylor 2005). Mais tarde, Mills autor da nomeação M1/M2 propôs ainda que os macrófagos M1 teriam um papel inflamatório e os M2 um papel resolutivo, baseado principalmente nas diferenças de expressão de arginase entre esses macrófagos (Mills 2012). A partir daí,

surgiram novas propostas de marcadores capazes de gerar subclassificações aos macrófagos M2. Macrófagos M2a, M2b e M2c foram descritos como células geradas por estímulos distintos e expressando diferentes marcadores (Figura 5). Nesse momento, surgiram também na literatura os primeiros relatos sobre os macrófagos associados a tumores (TAMs) foram citados na literatura (Stout and Suttles 2004, Edwards, Zhang et al. 2006, Biswas and Mantovani 2010).

Recentemente, alguns dos principais biólogos de macrófagos, decidiram, frente à confusa e incoerente literatura, rever e unificar conceitos e terminologias acerca da classificação dos macrófagos, excluindo termos frequentemente mal empregados (ex: macrófagos reguladores) além de propor experimentos padronizados (Murray, Allen et al. 2014)

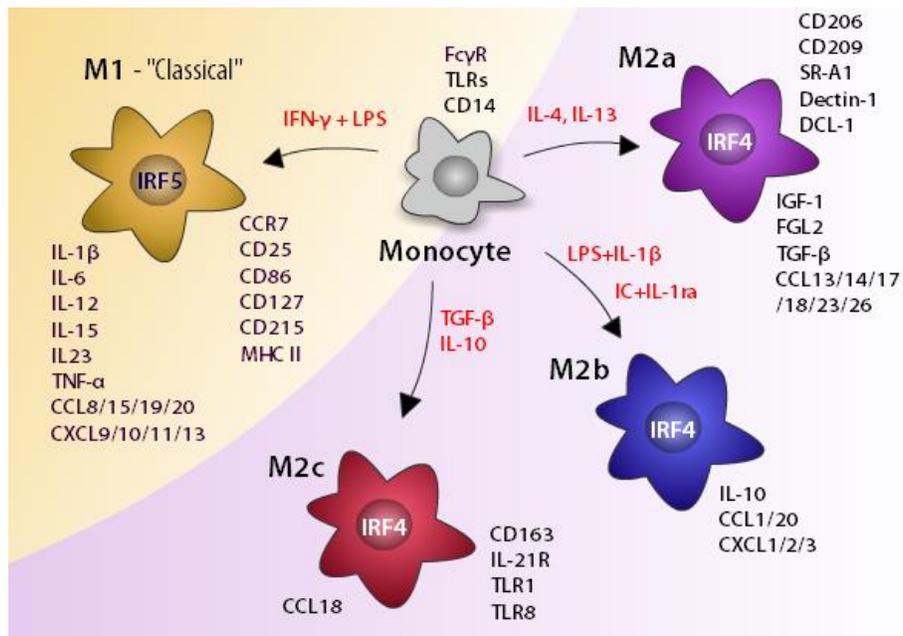


Figura 5: Ativação e polarização de macrófagos. Biolegend (2011).

No entanto, a associação entre essa classificação em subtipos de macrófagos de mucosa ainda não é clara. Segundo Bain e Mowat, não se sabe até que ponto seria possível validar tal classificação proposta nos últimos anos à imunobiologia dos macrófagos intestinais (Bain and Mowat 2011). No microambiente intestinal, esses autores propõem a classificação de 1)

macrófagos residentes; 2) macrófagos recrutados: podendo ser inflamatórios (perfil M1) ou resolutivos (perfil M2).

Os macrófagos residentes são essenciais à manutenção da homeostase intestinal. Produzem altas quantidades da citocina IL-10 e são considerados não responsivos a TLRs. Esses macrófagos expressam ainda altos níveis de CX3CR1, uma quimiocina transmembrana expressa pelo epitélio que permite que o macrófago residente projete dendritos e faça a captação de antígenos na base do epitélio, de forma similar às células dendríticas. Além disso, os macrófagos residentes exercem a importante função de favorecer a diferenciação e a manutenção de células Tregs na mucosa intestinal e produzir prostaglandina 2 (PGE₂), que estimula o epitélio a se renovar, mantendo a integridade da barreira intestinal. Os macrófagos residentes são CD103⁻ CD68⁺ CD64⁺ F4/80⁺ CD11b⁺ CD115⁺ CX3CR1⁺. No entanto, no contexto inflamatório ainda não está claro se há populações residentes diferentes de macrófagos no cólon ou se durante a inflamação essa população está modificada (Bain and Mowat 2011).

Mowat, ao estudar o intestino saudável versus intestino inflamado (na colite experimental), observou duas distintas populações de macrófagos: 1) macrófagos residentes F4/80⁺ TLR2⁻ CCR2⁻ CX3CR1^{hi} não produtores de TNF- α em resposta a estimulação; 2) macrófagos inflamatórios TLR2⁺ CCR2⁺ CX3CR1^{int} Ly6C^{hi} Gr-1⁺, produtores de TNF- α e iNOS. É importante ressaltar que esses macrófagos classificados como inflamatórios também estão presente no cólon não doente, no entanto, em menor número. Segundo esse autor, durante a colite, o recrutamento da população pro-inflamatória é dependente de CCR2. Camundongos deficientes em CCR2 demonstram susceptibilidade reduzida ao desenvolvimento da colite e menor recrutamento de macrófagos TLR2⁺ CCR2⁺ Gr-1⁺ produtores de TNF- α . Sendo assim, o balanço entre macrófagos residentes e pro-inflamatórios no cólon seria controlado pelo mecanismo de recrutamento dependente de CCR2 (Platt, Bain et al. 2010).

Além disso, a expressão colônica de TLRs é altamente dependente da inflamação, com o aumento drástico na expressão de TLR2 em macrófagos na

colite. Macrófagos TLR2⁺ F4/80 proliferam em maior quantidade do que TLR2⁻. Neste trabalho, os autores observaram que no dia 5-6 da colite por DSS, 96% dos macrófagos F4/80⁺ expressavam TLR2, MHC II e moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, enquanto as TLR2⁻ expressariam pouco ou nenhum MHC II, nenhum CD40 ou CD86 e pouco CD80, (Platt, Bain et al. 2010).

Para o grupo de Mowat, há diferença clara entre macrófagos residentes dos macrófagos inflamatórios que migram para o intestino contendo CCR2, e com menor expressão de CXCR1. No entanto, esse autor não descarta a possibilidade da migração de macrófagos M2, que teriam papel preferencialmente resolutivo, com alta capacidade fagocítica, e que se diferenciariam dos macrófagos residentes principalmente devido à expressão de arginase (Bain and Mowat 2011).

Alguns trabalhos recentes demonstram ainda uma origem intrigante para os macrófagos intestinais. Rivollier e colaboradores (2012), demonstraram que macrófagos residentes são repostos por monócitos que expressam Ly-6C^{hi} dependente de CCR2, ou seja, os mesmos descritos para caracterizar macrófagos recrutados, sejam eles, inflamatórios ou não (Rivollier, He et al. 2012)

Em resumo, o que foi proposto pelo grupo de Mowat é que monócitos Ly-6C^{high} CCR2⁺ (originalmente inflamatórios) podem gerar qualquer subtipo de macrófago intestinal, seja no ambiente inflamado ou não. A diferença é que o macrófago residente vai perdendo a expressão de Ly-6C, IL-6, iNOS e a sensibilidade a TLR, e progressivamente adquire F4/80, CD64, CD11c, CX3CR1, CD163 e CD206 (Rivollier, He et al. 2012, Bain, Scott et al. 2013).

Embora os estudos sobre a imunobiologia dos macrófagos intestinais tenha evoluído de forma considerável, com o reconhecimento de sua diferencial biologia e particularidades, ainda persistem perguntas importantes a serem respondidas sobre o fenótipo bem como os possíveis marcadores que possam auxiliar na distinção das populações de macrófagos no intestino.

2.6 Adenocarcinoma de Cólon

O câncer de cólon é a complicação mais grave associada com as Doenças Inflamatórias Intestinais e a epidemiologia de ambas as doenças (CU e DCh) têm sido consideravelmente debatida nos últimos anos, assim como a associação direta entre essas duas condições patológicas (Munkholm 2003).

Embora alguns estudos demonstrem significativa redução da associação entre pacientes que têm DII e o desenvolvimento do CRC (Jess, Simonsen et al. 2012), o grau inflamatório crônico ainda é considerado condição patológica importante associada ao desenvolvimento do CRC (Nieminen, Jussila et al. 2014).

O risco aumentado para desenvolvimento do CRC ocorre tanto para a colite ulcerativa quanto para doença de Crohn. Na CU esse risco é 2,4 maior e na DCh 1,9 vezes maior (Jess, Gamborg et al. 2005, Canavan, Abrams et al. 2006). Além disso, o sexo masculino e a idade aumentam o risco do desenvolvimento do CRC (Jess, Rungoe et al. 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de CRC para 2014 no Brasil foi de 32.600 novos casos e 14.016 mortes, com um acometimento ligeiramente maior controversalmente em mulheres.

2.6.1 Patogênese de adenomas e adenocarcinomas

A associação entre o microambiente observado nas DIIs e o desenvolvimento do CRC têm levantado questionamentos sobre o papel da inflamação e de mediadores inflamatórios na formação, progressão, proteção ou combate a diferentes tipos de tumor.

Acredita-se que a patogênese do tumor de cólon associado a DII ocorra e se desenvolva a partir de lesões displásicas observadas nas lesões na mucosa, que se comportariam como lesões pre-cancerígenas (Itzkowitz and Harpaz 2004). Essas lesões hiperplásicas¹ e displásias² podem gerar pólipos, lesões

¹ Hiperplasia: qualquer multiplicação anormal celular, células hiperplásicas não são malignas.

benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso e que caracterizam adenomas assintomáticos, que ocorrem na estrutura glandular do tecido (Itzkowitz and Harpaz 2004).

Os adenomas são tumores de tecido epitelial exclusivamente benigno que surgem no epitélio da mucosa e estão restritos a esse compartimento. Devem ser cirurgicamente removidos quando percebidos no exame de colonoscopia para exclusão da possibilidade de progressão a adenocarcinoma (Mastalier, Tihon et al. 2012). Os adenocarcinomas são formados através de transformações preferencialmente neoplásicas³ e caracterizam normalmente o perfil de um tumor maligno (Tanaka 2009).

A principal diferença de um tumor maligno para um tumor de caráter benigno é a característica de crescimento, delimitação e invasão. As neoplasias benignas crescem por expansão, permanecendo no local de origem, sem infiltrar ou invadir tecidos vizinhos ou provocar metástases para outros locais. Sendo assim, as neoplasias benignas são geralmente limitadas. Já nas neoplasias malignas há invasão provocando destruição dos tecidos adjacentes. No caso do adenocarcinoma de cólon, esse pode atingir, por exemplo, a camada muscular. Além disso, os tumores malignos se caracterizam pela possibilidade do desenvolvimento de metástases⁴ regionais e à distância (Itzkowitz and Harpaz 2004).

Quadro 1: Diferenças entre tumores benignos e malignos

Características	Benignos	Malignos
ritmo de crescimento	normalmente lento	normalmente rápido
invasão	não invadem	invadem
mitoses	raras e normais	frequentes e atípicas
metástase	ausente	presente

² Displasia: desordem de crescimento e maturação celular (pré-câncer), as características das células estão alteradas.

³ Neoplasia: crescimento de um tipo celular novo de forma incontrolada. Formam tumores que podem ser benignos (adenomas) ou malignos. (adenocarcinomas).

⁴ Metástase é a presença de células ou massas tumorais em tecidos que não apresentam continuidade com o tumor primário. É a principal característica das neoplasias malignas.

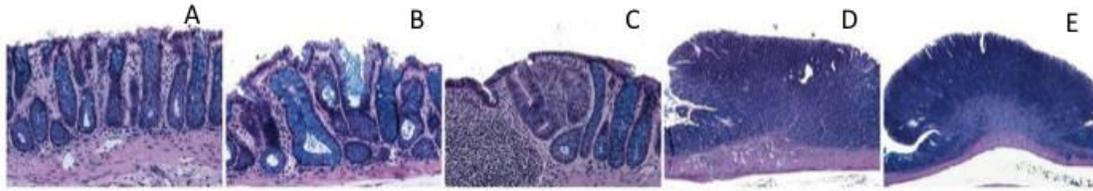


Figura 6: Alterações histopatológicas no câncer. A-) Estrutura normal de mucosa colônica B-) Criptas hiperplásicas C-) Criptas Displásicas D-) Adenomas E-) Adenocarcinomas. Adaptado de (Perse and Cerar 2011).

2.6.2 Imunidade e Câncer

O câncer é caracterizado pela perda da regulação no processo natural celular devido à incapacidade de células do sistema imune em realizar o reconhecimento e a eliminação de células cancerosas.

O processo de instalação da resposta imune ao tumor inicia-se pela captura de neoantígenos (criados e liberados na oncogênese) pelas células dendríticas. Esse complexo peptídeo-MHC câncer-específico é, então, apresentado às células T que são ativadas e preferencialmente se tornam efectoras. Nesse momento, a resposta anti-câncer efetiva é dependente de sinais imunogênicos tais como citocinas inflamatórias e outros fatores liberados por células cancerosas em morte. As células T efectoras então migram e infiltram o tumor, reconhecem as células cancerosas e, posteriormente, as eliminam (Figura 7) (Chen and Mellman 2013).

Em pacientes com câncer, esse ciclo de imunidade contra células cancerosas não acontece de forma apropriada. Vários eventos podem estar associadas a essa falha: antígenos tumorais podem não ser detectados, as células dendríticas e células T podem tratar esse antígeno como próprio criando células T reguladoras em detrimento das T efectoras, células T podem não migrar para tumor ou ainda o microambiente pode suprimir células efectoras que foram produzidas. Além disso, a morte de células cancerosas requer alguns antígenos adicionais, sem esses não é possível eliminar ou controlar o crescimento de

células cancerosas. Em destaque, falamos sobre o papel do fator de crescimento tumoral TGF- β nesse processo de evasão tumoral (Figura 7 passo 7).

Observa-se na figura 7, vários fatores inflamatórios são importantes no combate ao câncer e participam efetivamente das etapas do ciclo da imunidade contra células tumorais, garantindo que todas as etapas de reconhecimento e geração de resposta anti-câncer ocorram. Sendo assim, o microambiente inflamatório é de fundamental importância para o controle tumoral. Além das células tumorais e do estroma que as compõem, observa-se a participação de vários tipos celulares imunes. Em contrapartida, células Tregs e macrófagos com perfil anti-inflamatório caracterizam o perfil pro-tumoral (Grivennikov, Greten et al. 2010). Quando o câncer se instala, é possível observar altas frequências de linfócitos e macrófagos com perfil regulador infiltrados no tumor (Chanmee, Ontong et al. 2014) (Nishikawa and Sakaguchi 2014).

Macrófagos associado a tumores (TAMs) promovem o crescimento do tumor, a angiogênese, promovendo invasão e metástase. Possuem um perfil M2c e são frequentemente encontrados em vários tipos de tumores (Chanmee, Ontong et al. 2014). Além dos macrófagos, as células T reguladoras (Treg) também exercem importante papel pro-tumoral e são fundamentais no desenvolvimento do câncer. As células Treg suprimem a citotoxicidade de células T, de células dendríticas (DC) e de células *natural killer* (NK) garantindo a evasão do tumor (Ghiringhelli, Menard et al. 2005).

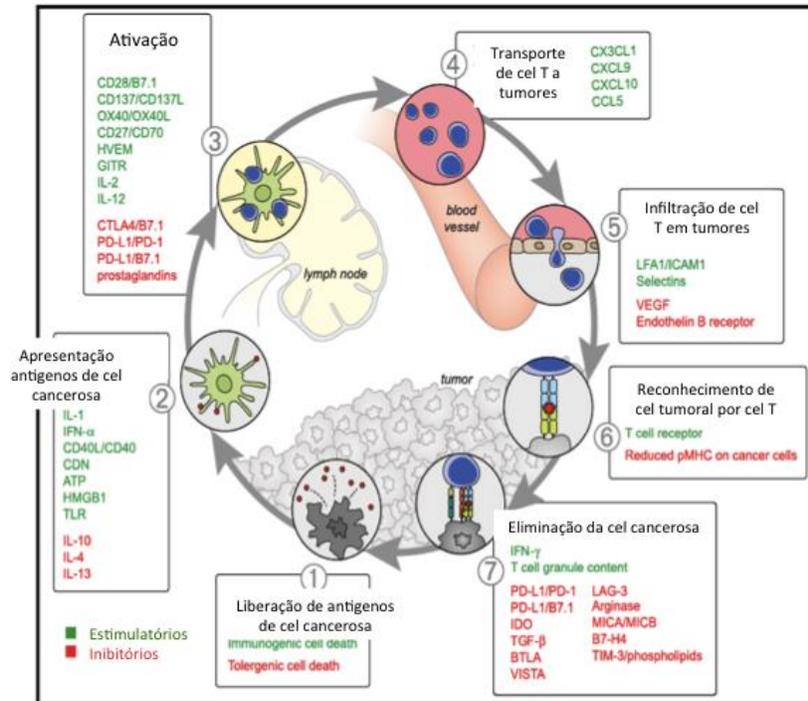


Figura 7: Imunidade e câncer. O ciclo de imunidade contra o câncer está dividido em 7 passos, iniciando com a liberação de antígenos de células mortas e terminando com a morte. Cada passo pode ser caracterizado por diferentes fatores de estimulação (em verde) e inibitórios (em vermelho) representando uma importante via de *feedback* regulatória (Chen and Mellman 2013).

2.6.3 Células T reguladoras e o Câncer

O linfócito T com propriedades reguladoras (Treg) é um subtipo de linfócito T fundamental no controle da autoimunidade e da inflamação. As células Tregs atuam na supressão de células do sistema imune através de interações direta célula-a-célula e pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, TGF- β ou IL-35 (Nishikawa and Sakaguchi 2014).

As células Treg expressam várias proteínas de superfície celular como CD25, CTLA-4 e fatores de transcrição intranucleares como Foxp3. Foxp3 interage com o fator de ativação de células T (NFAT) regulando a expressão de genes como a IL-2 e o CD25 (Fontenot, Rasmussen et al. 2005, Sakaguchi, Ono et al. 2006).

CD25 é um receptor de alta afinidade da citocina IL-2. Segundo Stockinger, quando o linfócito regulador capta a IL-2 por meio do seu receptor CD25 ele garante que esta citocina com importante efeito proliferativo, não esteja disponível para o linfócito efetor, garantindo uma de suas funções supressoras da resposta inflamatória (Barthlott, Moncrieffe et al. 2005).

Células T reguladoras (Treg) são encontradas em alta frequência em tecidos tumorais e em vários tipos de câncer como mama, pulmão, fígado, pâncreas e cânceres gastrointestinais (Nishikawa and Sakaguchi 2014).

A utilização de anticorpos inibidores de moléculas correlacionadas com a função das células Treg tem sido testada em humanos. No entanto, a contribuição das Tregs, tem sido associada tanto à proteção quanto à instalação de diferentes tipos de câncer (Nishikawa and Sakaguchi 2014). Segundo Nishikawa e Sakaguchi esses dados contraditórios podem ser explicados pelas possíveis falhas no delineamento de populações de células com fenótipos de Tregs com funções supressivas e não supressivas (Nishikawa and Sakaguchi 2014). Miyara e colaboradores (2009) demonstraram uma população F_{oxp3}⁺ produtora de citocinas pro-inflamatórias com função anti-tumoral (Miyara, Yoshioka et al. 2009). Além disso, Scurr e colaboradores (2014) demonstraram recentemente que as células F_{oxp3}⁺ não seriam essencialmente as células mais importantes no controle do CRC. Esses pesquisadores constataram a presença de uma população expressando TGF- β de membrana na forma latente (LAP) e CD25 produtora de IL-10 e TGF- β com uma competência anti-tumoral 50 vezes maior que as células T CD25⁺ F_{oxp3}⁺ no câncer de cólon (Scurr, Ladell et al. 2014).

2.6.4 O fator de crescimento tumoral: TGF- β

O fator de crescimento tumoral ou *transforming grow factor* TGF- β foi inicialmente descrito e assim nomeado pela sua atividade sobre o crescimento celular. Os ligantes de TGF- β são receptores transmembrana que sinalizam para desencadear um processo de fosforilação e transdução de sinais culminando em

regulação gênica de proteínas envolvidas com o ciclo celular e a apoptose essenciais à supressão de tumores (Biswas, Guix et al. 2007).

Perda ou acentuação da sinalização do TGF- β pode atenuar ou promover os processos tumorais por diferentes vias. O TGF- β pode, por exemplo, direcionar transformações sobre o ciclo celular em células epiteliais garantindo o crescimento do tumor ou proteger as células mutadas dos processos de apoptose (Huang, Hutter et al. 2000, Bierie and Moses 2006). Acredita-se que os processos que envolvam a participação do TGF- β na piora do câncer ocorram através de efeitos diretos (célula-dependente) da citocina sobre o desenvolvimento e progressão do câncer, enquanto que os efeitos positivos seriam justificados por ações do TGF- β sobre o microambiente, exercendo por exemplo, um papel pro-inflamatório como no caso da diferenciação de células Th17 (Ikushima and Miyazono 2010).

Tsushima e colaboradores (1996) analisaram os níveis TGF- β 1 plasmáticos, a expressão de RNA mensageiro e a distribuição do TGF- β 1 em tecidos de 22 pacientes com CRC. Os níveis plasmáticos de TGF- β 1 em pacientes com CRC foram de 14.8 ± 8.4 ng/mL enquanto que pacientes saudáveis tinham concentrações médias de 1.9 ± 1.4 ng/mL ($P < 0.001$). Além do aumento significativo nos níveis plasmáticos da citocina TGF- β 1, foi relatado nesse trabalho, a expressão de RNA mensageiro 2,5 vezes maior em pacientes com CRC (Tsushima, Kawata et al. 1996).

Assim, é possível constatar que as mutações no gene do TGF- β estão fortemente associadas com a redução do carcinoma de cólon (Akiyama, Iwanaga et al. 1996, Samowitz and Slattery 1997, Shin, Park et al. 2000).

2.7 Modelos experimentais de adenocarcinoma de cólon

Os modelos murinos disponíveis para o estudo do adenocarcinoma de cólon são de dois tipos: 1) induzidos, quando utilizam compostos inflamatórios e carcinogênicos, tais como DSS, o Metilazoximetano (MAM), o Azoximetano dimetilhidrazina (AOM) e a dimetilhidrazina (DMH) ou espontaneamente; 2)

espontâneos, como em camundongos deficientes para IL-10 e *Apc^{Min/+}*. A utilização concomitante de dois agentes carcinogênicos como o DSS e o AOM diminui consideravelmente o tempo experimental e o uso de animais, além de otimizar a caracterização do tumor e garantir a ocorrência de mutações genéticas que não ocorrem quando esses são administrados separadamente (Bissahoyo, Pearsall et al. 2005).

2.7.1 Azoximetano Dimetilhidrazina (AOM)

O Azoximetano (AOM) é um óxido de azometano amplamente utilizado para a indução de tumor de cólon em murinos. O modelo experimental de adenocarcinoma induzido por AOM reproduz as fases de iniciação e progressão do tumor que ocorrem em seres humanos (Bissahoyo, Pearsall et al. 2005).

Para que o AOM se encontre na sua forma reativa e atue na alteração do DNA, vários passos de ativação metabólica são necessários, quando, por fim, se obtém o MAM. O MAM é gerado no fígado e chega ao intestino através da circulação sanguínea. No intestino, há formação de compostos em formato eletrofílico cancerígeno pela ação de enzimas do tecido do cólon ou pela ação de bactérias do cólon. As bactérias são capazes também de desativar a ação cancerígena desse composto proporcionando proteção contra a indução de tumor (Tanaka *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, a utilização do AOM isoladamente é capaz de gerar adenocarcinomas, todavia, a combinação de AOM com o DSS reduz drasticamente o tempo de latência observado no modelo clássico de injeções intraperitoneais repetidas de AOM (Rosenberg, 2008). A administração conjunta de AOM com DSS (na água potável de beber) provoca rápido crescimento de tumores do cólon em cerca de 10 semanas, enquanto que, nos demais modelos, o tempo de latência é de aproximadamente 30 semanas (Rosenberg *et al.*, 2008). O DSS isolado também é capaz de gerar adenocarcinomas, mas somente após nove ciclos intervalados e repetidos de administração, o que cria inviabiliza seu uso (Okayasu, Yamada et al. 2002).

Além disso, a multiplicidade e a incidência de tumores é baixa quando os agentes são oferecidos de forma separada.

Uma dose única do agente cancerígeno AOM, seguido pela exposição DSS por apenas uma semana é eficaz na indução de tumores do cólon, o que sugere a participação efetiva da inflamação observada nas DIIs no desenvolvimento do câncer (Tanaka, Kohno et al. 2003).

O modelo para indução do CRC utilizado neste trabalho consiste na administração de uma injeção intraperitoneal 10mg/Kg de AOM, seguido de três ciclos intervalados de DSS a 1,5% conforme protocolo (Wirtz, Neufert et al. 2007)

2.8 Proposta terapêutica: Ácido Linoléico Conjugado

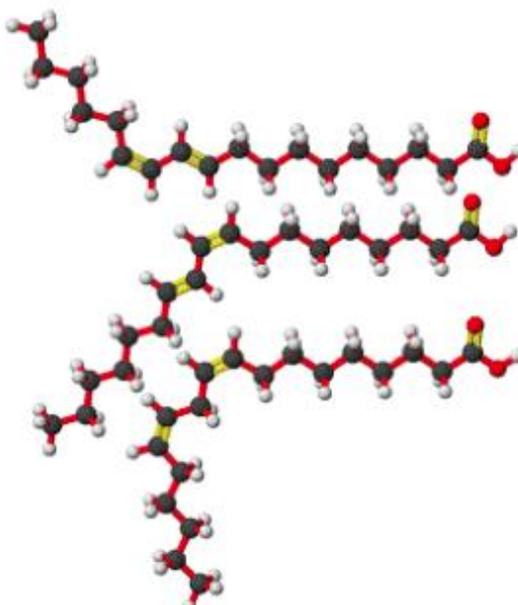
O CLA é o nome genérico utilizado para todas as isomerias posicionais e geométricas do ácido linoléico. O ácido linoléico, ou o *cis*-9 e *cis*-12 ácido octadecadienóico, é um ácido graxo de 18 carbonos contendo duas duplas ligações nas posições 9 e 12 (Figura 8). O ácido linoléico pode ser convertido a CLA quando reações microbiológicas ou reações químicas deslocam a dupla ligação para formar alternadas ligações duplas e simples, por isso, então, denominados conjugados. As duplas ligações do CLA podem estar nas posições 7,9-, 8,10-, 9,11-, 10,12- e 11,13 e geométricos (*cis* ou *trans*) (Rainer and Heiss 2004). Os dois isômeros, *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12 são conhecidos como os responsáveis pelas ações biológicas do CLA (Pariza, Park et al. 2001). Há cinquenta e seis possíveis isômeros geométricos e de posição do CLA (Sehat, Yurawecz et al. 1998).

O CLA é produzido principalmente no rúmem de animais que realizam esta função pela fermentação da bactéria *Butyrovivrio fibrisolvens* que isomeriza o ácido linoléico em CLA. A outra forma de produção seria endogenamente pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans*-11, o ácido vacênico (VA), por uma enzima presente na glândula mamária e no tecido adiposo chamada esteroil-CoA desaturase ou delta-9-desaturase (Palmquist, Lock et al. 2005). Os humanos conseguem converter pequena porção de VA (dieta rica em óleo) em CLA. Turpeinen e colaboradores (2002) constataram uma conversão em até 19% de VA em RA em humanos (Turpeinen, Mutanen et al. 2002).

A forma sintética do CLA é composta por isômeros diferentes daqueles encontrados naturalmente nos alimentos. O método tradicional usado para a síntese baseia-se na reação alcalina na qual o ácido linoléico é o substrato. Como resultado, obtém-se uma mistura com 42% de *cis*-9, *trans*-11-CLA, 43% de *trans*-10, *cis*-12-CLA e 15% de outros isômeros, além do ácido linoléico, do ácido oléico e outros ácidos graxos não identificados (Sehat, Yurawecz et al. 1998)

trans-10, *cis*-12-CLA

cis-9, *trans*-11-CLA



Ácido Linoléico (*cis*- 9, *cis*- 12)

Figura 8: Estrutura do isômero biológico ativo do Ácido Linoléico Conjugado (CLA). O ácido Linoléico, ácido graxo de 18 carbonos contendo duas duplas ligações nas posições 9 e 12. Principais formas geométricas *trans*-10, *cis*-12-CLA e *cis*-9, *trans*-11-CLA. Adaptado de (Pariza, Park et al. 2001).

A primeira ação benéfica do CLA foi observada no final dos anos 80 pelo grupo de pesquisas de Pariza, na Universidade de Wisconsin-Madison, que investigou as propriedades anticarcinogênicas desse composto. Desde então, várias ações benéficas vêm sendo atribuídas ao CLA. Segundo Pariza e colaboradores (2001), os benefícios atribuídos ao CLA são dependentes da proporção e do tipo do isômero utilizado (Pariza, Park et al. 2001). No que tange à inibição de síntese de gordura e deposição de triacilglicerol, por exemplo, o isômero *trans*-10- *cis*-12 seria o responsável por esses efeitos (Huebner, Olson et al. 2014). O mesmo acontece com estudos para avaliação do CLA e imunomodulação. Yamasaki e colaboradores (2003) observaram que a administração, isolada e conjunta dos isômeros de CLA é capaz de promover respostas diversas nos níveis de citocinas e imunoglobulinas (Yamasaki, Chujo et al. 2003). O isômero *cis*-9 *trans*-12 teria efeitos mais expressivos sobre o sistema imune e a inflamação (Pariza, Park et al. 2001).

Ácidos graxos com duplas ligações conjugadas ocorrem em vários óleos

vegetais, mas o CLA não é encontrado em muitos dos óleos vegetais comumente utilizados nos alimentos usuais (Wahle, Heys et al. 2004). Carne e leite bovino são os dois produtos naturais com a melhor concentração de CLA com 4-6mg de CLA por grama de gordura (Wahle, Heys et al. 2004).

Mesmo que o consumo de CLA pareça ser adequado à saúde humana, no contexto de certas doenças ou desordem metabólica, o consumo usual parece ser insuficiente, principalmente devido ao consumo diário pelos humanos ser inferior aquele ingerido pelos animais em estudos com resultados positivos sobre a saúde (Turpeinen et al., 2002). Ritzenthaler e colaboradores (2001) estimaram, através de registro de frequência alimentar, que a ingestão diária de CLA seja de aproximadamente 200 mg/dia. Esses valores variam significativamente de acordo com a dieta e país (Ritzenthaler, McGuire et al. 2001).

Segundo Wahle e colaboradores (2004), a única forma de garantir que o consumo de CLA seja adequado, correspondendo ao nível ideal (3-6g/d), seria pelo aumento dos níveis de CLA no leite e conseqüentemente em laticíneos, pela suplementação da dieta de vacas e outros ruminantes, pela adoção de um programa de seleção genética, pela ingestão de óleos ou cápsulas ricas em CLA, ou pelo uso de alimentos fortificados com CLA. A abordagem desse autor mostra ainda que, sendo o CLA um componente natural, esse poderia ser utilizado em dosagens farmacêuticas enquadrando-se na classificação de alimentos funcionais/nutracêuticos (Wahle, Heys et al. 2004).

Desta forma, muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de otimizar a oferta desse composto nos alimentos, seja por desenvolvimento de tecnologias visando a maior produção do CLA pelo animal ou pelo enriquecendo de alimentos utilizando o composto isolado ou bactérias capazes de produzir CLA (Lopes 2013, Stefanson, Hopkins et al. 2014, Villar-Tajadura, Rodriguez-Alcala et al. 2014).

Os numerosos efeitos benéficos do CLA baseados em vários estudos experimentais são sugestivos do conceito de panacéia. Além disso, alguns

trabalhos têm tentando demonstrar alguns possíveis efeitos deletérios do CLA delineando a segurança de uso (Park, 2009).

Segundo Park, a principal preocupação acerca da suplementação do CLA seriam os efeitos relativos a lipodistrofia, esteatose hepática e intolerância à glicose. Esses efeitos seriam consequência do processo oxidativo do CLA e dos seus respectivos produtos e estariam vinculados principalmente ao isômero *trans*-10, *cis*-12 (Park, 2009).

Para avaliar esses efeitos deletérios do CLA, mais de 10 estudos foram analisados por Park incluindo testes de marcadores de função hepática, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, e um estudo ecográfico. Apenas um deles apresentou mudanças significativas nesses marcadores (Park 2009).

Também existem importantes contradições a respeito do efeito do CLA na homeostase glicêmica e insulínica em humanos. O CLA produziria aumento da resistência insulínica em animais normais, mas melhoraria a resistência insulínica em obesos, sugerindo um efeito temporal (Riserus, Basu et al. 2002, Halade, Rahman et al. 2010)

Segundo Park, 24 dos 31 estudos relacionando CLA e glicemia não demonstraram qualquer alteração dos níveis plasmáticos de glicose ou concentração de insulina. Esse autor afirma que não existem evidências para indicar que o consumo de CLA na concentração de 3-6g/dia produza efeitos adversos a saúde humana (Park, 2009).

Gaullier e colaboradores (2005) conduziram um estudo com 157 participantes consumindo 3,4g/dia de CLA na forma de triglicérido por 24 meses e constataram boa tolerância do consumo de CLA em adultos com sobrepeso. Nesse estudo, foi possível observar redução do colesterol plasmático e LDL colesterol sem modificações no perfil do HDL e triglicérides. Constatou-se, ainda, aumento da aspartato amino transferase, mas não da alanina amino transferase. Nenhum efeito adverso sobre a glicemia foi observado (Gaullier, Halse et al. 2005).

Um grupo de pesquisa da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais desenvolveu ensaio clínico com mulheres com

sobrepeso que consumiram CLA (4g/dia) durante quatro meses no qual se constatou a segurança do uso do CLA nesse período de consumo. Nesse trabalho, o perfil glicêmico, lipídico, bem como a função hepática, foi analisado mensalmente e nenhuma alteração ao longo do período pode ser observada nas 28 voluntárias participantes da pesquisa (Lopes, Silva et al. 2013).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) publicou, em 2010, um documento denominado de “opinião científica” sobre o CLA indicando-o como novo ingrediente alimentar e atestando que o consumo, na concentração de 3,75g/dia por até seis meses, é seguro.

Apesar da comercialização do CLA encontrar-se proibida no Brasil, esse composto é facilmente encontrado em lojas de suplementos alimentares para praticantes de atividade física e em sites da *internet* com a principal função de emagrecimento. Ainda não há no Brasil alimentos enriquecidos com CLA.

Segundo a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), para que as preparações comerciais contendo CLA possam ser comercializadas no Brasil como alimento, é necessário que as empresas apresentem documentação científica comprovando a segurança de uso e eficácia das alegações dos produtos já que essas substâncias serão utilizadas em níveis superiores aos atualmente observados na alimentação da população brasileira. Assim, os produtos contendo CLA podem ser avaliados na categoria de novos alimentos (Resolução nº. 16/1999) ou na categoria de alimentos com alegações de propriedade funcional (Resolução nº. 18/1999 e Resolução nº. 19/1999) e possuem obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2007).

2.9 CLA na função imune e o fator de transcrição PPAR- γ

A influência do consumo de ácidos graxos na função imune foi primeiramente estudada por Meade e Mertin que analisaram a ação desses ácidos graxos *in vitro* na proliferação de linfócitos (Meade and Mertin 1978). Muitos estudos foram subseqüentemente publicados e sabe-se atualmente que o consumo diário de ácidos graxos modula a resposta imune (Shaikh and Edidin 2006).

Estudos *in vitro* com o uso de células imunes demonstram que a proliferação de linfócitos, a produção de imunoglobulina e de citocinas assim como as frequências de subtipos de células T são afetados pela suplementação de animais com CLA (O'Shea, Bassaganya-Riera et al. 2004).

Pesquisas recentes têm revelado íntima relação entre modulação do sistema imune, principalmente de macrófagos, pelo CLA e a ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma ou *peroxime proliferator activated receptors* (PPARs) (Lee and Vanden Heuvel 2010).

Os PPARs são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam várias funções no organismo como a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e a inflamação (Figura 11) (Ahmadian, Suh et al. 2013).

Esses fatores de transcrição são caracterizados pelo padrão de distribuição nos tecidos. Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas: PPAR α , PPAR β e PPAR- γ . PPAR- α é predominantemente expresso no fígado, rins, intestino e coração. PPAR- β é expresso amplamente em tecidos. PPAR- γ está altamente expresso no tecido adiposo, na glândula adrenal, no colón e em macrófagos. PPAR- γ têm como subtipos PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2. O PPAR- γ 1 é expresso em células do sistema imune tais como linfócitos T e B, monócitos, células dendríticas, células epiteliais e macrófagos. A expressão de PPAR- γ 2 está restrita ao tecido adiposo (Straus and Glass 2007, Marion-Letellier, Butler et al. 2008, Tuna, Avdiushko et al. 2014).

O mecanismo de ativação de PPARs envolve o acoplamento de ligantes

em bolsos hidrofóbicos de sua estrutura ocasionando uma mudança conformacional na estrutura que resulta na dissociação de proteínas com a atividade de co-fator que inibem ou aumentam a transcrição gênica. A ativação de PPAR- γ induz redução na expressão de citocinas pro-inflamatórias por antagonizar a ação do fator de transcrição NF- κ B (nuclear factor – κ B) (Wright, Bortolini et al. 2014). Vários ligantes endógenos e exógenos se ligam aos PPAR, dentre esses estão as drogas sintéticas Tiazolidinedionas (TZDs), como a Rosiglitazona e Pioglitazona, os eicosanóides e os lipídeos poliinsaturados como o CLA (Ahmadian, Suh et al. 2013).

A utilização de drogas TZDs reconhecidas e utilizadas pela ação antidiabetogênica (sensibilização à insulina) tem recebido especial adesão e atenção pelos médicos e seus pacientes. No entanto, sabe-se que o uso desses medicamentos se acompanha de efeitos colaterais graves como a osteoporose, o risco de falhas cardiovasculares, ganho de peso, retenção de fluidos, dentre outros (Figura 9) (Ahmadian, Suh et al. 2013).

Em relação as ações do PPARs sobre as células do sistema imune, muitos trabalhos têm focado na ação desse receptor nuclear sobre as células mielóides apresentadoras de antígenos (APCs) como as células dendríticas (DCs) e os macrófagos (Szanto, Balint et al. 2010). Em células dendríticas, sabe-se que a ativação de PPARs regula o metabolismo lipídico e vários processos relacionados a captação e apresentação de antígenos, maturação, ativação, migração e produção de citocinas. A estimulação de DCs com CLA suprime a ativação de NF- κ B e a produção de IL-12 e induz a produção de IL-10 (Loscher, Draper et al. 2005).

Em macrófagos, a participação do PPAR- γ tem sido amplamente estudada e vários efeitos benéficos dos agonistas de PPARs têm sido atribuídos a esse tipo celular. A ativação de PPAR- γ em macrófagos interfere com o metabolismo lipídico e com a produção de mediadores inflamatórios. Camundongos com reduzida expressão de PPARs são mais susceptíveis à resistência a insulina e a doenças inflamatórias. Além disto, esses camundongos têm capacidade aumentada de polarizar macrófagos para perfil anti-inflamatório

M2 (Szanto, Balint et al. 2010). É sabido que o perfil inflamatório M1 é significativamente inibido por drogas TZDs (Odegaard, Ricardo-Gonzalez et al. 2007).

Muitos trabalhos revelam ainda a capacidade do CLA em modular a produção de mediadores inflamatórios como óxido nítrico e eicosanóides (metabólitos endógenos do ácido araquidônico) (Iwakiri, Sampson et al. 2002, Nakanishi, Koutoku et al. 2003). Culturas de macrófagos estimuladas com *trans*-10, *cis*-12 CLA tiveram redução da produção de TBX(2) e PGE(2) acompanhada de mudanças significativas na expressão da cicloxigenase COX-2 (Stachowska, Dolegowska et al. 2009).

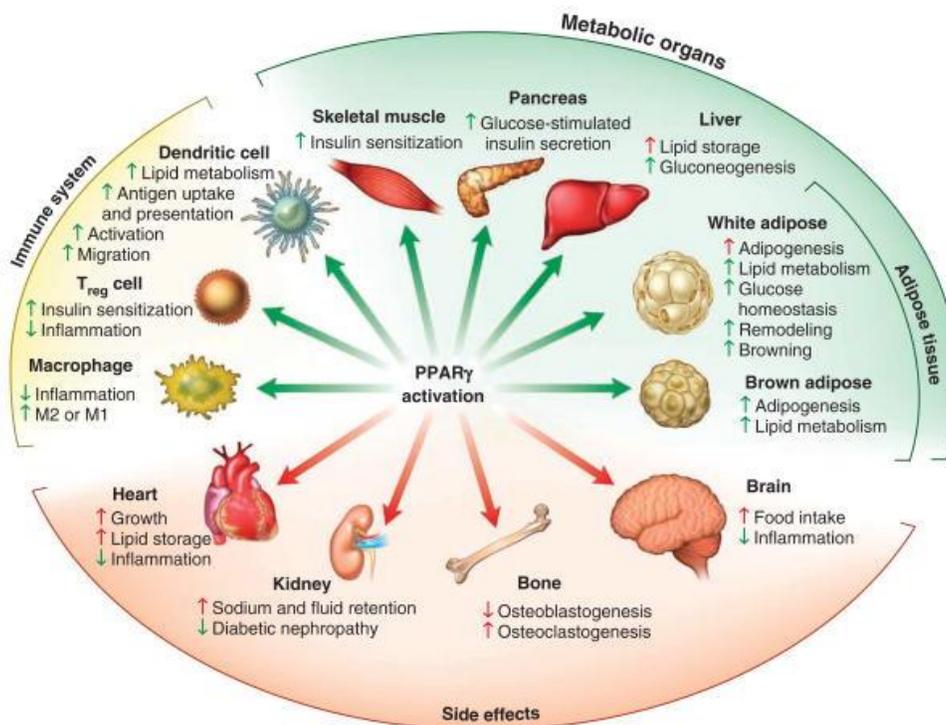


Figura 9: Efeitos no organismo da ativação de PPAR γ . A ativação de PPAR γ resulta em efeitos principais (em verde) e efeitos colaterais (em vermelho) (Ahmadian, Suh et al. 2013).

Em linfócitos, a ativação de PPAR- γ parece potencializar a função de células Tregs influenciando assim os processos inflamatórios. Yasukawa e colaboradores (2010) demonstraram que agonistas de PPAR- α e PPAR- γ na presença de TGF- β convertem células T CD4+CD25- humanas em células Treg

Foxp3+ (Lei, Hasegawa et al. 2010). Hontecillas e colaboradores (2007), utilizando animais deficientes condicionais para PPARs e animais SCID⁵, demonstrou que a expressão de PPAR- γ em células T CD4+ é essencial para a proteção da colite induzida por TNBS (Hontecillas and Bassaganya-Riera 2007).

Vários trabalhos já foram publicados demonstrando que agonistas de PPAR- γ têm potencial terapêutico nas DIIs (Annese, Rogai et al. 2012). Dubuquoy e colaboradores (2003) demonstraram uma redução em 60% de PPAR- γ em pacientes com CU (Dubuquoy, Jansson et al. 2003). Su e colaboradores (1999) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que agonistas de PPAR- γ (TZDs- Rosiglitazona) reduzem dramaticamente a inflamação colônica com diminuição significativa da expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias (Su, Wen et al. 1999). Estudos subsequentes demonstraram a ação dos agonistas de PPAR- γ em outros modelos de colite (quadro 2). Paralelamente à eficiência das drogas sintéticas ativadoras de PPARs na DII, outros trabalhos têm demonstrado que a utilização de ligantes naturais de PPAR- γ como probióticos (VSL#3) e ômega-3 também se mostraram eficientes na prevenção e tratamento das doenças inflamatórias intestinais (Annese, Rogai et al. 2012).

Segundo Annese e colaboradores (2012), as lições retiradas de estudos em animais mostram que ligantes naturais ou sintéticos de PPAR- γ são ambos eficientes no tratamento das formas crônicas e agudas de DII. A ação profilática seria mais eficiente que a terapêutica (Annese, Rogai et al. 2012).

⁵ Deficientes em célula T e B

Quadro 2: Propriedade anti-inflamatória de agonistas de PPAR- γ em modelos experimentais de inflamação intestinal

Modelo	Modulador do PPAR- γ	Efeito	Autores
Colite Aguda			
DSS	Troglitazona	↓ Inflamação colônica ↓ expressão genética de citocinas	Su et al. 1999
	Rosiglitazona	Inflamação reduzida colite menos severa prevenção da colite	Saubermann et al. 2002 Ramakers et al. 2007 Takagi et al. 2002
	Pioglitazona	recuperação da colite níveis reduzidos de CXCL10	Hontecillas et al. 2011 Schaefer et al. 2005
	CLA	atraso do início da doença	Bassaganya-Riera 2006
	CLA + VSL#3 α -Eleostearic acid	melhora da colite melhora da colite	Bassaganya-Riera et al. 2012 Lewis et al. 2011
TNBS	Troglitazona	reduz inflamação	Desreumaux et al. 2001
	Rosiglitazona	reduz inflamação	Sánchez-Hidalgo et al. 2007
	Pioglitazona	níveis reduzidos de CXCL10	Schaefer et al. 2005
	FMOC-L-leu	reduz inflamação	Rocchi et al. 2001
	5-ASA	reduz inflamação	Rousseaux et al. 2005
ácido acético	THSG	melhora de lesões no cólon	Zeng et al. 2011
	Rosiglitazona	proteção	Nakaijima et al. 2001
	15-d-PGJ2	reduz dano	Cuzzocrea et al. 2003
	NS-398	proteção	Sato et al. 2005
	Glutamina	proteção	Sato et al. 2006
Bacteria	CLA	melhora inflamação	Hontecillas et al. 2002
Inflamação crônica			
DSS	Triglitazona	↓ Cell proliferation	Tanaka et al. 2001
TNBS	Rosiglitazona	proteção	Sánchez-Hidalgo et al. 2005
CD4-CD45RBhi	CLA	reduz inflamação	Bassaganya-Riera et al. 2004
IL-10 KO	Rosiglitazona	desacelera colite	Lytle et al. 2005
SAMP1/Yirfc	Rosiglitazona	diminui severidade	Sugawara et al. 2005
modelos genéticos	PPAR γ floxed-DSS	acelera colite	Guri et al. 2010
	PPAR γ -/- genéticos	PPAR γ Δ M ϕ	aumenta susceptibilidade

Adaptado de (Annese, Rogai et al. 2012).

2.10 O uso de CLA nas doenças inflamatórias intestinais

As influências nutricionais constituem importante componente relacionado à DII e têm demonstrado contribuir significativamente para prevenir, atenuar ou acentuar o início da doença, bem como tratar, determinar reincidências e auxiliar ou dificultar os processos de cicatrização (Pariza, Park et al. 2001).

Embora poucos trabalhos tenham sido publicados relacionando o consumo de CLA e as DIIs e apenas um único estudo clínico com 13 humanos tenha sido publicado até o momento, a influência da suplementação com CLA tem se revelado potencial agente terapêutico nas DIIs. O grupo de Bassaganya-Riera e Hontencillas foi o primeiro a relatar a ação benéfica do CLA na DII e tem sido o grupo a publicar mais trabalhos sobre o assunto. Segundo esses autores, o CLA age positivamente na DII melhorando a inflamação do tecido e evitando a perda de peso associada à inflamação. Os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune inflamatória pelo CLA seriam a supressão da produção de eicosanóides e ativação dos PPARs (Bassaganya-Riera et al., 2002).

Devido à similaridade estrutural entre o isômero do CLA e o ácido linoléico, parece que pelo menos alguma das atividades do CLA podem ser mediadas via modificação de sinalização intracelular por eicosanóides e outros intermediários lipídicos, afetando a síntese, e/ou a ação desses intermediários. Um dos mecanismos para tal função seria a competição pela enzima necessária à síntese do ácido araquidônico pelo CLA, influenciando assim a produção (Bassaganya-Riera et al., 2002).

Outro mecanismo citado pelos autores seria a supressão da indução de eicosanóides pela ação direta do CLA nas enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LO), responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em eicosanóides (prostaglandinas e Leucotrienos) através da ativação de PPARs (Bassaganya-Riera et al., 2002).

No intestino, o maior representante dos eicosanóides é o leucotrieno B₄ (LTB₄) e é possível observar aumento expressivo desse eicosanóide em

pacientes com CU e DCh (Stenson 1990). Já a participação da prostaglandina PGE2 na inflamação presente nas DIIs ainda é contraditória. A PGE2 parece estar mais presente em pacientes em que a inflamação seja de menor intensidade, ou pacientes em tratamento (Schmidt, Kosche et al. 1995, Baumeister, Schmidt et al. 1996). Além disto, a participação da PGE2 sobre a inflamação poderia exarcebar ou controlar o processo inflamatórios. Em humanos, as drogas anti-inflamatórias não esteróidais (NSAIDs), inibidoras de COX-2, enzima necessária a metabolização de ácido araquidônico (AA) em eicosanóides têm sido utilizadas com cautela. Esses medicamentos têm demonstrado efeitos controversos (Paiotti, Marchi et al. 2012) e há evidências de que o uso de NSAID piore o quadro inflamatório da DII (Kefalakes, Stylianides et al. 2009).

Portanto, a hipótese pela qual o CLA influenciaria a produção de eicosanóides ainda não explica os efeitos obtidos em modelos *in vivo*, onde se observa prevenção significativa do processo inflamatório.

Nesse cenário, o estudo do PPAR- γ , a influência sobre a biologia de células do sistema imune e os efeitos do CLA nas DIIs tem ganhado especial atenção (Bassaganya-Riera and Hontecillas 2006, Evans, Misyak et al. 2010).

Assim, os oito trabalhos publicados e disponibilizados até o momento (quadro 3) relacionando CLA e DIIs apontam para a ativação de PPAR- γ em diferentes tipos celulares pelo CLA como o principal mecanismo para a ação moduladora (Bassaganya-Riera and Hontecillas 2006, Evans, Misyak et al. 2010).

Bassaganya-Riera e colaboradores (2004) avaliaram a capacidade do CLA em modular a DII pela modulação da expressão gênica do PPAR- γ e da supressão da ativação NF- κ B p65 em um modelo murino de colite induzida por DSS e no modelo utilizando transferência de células CD4+CD45RB^{hi}+. Nesse trabalho, os autores constataram que o CLA contribuía para a manutenção da homeostase intestinal e prevenção da colite experimental. Isto não ocorreu quando animais deficientes em PPAR- γ foram tratados com a dieta contendo CLA (Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004).

Resultados semelhantes foram encontrados utilizando um modelo suíno de colite induzida por bactéria, onde pôde se observar um menor dano tecidual associado à administração de CLA mediada por um aumento da expressão de PPAR- γ (Hontecillas, Wannemeulher et al. 2002). Em um modelo de colite induzida por DSS em suínos, o CLA apresentou a propriedade de atrasar o início da doença (Bassaganya-Riera and Hontecillas 2006). Além disto, Evans e colaboradores (2010) constataram que, além da melhora no perfil histológico da colite, o CLA preveniria a formação de adenoma e adenocarcinoma de forma dependente de PPAR- γ (Evans, Misyak et al. 2010). Trabalho de Bassaganya e colaboradores em 2012, utilizando bactérias que produzem CLA e o CLA isolado, demonstraram o papel deste sobre a redução da inflamação e sobre o adenoma e o adenocarcinoma induzidos experimentalmente (Bassaganya-Riera, Hontecillas et al. 2012, Bassaganya-Riera, Viladomiu et al. 2012, Bassaganya-Riera, Viladomiu et al. 2012).

Um trabalho conduzido em 13 pacientes portadores de doença de Crohn confirmou os efeitos do CLA sobre o processo inflamatório e a redução da atividade da doença (Bassaganya-Riera, Hontecillas et al. 2012).

Os trabalhos publicados que correlacionam o consumo de CLA com as DIIs estão registrados no quadro 3.

Quadro 3: Resumo dos trabalhos publicados que correlacionam o Acido Linoléico Conjugado com as Doenças Inflamatórias Intestinais

Título	Objetivos/métodos	Modelo	Resultados
(Hontecillas, Wannemeulher et al. 2002)			
Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid	Observar melhoras no perfil inflamatório da colite induzida por DSS.	64 Porcos foram desafiados com a bactéria <i>Brachyspira Hyodysenteriae</i>	Suplementação com CLA previniu o dano na mucosa e o retardo do crescimento, mantendo perfil de citocinas (IL-10 e IFN-g) e a distribuição de subtipos de linfócitos (CD4+ e CD8+) similares a porcos não infectados, aumentando a expressão colonica de PPAR- γ . Análise de plasma revelou menos oléico e acido araquidônico
(Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004)			
Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease	Investigar se CLA melhora a colite via mecanismo dependente de PPAR- γ (NF-K β).	Camundongos PPAR- γ -null / expressado Modelo DSS e de transferência CD4+CD45RB ^{high}	CLA induziu PPAR γ e δ , modulando genes envolvidos no metabolismo lipídico e de maturação celular. Cla reprimiu expressão de TNF-alpha e a ativação de NF-K β , induzindo TGF- β 1. CLA melhorou a gravidade da colite e a perda de peso de forma superior ao ômega 3.
(Bassaganya-Riera and Hontecillas 2006)			
CLA & n-3 differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model DII	Avaliar a habilidade do CLA, sozinho ou em combinação com n-3	66 porcos receberam DSS Intragástrico e suplementação por 42d.	O CLA atrasou o início da doença e reproduziu colite menos severa e reduziu o retardo do crescimento que correlacionou com a indução de PPAR- γ e δ e diminuiu a expressão de TNF- α .

O uso concomitante de n-3 e CLA obtiveram efeitos antagônicos.

Quadro3: Resumo dos trabalhos publicados que correlacionam o Acido Linoléico Conjugado com as Doenças Inflamatórias Intestinais

Título	Objetivos/métodos	Modelo	Resultados
(Evans, Misyak et al. 2010)			
Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPARgamma	Determinar o papel do PPAR- γ na inflamação e no desenvolvimento de cancer	PPAR- γ null / expressado Indução colite e câncer coloretal com azoximetano e DSS Suplementação 42d	CLA melhorou a colite (perfil histológico) preveniu adenoma e adenocarcinoma PPAR- γ dependente. Cla reduziu migração de macrófagos para o MLN e aumentou o perfil de células Treg. Reduziu expressão de TNF- α e de Ly6C, indicando uma redução de macrófagos com propriedades inflamatórias no cólon.
Nossos experimentos (Dissertação de mestrado)			
CLA nas DII	Avaliar a capacidade do CLA em modular a DII delineando a segurança de uso	C57BL/6 desafiados com DSS IL-10 -/-	CLA melhorou a colite (perfil histológico) nos modelos por DSS e IL 10 -/-, evitando a perda de peso e a esteatose hepática. Manteve níveis de IgA sérica e S-IgA, IL-4 e IL-10 similares aos basais de animais não infectados. Quando comparado com animais controles acometidos com colite, animais suplementados com CLA tiveram níveis reduzidos de IL-17 e MCP-1 no cólon e IFN- γ no LN mesentérico e cecal. Redução TNF- α no colon (p=0,06). Nenhuma alteração sorológica bioquímica foi percebida com a suplementação

Quadro 3: Resumo dos trabalhos publicados que correlacionam o Acido Linoléico Conjugado com as Doenças Inflamatórias Intestinais

Título	Objetivos/métodos	Modelo	Resultados
(Bassaganya-Riera, Viladomiu et al. 2012)			
Probiotic Bacteria Produce Conjugated Linoleic Acid Locally in the Gut That Targets Macrophage PPAR c to Suppress Colitis	Avaliar os efeitos da bacteria probiotica VSL#3 produtorada de CLA e do CLA na colite e avaliar a diversidade da microbiota	DSS	Observaram melhora da colite com os tratamentos, redução de TNF-a e MCP-1. E expressão de TLR4. O uso da bacteria aumentou a concentração de CLA cis-9, trans-11 no colon mas não no plasma. A deleção de PPAR em macrófagos reverte os efeitos sobre a colite. Ambos os tratamentos diminuíram a diversidade da microbiota das fezes dos camundongos durante a colite
(Bassaganya-Riera, Viladomiu et al. 2012)			
Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria	Avaliar o efeito do CLA e da bacteria VSL#3 na colite associada ao cancer	Aoxozymetano e DSS IL-10 -/- Helicobacter typhlonius	O CLA foi eficiente em prevenir a inflamação no modelo de câncer associado à inflamação, mas não a bacteria probiótica. Por sua vez, no modelo utilizando Il-10 Ko, a VSl#3 foi eficiente em reduzir o processo inflamatório mas não o CLA. Ambos os tratamentos formam eficientes na prevenção do câncer.

Quadro 3: Resumo dos trabalhos publicados que correlacionam o Acido Linoléico Conjugado com as Doenças Inflamatórias Intestinais

Título	Objetivos/métodos	Modelo	Resultados
(Borniquel, Jadert et al. 2012)			
Dietary Conjugated Linoleic Acid Activates PPAR γ and the Intestinal Trefoil Factor in SW480 Cells and Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis	Avaliar o efeito do CLA, agonistas e antagonistas de PPAR in vitro em ceuluas SW480 e in vivo	In vitro SW480 In vivo DSS	Células tratadas com CLA aumentaram a expressao do fator intestinal trefoil (TFF) via PPAR-gamma. <i>In vivo</i> , o CLA preveniu a colite experimental com redução na produção de óxido nítrico (NO) e de NF-kB. Pela tecnica de imunohistoquímica foi possivel perceber aumento colônico de PPAR- γ e TFF3
(Bassaganya-Riera, Hontecillas et al. 2012)			
Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease	Avaliar o efeito do CLA em paciente com DII (doença de Crohn)	13 Pacientes com Dch receberam 6g/dia CLA por 12 semanas	Ao final do experimento, o CLA reduziu a capacidade de células CD4+ e CD8+ em produzir IFN- γ , TNF- α e IL-17. Este resultado foi acompanhado de um aumento na qualidade de vida e redução da atividade da doença

2.11 CLA nos adenocarcinomas

Como demonstrado anteriormente, o CLA foi inicialmente descrito através de sua propriedade anti-carcinogênica por Pariza e colaboradores (Pariza, Park et al. 2001). Desde a descoberta, a propriedade anticarcinogênica do CLA foi testada em diferentes tipos de câncer, principalmente no câncer de mama. As ações benéficas do CLA no câncer depende do tipo de isômero e do tipo de câncer, bem como dos modelos experimentais utilizados para indução do câncer (Mandir and Goodlad 2008).

Além da heterogeneidade dos resultados sobre os diferentes tipos de câncer, variados mecanismos de ação também têm sido propostos. O CLA pode agir pela modulação gênica, no metabolismo de eicosanóides, na regulação no ciclo celular, na proliferação e na apoptose. No caso do câncer de mama, por exemplo, o CLA é capaz de suprimir o câncer em modelos *in vitro* pela modulação de genes supressores de tumores regulados por estrôgenio. A exposição ao estrogênio reduz a apoptose pela regulação de várias proteínas pré apoptóticas como a Bcl-2, e o CLA conseguiria reverter esses efeitos (Wang, Liu et al. 2013). Os efeitos do CLA sobre o câncer mamário abrangem tanto a iniciação quanto a promoção do tumor (Mandir and Goodlad 2008).

Ações sobre o gene p53 e de proteínas envolvidas no ciclo celular também são descritas como mecanismo anti-carcinogênico do CLA (Yasui, Suzuki et al. 2007)

Além da modulação gênica, a propriedade antioxidante do CLA também poderia ser importante fator na inibição da instalação do câncer. Suzuki e colaboradores (2004) demonstraram que o CLA é um antioxidante mais potente que α -tocoferol, chegando a ser similar ao BHT *butylated hydroxutoluene* (Kohno, Suzuki et al. 2004) .

2.11.1 CLA no adenocarcinoma de cólon

Alguns trabalhos *in vitro*, utilizando células tumorais de cólon, têm demonstrado o efeito benéfico dos isômeros de CLA sobre o adenocarcinoma (ver quadro suplementar 4). Contudo, é possível dizer que os dados obtidos com o CLA são restritos ao uso isolado de cada tipo de isômero. Além disto, a

grande maioria das linhagens de células utilizadas nos trabalhos publicados correspondem a modelos humanos. Não há trabalhos publicados que relacionem o uso de CLA em pacientes com câncer colorretal de forma a comparar os efeitos obtidos *in vitro* com aqueles que envolvam um contexto biológico.

O efeito da suplementação de CLA em modelos experimentais (*in vivo*) são poucos e divergentes. Shiraish e colaboradores (2010) utilizando ratos e modelo de CRC induzido por AOM, observaram redução em até 50% de tumores. Esses efeitos estariam associados a um aumento da apoptose nos grupos suplementado com CLA acompanhado de significativa redução na enzima caspase-3 (Shiraishi, Iwakiri et al. 2010).

Yasui e colaboradores (2007) encontraram resultados semelhantes também utilizando ratos e modelo induzido por AOM. Nesse trabalho, foi possível observar que o isômero *trans-9,trans-11*t prevenia a ACF (*aberrant crypta foci*) pela indução de apoptose e da inibição da proliferação celular (Yasui, Suzuki et al. 2007).

Todavia, é possível perceber claramente que as formas de análise do tumor, ou seja, os marcadores e metodologias histopatológicas não são comuns aos trabalhos, dificultando significativamente a conclusão acerca dos efeitos do CLA nesse tipo de câncer.

Utilizando esse mesmo modelo experimental, Kohno e colaboradores (2002) observaram que o óleo extraído da romã contendo *cis-9-trans-11*, mas não o CLA, era capaz de prevenir adenocarcinoma colônicos quando administrado de forma isolada (Kohno, Suzuki et al. 2004). Outros componentes alimentares como o melão amargo (Cabaço) e a Catalpa (gênero árvore) produzem óleos ricos em *cis-9,trans-11* e possuem efeitos sobre o câncer de cólon induzido em ratos por injeções de AOM (Kohno, Suzuki et al. 2002, Suzuki, Yasui et al. 2006).

Mandir e Goodlad (2008), utilizando o modelo *Apc(Min/+)*, observaram que, enquanto o isômero *cis-9-trans-11* reduzia o número de pólipos, o isômero *cis-10 trans -12* aumentava o diâmetro dos pólipos (Mandir and Goodlad 2008).

Como podemos observar, os trabalhos que avaliaram *in vivo* a utilização de CLA em modelos de adenocarcinoma de cólon não associam a inflamação ao surgimento do câncer. Evans e colaboradores (2010) foram os únicos

pesquisadores a relatar as ações do CLA no modelo de adenocarcinoma de cólon associado à DII (AOM e DSS). Nesse trabalho, camundongos PPAR- γ fl/fl foram utilizados para demonstrar que os efeitos do CLA sobre o adenoma e adenocarcinoma é dependente de PPAR- γ (Evans, Misyak et al. 2010).

Nosso estudo pretendeu preencher essas lacunas analisando os efeitos da suplementação com CLA na dieta na colite induzida por DSS e no adenocarcinoma induzido por DSS e azoximetano. Além disto, avaliamos os mecanismos envolvidos nesses efeitos com atenção especial ao papel de PPAR- γ e de células reguladoras produtoras de TGF- β .

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos de ação do ácido linoléico conjugado na DII e no adenocarcinoma de colon experimentais.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Averiguar a composição bromatológica da dieta AIN-93G suplementada com CLA utilizada no estudo e a incorporação do CLA nos tecidos de camundongos suplementados;
- b. Investigar os efeitos dos isômeros CLA (mistura cis-9 trans-11 + trans10-cis-12) no modelo experimental espontâneo de DII (aspectos micro e macroscópicos da colite);
- c. Investigar modificações na permeabilidade intestinal na DII em grupos controle e tratados com CLA;
- d. Caracterizar o perfil de células presentes na lâmina própria do cólon de camundongos tratados com CLA;
- e. Analisar o perfil de macrófagos peritoneais M1 e M2 em camundongos suplementados com CLA (citometria de fluxo);
- f. Investigar os efeitos dos isômeros CLA (mistura cis-9 trans-11 + trans10-cis-12) sobre a ativação de PPAR- γ ;
- g. Mensurar a expressão de PPAR- γ nas células do cólon e macrófagos de camundongos tratados com CLA;
- h. Caracterizar o perfil de prostaglandinas em amostras colônicas de camundongos tratados com CLA;
- i. Investigar o papel do fator de transcrição PPAR- γ sobre os efeitos do CLA ;
- j. Delinear possíveis efeitos colaterais da utilização do CLA. Análise bioquímica sorológica e integridade hepática;
- k. Verificar os efeitos do CLA na formação de adenocarcinomas decorrentes da inflamação na mucosa;
- l. Investigar os mecanismos envolvidos na ação do CLA sobre o câncer;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Animais experimentais

Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas de idade, foram obtidos no CEBIO da UFMG e mantidos em nosso sistema de biotério.

Aprovação do modelo utilizado no projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação animal – CETEA – UFMG – Protocolo n. 241/2008, e Protocolo n. 116/2010.

Camundongos LysMCre PPAR γ ^{flox/flox} foram gerados e mantidos no biotério do departamento de Imunologia da Universidade de Debrecen, Hungria.

Os animais foram divididos em grupos experimentais e receberam a dieta AIN-93G (Reeves et al., 1993) contendo 0 e 1% CLA. A dieta utilizada nos experimentos conduzidos na Universidade de Debrecen foi produzida na França pela empresa Safe® seguindo os padrões AIN-93G.

4.1.2 Ácido Linoléico Conjugado

Ácido Linoléico Conjugado na forma oleosa (Tonalin®) BASF. O Tonalin® é um triglicerídeo que contém 80% dos isômeros do Ácido Linoléico Conjugado, sendo 74,5% dos isômeros de interesse, e é obtido do óleo natural de girassol por processo próprio da empresa (não divulgado). O produto foi gentilmente doado pela BASF corporation. A forma sintética do CLA e do ácido Linoleico (LA) foram obtidos na Sigma® e possuem 99% de pureza.

4.1.2.1. Escolha da dose utilizada

A justificativa inicial para a utilização da dose de 1,0% de CLA, para cada 100g de dieta, é a consenso da literatura da utilização desta dose para a linhagem experimental de camundongos utilizada.

Segundo Banni e colaboradores (2004) uma dieta animal experimental possui cerca de 2,5 a 3,0% de ácido linoléico. Como a suplementação na literatura é feita entre 0,5-2,0% de CLA, temos uma relação entre o ácido linoléico com ácido linoléico conjugado de 1,5:1 – 5:1 (Banni, Petroni et al. 2004).

Em humanos, o consumo de ácido linoléico é de 10-20g/dia e a suplementação de CLA preconizada na literatura esta entre 1,5-6g/dia. Sendo assim, a relação ácido linoléico e ácido linoléico conjugado seria de 7-14: 1 e 1,5-3:1 . Se considerarmos a utilização da suplementação para humanos igual a 3g/d, o que normalmente se adota, teremos a relação entre estes ácidos poliinsaturados de 3-6:1.

Sendo assim, a escolha da utilização da dose a 1,0% de CLA, pode ser considerada como dentro as proporções de uso ácido linoléico: ácido linoléico conjugado que ocorre em humanos (1,5-5:1) (3-6:1).

4.1.3 Dieta AIN-G e suplementações

Os camundongos foram alimentados com dieta AIN-93G (Reeves, Nielsen et al. 1993). Grupos experimentais receberam a dieta contendo 0 e 1,0% de CLA, o restante referente ao aporte lipídico foi completado com óleo de soja, como descrito na Tab. 1.

Tabela 1: Dieta AIN-93G e dietas usadas para suplementação

PADRÃO	DIETA AIN-G (1000g)	CLA(g) (1000g) MIX Isômero
Caseína Rhoster®	200,00	200
Amido de Milho Maisena®	397,486	397,486
Amido Dextrinizado Rhoster®	132,00	132,00
Sacarose (marca comercial)	100	100
Óleo Lisa ® e CLA	70	10g Mix isômeros (50-50)+ 60 soja
Celulose Rhoster®	50	50
Mix minerais Rhoster®	35	35
Mix vitaminas Rhoster®	10	10
L- cistina Synth®	3,500	3,500
Colina (Bitartarato) Rhoster®	2,5	2,5
BHT (conservante) Rhoster®	0,014	0,014

Adaptado de Reeves et al. (1993).

As referidas dietas, controle e dieta suplementada com CLA, foram substituídas por nova na gaiola dos camundongos a cada dois dias. Para acompanhamento do consumo de dieta, o peso de dieta oferecido e restante foi medido a cada troca. Três dias antes do início dos experimentos, a dieta comercial foi substituída pela dieta AIN-G padrão para ambos os grupos experimentais, afim de garantir a adaptação da dieta pelos camundongos. Após o período de adaptação de três dias, as intervenções foram então procedidas e o consumo devidamente calculado.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Composição bromatológica da dieta e análise incorporação do CLA nos tecidos

A determinação do CLA foi feita após da obtenção da porção lipídica da amostra que foi extraída pela técnica Folch (1957) e analisada por cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama.

4.2.2 Quantificação das concentrações de lipídes hepáticos pela técnica FOLCH

Os lipídeos totais hepáticos e da dieta foram extraídos de acordo com o método de Folch et al. (1957) (Folch, Lees et al. 1957)

Em suma, 100 mg de fígado e de dieta foram triturados durante 3 min com 1900µL de solução de clorofórmio: metanol (2:1) usando-se homogeneizador. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 3000rpm após adição de 400 µL de metanol. O sobrenadante foi então recolhido em tubo de peso conhecido e, posteriormente, acrescido de 800 µL de clorofórmio e 640 de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 min a 3000rpm, a fase superior foi desprezada. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600 µL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os

extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37° C e os lipídeos quantificados gravimetricamente.

4.2.3 Cromatografia Gasosa e Preparo da amostra

Hidrólise de lipídeos: Dissolveu-se, em tubo criogênico de capacidade de 2mL, ~10 mg da amostra ou padrão em 100 μ L de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 s, a amostra foi hidrolisada em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80W (Potencia 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 400 μ L de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl e 600 μ L de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300 μ L da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seca por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres. (adaptado de W. W. Christie, Gas Chromatography and Lipids, 1989, Pergamon Press)

Metilação dos ácidos graxos: os ácidos graxos livres foram metiladas com 100 μ L BF₃ / metanol 14% (Aldrich) e aquecidos durante 10 minutos em banho de água a 80°C. Foram em seguida diluídos com metanol e analisados por Cromatografia Gasosa.

Cromatografia: as análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou coluna SP2380 (Supelco) 30m X 0,25mm com gradiente de temperatura: 150°C, 0min, 7°C/min até 240°C; injetor (split de 1/50) a 250°C e detector a 250°C. Hidrogênio como gás de arraste (2 mL/min) e volume de injeção de 2 μ L. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de CLA ácido metilado e óleo de soja hidrolizado e metilado.

4.2.4 Eutanásia e coleta de sangue

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram anestesiados com 0,1 mL de solução (xilasina/ketamina) e após procedimento de sangria e lavagem peritoneal. Na ausência da sangria foi realizado eutanásia por deslocamento cervical.

Preparo da anestesia: 3mL de salina ou PBS + 1mL de Ketamina + 1 mL de Xilasina

O sangue foi coletado pela sangria da artéria femural ou axilar com o auxílio de pipeta pasteur e transferido para tubos. Estes foram posteriormente incubados por 15 minutos em estufa a 37° C. Após este período o sangue foi tranferido para geladeira a 4°C, onde permaneceram por mais 15 minutos.

Os endorffs contendo sangue refrigerado foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos em centrifuga de mesa, e posteriormente foi coletado o sobrenadante (soro) com auxílio de pipeta. O soro obtido foi armazenado em freezer -25°C.

4.2.5 Recrutamento de macrófagos e lavado peritonial

Os macrófagos foram recrutados pela inoculação intraperitoneal de 3% de tioglicolato . Após três dias da injeção, os animais foram anestesiados e com o auxílio de seringa de volume 10 mL, injetou-se volume de 10mL de meio RPMI 1640 completo* (GIBCO BRL) na cavidade peritonial dos animais; após a tranferência deste líquido, o mesmo foi posteriormente puxado de forma a retornar para a seringa. O volume obtido foi tranferido para tubos de 15 mL e centrifugados a 1200 rpm por 10 min em centrifuga refrigerada (4°C).

4.2.6 Macrófagos derivados de medula

Após eutanásia de camundongos C57BL/6, femur e tibia foram recolhidos. Cada amostra foi lavada com auxilio de seringa contendo meio *Dulbecco's Modified*

Eagle's Medium (DMEM). O lavado foi centrifugado e o *pellet* ressuspedido em solução de lise ACK. Células foram purificadas com a utilização de gradient de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL), e colocadas em cultura em meio (DMEM) contendo 20% *endotoxin-reduced fetal bovine serum* (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) e 30% L929 por 5 dias.

4.2.7 Cultura Celular

As células na concentração de 1×10^6 foram plaqueadas em placas de 24 poços ou na concentração de 1×10^7 em garrafas de cultura 50mL e estimuladas com CLA 10,50,100uM (forma oleaginoso ou purificada Sigma ®) e como controle, óleo de soja comercial ou ácido linoléico Sigma ® 10,50 e 100uM diluídos em DMSO, Pioglitazone e Rosiglitazona (Sigma ®) nas concentrações de 1 e 100uM, e GW9662 (Sigma ®) nas concentrações de 1mM. As placas ou garrafas foram mantidas em cultura a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. por 24 horas. Após este período as células foram lavadas com meio RPMI levemente aquecido para exclusão de células não aderentes. Após este período, as placas ou garrafas de cultura foram colocadas em gelo e lavadas com PBS 1x gelado e com o auxílio de raspador plástico, as células foram coletadas, transferidas para tubo Falcon®, centrifugadas e posteriormente re-contadas para proceder a citometria de fluxo, ou lisadas para extração de proteínas.

4.2.8 Remoção do intestino delgado e grosso

O intestino delgado e grosso dos camundongos foi removido e colocados em PBS 1X pH 7.4, gelado. Após medição do comprimento do cólon, este foi seccionado verticalmente para análise macroscópica da colite (Axelsson et al. 1998). A porção distal do cólon foi reservada para análise histológica em tampão formaldeído 10% e o restante do cólon foi armazenado em freezer -80°C para posterior dosagem de citocinas. Para obtenção de células da lâmina própria, a

totalidade do cólon foi reservada para o procedimento. Ou seja, experimentos específicos para este propósito foram conduzidos.

4.2.9 Separação de leucócitos da lâmina própria

Para proceder a técnica de separação de leucócitos da lâmina própria, amostras de cólon foram cuidadosamente removidas, retirando o tecido adiposo aderido. Posteriormente, os cólons foram abertos veticalmente em papel filtro, para remoção das fezes e das placas de Peyer, e lavados cuidadosamente com solução de HBSS 1x, contendo 10% SBF, 2mM EDTA (2mL of 0.5M EDTA) e 25mM HEPES (12.5mL of 1M HEPES) O cólon foi, então, fragmentado em pequenos pedaços de 0,5 cm e colocado sob agitação lenta no agitador magnético. A solução de HBSS 1x foi trocada quatro vezes após intervalo de 15 minutos cada, para limpeza dos tecidos. Os linfócitos intraepiteliais bem como as células epiteliais serão removidas após incubação por 30 minutos a 37°C em agitação lenta, em uma solução de HBSS 1x (acrescentada com itens anteriores) com acréscimo de 0.015% ou 1mm de DDT (dihidrotreitol). O tecido restante após a separação dos linfócitos intraepiteliais foi incubado por 1 hora a 37 °C em uma solução contendo Liberase TL (Roche Molecular Biochemicals) 0.17mg/mL e DNase 30ug/mL (Sigma) para separação das células da lâmina própria. Após esta incubação as células foram lavadas e filtradas em *cell strainer* 40uM. Após esta filtragem as células foram novamente lavadas, contadas e submetidas a marcação celular para citometria de fluxo (Davies e Parrot, 1981).

4.2.10 Citometria de Fluxo

Em placas de 96 poços de fundo em estilo U colocamos 25 µl de suspensão celular (1×10^6 células) e 10 µl de anticorpos (em diluição previamente padronizada por titulação de anticorpo) que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células dos camundongos, conjugadas com os fluorocromos – PE (ficoeritrina), FITC (fluoresceína) ou Cy (CyChrome) (BD Pharmingen). Foram utilizadas células

não marcadas como controles negativos. As placas foram incubadas a 4 °C durante 30 minutos e então lavadas por duas vezes com PBS-wash, pela centrifugação a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, vertendo-se as placas e o *pellet* foi ressuspendido em 200 µl de solução fixadora contendo 1% Paraformoldeído. As suspensões celulares foram transferidas para microtubos de leitura e armazenadas a 4 °C, protegidas de luz. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura FACScalibur (*Becton Dickinson*) acoplado a um computador com o *software Cell Quest* (*Becton Dickinson*). A partir de gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células através do padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (Forward Scatter x Side Scatter), foi feito enquadramento ou “*gate*” na população de linfócitos e granulócitos e a partir destes foram gravados 30.000 eventos para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra. As análises posteriores foram feitas utilizando-se *software Flow Jo* (Tree Star). Para estratégia de análise utilizou-se FMOs [todas as fluorescências menos uma (de interesse)].

4.2.11 Dosagem de citocinas intracelular

Para marcação de citocina intracelular utilizamos KIT de permeabilização e fixação (eBioscience) *Fixations e Permeabilizations Buffers*®. Após incubação das células em cultura *overnight*, adicionou-se solução de stopGolgi® (eBioscience) contendo Brefeldina. A cultura de células contendo Brefeldina foi novamente incubada por mais quatro horas, após centrifugação e lavagem da placa, procedeu-se à marcação das células com anticorpos de interesse. As lavagem seqüentes foram realizadas utilizando-se solução citofix-citoperm® contidas no KIT. Após estes procedimentos as células marcadas foram fixadas em com solução contendo 1% paraformoldeído e levadas para leitura no FACScalibur (*Becton Dickinson*)

4.2.12 Lise para obtenção de proteínas

Células aderidas nas placas de cultura, foram lisadas diretamente na placa com 40 μ L de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β -glicerofosfato, 0,1 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100 e suplementado com mix de inibidores de proteases Sigma e inibidores de fosfatase Roche). O lisado celular foi transferido para um tubo 1,5 mL e incubado no gelo por 30 minutos. Após este tempo os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por um minuto e o sobrenadante (extrato protéico) estocado a -20°C até o momento do uso. O extrato protéico foi quantificado utilizando-se o reagente para dosagem de proteína da Bio-Rad (método de Bradford modificado para microplacas) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.13 SDS-PAGE e *Western-Blot*

O extrato protéico total (40 μ g) foi aplicado com tampão de amostra (1% SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 1 mM EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) em gel de SDS-PAGE e submetido a eletroforese a 100 V.

As proteínas fracionadas pelo SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de PVDF Amersham Hybond-LFP (GE Healthcare) com amperagem constante de 300 mA por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% v/v metanol), sendo o sistema montado dentro de caixa de isopor com gelo. Após a transferência, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio (TBS contendo 5% de leite em pó desnatado) por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. A seguir, foram incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação com os anticorpos primários diluídos em tampão de anticorpo (TBS contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de albumina bovina). Os anticorpos primários utilizados foram monoclonais para camundongos, produzidos em coelho PPAR γ (C26H12), Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1) e β -Actin (13E5) ou em camundongo I κ B α (L35A5) (Cell Signaling) na diluição de 1:1000. As membranas foram então lavadas com TBS-Tween 20 0,1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (KPL) diluído no tampão de anticorpo por uma

hora a temperatura ambiente, sob agitação. Para a revelação foi utilizado o *Luminata Forte Western HPR Substrate* (Millipore) conforme as recomendações do fabricante e a luminescência foi captada utilizando-se filme autoradiográfico *Amersham Hyperfilm MP* (GE Healthcare) ou o equipamento Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak). A densitometria das bandas visualizadas foi realizada utilizando-se programa ImageJ.

4.2.14 Ensaio Luciferase

Células AD293T foram electroporadas (300V por 15 ms). Células foram plaqueadas em placas 48wells por 24 horas. Após este periodo as células foram transfectadas em triplicata utilizando polyethyleneimine (PEI) e DNA purificado com Medprep Kit (Roche) por 36 horas. A atividade de Luciferase reporter foi determinada pelo ensaio de Luciferase (Promega) e normalizada para atividade de beta-galactosidase.

4.2.15 PCR em tempo real (RT-PCR)

As amostras de cólon foram homogeneizadas e armazenadas em 0,5 mL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras posteriormente descongeladas foram homogeneizadas utilizando-se 350mg de microesferas ou *Beads* em aparelho Precellys.

As amostras homogeneizadas foram incubadas por cinco a 10 min a temperatura entre 15° a 30° C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de Clorofórmio de alta qualidade para cada 0,5 mL de TRIZOL. Foi realizada agitação em *vortex* e depois incubação por três minutos entre 15° a 30° C. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 2 a 8o C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa que foi transferida para microtubo novo. O RNA foi precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (250µL de isopropanol para cada 0,5mL de

TRIZOL). As amostras foram incubadas por 10 min entre 15 a 30°C e então centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 2 a 8°C e então formou-se um pequeno sedimento branco. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 0,5 mL de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC) para 0,5mL de TRIZOL. O tubo foi agitado no *vortex* para que o sedimento se soltasse do fundo. Então, foi realizada nova centrifugação a 7.500 x g (10.000 rpm) por cinco min entre 2 a 8°C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por cinco minutos para secagem do sedimento que, em seguida, foi diluído em água de alta qualidade tratada com DEPC, em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi estocado a -80 C.

Quantificação do RNA; a quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água de alta qualidade tratada com DEPC e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2mL da amostra pura. O aparelho forneceu a concentração em ng/mL e a associação 260/280 (RNA/proteínas).

Preparo do cDNA por Transcrição Reversa: a reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Fermentas, Vilnius, Lithuania), conforme instruções do fabricante.

PCR específica: para as reações subseqüentes de amplificação, 5µl da amostra de cDNA foi utilizada. A PCR foi realizada em volume final de 20 µL contendo 10µL de SYBER Green (Master Mix, Applied Biosystems, Warrington,), 1,5µL de primer senso a 5µM, 1,5µL de primer anti-senso a 5µM e 2µL de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se termociclador Step One PCR System (Stratagene MxPro3005PTM QPCR Systems (Santa Clara, CA, USA). Em resumo, foi feita

incubação inicial de um minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, um minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. A expressão relativa foi calculada pelo método $-\Delta\Delta CT$. Os dados foram demonstrados como (fold change) dos genes alvo em relação ao controle interno do gene GAPDH.

4.2.16 Indução colite por DSS

A colite experimental foi induzida pela administração de 1,5% Dextrano Sulfato de Sódio (MP Biomedical, USA) por sete dias na água de beber na quarta e última semana experimental. Foram oferecidos 5mL/dia/animal, sendo o consumo quantificado diariamente.

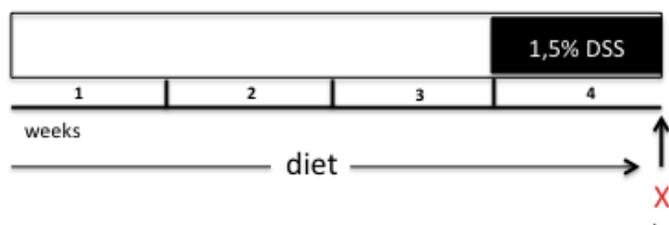


Figura 10: Modelo experimental indução de colite. Dieta AIN-G suplementada com 0 e 1% de CLA foi oferecida por 4 semanas aos camundongos experimentais, sendo que, na última semana solução de DSS foi oferecida *ad libitum* na água potável de beber.

4.2.17 Caracterização macroscópica e microscópica da colite

A caracterização clínica da doença foi realizada por meio da determinação do índice de atividade da doença DAI (*disease activity index*). O primeiro parâmetro avaliado foi o peso corporeo. Na autópsia, foram observados dois parâmetros principais: consistência das fezes e a presença de sangue nestas, conforme estabelecido na Tabela 2.

Tabela 2: Sistema de Score DAI

Score	Perda de peso	de Consistência das fezes	Sangue nas fezes
0	nenhum	normal	ausente
1	1~5%	pouco perdida	pouco
2	6~10%	perdida	presente
3	>10%	diarreia	visivelmente presente

Consistência das fezes: normal: fezes com aparência de bem formada; pouco perdida: ligeira perda do formato; perdida: pastosa, semi-formada, amolecida mas não adere ao ânus; diarreia: fezes líquidas que aderem ao ânus. Sangue nas fezes: visivelmente presente: sangue visível aderindo na região anal. É possível observá-lo sem autópsia. Já a opção presente só é possível observar após abertura do cólon. Adaptado McHenga et al. (2008).

Amostras do cólon de camundongos foram fixadas em formalina e encaminhadas para análise histológica. Cortes corados com hematoxilina e eosina foram ranqueados às cegas, baseado no sistema de score semi-quantitativo previamente descrito McCafferty et al. (2000), que classifica as seguintes características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa, presença e grau de infiltração celular, extensão do espessamento do músculo, presença ou ausência de abscessos das criptas e a presença ou ausência de depleção das células caliciformes conforme Tabela 3. Escore máximo histológico da colite igual a 11.

Tabela 3: Score microscópico da colite

Característica observada	Classificação
Extensão da destruição da arquitetura da mucosa	0 normal, 1 leve, 2 moderada 3 dano extensivo
Presença e grau de infiltração celular	0 normal; 1 leve, 2 moderada 3 infiltração transmural
Extensão do espessamento do músculo	0 normal; 1 leve, 2 moderada 3 espessamento extensivo
Presença ou ausência de abscessos das criptas	0 ausente e 1 presente
Presença ou ausência de depleção das células caliciformes	0 ausente e 1 presente

Adaptado de McCafferty et al., (2000).

4.2.18 Teste de permeabilidade intestinal

O ensaio de permeabilidade intestinal *in vivo* para verificar a função da barreira de mucosa foi realizado utilizando-se o método do *FITC-labeled dextran*, como descrito por Yan et al (2009).

Os camundongos foram submetidos a jejum de quatro horas de água e alimento e após este período, receberam solução estéril por gavagem de FITC-DEXTRAN (F4-Sigma®) 0.6mg/g (protegido da luz). Após 4 horas da gavagem (agulha 22G) os animais foram anestesiados e submetidos a sangria . O sangue coletado em tubo eppendorf foi então centrifugado a 10000rpm por três minutos a 4°C. Em placa de 96 wells, transferimos 100 µL de cada amostra. Curva padrão foi realizada com concentrações conhecidas de FITC Dextran (inicial 10ug/mL), diluída 1;5. Foi, então, realizada a medida da intensidade de fluorescência de cada amostra (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm; Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA).

4.2.19 Preparação de extrato de tecido

Amostras de porções do cólon foram pesadas e adicionados 1mL de solução tampão contendo inibidor de proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A e 0,05% Tween-20) para cada 100 mg de tecido. As amostras foram trituradas com homogenizador e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C . As amostras foram mantidas a - 20°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

4.2.20 Dosagem de citocinas por ELISA

Os níveis de citocinas nos extratos de tecidos e nos sobrenadantes de cultura foram determinados por ELISA *sandwich* (Maron et al. 1999) e padronizadas no laboratório ou por KIT conforme fabricante (R&D systems). As placas foram sensibilizadas com 50µL de solução contendo anticorpos

monoclonais purificados reativos (BD Pharmingen) diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução salina-Tween 0,05% e bloqueadas com PBS-caseína por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes da cultura celular ou os extratos de tecido (100µL) e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Alguns poços receberam diluições seriadas de cada citocina purificada com concentrações conhecidas, para construção de curva padrão, a partir da qual pode ser determinada a concentração de cada amostra. As placas foram novamente lavadas e então incubadas por uma hora à temperatura ambiente com 50 µL de solução contendo anticorpos monoclonais de camundongo específicos para cada citocina dosada (BD Pharmingen) marcados com biotina em solução de PBS-caseína. Após nova lavagem, solução contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology) foi adicionada e incubada por uma hora à temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas, ao abrigo da luz, com solução contendo 0,2 µl/mL de H₂O₂ e 0,4 mg/mL de OPD em tampão citrato pH 5, até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escura. A reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ($\lambda=492\text{nm}$) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

4.2.21 Atividade das enzima NAG, MPO e EPO

N-acetilglicosaminidase (NAG) : porções do cólon foram pesadas para ensaio de NAG, MPO e EPO.

No ensaio para medida de NAG o cólon recebeu, na proporção de 1.9 mL de solução para cada 100mg de tecido, solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck). Este tecido foi então homogeneizado em homogenizador de tecido e centrifugado a 4°C por 10 min a 1.500 g. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de 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), a concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação do homogenato. A reação foi processada a 37°C por 10 min, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0.2 M (pH 10,6) e quantificado em espectrofotômetro a 405 nm.

Mieloperoxidase (MPO): Para avaliar o acúmulo de neutrófilos foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO. Em suma, o cólon foi pesado, ressuspenso em 5% salina EDTA (Buffer 1), e submetido à homogeneização e centrifugação (10.000g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação 10.000g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em tampão fosfato com HETAB (Buffer 2) e re-homogenizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (10.000g, 15 minutos) e o sobrenadante coletado para ensaio. As amostras dos tecidos foram diluídas três vezes para o ensaio. Em seguida as amostras foram plaqueadas (25µL/poço) e a cada poço foram adicionados 25µL de tetramethylbenzine (TMB) a 1.6 mM. A placa foi posteriormente incubada a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionado 100µl por poço de H2O2 (0,002%) e o término da reação foi dado com a adição de ácido sulfúrico 1M. A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em leitor de ELISA (450 nm). Os resultados foram expressos como absorbância em 450nm por 100 mg de tecido.

Peroxidase de eosinófilos (EPO): Para quantificar a atividade da enzima peroxidase de eosinófilos, o tecido pesado para esta técnica foi acrescido de PBS 5% em proporção de 1,9mL/100 mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi ressuspenso em solução salina 0,2% e solução salina 1,6% com 5% de glicose, ambas na proporção de

1,5mL/100mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em solução de PBS com HETAB 0,5%, na proporção de 1,9mL/100mg de tecido. Após a homogeneização, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado três vezes. Após esta etapa, as amostras foram novamente centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. No ensaio enzimático, 75 µL de cada amostra foram plaqueados em microplacas, em duplicata. Acrescentou-se 75 µL do substrato OPD diluído em tampão tris-HCl 78 com acréscimo de H₂O₂ 30% e a placa foi mantida à temperatura ambiente e protegida da luz por 30 minutos, tempo necessário para ocorrer a reação desejada. A reação foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ 1M. A absorbância foi lida a 492nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

4.2.22 Histologia das amostras de cólon: Inclusão e Coloração H&E

Cada amostra de cólon foi transferida para cassetes®, previamente identificados. Estes foram colocados em soluções de álcool obedecendo os referidos tempos e concentrações (Álcool 70% - 30 min/ Álcool 80% - Álcool L 90% - 30 min). Após a imersão nos três alcoóis (70°, 80° e 90°), os cassetes® foram imersos em solução de álcool etílico absoluto que foi colocada em três diferentes compartimentos. (absoluto 1 - 30 min/ absoluto 2- 30 min /absoluto 3- 30 min). Após a imersão em álcool etílico absoluto, os cassetes®, foram imersos em parafina líquida acondicionada em estufa 60°. Devem-se observar os tempos e os três diferentes compartimentos. (parafina 1 - 30 min / parafina 2 - 30 min/ parafina 3 - 30 min). Ao final deste processo, os cassetes ® foram abertos, os tecidos retirados e colocados em parafina em forma própria para secagem final e formação de blocos de parafina contendo o órgão em questão. Os blocos foram acondicionados por 24h para secagem, após este período, esses foram desenformados e acondicionados em freezer. Os blocos de parafina, contendo os

tecidos incluídos, foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se geralmente cortes de 4 μm de espessura.

A coloração foi realizada por meio da técnica HE (Hematoxilina-Eosina) conforme descrito por Lev e Spicer (1964).

As análises morfométricas do cólon foram feitas utilizando-se um processador de imagens acoplado a microscópio óptico com supervisão de técnico patologista.

4.2.23 Avaliação quantitativa de degeneração hepática

A partir de cortes histológicos hepáticos corados com H&E, foram realizadas análises quantitativas do grau de degeneração dos hepatócitos, representados pela presença de vacúolos citoplasmáticos. Imagens de três campos/animal (100X) foram capturadas a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software de morfometria ImageJ [®] (Image Processing and Analysis in Java [®]). Os resultados foram obtidos a partir da média da cada grupo e expressos em porcentagem de degeneração/área.

4.2.24 Determinação das concentrações de prostaglandinas

As prostaglandinas foram mensuradas pela técnica de ELISA Kit Prostaglandina E Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. conforme instruções do o fabricante.

4.2.25 Ensaio Anti-COX2

As injeções contendo Nimesulida[®] (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram injetadas (intraperitoneal) diariamente conforme esquema abaixo, durante a administração de Dextrano Sulfato de Sódio DSS (7 dias) na concentração de 5mg/Kg diluídos em solução salina estéril em volume final de 200 μL . Camundongos para controle receberam apenas o veículo PBS.

4.2.26 Ensaio de Fagocitose de *Beads* fluorescentes

O ensaio de Fagocitose foi feito como descrito por Rivollier e colaboradores (2012) (Rivollier, He et al. 2012).

Um total de 3×10^6 células totais da Lâmina Própria foram incubadas por 45 minutos a 37°C na presença de $7,5 \times 10^6$ *Fluoresbrite Plain Yellow Gold*[®] 1- μm Microspheres (Polysciences Inc[®].) e depois lavadas 2 vezes com PBS-wash gelado. As células foram marcadas com F4/80 APC por 20 minutos, novamente lavadas e levadas a leitura no aparelho FACScalibur.

No caso dos ensaios *in vitro*, os macrófagos estimulados em cultura foram coletados com o auxílio de um raspador de plástico, recontados e 3×10^5 células foram incubadas com 25×10^6 *beads*.

4.2.27 Imunohistoquímica

Para análise imuno-histoquímica foram obtidos cortes histológicos de $4\mu\text{m}$ a partir do tumor. Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use- Lab Vision) (DAKO K0690), sendo empregada a técnica de recuperação antigênica pela utilização de solução Retrieval (DAKO) durante 30 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por uma hora com o anticorpo primário (CDC47 ou TGF- β) por 15 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra Vison Block, Lab Vison), anticorpo secundário (Biotin Goat, Lab Vision), estreptavidina peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vison). O cromógeno utilizado foi o DAB (DAB Substrate System, Lab Vision), em incubação durante 10 minutos. A determinação do índice proliferativo pelo CDC47 e a contagem do TGF- β foi realizada pelo percentual de células positivas em 500 células em cada campo visual.

4.2.28 Co-focal

A imunofluorescência para o co-focal foi realizada conforme (Gomes, Rodrigues et al. 2008). Em suma, as amostras de cólon foram desparafinizadas, rehidratadas e recuperadas com solução trilogy (Cell Marque, Koclin, CA, USA) em aquecimento pressurizado (125^oC) durante 20 minutos de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram lavadas em solução de PBS (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 10 mM phosphate buffer solution, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA), e incubadas em solução de PBS contendo 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 20 minutos e bloqueados em PBS contendo 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Os *slides* contendo as amostras foram posteriormente incubados com anticorpo monoclonal contra F4/80 (1:100, Santa Cruz, USA) e um anticorpo coelho policlonal contra TGF-beta (1:1000, Santa Cruz USA), *overnight* a 4^oC, e posteriormente lavadas em PBS três vezes por cinco minutos. Subsequente, as amostras foram incubadas com anticorpo Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Rabbit IgG (1:1000, Life Technologies), Alexa Fluor[®] 555 Goat anti-mouse IgG antibody (1:1000, Life Technologies) e Hoechst 33258 (1 μ g/mL, Life Technologies) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em PBS por 10 minutos e posteriormente montadas em reagente Prolong Gold Antifade (Life Technologies). O controle negativo foi incluído em todas as etapas excluindo etapa de anticorpos primários. As imagens foram coletadas utilizando-se microscópio confocal Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss, Jena, Germany) com auxílio de óleo 40x 1.3. nas lentes. As células foram excitadas a 405 nm e observadas a 415-480 nm para detectar Hoechst, 488 nm e observada at500-525 nm para detectar Alexa Fluor 488 e a 532 nm e observada utilizando filtro LP550 filter para detectar o Alexa Fluor 555. Os resultados obtidos no microscópio foram avaliados em 10 áreas e três imagens foram coletadas para cada caso.

4.2.29 Indução Adenocarcinoma

Para indução do adenocarcinoma foram utilizadas injeção intraperitoneal de Axozimetano (AOM) (Sigma) 10mg/Kg seguidas de três ciclos de Dextrano Sulfato de Sódio , conforme esquema abaixo:

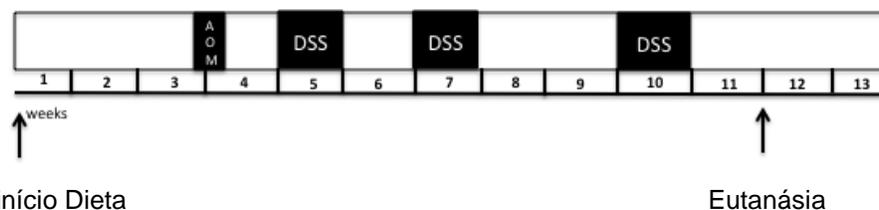


Figura 11: Modelo experimental de indução de adenocarcinoma. Utilizando DSS e AOM

4.2.30 Análise macroscópica e microscópica do adenocarcinoma

A análise de pólipos foi realizada macroscopicamente, os pólipos foram contados e medidos com auxílio de paquímetro Starrett®. A análise histológica da neoplasia foi realizada por escore de acordo com o critério descrito na tabela 4.

Tabela 4: Análise Microscópica de adenocarcinoma

Característica observada	Classificação
Epitélio mucoso	(0, normal; 1, hiperplasia leve 2, displasia leve ; 3, displasia grave)
Pleomorfismo nuclear	(0, ausente; 1 leve, 2 moderada, 3 intensa)
Invasão Muscular	(0, ausente; 1, presente)
Invasão camada serosa	(0, ausente; 1, presente)
Displasia Glandular	(0, ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 intensa)
Intensidade Infiltração Lamina Própria	(0, ausente, 1 leve, 2 moderada, 3 intensa)

Adaptado de McCafferty 2007

4.2.31 Ensaio anti-LAP *in vivo*

Para o ensaio onde houve neutralização do TGF- β de membrana (LAP) os animais experimentais receberam em momentos diversos injeção intraperitoneal contendo o anticorpo purificado anti-LAP (TW7-16B4) gentilmente cedido pelo professor Dr. Howard Weiner, center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, em diferentes concentrações conforme modelo abaixo:

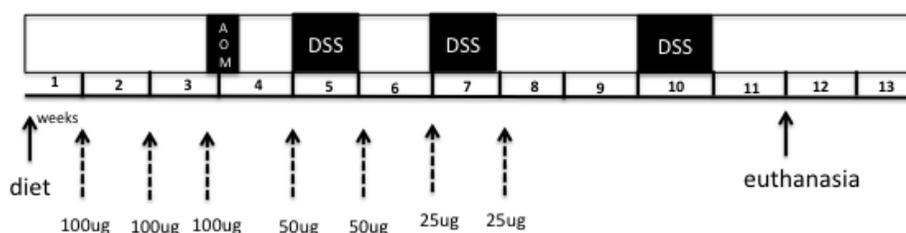


Figura 12: Modelo experimental de indução de adenocarcinoma com administração de anti-LAP em diferentes *time-points* e doses

4.2.32 Ensaio proliferação de célula T, geração de Treg e a participação de PPAR- γ

Para este ensaio foi realizada separação ou *sorting* de células CD4+ obtidas através da utilização de *microbeads* (Miltenyi Biot) de camundongos FOXP3 GFP. Células T Naïve (CD4+CD62L+CD44-Foxp3-) foram coletadas (FACS Aria II, BD Bioscience). As células Naïve (1×10^5 cells/well) foram colocadas em cultura em placas de 96 poços 37°C/5% CO₂ Contendo CLA (Tonalin®) , pioglitazone hydrochloride (Sigma) na presença e ausência de 100 μ M de 2-Chloro-5-nitobenzanilide (Sigma) (antagonistas de PPAR) Após 24h as células foram marcadas com eFluor780 *fixable viability dye* (FVD), PerCP-anti-CD4 (RM4-5) e Brilliant Violet 421 (BV421)-anti-LAP (TW7-16B4) para análise de citometria de fluxo. A aquisição foi realizada em LSRII (BD Bioscience) utilizando-se DIVA

software (BD Bioscience).

4.2.33 Ensaio bioquímicos

Para a quantificação da enzima aspartate transaminase (AST/TGO) , 10 μ L do soro foi incubado com o reagente de trabalho Bioclin® por 1 minuto. A leitura da absorbância foi feita a 340 nm 334 nm e 365 nm após um, dois, três minutos respectivamente. A média das diferenças por minuto (DA/min) foi utilizada para o cálculo final de acordo com instruções do fabricante. Os resultados são dados em U/L. A quantificação de triglicérides, colesterol e glucose sorológica foram realizadas utilizando Kits Bioclin® conforme fabricante.

4.2.34 Calorimetria indireta

O consumo de oxigênio (VO_2), a produção de carbônio (VCO_2), o consumo de dieta e água, a atividade locomotora foram mensuradas utilizando um circuito aberto de calorimetria (Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, OH). Os parametros metabólicos foram mensurados após 21 dias de suplementação dietética (período prévio ao DSS) e após sete dias de oferecimento do DSS. Os camundongos foram colocados em câmeras calorimétricas para aclimatização com acesso livre a dieta e água (controle e CLA). Uma amostra de ar era injetada nas cameras por 75 segundos a cada 20 minutos e o conteúdo de O_2 e CO_2 medido por sensores. Estes valores foram utilizados para o cálculo VO_2 e VCO_2 . Os dados referentes as primeiras 12 hora aferidas não foram utilizadas para o cálculo final. Os parametros metabólicos consistem em 24hora. A taxa de trocas respiratórias *respiratory exchange ratio* (RER) reflete o balanço do substrato de oxidação com limite teórico entre 1.0 e 0.7. Um RER de 1.0 reflete a oxidação de carboidratos enquanto 0.7 reflete oxidação de lipídeos. Os valores da taxa metabólica são correlacionados ao peso individual de cada animal. Após a primeira aferição os camundongos foram colocados em gaiolas convencionais para recuperação de peso e aclimatização, apenas após três dias em gaiolas convencionais, o DSS foi

oferecido aos camundongos. Após sete dias de oferecimento de DSS os camundongos foram novamente colocados nas câmaras calorimétricas para segunda aferição.

4.2.34 Análise estatística

Análise de normalidade dos dados foi realizada antes da determinação de testes paramétricos- e não paramétricos (Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino e correlação de Pearson). Para testes não-paramétricos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns e Mann-Whitney.

Os métodos utilizados para o tratamento estatístico dos resultados paramétrico foram Teste t , análise de Variância (ANOVA fator único) com posterior análise, Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O software de estatística utilizado foi graphprism[®]

5. Resultados

Para confirmarmos a presença de CLA na dieta suplementada, os lipídeos presentes na ração oferecida aos camundongos foram extraídos e submetidos à análise cromatográfica a gás para a quantificação dos isômeros de CLA *cis9-trans11* e *trans10-cis12*.

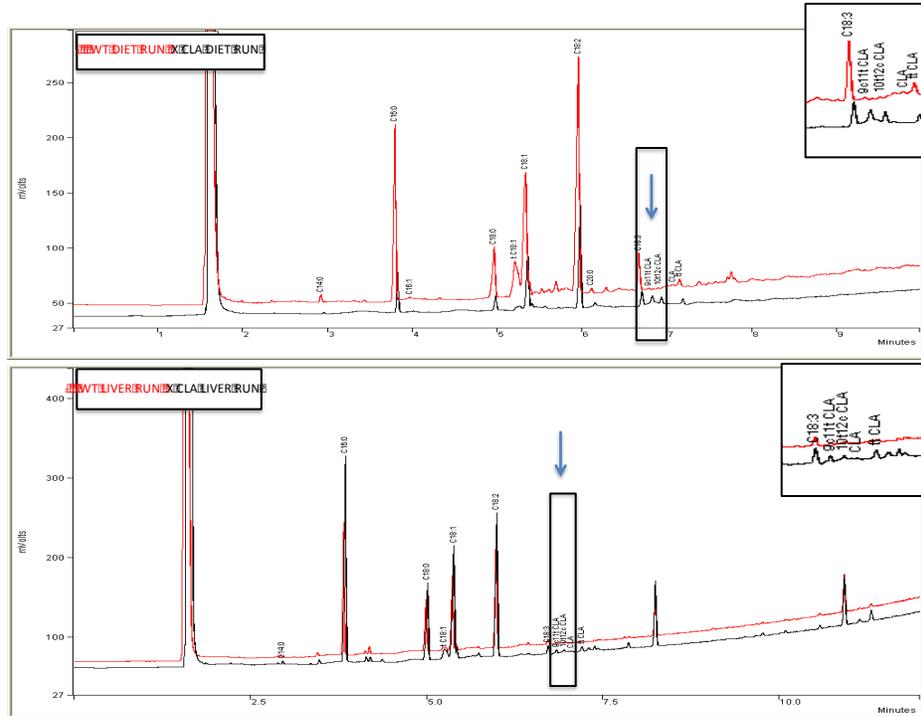
Os resultados obtidos demonstram que a dieta suplementada com CLA possui uma concentração dos isômeros de CLA aproximadamente sete vezes superior àquela presente na dieta controle na qual utilizou-se exclusivamente o óleo de soja. Consequentemente, pode-se observar valores inferiores de ácido linoléico (C18:2) na dieta CLA, uma vez que há substituição do ácido graxo linoléico pelo CLA. Além dos isômeros de CLA, a quantificação de algumas estruturas saturadas e insaturadas também podem ser vistas na figura 13.

Para confirmar a presença de CLA nos tecidos dos camundongos tratados com a dieta suplementada, amostras de fígado foram coletadas, os lipídeos extraídos e submetidos à análise cromatográfica. Notou-se a incorporação de CLA no fígado dos camundongos tratados com dieta contendo 1% de CLA. Observou-se valor sete vezes maior de *cis9-trans11* e três vezes maior de *trans10-cis12* em amostras de fígado de camundongos suplementados com CLA quando comparados com animais alimentados com dieta controle (Figura 13).

É possível observar, nas figuras 13A e B, que a dieta suplementada com CLA possui concentração dos isômeros de CLA 9c11t e 10t12c aproximadamente sete vezes superior à dieta controle e, consequentemente, valores inferiores de C18:2 (ácido linoléico) uma vez que há uma substituição entre os ácidos graxos.

Além disso, pela análise dos valores de isômeros de CLA presentes no fígado dos camundongos é possível observar que o CLA foi devidamente absorvido e incorporado nos tecidos (figura 13B).

A



B

Amostra	*Conc mg/ml	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	t C18:1	C18:1	C18:2
Padrão CLA	5,0				8336	27682	20556	27982
CLA comercial	10,0		30923	1672	18910	21335	87684	11789
DIETA CLA	20,0	2232	51416	1949	24163	11868	103045	180978
DIETA								
CONTROLE	20,0	9888	273431	6024	110566	137225	344833	512644
FIGADO CLA	20,0	9729	444491		219464	56697	339223	365058
FIGADO								
CONTROLE	19,4	4469	254948		121357	18231	185764	269582
METIL CLA	5,0				21711	127649	74293	75561
SOJA	13,6		83497		33620	217261	19611	330902

Amostra	Conc mg/ml	C18:2	C20:0	C18:3	9c11t CLA	10t12c CLA	CLA	tt CLA
Padrão CLA	5,0	27982			245401	259660	42670	109914
CLA comercial	10,0	11789			130573	136388	13372	48486
DIETA CLA	20,0	180978	6637	21802	15931	14783	3213	9299
DIETA								
CONTROLE	20,0	512644	8064	58652	2205	2453	10664	12938
FIGADO CLA	20,0	365058		20633	10707	13380	9779	12130
FIGADO								
CONTROLE	19,4	269582		11597	1444	4349	2926	4704
METIL CLA	5,0	75561			812327	827193	89628	102433
SOJA	13,6	330902	5517	32550				

Figura 13. Quantificação do conteúdo de CLA na dieta e em amostras de fígado. O conteúdo lipídico da dieta e de amostras de fígado foi extraído pela técnica de Folch e submetido à cromatografia gasosa para análise do perfil lipídico A) Representa os picos de identificação B) Quantificação das áreas dos picos das estruturas lipídicas presentes na dieta e no fígado de animais suplementados e não suplementados. Experimento representativo de amostras em triplicata.

SEÇÃO I: Efeitos da suplementação com CLA na colite experimental

Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta suplementada contendo 1% CLA e dieta controle por 4 semanas. Na terceira semana, os animais experimentais receberam uma solução contendo DSS a 1,5% para indução de colite ulcerativa.

Ao final do tempo experimental (7 dias de oferecimento de DSS), os animais foram eutanasiados e a ocorrência de colite avaliada.

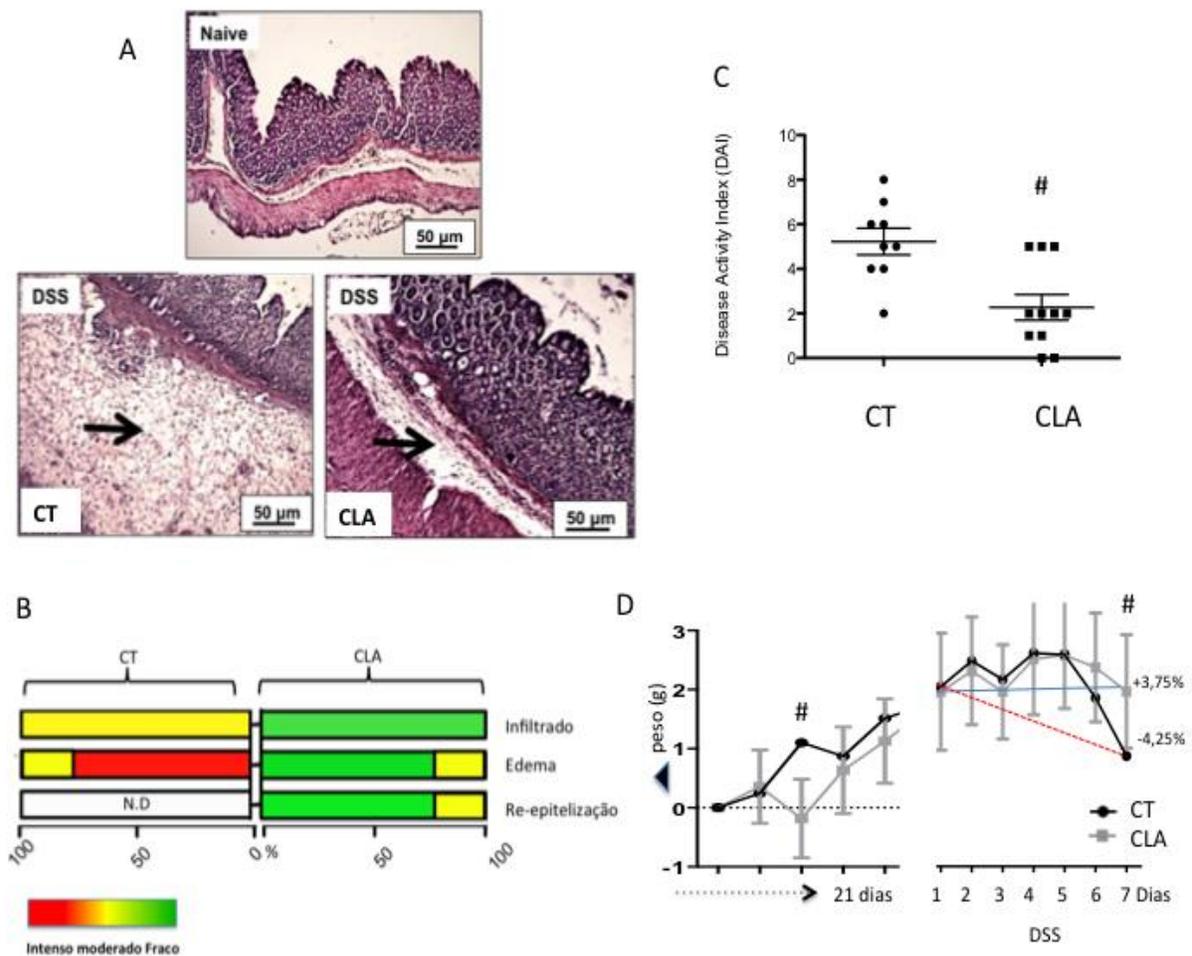


Figura 14: Efeitos da suplementação com CLA sobre a colite experimental: aspectos micro e macroscópicos. Camundongos C57BL/6 alimentados por 4 semanas com dieta suplementada com CLA e dieta controle foram submetidos à colite experimental induzida por DSS por 7 dias (na terceira semana experimental). A) Cortes histológicos (H&E) demonstrando infiltrado inflamatório difuso com perda da arquitetura da mucosa colônica na colite induzida por DSS. B) Ilustração representando o percentual de cortes histológicos apresentando infiltrado inflamatório, edema e re-epitelização. As cores vermelho, amarelo e verde indicam a intensidade de cada parâmetro

analisado. C) Índice de atividade da doença ou *Disease Activity Index* (DAI) avaliação macroscópica da colite que pontua os sinais clínicos da doença (diarreia, sangramento e perda de peso). O gráfico representa os valores absolutos, a média e o erro padrão D) Variação do peso corporal dos camundongos suplementados com dieta CLA ou dieta controle ao longo do período experimental. Os pontos representam a média \pm o erro padrão. A linha preta representa o grupo que recebeu dieta controle (CT), a linha cinza representa o grupo que recebeu a dieta com 1% de CLA (CLA). A linha de tendência azul indica a manutenção do peso durante a colite no grupo CLA, a linha de tendência pontilhada vermelha demonstra perda de peso no grupo CT na colite. N=10 *Teste t* de Student. # = $p < 0.05$.

Foi possível observar menor infiltrado Inflamatório e edema menos intenso nos grupos tratados com dieta contendo CLA (Figura 14A e B). Além disso, enquanto não foi possível observar re-epitelização nos grupos que receberam dieta controle no dia 7 da colite, amostras histológicas de cólon de camundongos suplementados com CLA apresentaram re-epitelização moderada (ver figura suplementar 1).

A análise do escore macroscópico da colite (índice da atividade da doença - DAI), demonstra que a suplementação com CLA reduziu significativamente as manifestações macroscópicas da colite (Figura 14 C).

Esses resultados estão de acordo com a manutenção do peso corporal nos animais suplementados com CLA durante a indução da colite. Enquanto o grupo alimentado com a dieta controle chegou a perder aproximadamente 4% do peso corporal após os 7 dias de consumo de DSS, os animais que consumiram CLA não perderam peso (Figura 14 D). Sendo assim, o CLA preveniu a perda de peso na colite experimental induzida por DSS.

Não houve diferença, entre os grupos experimentais, no consumo do DSS ou no consumo de dieta durante todo o período experimental (suplementar 2).

A análise macroscópica do encurtamento do cólon entre os animais tratados com CLA ou com dieta controle (Figura 15), mostra que não houve diferença no comprimento do cólon entre os grupos experimentais, o que sugere participação dos outros parâmetros considerados no DAI nos efeitos do CLA.

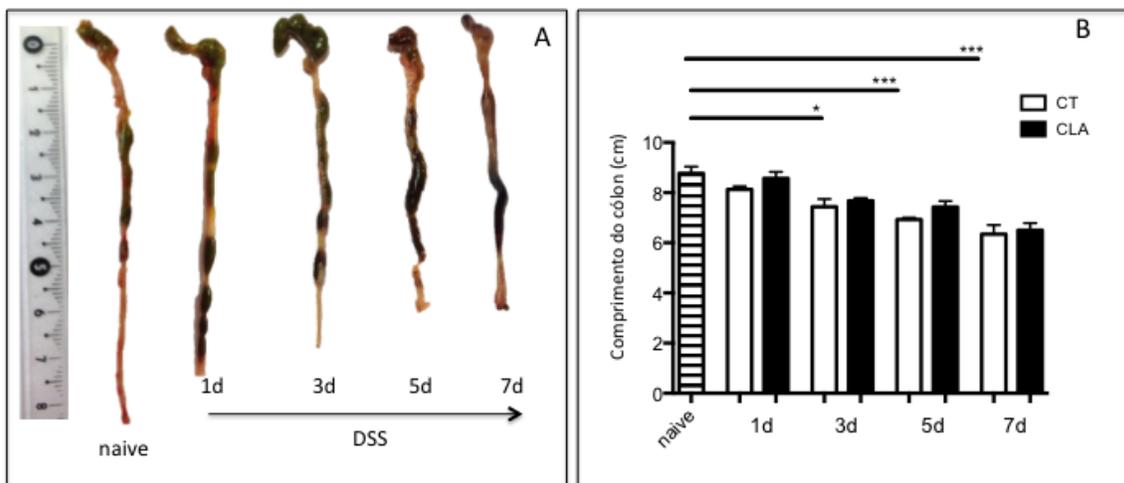


Figura 15: Comprimento do cólon em camundongos com colite induzida por DSS. Camundongos C57BL/6 que receberam dieta CLA e dieta controle foram eutanasiados ao final do protocolo experimental de indução da colite por DSS. Os cólons foram retirados e medidos com régua. A) Foto representativa do cólon murino durante os dias de administração de DSS. É possível observar presença de sangue e diarreia a partir do dia 5 da administração do DSS. B) Comprimento do cólon (cm) de camundongos suplementados com CLA e dieta controle. Barras representam a média \pm erro padrão. Barras brancas representam o grupo que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1%CLA (CLA), barra pontilhada representa grupo naive (sem colite) / N=5 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$. *d=dias

Além das avaliações micro e macroscópicas da colite, avaliamos a permeabilidade intestinal que reflete a integridade da barreira mucosa e representa importante parâmetro clínico na DII.

Para avaliação da permeabilidade intestinal, realizamos a medida da absorção da molécula fluorescente FITC dextrana. Uma solução contendo a dextrana marcada com o fluorocromo FITC foi oferecida via oral por gavagem aos camundongos (em jejum) com ou sem colite nas diferentes condições dietéticas. Após 4 horas da gavagem, os camundongos foram anestesiados e o sangue/soro colhido. A quantidade de FITC presente no soro foi utilizada como um indicador da permeabilidade intestinal.

Observamos que a redução da colite experimental observada em camundongos suplementados com CLA foi acompanhada de menor permeabilidade intestinal ao composto FITC dextrana (Figura 16).

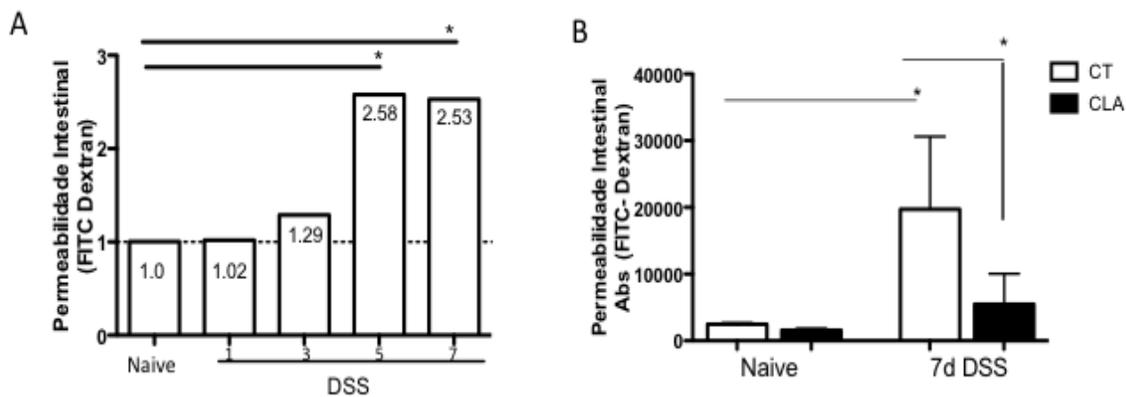


Figura 16: Efeitos da suplementação de CLA sobre a permeabilidade intestinal na colite induzida por DSS. Camundongos C57BL/6 submetidos à colite e camundongos naïve (sem colite) receberam, por gavagem, uma solução contendo FITC dextrana. Após 4 horas, o sangue foi coletado e a detecção de FITC plasmática efetuada. A) Medida da absorção de FITC dextrana (avaliação da permeabilidade intestinal) ao longo dos 7 dias (d) de administração de DSS (1,3,5 e 7 dias). O gráfico de barras representa a razão entre as médias de cada grupo experimental considerando 1.0 = valor de referência (grupo sem colite). B) Permeabilidade intestinal em camundongos suplementados com dieta CLA ou dieta controle. Barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam grupo que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA)/ N=6 Teste *t* de Student *= $p < 0.05$

A diferença na permeabilidade intestinal em camundongos com colite induzida por DSS a 1,5% só foi percebida pela técnica de FITC-dextrana no dia 5 da colite (Figura 16 A). No dia 7, observamos diferença significativa na permeabilidade intestinal no grupo suplementado com CLA quando comparado com o grupo que recebeu dieta controle (Figura 16B).

A redução do infiltrado inflamatório (Figura 14A) associado a re-epitelização precoce (Figura 14B e suplementar 1) e ao aumento da produção da citocina IL-1 β (Figura Suplementar 3) em camundongos suplementados com dieta CLA estavam associados a menor permeabilidade intestinal durante o desenvolvimento da colite induzida por DSS.

Após constatar que a suplementação com dieta CLA prevenia a colite experimental, buscou-se avaliar os tipos celulares envolvidos nesse efeito. Para isto, inicialmente examinou-se a participação de algumas células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos e monócitos) reconhecidas como essenciais no desenvolvimento da colite induzida por DSS por citometria de fluxo (Figura 17)

Observa-se que os neutrófilos chegam ao local da inflamação (lâmina própria colônica) em número mais expressivo no dia 7 da colite (Figura 17 E) enquanto que os monócitos parecem ser os primeiros a chegar no sítio inflamatório com redução proporcional e concomitante de macrófagos regulatórios residentes (Figura 17 F e G).

É possível ainda observar uma redução do percentual de monócitos inflamatórios na lâmina própria de camundongos que receberam DSS por sete dias e dieta contendo CLA (Figura 17 F).

Esse resultado foi acompanhado da redução da atividade da enzima N-Acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), que representa uma medida indireta da atividade de macrófagos, e da redução da peroxidase eosinofílica (EPO), medida indireta da atividade de eosinófilos. Não houve diferença na medida de mieloperoxidase (MPO), produzida por neutrófilos, entre os grupos experimentais. Tais medidas foram realizadas no cólon de camundongos tratados com as diferentes dietas após 7 dias de DSS (Figura 18).

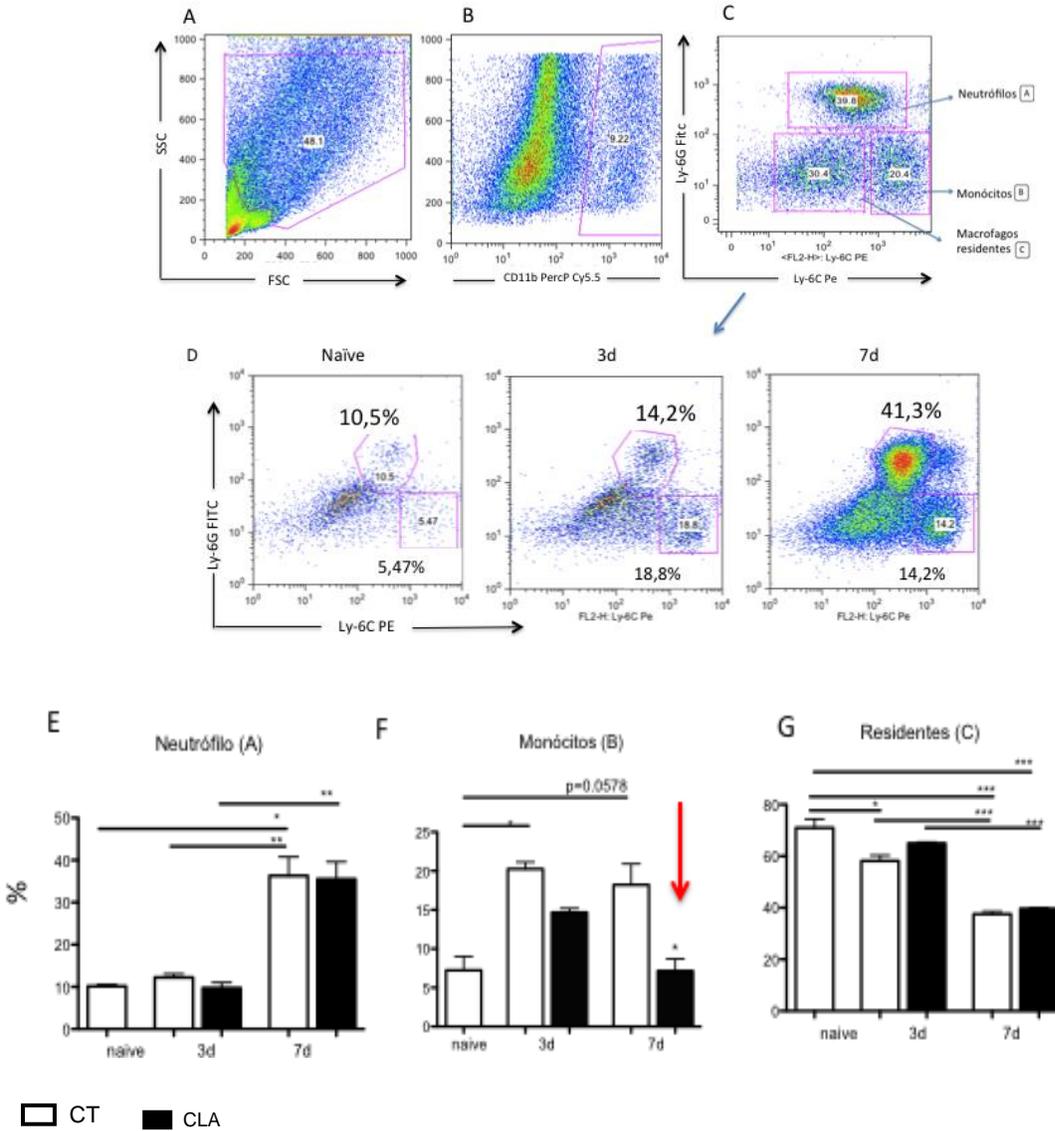


Figura 17: Análise fenotípica das células da imunidade inata da lâmina própria colônica durante o desenvolvimento da colite ulcerativa experimental (3 e 7 dias). Células da lâmina própria (LP) de camundongos C57BL/6 com e sem colite alimentados com a dieta CLA ou com a dieta controle foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo. A) Gráfico FSCxSSC (tamanho x granulosidade) mostrando a seleção de granulócitos na LP B) Frequência de células CD11b+ na LP na colite ulcerativa (representativo 3 e 7 dias). C) Estratégia de análise para diferenciação de neutrófilos, monócitos e macrófagos residentes, considerando expressão das moléculas Ly- 6C e Ly-6G. D) Frequência de neutrófilos e monócitos na colite (3 e 7 dias). E) Frequência de granulócitos (neutrófilos). F) Frequência granulócitos (monócitos inflamatórios). G) Frequência de granulócitos (macrófagos residentes). Barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1%CLA (CLA)/ N=5 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$ d= dias

Observou-se uma diminuição na atividade de macrófagos entre nos animais alimentados com dieta CLA (Figura 18) e essa diferença não estava relacionada a uma redução do número de macrófagos (dado não mostrado).

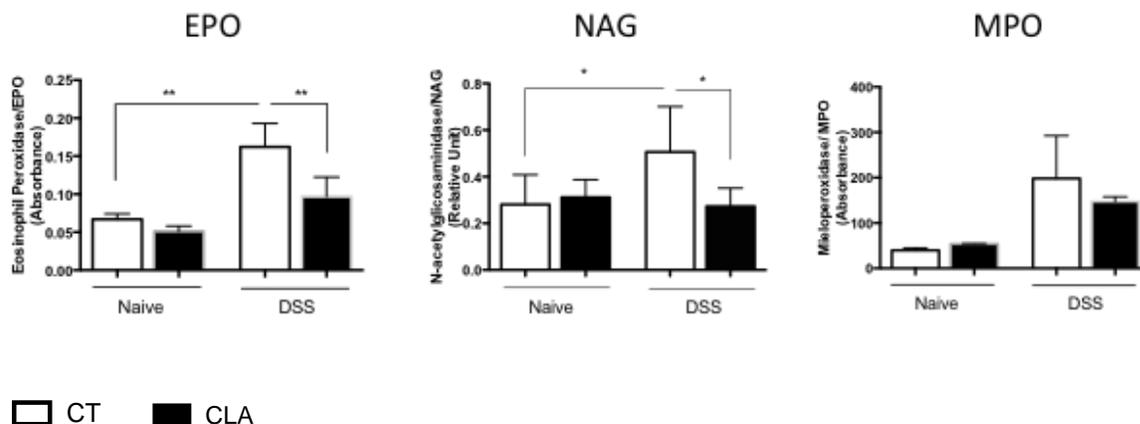


Figura 18: Efeito da suplementação CLA sobre a atividade das enzimas NAG, MPO e EPO em tecidos colônicos na colite experimental. Quantificação, no dia 7 da colite experimental, da atividade das enzimas NAG, EPO e MPO em amostras de extrato cólon de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta CLA ou com dieta controle. Barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo que recebeu dieta controle (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta 1%CLA (CLA)/ N=5 Teste t. *= $p < 0.05$

Também estavam reduzidos os monócitos com perfil inflamatório (apresentando Ly-6C^{Hi}) (Figura 17F) no infiltrado inflamatório colônico de camundongos suplementados com dieta CLA. Hipotetizamos que macrófagos com perfil anti-inflamatório participariam efetivamente da melhora da colite no grupo suplementado com dieta CLA.

Para melhor caracterizar o perfil de macrófagos presentes na mucosa colônica de camundongos após a administração da dieta, analisamos o perfil fenotípico das células da lâmina própria do colón para avaliação de moléculas conhecidas como indicadores do perfil de macrófagos anti e pro-inflamatórios (Figura 19).

Na Figura 19, podemos observar que a dieta suplementada com CLA induziu um perfil preferencialmente M2 de macrófagos na lamina própria na

ausência da inflamação, ou seja, previamente à indução da colite pelo DSS (ver Figura Suplementar 4).

A ação do CLA sobre os macrófagos também pode ser vista em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com CLA, conforme mostrado nas Figuras Suplementares 5 e 6. O processo de fagocitose *in vivo* não se altera com a suplementação de CLA (suplementar 7 e 8).

Para demonstrar que a nossa amostra de CLA atuava ativando o fator de transcrição PPAR- γ , como já descrito na literatura (Yu, Correll et al. 2002) utilizamos experimentos *in vitro* de transfecção de células AD293T utilizando o sistema de Luciferase (Figura 20). Para a transfecção, bactérias competentes (E.coli DH5 γ) receberam os plasmídeos contendo o gene reporter. As bactérias transformadas cresceram *overnight* em meio LB contendo antibiótico. As bactérias foram lisadas e os plasmídeos purificados utilizando-se Medprep Kits (Roche). As células AD293T foram transfectadas com polietilenimina (PEI) e uma mistura contendo o gene reporter (MH100), gene construído PPAR- γ e β -gal por 6 horas. Após essa etapa, as células foram estimuladas em cultura com diferentes concentrações de CLA, ácido Linoléico (LA), o agonista de PPAR- γ Rosiglitazona (RSG) e o antagonista de PPAR- γ GW9662 (GW). Após 36 horas, procedeu-se ao ensaio de Luciferase (Promega).

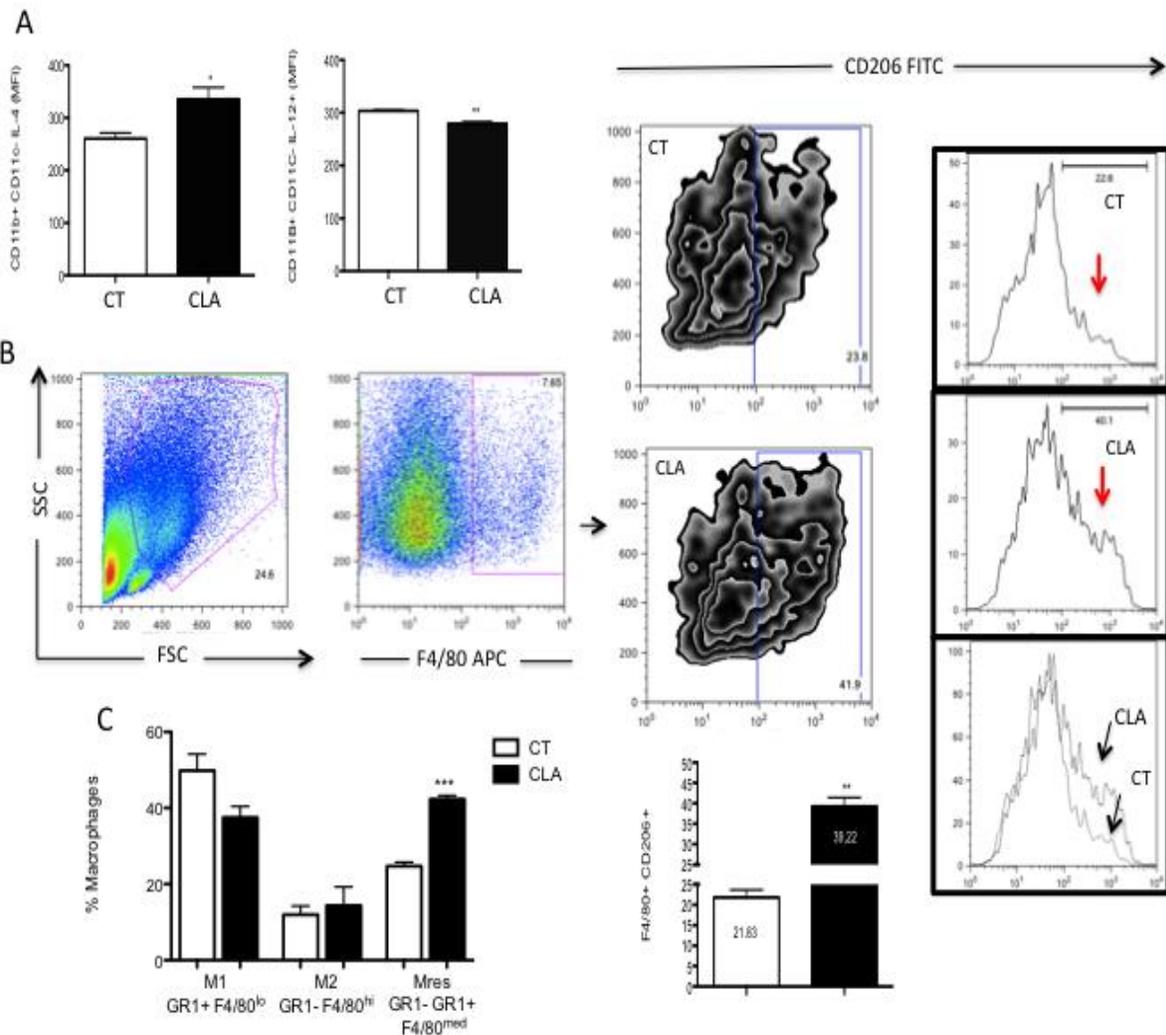


Figura 19: Efeitos da suplementação com CLA sobre a frequência de macrófagos F4/80+ M1 e M2 na lâmina própria colônica. Células da lâmina própria do cólon de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta CLA ou com a dieta controle por 3 semanas foram extraídas e marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos para imunofenotipagem por citometria de fluxo. A) Expressão intracelular das citocinas IL-4 (M2) e IL-12 (M1) em macrófagos CD11b+ CD11c- em intensidade média de fluorescência (MFI). B) Expressão do receptor de manose (CD206) em macrófagos F4/80+ (M2) C) Diferenças na expressão de F4/80 e Ly-6C considerando baixa/low(lo), média/medium(Med) e alta/high(Hi) expressão. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo alimentado com a dieta suplementada com 1% CLA (CLA)/ N=5 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$. Mres= M resolutivo. GR1= Ly6G/Ly-6C. MFI= medium fluorescence intensity

Observa-se, na figura 20 A, que a capacidade do CLA, assim como a Rosiglitazona (RSG), em ativar PPAR- γ foi dose dependente. Na figura 20 E, observa-se que a capacidade do CLA em ativar PPAR- γ é superior à da RSG na dose máxima utilizada de 1mM (dose superior àquela utilizada na literatura para estudos dos efeitos desse agonista de PPAR- γ). Isto mostra que o CLA apresentou capacidade alta para ativar este fator de transcrição.

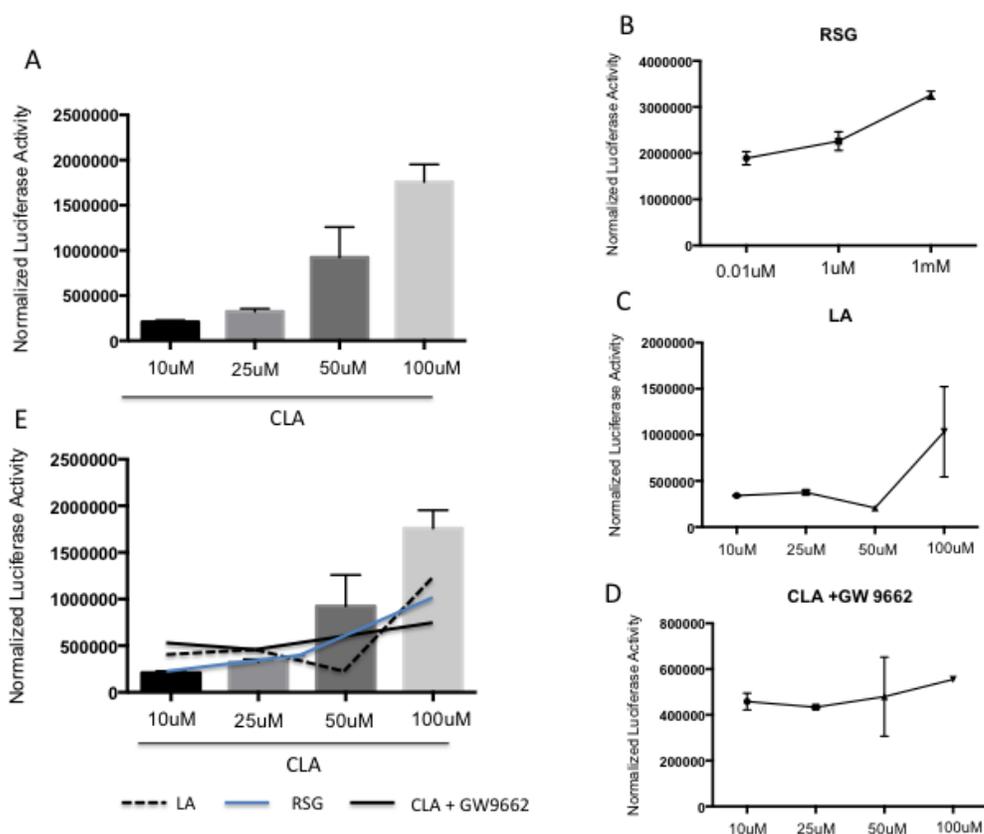


Figura 20. Efeito do CLA sobre a ativação de PPAR- γ . Células AD293T foram transfectadas com polietilenimina PEI e estimuladas com ácido linoléico conjugado (CLA), ácido linoléico (LA) rosiglitazona (RSG) e GW9662. A) Representação gráfica da média \pm o erro padrão da ligação do PPAR- γ de forma dose dependente 10uM, 25uM, 50uM e 100uM de CLA. B) Ligação do PPAR- γ pela rosiglitazona 0.01uM, 1 uM e 1 mM. C) Ligação de PPAR- γ com 10uM, 25uM, 50uM e 100uM ácido linoléico(LA). D) Ligação de PPAR- γ na presença de CLA e de GW9662. E) Gráfico representativo demonstrando os diferentes tipos de tratamento sobre a capacidade de ligação do PPAR- γ . Os pontos e as barras representam a média \pm o erro padrão. As linhas de tendência em E indicam os valores observados em B,C e D. Valores referem-se a triplicatas em experimento representativo N=3

A ativação de PPAR- γ pelo ácido linoléico (LA) não foi dose dependente. Observou-se, principalmente na dose de 100uM, que o CLA ativou PPAR- γ de forma superior ao LA e esse efeito foi abolido na presença do antagonista de PPAR- γ GW9662.

No entanto, não foi possível observar diferenças à nível de expressão gênica de PPAR- γ em cultura de macrófagos peritoneais nem em extrato total do cólon (Figura Suplementar 9).

Não foi possível quantificar PPAR- γ diretamente nos macrófagos presentes no cólon pela dificuldade de obtenção de um número suficiente de macrófagos em amostras murinas de cólon. Todavia, demonstramos que macrófagos estimulados *in vitro* com CLA possuem maior quantidade de PPAR- γ (figura 21) e utilizamos camundongos com sistema LysMCre (LysMCre PPAR $\gamma^{flox/flox}$) em células mielóides para demonstrar que os efeitos do CLA são dependentes de PPAR- γ em macrófagos.

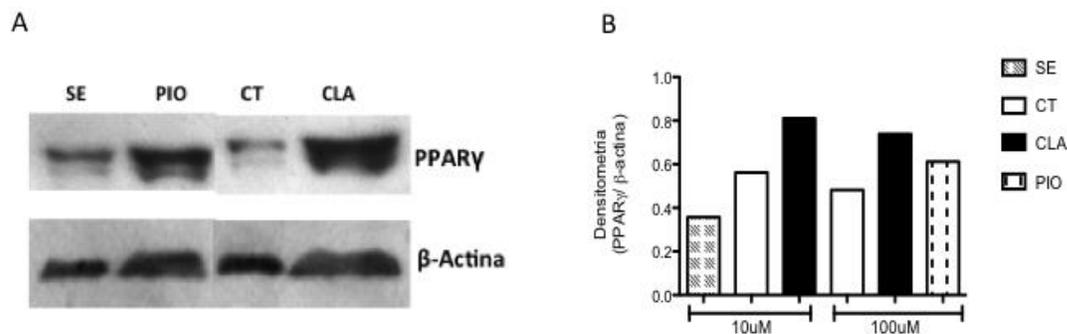


Figura 21: Efeito do CLA sobre o PPAR- γ em macrófagos *in vitro*. Macrófagos peritoneais estimulados em cultura por 24h com 10-100uM óleo de soja + DMSO (CT) , 10-100uM CLA + DMSO (CLA) 100uM pioglitazona (PIO) e não estimulados (SE), foram coletados e lisados para extração de proteínas. Esses extratos proteicos foram analisados pela técnica de *Western-Blot* para marcação e posterior quantificação da proteína PPAR- γ . A) Fotodocumentação demonstrando bandas positivas para PPAR- γ e β -actina. B) Representação gráfica da densitometria PPAR γ / β -actina. Os dados representam valores referentes a um experimento representativo de três experimentos independentes. A barra sombreada representa as células foram estimuladas apenas DMSO (SE), a barra branca representa as células estimuladas com 10 e 100uM de óleo de soja + DMSO (CT), a barra pretas representa as células estimuladas com 10 e 100uM de CLA + DMSO (CLA), a barra pontilhada representa as células estimuladas com 100uM de pioglitazona (PIO).

Para demonstrar que os efeitos do CLA sobre os macrófagos são essenciais ao seu efeito anti-inflamatório e preventivo da colite, utilizou-se camundongos geneticamente manipulados com sistema LysMCre em células mielóides (LysMCre PPAR γ ^{flox/flox}).

Camundongos C57BL/6J e LysMCre PPAR γ ^{flox/flox} receberam dieta contendo 1% CLA ou dieta controle por 3 semanas. Após esse período, os camundongos receberam *ad libitum* uma solução contendo 1,5 ou 3,0% de DSS por 7 dias, sendo a ração comercial mantida nesse período. Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram eutanasiados e a colite avaliada.

Observou-se que o grupo LysMCre PPAR γ ^{flox/flox} suplementado com dieta CLA apresentou os sintomas macroscópicos da doença de forma muito precoce. Após o terceiro dia de oferecimento de DSS, foi possível observar um intenso sangramento e perda de peso. No dia 4 e 5 de tratamento com DSS, foi possível observar óbito nesse grupo experimental. Esses dados mostram que a suplementação com CLA age diretamente em macrófagos da mucosa colônica pela ativação de PPAR γ promovendo efeitos anti-inflamatórios na colite induzida por DSS.

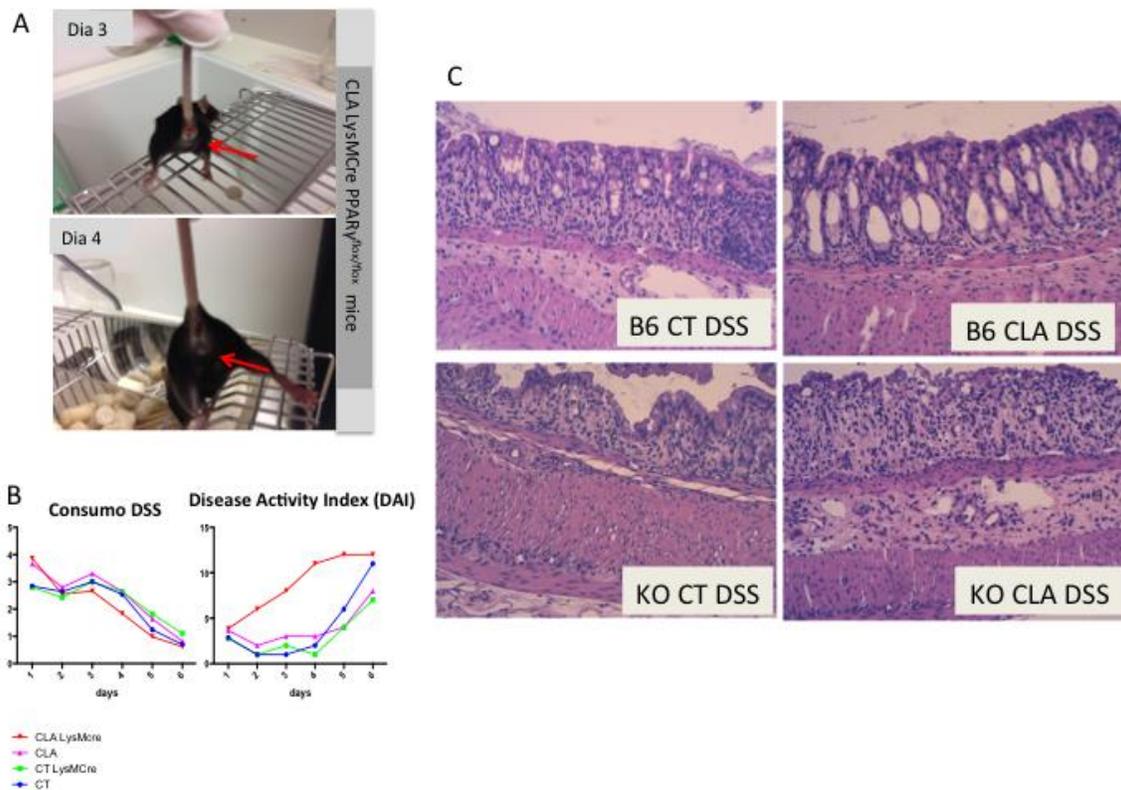


Figura 22: Efeitos da suplementação com CLA sobre a colite experimental em camundongos C57BL/6 e LysMCre PPAR γ ^{flox/flox}. Camundongos C57BL/6 e LysMCre PPAR γ ^{flox/flox} alimentados por 4 semanas com dieta suplementada com CLA e dieta controle foram submetidos à colite experimental induzida por DSS por 7 dias (na terceira semana experimental). A-) fotografias representando prolapso retal no dia 3 de oferecimento do DSS e sangramento retal intenso no dia 4 do oferecimento do DSS em camundongos LysMCre PPAR γ ^{flox/flox} suplementado com dieta CLA. B-) Gráfico do consumo de DSS e índice de atividade da doença (DAI) durante os 7 dias de oferecimento de DSS. C-) Cortes histológicos (H&E) demonstrando infiltrado inflamatório difuso com perda da arquitetura da mucosa colônica na colite induzida por DSS.

O papel de outras células que expressam PPAR- γ , como os enterócitos, e que poderiam ser também moduladas pelo CLA assim como a participação de outros mediadores lipídicos derivados do metabolismo dos ácidos linolêicos, como PGE₂, podem ser vistos nas figuras suplementares 10 e 11.

Sumário dos resultados - Seção I

A suplementação com CLA :

Induz PPAR γ em macrófagos

Aumenta a frequência de macrófagos M2 *in vivo*

Promove ações semelhantes a macrófagos não estimulado *in vitro* – modulando fagocitose e ativação

Reduz monócitos inflamatórios na lâmina própria do cólon durante a colite experimental

Reduz a atividade das enzimas NAG e EPO no cólon na colite experimental

Previne o dano na mucosa e a perda de peso na colite dependente de PPAR γ

Promove a re-epitelização recente e reduz o índice de atividade da doença (DAI).

Reduz a permeabilidade intestinal na colite experimental

Os efeitos do CLA sobre a colite são dependente do fator de transcrição PPAR γ em macrófagos

SEÇÃO II: Viabilidade do uso do CLA como Terapia para DII

Nossos resultados mostram que a suplementação com CLA é capaz de prevenir a inflamação na mucosa em modelos murinos de colite e apresentando, portanto, potencial terapêutico no tratamento das doenças inflamatórias crônicas do intestino (DII).

No entanto, trabalhos em modelos animais têm demonstrado que o CLA pode gerar alguns efeitos relacionados à lipodistrofia, tais como a esteatose hepática e a intolerância a glucose. Esses efeitos seriam consequência do processo oxidativo do CLA e de seus produtos e estariam vinculados principalmente ao isômero *trans*-10, *cis*-12 (Park 2009).

Para avaliar a viabilidade da utilização do CLA como tratamento e prevenção da doença inflamatória crônica, foram realizadas análises bioquímicas sorológicas e avaliação da integridade hepática em camundongos naïve e com colite.

Observa-se, na Figura 23G, que a suplementação com CLA promoveu esteatose hepática (painéis I, II, III e IV) com aumento de colesterol total e triglicérides no soro (Figura 23 B-C).

No entanto, surpreendentemente, observou-se que o processo de esteatose hepática observado em camundongos no estado naïve foi revertido após a instalação da inflamação intestinal. É possível observar na Figura 23 B e C que as alterações no conteúdo de colesterol e triglicérides se modificaram com o desenvolvimento da colite. Não entanto, na Figura 23A, observa-se um aumento da glicose sérica com a doença.

Apesar da esteatose hepática observada no painel II (Figura 23G), não ocorreram alterações na alanina aminotransferase (Figura 23D). O peso do fígado (Figura 23E), o conteúdo de lipídeos hepáticos (Figura 23F) e o grau de degeneração hepática (Figura 23G) estavam aumentados no grupo naïve, mas permaneceram inalterados no grupo de animais com colite.

A reverção do processo de esteatose hepática pela presença da inflamação da mucosa colônica pode ser justificada, em parte, por alterações metabólicas referentes ao gasto energético que acompanha o processo inflamatório, conforme mostrado na Figura 24E onde foi calculada a taxa metabólica pela razão de troca respiratória (VO_2/VCO_2).

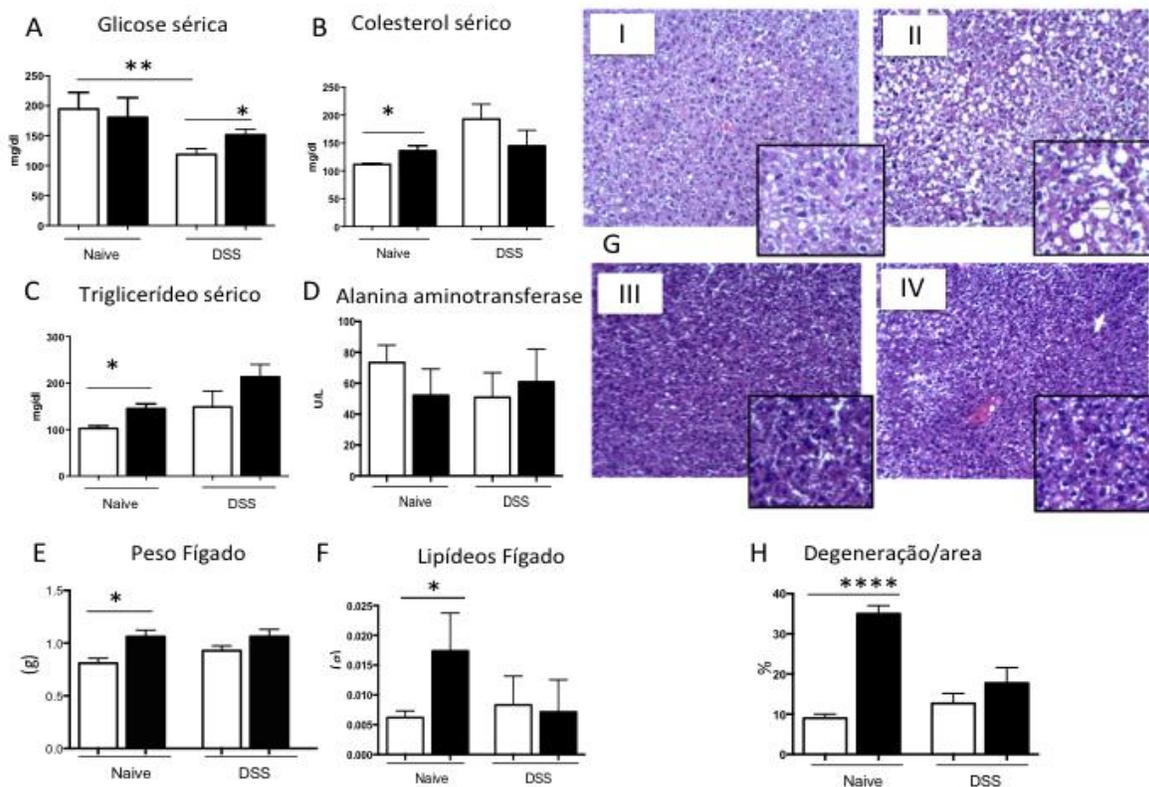


Figura 23: Efeitos do CLA sobre o perfil bioquímico e repercussões no fígado. Camundongos alimentados com dieta contendo 1% CLA ou dieta controle por 3 semanas foram submetidos ao protocolo experimental de indução de colite. Após 7 dias de oferecimento de uma solução contendo 1,5% de DSS, os camundongos foram eutanasiados e amostras de sangue e fígado foram coletados. Camundongos naïve receberam apenas água. Painel I) Amostras de fígado de camundongos suplementados com dieta controle. Painel II) Amostras de fígado representativa de camundongos suplementados com dieta 1%CLA. Painel III) Amostra representativa de amostra de fígado de camundongos que receberam dieta controle e DSS. Painel IV) Amostra representativa de fígado de camundongos que receberam dieta contendo 1% CLA e tratados com DSS. Gráficos representam a média \pm o erro padrão. Foram medidos no soro os seguintes parâmetros bioquímicos: A) glicose; B) colesterol sérico; C) triglicérides; D) Alanina Transaminase. Também foram avaliados parâmetros de dislipidemia: E) peso em gramas(g) do fígado; F) conteúdo de lipídeos extraídos pela técnica de Folch; H) quantificação da área degenerada do fígado pelo acúmulo de lípidos através da análise de espaços vazios pelo Image J. [®] Amostras histológicas coradas em H&E demonstram esteatose hepática após 4 semanas de dieta. N=5 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$.

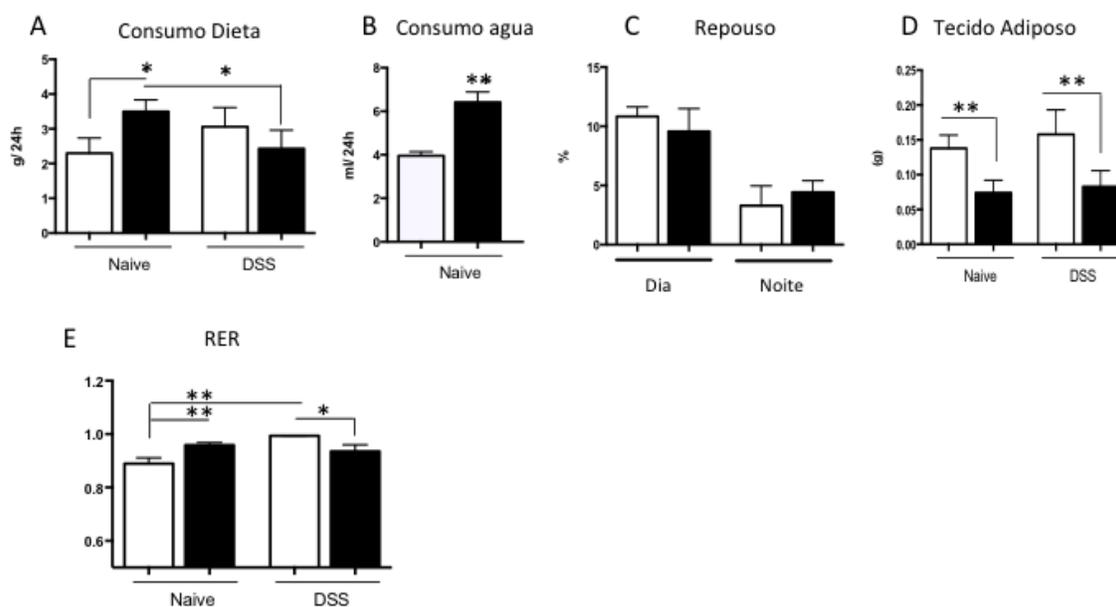


Figura 24: Efeitos do CLA sobre o metabolismo. Camundongos alimentados com dieta contendo 1% CLA ou dieta controle por 3 semanas foram submetidos ao protocolo experimental de indução de colite. Após 7 dias de oferecimento de uma solução contendo 1,5% de DSS, os camundongos foram colocados em câmaras de calorimetria indireta. Camundongos naïve receberam apenas água. Após a coleta de sangue e as medidas metabólicas, os camundongos foram eutanasiados e o tecido adiposo epididimal pesado. A) Consumo de dieta entre os grupos experimentais em gramas por 24 horas. B) Consumo de água em mL por 25 horas. C) Grau de atividade entre os grupos experimentais D) Peso do tecido adiposo epididimal. E) Razão entre a troca respiratória (VO_2/VCO_2). Barras representam a média \pm o erro padrão. N=3 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$

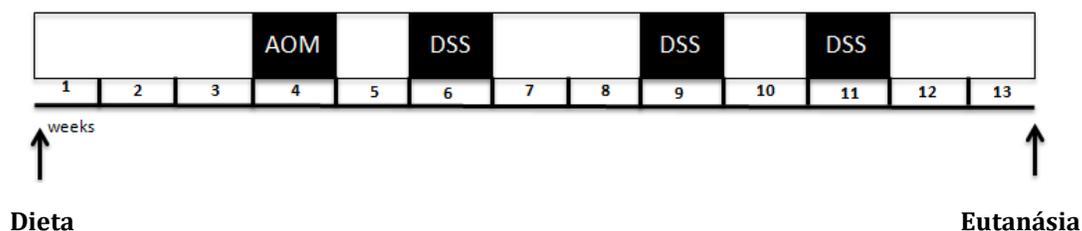
Camundongos alimentados com dieta CLA apresentaram taxa metabólica aumentada (Figura 24E) com aumento do consumo de água e de dieta (Figuras 24A e B) e quantidades reduzidas de tecido adiposo epididimal (Figura 24D) sem alterações na atividade locomotora (Figura 24C)

Com a inflamação intestinal, os camundongos alimentados com dieta contendo 1% CLA consumiram menor quantidade de dieta, continuaram a possuir menos tecido adiposo e utilizaram mais os lipídeos como fonte energética quando comparados aos camundongos do grupo controle que utilizaram preferencialmente carboidratos.

Em conjunto, esses dados sugerem que o uso da suplementação com CLA não se acompanha de esteatose hepática em condições inflamatórias mas não em condições normais.

SEÇÃO III : Efeitos do CLA no adenocarcinoma de cólon

Dadas as propriedades anticarcinogênicas já descritas na literatura para o CLA (Belury 2002) o próximo objetivo foi testar a eficiência desse ácido graxo na prevenção do câncer cólon retal que é a complicação mais grave das doenças inflamatórias crônicas do intestino (DII), principalmente a colite ulcerativa (Munkholm 2003). Para isto, delineamos um protocolo que associa o câncer e a inflamação (adaptado de Wirtz, Neuffer et al. 2007) (conforme esquema abaixo) e reproduz os eventos que acontecem em pacientes com DII.



Ao final do protocolo experimental, os camundongos foram eutanasiados e os tumores corados com corante *Alcian Blue* para visualização, contagem e medição.

A administração de injeção de Azoxymetano (AOM) (10mg/Kg) seguida de três ciclos de administração de DSS se mostrou protocolo eficiente de indução do câncer polipóide. Foi possível obter até 10 pólipos por animal. Os tumores estavam exclusivamente localizados na porção distal e média do cólon.

Surpreendentemente, observamos que o consumo de CLA não prevenia, mas, ao contrário, estava associado a um estímulo ao desenvolvimento do câncer.

Na figura 25B, observamos que o número de tumores foi maior no grupo alimentado com a dieta CLA, independentemente do tamanho do tumor (maior ou menor que 2 mm).

O maior acometimento de tumores no grupo CLA refletiu-se no peso corporal dos camundongos desse grupo experimental. O grupo que recebeu dieta CLA e o protocolo de indução do câncer (grupo AOM CLA) foi o único grupo

experimental a perder peso corporal ao longo do desenvolvimento dos tumores (Figura 26).

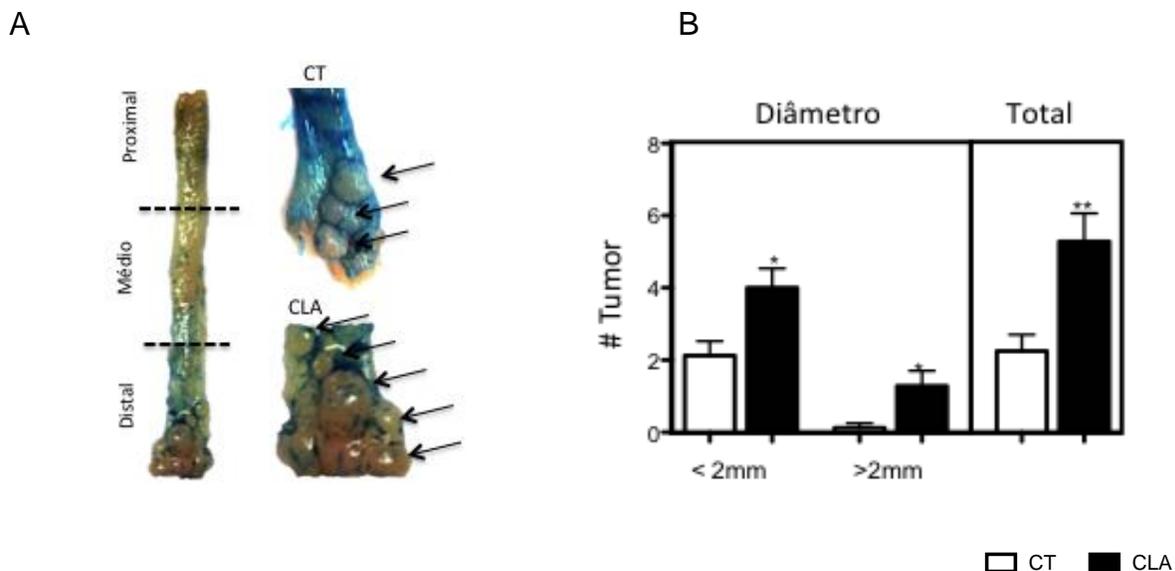


Figura 25: Efeitos do CLA sobre o adenocarcinoma de cólon. A) Foto representativa do adenocarcinoma pólipóide de cólon. Tumores estão localizados principalmente na porção distal do cólon. O tecido foi corado com Alcian Blue para auxiliar na visualização dos tumores. B) Representação gráfica do número de tumores totais e classificados por tamanho em camundongos alimentados com dieta CLA ($6 \pm 2,82$) ou com dieta controle (2 ± 2). As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo experimental alimentado com dieta suplementada com 1%CLA (CLA)/ N=9 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$

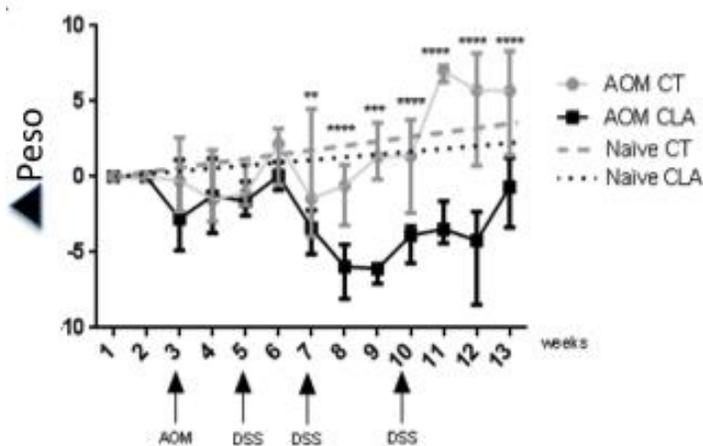


Figura 26: Efeitos do CLA sobre o peso corporal durante o desenvolvimento do adenocarcinoma de cólon. Peso corporal durante as 13 semanas experimentais. Os pontos representam a média \pm erro padrão. As linhas pontilhadas referem-se ao grupo naíve sem tumores. A linha contínua cinza refere-se ao grupo com tumor que recebeu dieta controle, a linha contínua

preta refere-se ao grupo experimental com tumor que recebeu dieta suplementada com CLA. N=9
Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$ *** = $p < 0.0001$.

Os cortes histológicos da mucosa colônica foram avaliados e pontuados de acordo com: alterações epiteliais (hiperplasia e grau de displasia), presença e intensidade do pleomorfismo nuclear, invasão muscular e da camada serosa, presença e intensidade de displasia glandular e intensidade da infiltração na lâmina própria colônica. O escore máximo foi de 14.

Observa-se, na figura 27A, que os camundongos suplementados com CLA tiveram escore histológico compatível com tumores mais invasivos e agressivos. A representação das alterações histológicas observadas nos cortes histológicos podem ser vistas na figura 28.

O número aumentado de tumores e os achados histopatológicos no grupo CLA estavam associadas a uma taxa proliferativa aumentada refletida pelo aumento da frequência de células positivas para a ciclina CDC47+ nos cortes histológicos utilizados no ensaio de imunohistoquímica. (Figura 27B)

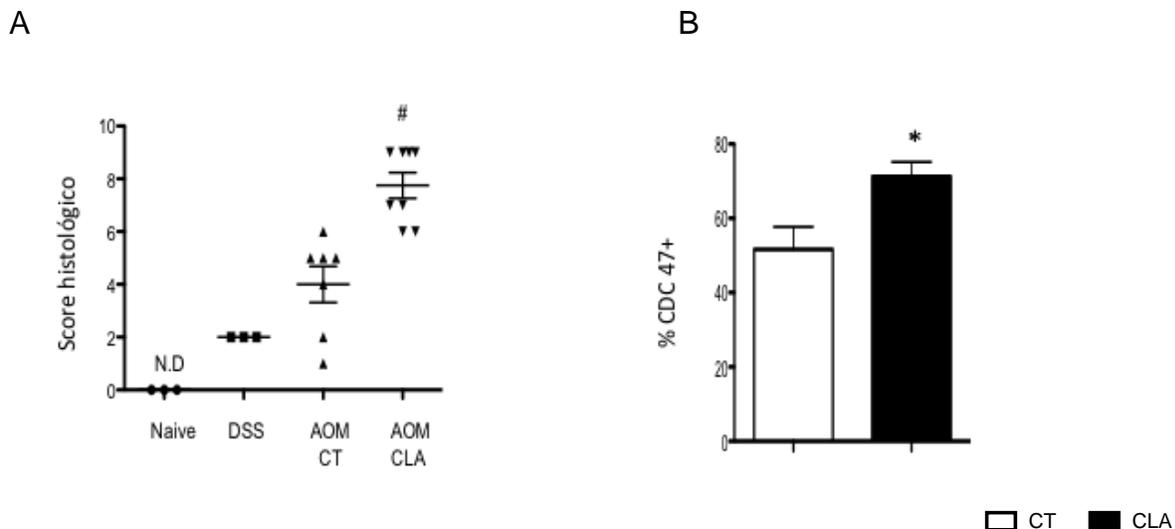


Figura 27: Efeito do CLA no escore histológico e na proliferação celular no adenocarcinoma de cólon. A) As lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram utilizadas para o cálculo do escore de pontos que avaliou a mucosa colônica com relação à displasia epitelial e glandular, ao pleomorfismo nuclear, à invasão e ao infiltrado inflamatório. Os animais do grupo naïve receberam injeção contendo salina. O grupo DSS recebeu injeção de salina e 3 ciclos de DSS. Os animais do grupo experimental AOM receberam injeção de AOM e três ciclos de DSS sendo alimentados pelas dietas CT ou CLA. B) Percentual de células CDC47+ avaliadas por imunohistoquímica. As barras representam a média \pm erro padrão. A barra branca representa o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), a barra preta representa

o grupo experimental que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA)/ N=8 Teste *t* de Student. * ou # = $p < 0.05$.

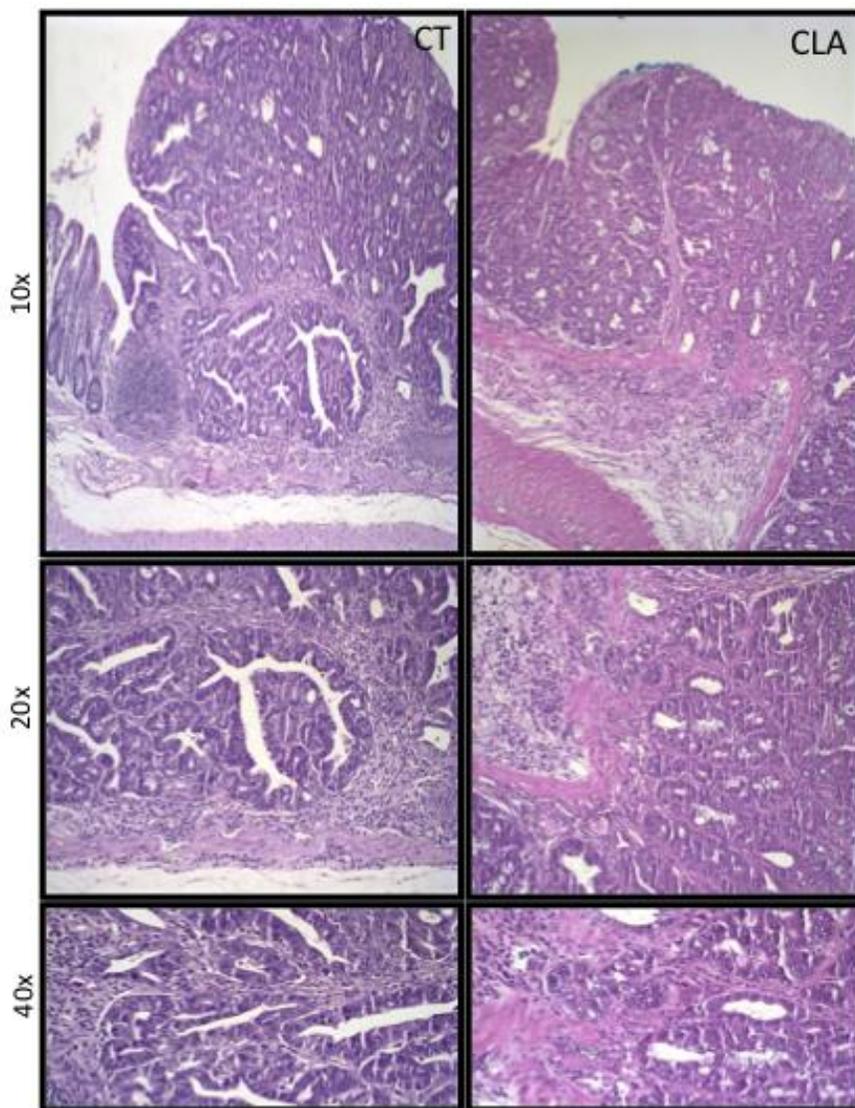


Figura 28: Análise do adenocarcinoma em cortes histológicos corados em H&E. À esquerda: corte histológico de cólon de camundongo suplementado com dieta controle contendo óleo de soja (CT) apresentando múltiplas formações adenomatosas de moderada a discreta displasia associada a discreta atipia e baixa perda de polarização nuclear. À direita: corte histológico de cólon de camundongo suplementado com dieta CLA apresentando lesões sésseis extensas com múltiplas formações adnomatosas e moderada displasia comprometendo a região muscular da mucosa, formando ninhos epiteliais isolados pseudoglandulares. Observa-se moderada atipia nuclear com perda de orientação e polarização nuclear com inúmeras figuras de mitose. Infiltrado inflamatório moderado difuso predominantemente linfoplasmocitóide em ambas as demonstrações. Aumento 10, 20 e 40X.

O efeito pro-tumoral do CLA estava associado ao aumento da citocina TGF- β que ocorreu durante o consumo da dieta e previamente à indução do tumor (figura 29).

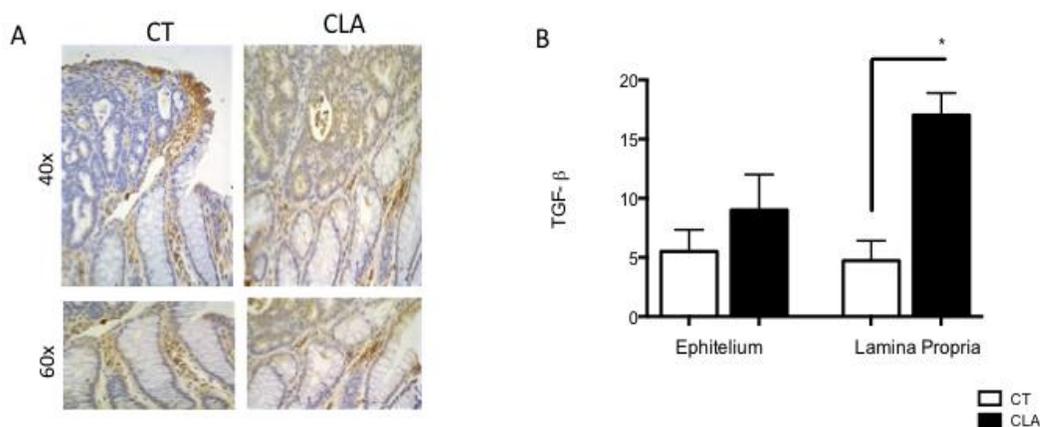


Figura 29: Efeito da suplementação de CLA na produção de TGF- β na mucosa intestinal. Após o oferecimento de 3 semanas de dieta, os camundongos foram eutanasiados e amostras de colon coletadas. Cortes histológicos foram corados com anticorpos anti-TGF- β e analisados pela técnica de Imunohistoquímica (IHC). A) Foto representativa de cada grupo experimental. Aumento 60X e 40X. B) Representação quantitativa da IHC. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo experimental que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA). / N=8 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$. C) Células extraídas de tumor de camundongos suplementados com dieta CLA e controle (CT) foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos e analisados pela técnica de citometria de fluxo para imunofenotipagem.

A produção aumentada de TGF- β pode ser vinculada a dois tipos celulares importantes da imunidade do câncer: linfócitos T com perfil regulador e macrófagos.

Foi possível observar a expansão de células T LAP+ (expressando a forma de membrana de TGF- β) na lâmina própria do colon com a formação do tumor (Figura 30).

Recentemente, Sturr e colaboradores (2014) demonstraram que células T reguladoras LAP+Foxp3- possuem um potencial supressivo cinquenta vezes superior àquele de células T reguladoras Foxp3+ convencionais no

adenocarcinoma humano constituindo, assim, um importante mecanismo de evasão ao tumor das células do sistema imune (Scurr, Ladell et al. 2014).

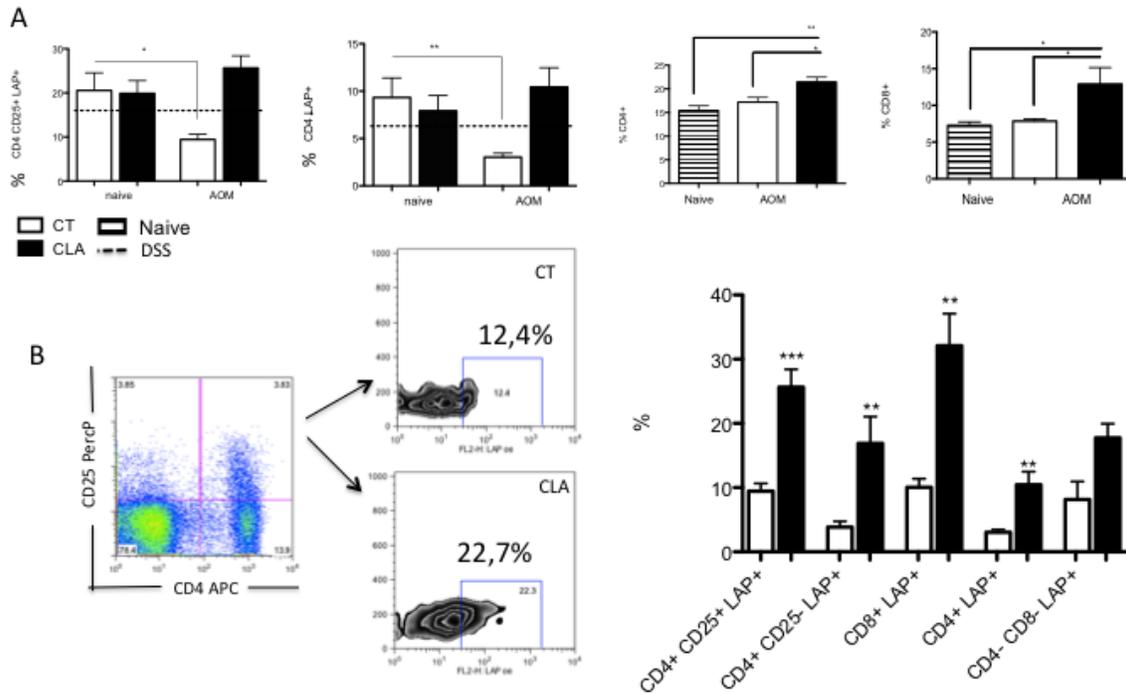


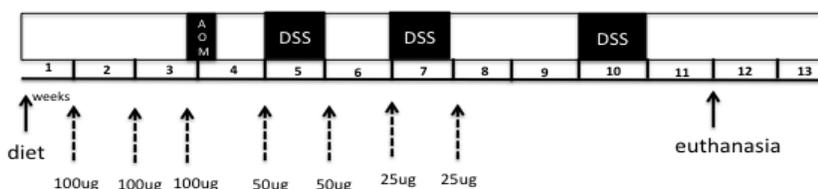
Figura 30: Efeito da suplementação de CLA sobre células T reguladoras expressando TGF- β de membrana (LAP) na lâmina própria de camundongos com adenocarcinoma de cólon. Células da lâmina própria de camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle portadores de adenocarcinoma de cólon e camundongos naïve foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos e analisadas pela técnica de citometria de fluxo para imunofenotipagem. A) Percentual de células T CD4⁺ expressando LAP. B) *Dot-plot* representativo da estratégia de análise de células CD4⁺CD25⁺ expressando LAP. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA). As barras pontilhadas representam o grupo naïve (sem colite e sem adenocarcinoma) alimentado com dieta padrão. A linha pontilhada refere-se ao grupo que recebeu dieta padrão, injeção de salina e 3 ciclos de DSS./ N=8 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$. AOM= grupo que recebeu Azoxyetano e 3 ciclos de DSS.

Após a instalação do cancer, foi possível perceber uma significativa diferença na população de células T LAP⁺ no grupo suplementado com dieta CLA

(Figura 30). A frequência de todos os tipos de células T LAP+ (CD4 e CD8) analisados eram maiores em camundongos alimentados com a dieta CLA.

Não houve diferença entre a frequência de células T LAP+ infiltrantes dos tumores de camundongos dos grupos CT e CLA (suplementar 12). Esse resultado foi confirmado pela imunohistoquímica, onde observamos a localização da expressão de TGF- β exclusivamente na lâmina própria e no epitélio e não no infiltrado celular associado aos tumores (Figura 29).

Para demonstrar a importância dos efeitos das células LAP+ induzidas por CLA no desenvolvimento do câncer, camundongos C57BL/6 receberam injeções intraperitoneais de um anticorpo monoclonal anti-LAP ao longo do protocolo de indução do câncer em diferentes concentrações conforme esquema a seguir:



Após o período experimental, os camundongos que receberam o anticorpo anti-LAP foram sacrificados e a formação do tumor avaliada (contagem e medição).

Observou-se que a administração do anticorpo anti-LAP reverteu o processo pro-tumoral observado no grupo que recebeu a dieta CLA. O número de tumores foi significativamente reduzido (Figura 31A). Nos cortes histológicos, observa-se destruição de mucosa, por vezes apresentando re-epitelização, associado a intenso infiltrado inflamatório difuso formando centros linfóides germinativos em moderada quantidade. Houve redução das alterações displásicas/ neoplásicas em todos os animais tratados com o anticorpo anti-LAP (Figura 31B).

Não houve diferenças histológicas entre camundongos alimentados com dieta CLA e com dieta controle que receberam o tratamento com o anticorpo anti-LAP (Figura 31B). Não foi possível observar diferenças na frequência de células Treg LAP+ entre os grupos experimentais que receberam o anticorpo anti-LAP ao

final do protocolo experimental (dado não mostrado) confirmando a eficiência do tratamento com o anticorpo.

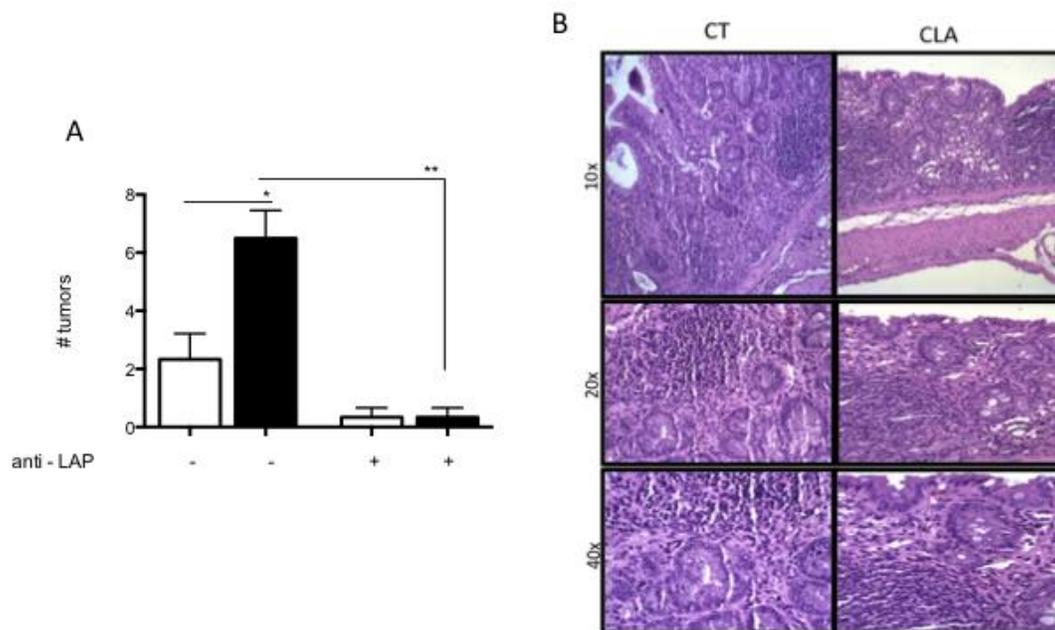


Figura 31: Efeito da administração de anticorpo anti-LAP no adenocarcinoma de cólon. Camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle (CT) receberam injeções intraperitoneais em diferentes concentrações e momentos do anticorpo anti-LAP (TW7-16B4) ou injeções de salina. Ao final das 13 semanas experimentais, os camundongos foram eutanasiados e a formação do tumor avaliada A) Número de tumores nos animais do grupo que recebeu o tratamento com o anticorpo anti-LAP e o grupo que recebeu tratamento com salina. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo experimental que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA) N=3 Teste *t* de Student * = $p < 0.05$. Os tumores avaliados tinham $< 2\text{mm}$. B) Cortes histológicas (coloração H&E) de amostras de cólon de camundongos que receberam dieta experimental e anticorpo anti-LAP durante o protocolo experimental de indução de câncer coloretal. (Aumento 10x, 20x e 40x)

A figura 31 mostra que a neutralização do TGF- β pelo tratamento com o anticorpo anti-LAP aboliu os efeitos do CLA sobre a expansão das célula Treg LAP+ e assim reverteu os efeitos do CLA sobre o desenvolvimento do câncer.

Para melhor compreender os mecanismos pelos quais o CLA foi capaz de induzir células Treg LAP+, realizamos ensaio *in vitro* com células T CD4+ naïve separadas por *cell sorter* e estimuladas com diferentes concentrações de CLA.

Nesse ensaio, constatamos que o CLA foi capaz de induzir a diferenciação das células T CD4+ naíve em células T CD4+ LAP+ (nas concentrações de 10 e 50uM de CLA) (Figura 32).

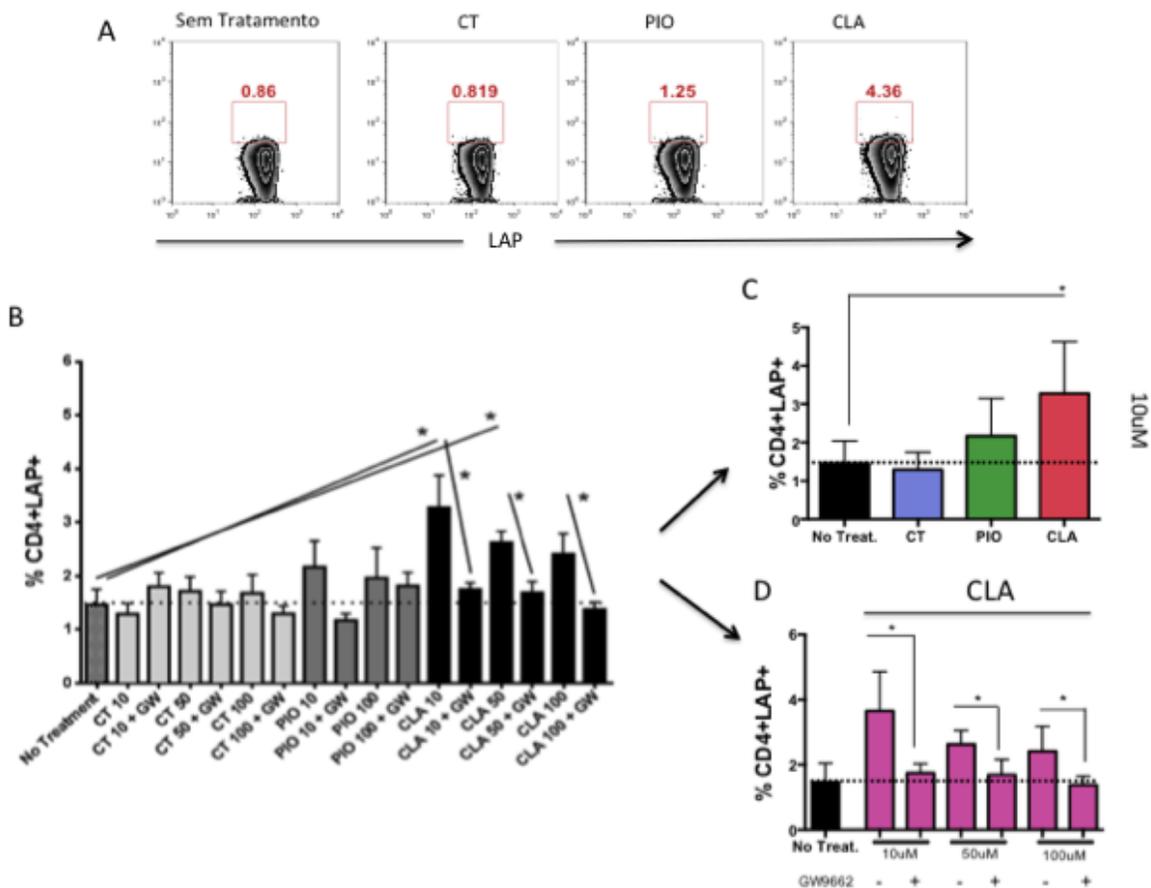


Figura 32: Efeito da estimulação de células T CD4+ naíve com CLA em cultura sobre a geração de células Treg LAP+ e a participação de antagonistas de PPAR- γ (GW9662) no processo. Células T CD4+ naíve separadas por citometria (*cell sorter*) foram colocadas em cultura na presença de 10, 50 e 100uM de CLA (+DMSO), de óleo de soja (CT)(+DMSO) ou de 10 e 100uM de pioglitazona (PIO) por 24 horas. Para cada condição experimental, adicionou-se 0 e 10uM de um antagonista de PPAR- γ (GW9662). Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos para análise por citometria de fluxo. A) Dot-plots representativos da geração de células T CD4+LAP+. B) Representação gráfica do percentual de células CD4+LAP+ em todas as condições experimentais. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras cinza claro representam as células estimuladas com óleo de soja (+DMSO) As barras cinza escuro representam as células estimuladas com agonista de PPAR- γ . As barras pretas representam as células estimuladas com CLA + DMSO. GW= GW9662. C) Representa os resultados com a dose 10uM para os estímulos. D-) Demonstra efeito do agonista de PPAR- γ (GW9662) sobre os efeitos do CLA (em diferentes doses) e sobre a geração de células CD4+LAP+. Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$.

É possível observar, na Figura 32D, que a utilização de antagonistas de PPAR- γ (GW9662) reverteu o efeito do CLA sobre a indução de células T CD4+ LAP+. Assim, os efeitos da estimulação de CLA sobre a indução de células Treg LAP+ foi dependente da ativação do fator de transcrição PPAR- γ .

Embora os efeitos do CLA diretamente nas células T reguladoras sejam promissores e sugestivos, principalmente devido ao fato de as células LAP+ serem as células reguladoras mais importantes no câncer de colon, não é possível garantir que todo o TGF- β induzido pelo CLA tenha sido produzido unicamente por linfócitos T. Hipotetizamos que o efeito indutor de TGF- β diretamente pelo CLA via fator de transcrição PPAR- γ ocorreu também em outros tipos celulares como os macrófagos e enterócitos que expressam grandes quantidades de PPAR- γ quando ativados por CLA (conforme demonstrado neste trabalho).

Já demonstramos na figura 25 que o CLA polarizou macrófagos da lamina própria do intestino para um perfil anti-inflamatório na ausência da patologia. Após a indução do câncer, o número de macrófagos na lâmina própria estava aumentado e estes expressavam mais TLR4 (Figura Suplementar 13). Camundongos geneticamente deficientes em TLR4 não desenvolvem adenocarcinoma de cólon e os níveis elevados de TLR4 encontrados em biópsias de pacientes se associam a um mau prognóstico (Cammara, Bertolini et al. 2010).

Assim, ressaltamos que os efeitos do CLA sobre o adenocarcinoma não devem ser justificados apenas pela ação do CLA diretamente sobre os linfócitos T reguladores. A presença de macrófagos ativados por PPAR- γ com perfil anti-inflamatório induzidos pelo consumo de CLA sugere forte participação dessas células na supressão da imunidade anti-tumor.

Observa-se, na Figura 33, que, assim como nos linfócitos T, o CLA induz TGF- β em macrófagos de forma PPAR- γ dependente.

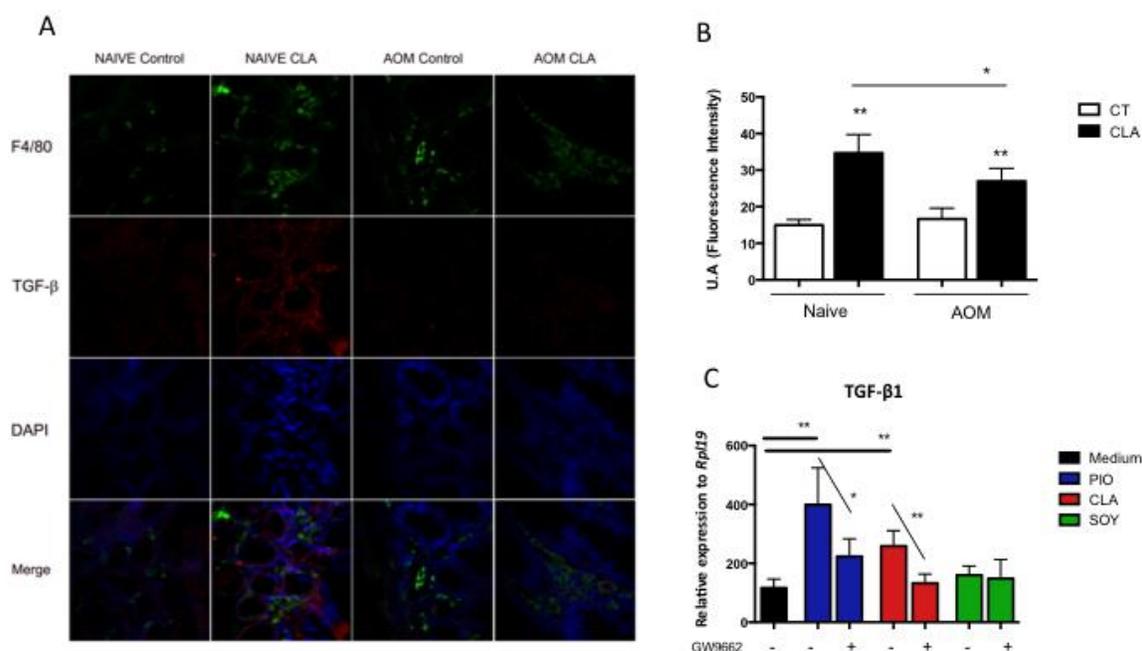
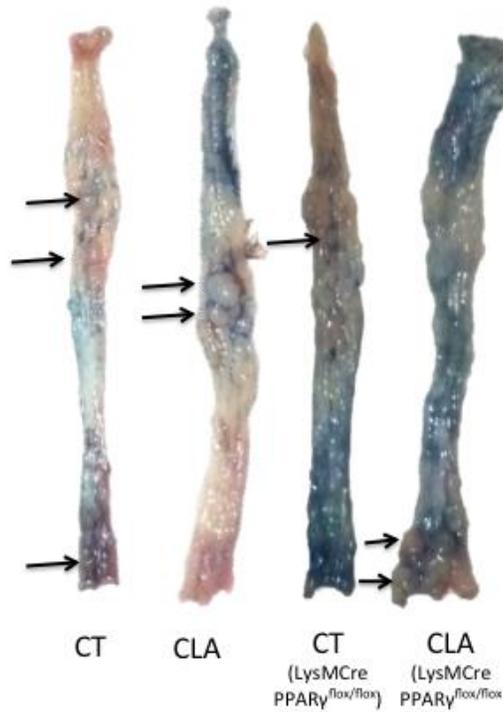


Figura 33: Efeitos do CLA sobre a produção de TGF-β por macrófagos. A) Camundongos C57BL/6 que consumiram dieta contendo CLA ou dieta controle foram sacrificados após 21 dias de suplementação (tempo referente ao início do protocolo de indução de CRC) e após 13 semanas de suplementação. Amostras de colon foram marcadas com anticorpos fluorescentes para F4/80 e TGF-beta e observados em microscópio co-focal. B) Quantificação da fluorescência observada em A através da análise por Image J ®. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA). / N=5 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$. C) Macrófagos peritoneais foram colocados em cultura na presença de CLA, óleo de soja ou pioglitazona, contendo ou não o antagonista de PPAR- γ GW9662 por 24h. As barras representam a média \pm erro padrão referente a medida da expressão gênica do TGF-beta1 (RT-PCR). A barra preta representa o grupo experimental que recebeu apenas meio de cultura contendo DMSO, barras azuis referem-se às células estimuladas com pioglitazona (PIO), barras vermelhas referem-se a células que receberam 100uM de CLA e barras verdes referem-se às células estimuladas com óleo de soja (CT). N=5 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$

Para testar a importância de macrófagos ativados por PPAR- γ no modelo de adenocarcinoma de cólon, camundongos seletivamente deficientes em PPAR-g em células mielóides (portadores do sistema LysMCre-PPAR γ em células mielóides) foram submetidos ao protocolo de indução de CRC.

A



B

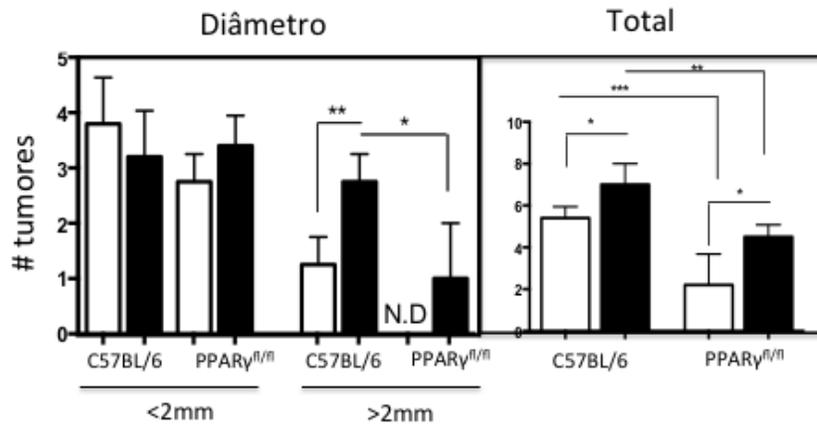


Figura 34: Efeitos do CLA no adenocarcinoma de cólon em camundongos LysMCrePPAR $\gamma^{flox/flox}$. A) Foto representativa do adenocarcinoma pólipóide de cólon. Tumores estão localizados principalmente na porção distal e média do colon. O tecido foi corado com Alcian Blue para auxiliar na visualização dos tumores. B-) Representação gráfica do número de tumores totais e classificados por tamanho em camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle em camundongos C57BL/6J e LysMCre PPAR $\gamma^{flox/flox}$. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo experimental alimentado com dieta suplementada com 1%CLA (CLA)/ N=4 Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$.

Foi possível observar que o tamanho dos tumores e número de tumores no grupo CLA é superior aquele encontrado no grupo controle e que, nos camundongos LysMCre-PPAR γ ^{fl/fl}/flox, o tamanho e número dos tumores é reduzido, indicando um tumor menos agressivo. Sendo assim, a participação de PPAR- γ nos macrófagos anti-inflamatórios demonstrou-se fundamental para formação de tumores de colon (figura 34).

Constatou-se, portanto, que o efeito anti-inflamatório do CLA ao induzir linfócitos T reguladores e macrófagos anti-inflamatórios, resulta em um efeito do tipo “faca de dois gumes” que, por um lado, previne a colite mas, por outro, exerce efeito pro-tumoral utilizando o mesmo agente inflamatório.

Sumário dos resultados - Seção II

A suplementação com CLA aumentou o número de tumores no modelo de CRC.

Camundongos suplementados com CLA perderam mais peso que animais que receberam dieta controle no CRC experimental.

A suplementação com CLA aumentou a proliferação e promoveu escore histológico desfavorável no CRC com maior agressividade tumoral.

No CRC, observou-se uma expansão significativa de células T LAP+ no grupo tratado com CLA.

A neutralização do efeito do CLA sobre a expansão de células Treg LAP+ reverteu a sua ação pro-tumoral.

O efeito do CLA sobre a expansão de célula Treg LAP+ foi dependente de PPAR- γ .

A suplementação de CLA induziu macrófagos produtores de TGF- β também dependente de PPAR- γ .

Camundongos deficientes em PPAR- γ nas células mielóides apresentam formação reduzida de tumores.

6- DISCUSSÃO

A utilização de nutrientes e nutracêuticos na prevenção e melhora de doenças crônicas tem se demonstrado eficiente e a suplementação dietética desses compostos já é uma realidade na prática clínica (Faria, Gomes-Santos et al. 2013). Pesquisas recentes relacionando a suplementação de CLA com a melhora do perfil imune e inflamatório nos incentivaram a investigar o papel desse ácido graxo nas doenças inflamatórias intestinais (DII) e no câncer colorectal (CRC).

Apesar de muito estudadas, as Doenças Inflamatórias Intestinais ainda permanecem marcadas pela imprecisão diagnóstica e o seu tratamento ainda é basicamente restrito a utilização de drogas antiinflamatórias e imunossupressores que apresentam importantes efeitos colaterais. Além disso, na prática clínica, o que se observa é uma baixa frequência de adesão ao tratamento e uma falta de resposta à terapia convencional, indicando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Bouma and Strober 2003).

No presente estudo, investigamos os efeitos da suplementação com CLA na colite ulcerativa experimental induzida pelo DSS.

Segundo Melgar e colaboradores (2008) esse modelo de colite induzida por DSS constitui um dos modelos mais frequentemente utilizados, provavelmente devido à conveniência de uso, baixo risco de mortalidade quando comparado com o modelo por TNBS (Melgar, Karlsson et al. 2008). Aproximadamente um terço das pesquisas com colite utilizam este modelo (Viennois, Chen et al. 2013). Embora nenhum dos modelos experimentais disponíveis reproduza todas as características da doença humana, alguns se assemelham em vários aspectos à CU outros têm mais similaridades com a DCh. O modelo de colite induzido por DSS apresenta muitas semelhanças com a colite ulcerativa além de ser um bom modelo para o estudo de alterações inflamatórias do epitélio intestinal (Perse and Cerar 2012).

Uma vez que se foi proposta a utilização de CLA de forma suplementar à alimentação, o primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se os camundongos suplementados com CLA continham, de fato, valores elevados de CLA em seus

tecidos. Para isso, obtivemos amostras de fígado. A suplementação com 1% de CLA foi suficiente para aumentar em até 7 vezes o conteúdo de CLA no fígado dos animais. Assim, mostrou-se que a quantidade de CLA oferecida na dieta e consumida pelos camundongos era suficiente para suplementar os camundongos experimentais. Assim sendo, foi testada, a seguir, os efeitos da suplementação com CLA no modelo experimental de colite induzida por DSS.

A suplementação com 1% de CLA por 3 semanas foi suficiente para prevenir o dano da mucosa intestinal no modelo de colite por DSS. A análise de cortes histológicos demonstraram um infiltrado inflamatório e edema reduzido. Além disso, foi possível observar que a suplementação de CLA acelerou o processo de reepitelização. O papel de enterócitos ativados por PPAR- γ neste processo é sugestivo, no entanto, ainda não é possível dizer os efeitos do CLA sobre este processo. Existem evidências de que a ativação de PPAR- γ regule as funções das *tight-junctions* e assim a função da barreira (Varley, Garthwaite et al. 2006, Ogasawara, Kojima et al. 2010). Nossos dados ainda se engajam em um cenário preliminar. Todavia, hipotetizamos que os efeitos do CLA sobre a colite estejam relacionadas também ao seu papel sobre enterócitos. Trabalhos utilizando células CACO-2 demonstram que o CLA modula várias funções no epitélio (Roche, Terres et al. 2001, Jewell, Cusack et al. 2005).

Os resultados obtidos na análise microscópica da colite corresponderam aos dados macroscópicos. Surpreendentemente, os camundongos que receberam CLA mantiveram seu peso corpóreo enquanto que os camundongos que receberam dieta controle perdem em torno de 4% do peso corpóreo ao final do protocolo de indução da colite. A perda de peso é uma das características mais comuns de pacientes portadores de DII sendo que 20 a 75% dos pacientes adultos apresentam perda de peso exarcebada (Dieleman and Heizer 1998). Como a suplementação com CLA promove uma redução do peso em camundongos já bem descrita na literatura (Park e Pariza, 2001; Peters et al., 2001; Cordero et al., 2010; Jaudszus et al., 2010; Kanaya e Chen, 2010; Parra et al., 2010; Racine et al., 2010), hipotetizamos que os animais do grupo experimental que recebeu dieta CLA e DSS apresentariam perda de peso exarcebada. No entanto, a prevenção da

doença demonstrou-se eficaz ao ponto de prevenir a perda de peso. Esse dado demonstra efeitos surpreendentes do CLA nos aspectos macroscópicos da doença.

Outro efeito surpreendente do CLA durante o desenvolvimento da colite experimental foi que a doença inflamatória intestinal preveniu a esteatose hepática observada em camundongos naïve após a administração da dieta suplementada com CLA. Segundo Park, a redução da deposição de gordura e o aumento da lipólise nos adipócitos somada a um aumento da oxidação de ácidos graxos pode gerar um processo esteatótico importante (Park 2009). A esteatose hepática não alcoólica é uma doença que atinge cerca de 20 a 30% da população mundial e pode causar cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Nascimento et al., 2010).

Existem na literatura algumas hipóteses para o fenômeno de esteatose hepática observada mediante suplementação de CLA. Segundo alguns autores, o CLA seria o responsável por diminuir a atividade da *stearoyl coenzyme A desaturase* (SDC), agindo de forma a reduzir a expressão mRNA e/ou atividade catalítica dessa enzima em animais ou em modelos de células animais (Lee, Pariza et al. 1998, Choi, Park et al. 2001). Klingenberg e colaboradores (1995) mostra que estudos prévios já haviam indicado que a composição dietética da dieta seria suficiente para alterar a atividade da enzima SCD (Klingenberg, Knabe et al. 1995)

A *Stearoyl-coenzyme A desaturase 1* (SDC) é uma delta-9 desaturase de ácido graxos, que catalisa a síntese de ácidos graxos monoinsaturados e têm sido reconhecida como um regulador chave do metabolismo (Miyazaki, Flowers et al. 2007). Camundongos deficientes para isoforma SCD1 apresentam adiposidade reduzida, aumento do gasto energético e aumento da expressão de vários genes de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos no fígado (Dobrzyn, Dobrzyn et al. 2004).

A redução da atividade da SDC poderia explicar em partes, o acúmulo de lípidos no fígado desses animais ocasionado a esteatose hepática não alcoólica observada (Ntambi, Miyazaki et al. 2002)

Surpreendentemente, após a instação da inflamação intestinal, o processo de esteatose hepática encontrado nos camundongos suplementados com CLA foi revertido.

Existem evidências de que o DSS em si produza efeitos sobre a função hepática, uma vez que a presença desse polímero pode ser detectada no órgão após a administração oral do fármaco (Kitajima et al., 1999; Karlsson et al., 2008; Oz et al., 2010). Oz e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento de animais com DSS está relacionado a alterações das concentrações hepáticas de antioxidantes endógenos (Oz et al., 2010). O conteúdo do anti-oxidante intracelular glutathiona (GSH) e de alguns de seus precursores estaria, assim, aumentado na colite induzida por DSS. Segundo Ono e colaboradores (2010) a presença de ácidos graxos livres e não a de triglicerídeos, gera lipotoxicidade e a esteatose hepática não alcoólica pelo excessivo estress oxidativo (Ono, Okamoto et al. 2010). Assim, o aumento do conteúdo anti-oxidante pelo acúmulo de DSS poderiam se associar a prevenção da esteatose hepática.

Outra hipótese para justificar o efeito da inflamação intestinal sobre o acúmulo de lípidos no fígado seria a alteração metabólica observada na colite. Segundo Melgar e colaboradores (2007), na fase aguda da doença induzida por DSS, camundongos passam a utilizar os lipídeos como a fonte principal de energia (Melgar et al., 2007). Assim, o processo inflamatório agudo em si, poderia auxiliar na redução da esteatose hepática não alcoólica pelo uso intensificado de lipídeos como fonte energética. No nosso trabalho, observamos que durante a fase aguda da doença, há um aumento das taxas respiratórias no grupo que recebeu dieta controle sugerindo a utilização de carboidratos como fonte energética, enquanto que, no grupo suplementado com CLA, a utilização de lipídeos pareceu ser preferencial. Esse dado poderia justificar também a reversão do processo de esteatose hepática no grupo CLA. Outros fatores como uma possível malabsorção devido ao processo diarréico encontrado nesse modelo também devem ser considerados como relevantes para o efeito encontrado (Barkun, Love et al. 2013).

Não há trabalhos publicados na literatura que demonstrem alterações metabólicas causadas pelo CLA na colite. Os trabalhos concentram-se apenas nos efeitos do CLA sobre o metabolismo no estado naïve. Nossos resultados mostraram que camundongos naïve suplementados com CLA possuem taxas aumentadas de troca respiratória e esse dado está de acordo com outros estudos publicados justificando o processo de perda de peso ou menor ganho de peso em camundongos suplementados com CLA (West, Delany et al. 1998). Ohnuki e colaboradores (2001) demonstraram que a suplementação com menos de 0.25% de CLA foi suficiente para aumentar o gasto energético e diminuir a quantidade de tecido adiposo branco em ratos (Ohnuki, Haramizu et al. 2001).

Esse efeito benéfico da inflamação sobre um efeito colateral do CLA indica duas conseqüências importantes. A primeira é que a sua utilização no tratamento da DII seria, então, viabilizada já que os efeitos sobre o fígado seriam mínimos quando se avalia a extensão dos benefícios sobre a colite. Além disto, o tratamento da esteatose hepática é possível (de Oliveira et al., 2008^a; de Oliveira et al., 2008^b; Ferreira et al., 2008; Khokhar e Lewis, 2010). A segunda conseqüência seria um alerta sobre a utilização da suplementação com CLA em condições fisiológicas nas quais, não havendo um processo inflamatório em andamento, esses lipídeos se acumulariam no fígado produzindo a esteatose. Este seria um efeito colateral grave do consumo de CLA com propósitos de perda de peso.

No entanto, mesmo nesse caso, algumas considerações devem ser feitas com relação ao uso do CLA em humanos. Segundo alguns autores, o efeito de lipodistrofia do CLA seria mais pronunciado em camundongos do que ratos e esse evento seria temporário e reversível pela interrupção do tratamento (O'Hagn e Menzel, 2003; Park et al., 2005). Além disso, triagens clínicas publicadas não relatam mudanças da função hepática em humanos suplementados com CLA mesmo na ausência da patologia. Blankson e colaboradores (2000) administraram um mix dos isômeros de CLA em homens e mulheres nas doses de 1,7-6,8g/d por 12 semanas. Níveis de alanina transaminase (ALAT), asparatato amino transferase (ASAT) e gama glutamil transferase (gama-GT) não foram afetados pelo tratamento (Blankson, Stakkestad et al. 2000). Outros autores, em estudos

similares, relatam que a administração de CLA em humanos por três, quatro, seis ou 12 semanas não resulta em efeitos clinicamente relevantes em marcadores de função hepática e renal dos voluntários (Lowery et al., 1998; Berven et al., 2000; Kreider et al., 2002; Wanders et al., 2010). Em um trabalho conduzido na Universidade Federal de Minas Gerais estudando a suplementação de mulheres com sobrepeso com CLA por 4 semanas, nenhuma alteração hepática foi observada (Fialho et al., 2013) (anexo)

Os efeitos da suplementação com CLA na colite experimental demonstra que o CLA é um lipídeo com propriedades anti-inflamatórias capazes de prevenir o dano da mucosa intestinal na colite e que esse ácido graxo apresenta um potencial terapêutico para as doenças inflamatórias intestinais.

No modelo de colite induzida por DSS, a participação de macrófagos ativados por PPAR- γ nos efeitos do CLA é fundamental. Mostramos neste trabalho que a suplementação de CLA induz um perfil anti-inflamatório M2 em macrófagos colônicos. Além disto, em cultura de macrófagos peritoneais, foi possível demonstrar que o CLA ativa PPAR- γ . Ao utilizar camundongos com deficiência seletiva de PPAR- γ em células mielóides (LysMCre PPAR $\gamma^{\text{flox/flox}}$), demonstramos que o efeito do CLA na colite não foi somente relacionado, mas também dependente de PPAR- γ expresso em macrófagos. Esses resultados estão em concordância com estudos publicados pelo grupo de Bassaganya-Riera (Bassaganya-Riera and Hontecillas 2006, Evans, Misyak et al. 2010).

A associação entre o fator de transcrição PPAR- γ e os efeitos do CLA podem ser melhor estudadas com o uso de técnicas de sequenciamento. Desta forma, será possível identificar a participação de outros fatores de transcrição e de outros genes relacionados ao PPAR- γ no efeito anti-inflamatório desse lipídeo.

Mostramos ainda, nesse trabalho, que a suplementação com CLA ao induzir um perfil anti-inflamatório em células imunes (macrófagos) foi capaz de prevenir a colite, mas também teve um efeito estimulador da formação de tumores do cólon.

Existe uma relação importante entre a inflamação e o câncer extensivamente discutida na literatura e que certamente fundamenta os resultados obtidos neste trabalho. O microambiente de cada tipo de tumor e suas

particularidades devem ser criteriosamente considerados, principalmente se tratando de tumores de alta complexidade como aqueles relacionados ao intestino e seu tecido linfóide (Chen and Mellman 2013).

Vários trabalhos têm demonstrado a presença de populações de células inflamatórias e de células T reguladores em tecidos tumorais incluindo os de intestino. A presença de certas populações imunes, principalmente de células T reguladoras e macrófagos anti-inflamatórios, em detrimento de células inflamatórias efetoras estão relacionadas ao prognóstico de variados tipos de câncer. Considerando o microambiente geral do câncer, a inibição de células importantes na resposta anti-tumoral, tais como os linfócitos T citotóxicos e as células NK, por linfócitos T reguladores e macrófagos associados a tumores (TAMs) (polarização M2), assegura o desenvolvimento do tumor (Nishikawa and Sakaguchi 2014).

Mostramos neste trabalho, pela primeira vez, que o CLA induz a produção da citocina TGF- β via PPAR- γ em dois tipos celulares importantes na imunidade anti-tumoral (células T reguladoras e macrófagos). A hipótese central é a de que a indução de células Treg e macrófagos anti-inflamatórios produtores de TGF- β assegurem a formação do tumor por (1) suprimir uma resposta efetora anti-tumoral e (2) pelos efeitos diretos da citocina no crescimento tumoral.

A indução de TGF- β a nível de expressão gênica pela suplementação de CLA já foi demonstrada (Bassaganya-Riera, Reynolds et al. 2004), mas nenhuma associação com o desenvolvimento de câncer havia sido feita até o momento.

A participação da citocina TGF- β na formação de tumores é clara devido principalmente a suas funções no crescimento e ciclo celular já bem descritas na literatura (Biswas, Guix et al. 2007). No caso específico do câncer de cólon, vários autores já demonstraram que os níveis plasmáticos e teciduais de TGF- β 1 em pacientes com CRC estão aumentados e esse aumento está associado ao aparecimento precoce de metástases e a um mau prognóstico (Shariat, Kim et al. 2001, Wojtowicz-Praga 2003). Muitos tipos de células tumorais apresentam receptores de TGF- β (Biswas, Guix et al. 2007).

Demonstramos neste trabalho a participação de TGF- β em uma população

de células Treg particular que possui a forma latente de membrana da citocina (LAP). Conforme mencionado anteriormente, um trabalho recentemente publicado, demonstrou que essa população de Treg (LAP+ Foxp3-) está associada especialmente ao tumor de cólon por exercer função supressora muito superior as Treg convencionais Foxp3+ (Scurr, Ladell et al. 2014). A neutralização da expansão desse tipo celular no grupo suplementado com CLA pela utilização *in vivo* de um anticorpo anti-LAP aboliu os efeitos do CLA na formação do tumor.

Ao utilizar camundongos que não possuem PPAR- γ em células mielóides, observamos também um redução do efeito pro-tumoral do CLA, demonstrando que os macrófagos, que os nossos dados sugerem ser também produtores da citocina TGF- β , são fundamentais no efeito pro-tumoral do CLA.

Sendo assim, linfócitos T reguladores e macrófagos anti-inflamatórios ativados por PPAR- γ são fundamentais no efeito pro-tumorigênico do CLA.

Existe uma vasta e divergente literatura mostrando o papel de agonistas de PPAR- γ no câncer. Efeitos pro-tumorigênicos (Saez, Tontonoz et al. 1998) e supressores de tumor de ligantes de PPAR- γ são relatados (Sarraf, Mueller et al. 1998). É importante considerar os contextos experimentais em que esses efeitos foram testados.

Se a doença inflamatória intestinal (DII) é um fator de risco para o CRC seria incoerente constatar que agentes anti-inflamatórios induziriam um processo tumoral. No entanto, é importante ressaltar que a inflamação encontrada na colite é marcada por recidivas e o longo e intercalado processo de inflamação e cicatrização pode ser o fator chave no processo pro-tumoral. Assim, ao mesmo tempo que a DII se acompanha de fatores inflamatórios, ela também está sempre associada a fatores anti-inflamatórios tipicamente induzidos nos processos inflamatórios crônicos. Além disso, este trabalho enfatiza o papel da citocina TGF- β no processo pro-tumoral e não é possível excluir a participação de outras citocinas e de prostaglandinas nesse processo. Mostramos, por exemplo, que o CLA induz COX-2, uma enzima negativamente relacionada com o desenvolvimento do CRC (Roelofs, Te Morsche et al. 2014).

Nossos dados demonstrando o efeito pro-tumorogênico do CLA divergem do trabalho publicado pelo grupo de Bassaganya-Riera e colaboradores (Evans, Misyal et al. 2010; Bassaganya-Riera, Viladomiu et al. 2012) que demonstra que o CLA reduz o número de adenocarcinomas no mesmo modelo utilizado neste trabalho (DSS e azoximetano). É importante ressaltar, no entanto, que os trabalhos publicados desse grupo mostram apenas o número de adenomas e adenocarcinomas e não de tumores polipóides e nenhum escore histopatológico foi avaliado. Além disso, nenhum estudo histológico dos tumores é apresentado. O principal objetivo de ambos os trabalhos não foi a avaliação dos efeitos do CLA sobre a formação de tumores e sim sobre o desenvolvimento da colite. Nosso trabalho se assemelha em parte ao de Mandir e colaboradores (2008) que, ao utilizar o modelo *Apc(Min/+)*, observaram que o mix de isômeros *cis-9-trans-11* e *cis-10 trans -12* reduziu o número de tumores, mas aumentava o diâmetro dos pólipos (Mandir and Goodlad 2008).

É indispensável a utilização de outros modelos *in vivo* de câncer de cólon para avaliar os efeitos pro-tumorais do CLA, bem como a utilização da suplementação de CLA durante os diferentes estágios de formação tumoral.

7- CONCLUSÃO

A suplementação dietética com CLA induz um aumento de macrófagos M2 na mucosa colônica de camundongos e protege contra a inflamação intestinal em modelo experimental de colite induzido por DSS. Esse efeito é dependente do fator de transcrição PPAR- γ .

Camundongos suplementados com dieta CLA na colite não apresentam esteatose hepática.

A suplementação dietética com CLA induz macrófagos e linfócitos T reguladores produtores de TGF- β via PPAR- γ que exercem papel pro-tumoral em modelo de adenocarcinoma associado à inflamação induzido por DSS e azoximetano.

8- FIGURAS SUPLEMENTARES

Quadro 4: Sumário dos trabalhos (*in vitro*) que correlacionam CLA e o câncer

Artigo	Metodologia	Resultados	Autores	Conclusão
Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated ER stress	In vitro Isômeros c9,t11 t10,c12 cultura célula	t10,c12 CLA exibiu um efeito citotóxico através da geração de ROS e estresse no RE ocasionando em apoptose de células cancerosas	Anne-Sophie Pierre (2013)	✓ apenas para um tipo de isômero
Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells	In vitro Isômeros isolados e em conjunto Cultura células Caco-2, HT-29 e DLD-1	Efeito apoptótico do isômero t9t11-CLA Através da indução da proteína Bcl-2 Isômeros em conjunto não tiveram este efeito	Beppu F 2006	✓ apenas para um tipo de isômero
Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2	In vitro Isômeros isolados e em conjunto Cultura células Caco-2,	Todos os tipos de CLA isolados ou em conjunto apresentaram efeito anti-carcinogênico	Huang G 2007	✓
Intestinal bifidobacteria that produce trans-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT-29 cancer cells.	In vitro Isômeros c9, t11 CLA e t9, t11 CLA. SW480 and HT-29	Efeito anti-proliferativo	Coakley M 2006	✓
Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells	In vitro Isômeros de CLA HT-29	Trans 1- cis-12 diminui atividade enzimas envolvidas em G1. CDK2	Cho HJ, 2006	✓ apenas para um tipo de isômero

Artigo	Metodologia	Resultados	Autores	Conclusão
Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression	Diferentes isômeros HT-29 Caco-2	Alguns isômeros os resultados sobre a proliferação foram positivos outros não	Lampen A 2005	✓ apenas para um tipo de isômero
Conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 cell growth via ERK-MAPK signaling pathway	In vitro Isômeros isolados e em conjunto Cultura células Caco-2,	Reduziu expressão de Raf-1 e a fosforilação Da ERK1/2, Diminuiu expressão de c-myc (fator transcrição) inibiu crescimento	Bocca C 2007	✓
Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells	In vitro Isômeros isolados e em conjunto Cultura células HCT116 cells	CLA aumentou p53, p21, p27 observou-se uma hiperfosforilação da hypophosphorylated (pRb) reduziu expressãp de ciclinaE	Kemp MQ 2003	✓

A Figura suplementar 1 mostra processo de reepitelização no grupo CLA

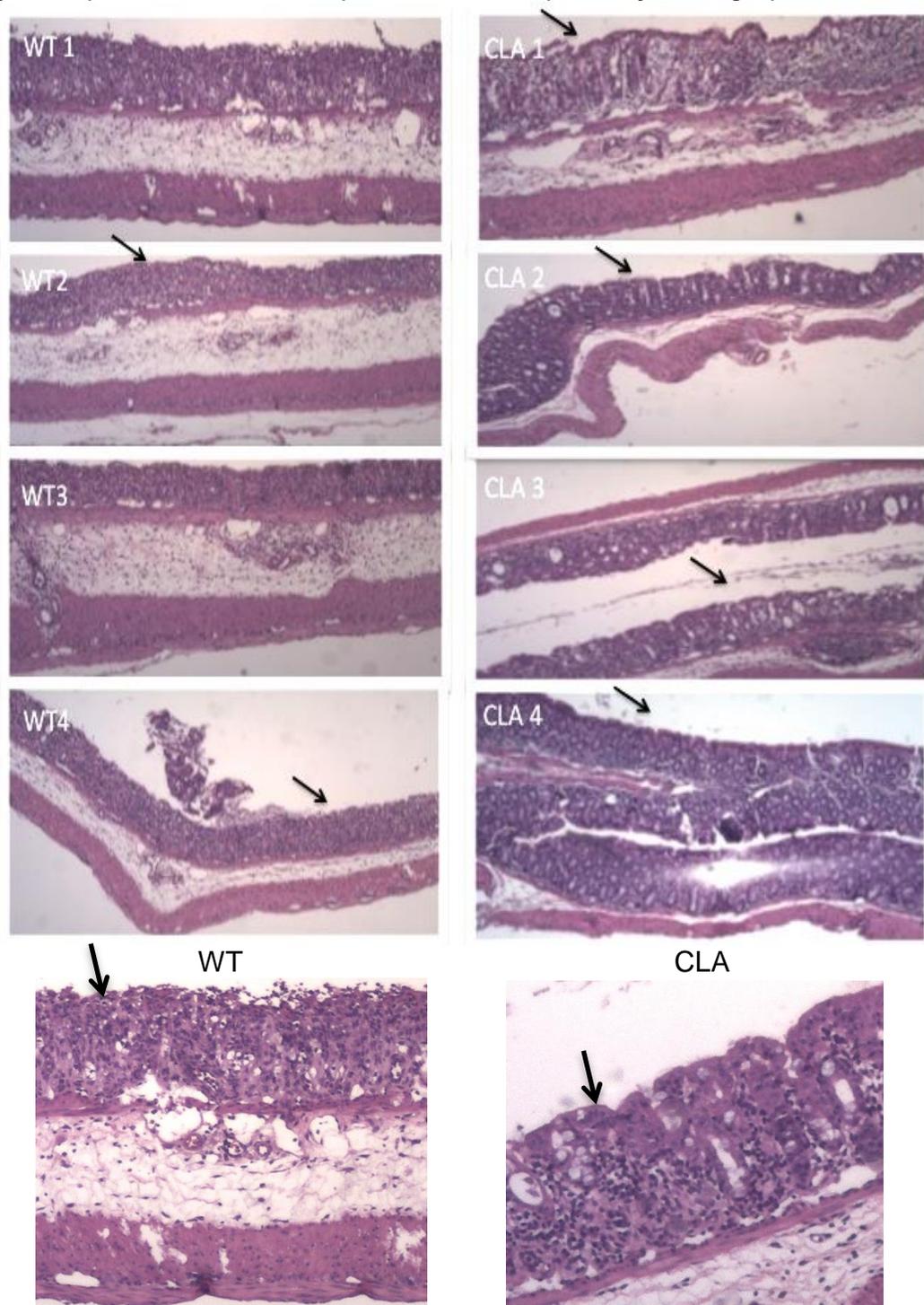


Figura Suplementar 1: Cortes histológicas longitudinais de amostras de cólon de camundongos alimentados com dieta contendo CLA ou com dieta controle submetidos à colite experimental por DSS, mostrando re-epitelização no grupo CLA. N=4. A figura mostra ainda o intenso infiltrado inflamatório e a perda da arquitetura da mucosa no grupo controle

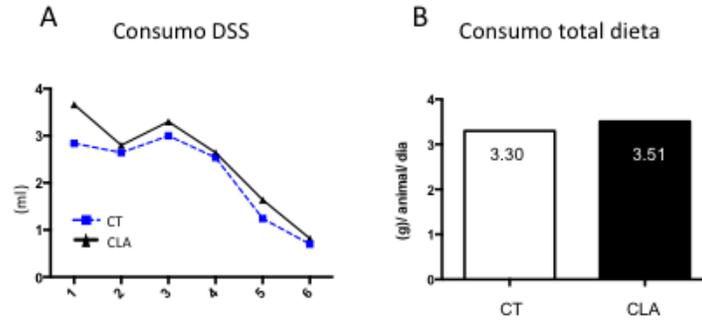


Figura Suplementar 2: A-) Consumo de DSS durante 7 dias. B-) consumo médio diário de dieta por animal.

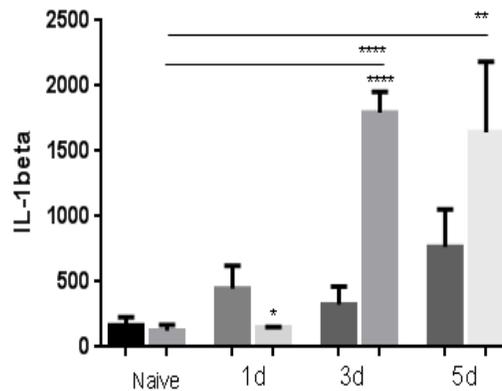
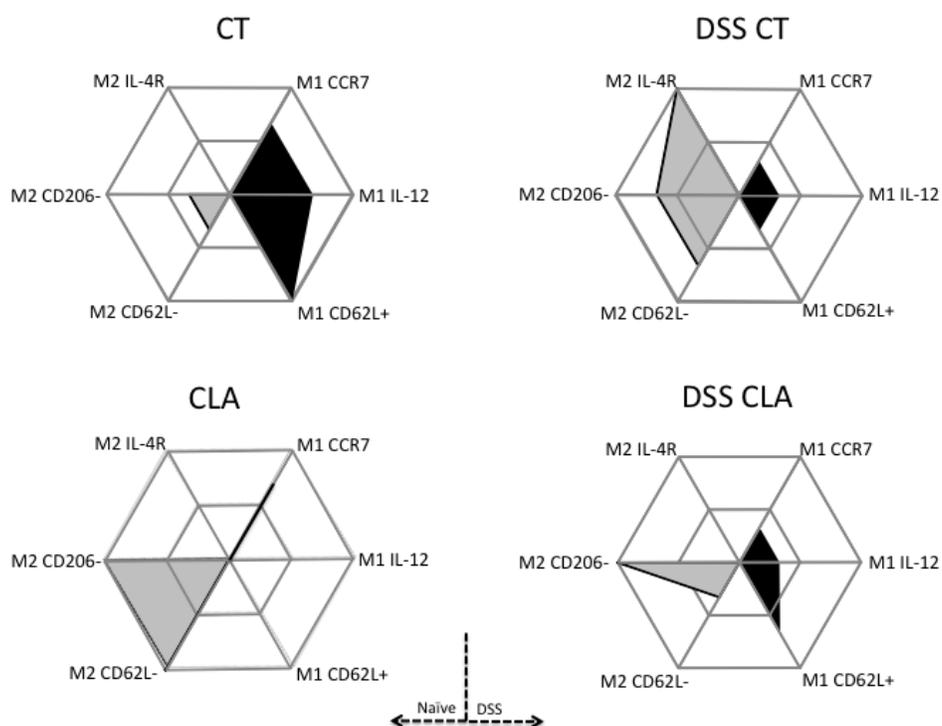


Figura Suplementar 3: Quantificação da citocina IL-1 β por ELISA no cólon de camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle no desenvolvimento da colite experimental induzida por DSS. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras cinza escuras representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras cinzas claras representam o grupo experimental referente à dieta suplementada com 1% CLA (CLA) N=3 Teste *t* de Student * = $p < 0.05$. *d*=dias. Os valores referem-se a pg/mL

Ao correlacionar a concentração local de IL-1 β com a histologia colônica observamos que, embora tenha havido uma piora progressiva do infiltrado inflamatório e perda da arquitetura colônica ao longo dos dias de administração de DSS, não houve um aumento progressivo da citocina IL-1 β acompanhando essa evolução. Além disto, o infiltrado na mucosa do grupo que recebeu a dieta CLA no dia 7 da colite foi menos pronunciado que o observado no grupo que recebeu a dieta CT. Sendo assim, acreditamos que a citocina IL-1 β desempenhou um papel protetor/regenerativo da mucosa.



Suplementar 4: Efeitos da suplementação CLA sobre o perfil macrófagos M1 e M2 na Lâmina Própria colônica na colite experimental. Células da Lâmina própria do cólon de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta CLA ou com controle colite (direita) na ausência da colite (esquerda) foram extraídas e marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos para imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo. O receptor de manose CD206, o receptor da citocina IL-4 e a ausência da L-selectina CD62L foram selecionados como marcadores de M2 (em cinza). A presença da citocina intracelular IL-12, a expressão da quimiocina de migração CCR7 e da molécula L-selectina CD62L foram utilizados como marcadores de macrófagos M1 (em preto). As cores cinza (M2) e preta (M1) nos hexagramas representam o número de animais que apresentam altas e baixas frequências de células expressando as referidas moléculas, calculados a partir da mediana dos grupos amostrais. N=5

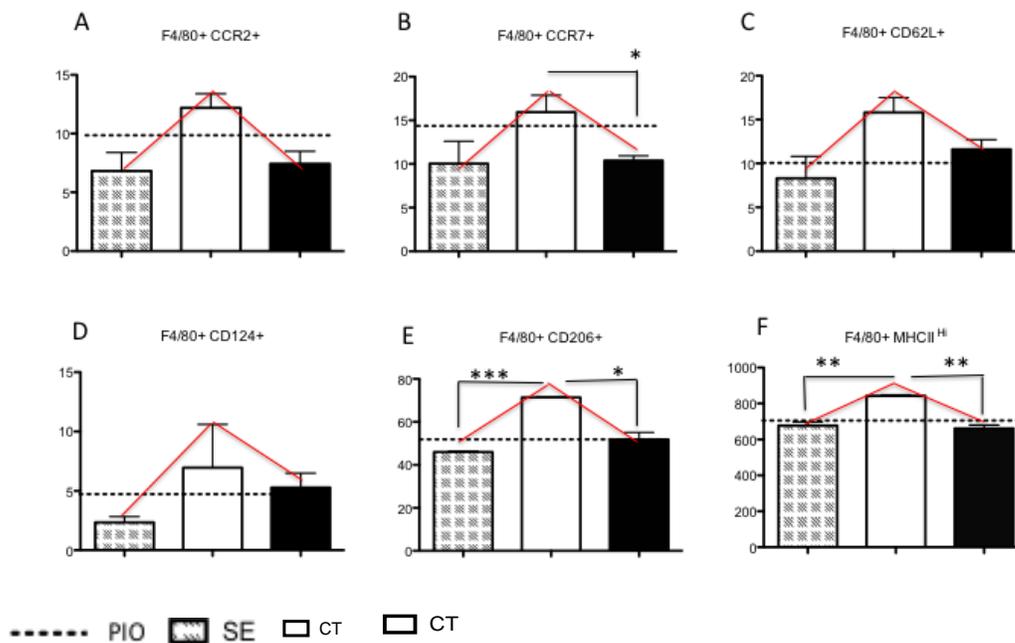
É possível observar uma tendência ao equilíbrio M1/M2 na análise das células da mucosa intestinal durante colite ulcerativa no grupo CLA, enquanto que no grupo controle observamos uma variação significativa no perfil quando há uma mudança na passagem da mucosa do estado fisiológico ao estado inflamado (Figura S3 direita)

Na Figura S3 (esquerda), podemos observar que a dieta suplementada com CLA induz um perfil preferencialmente de macrófagos M2 na Lamina Própria na ausência da inflamação, ou seja, previamente à indução da colite pelo DSS o intestino de camundongos suplementados com CLA possui um perfil anti-inflamatório.

Macrófagos peritoneais estimulados em cultura com óleo de soja (CT) , CLA e Pioglitazone (PIO) (agonista de PPAR- γ) foram submetidos a dois ensaios para avaliação do efeito do CLA sobre esse tipo celular: Imunofenotipagem (Figura S4), ensaio de fagocitose (Figura S5).

Para a imunofenotipagem, os macrófagos estimulados com CLA em cultura por 24 horas foram marcados com anticorpos acoplados a fluorocromos e submetidos à citometria de fluxo (Figura S4).

Macrófagos peritoneais estimulados com CLA apresentaram moléculas relacionadas a ativação (CD62L e MHC II), migração (CCR2 e CCR7) e outras moléculas relacionadas à função dessas células (receptor de Manose CD206 e receptor de IL-4) de forma muito semelhante aos macrófagos que não receberam estímulo em cultura (representação linha vermelha figura S4). Somente o óleo de soja foi capaz de promover uma polarização/ativação dos macrófagos peritoneais *in vitro*.

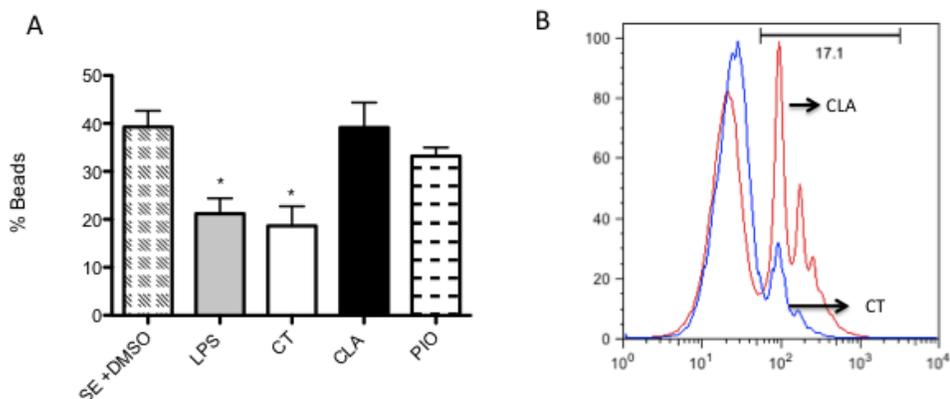


Suplementar 5: Efeitos do CLA sobre o perfil M1 e M2 em macrófagos F4/80+ *in vitro*. Macrófagos peritoneais estimulados em cultura por 24h com CLA, óleo de soja (CT) e Pioglitazona (PIO) foram marcados com anticorpos fluorescente reativos com moléculas representativas dos perfis M1/M2 e submetidos à técnica de citometria de fluxo para imunofenotipagem. Frequência de macrófagos F4/80+ expressando A-) a quimiocina CCR2 B-) a quimiocina CCR7+ C-) a molécula CD62L D-) a molécula CD124 (IL-4R) E-) o receptor de manose CD206 F-) a molécula MHC II (I-A/I-E) em níveis

altos (high). As barras representam a média \pm erro padrão. As barras brancas representam o grupo experimental que recebeu estímulo 100uM óleo de soja + DMSO (CT), as barras pretas representam o grupo experimental que recebeu 100 uM CLA + DMSO (CLA), as barras sombreadas representam o controle sem estímulo e DMSO (SE), a linha pontilhada representa a média dos valores para o grupo experimental que recebeu 100uM Pioglitazona (PIO). A linha vermelha demonstra a tendência de semelhança de perfil entre as células do grupo sem estímulo e as do grupo estimulado com CLA. / N=3 Teste *t* de Student. *= $p < 0.05$.

Este dado se associa à observação de que macrófagos estimulados com CLA possuem capacidade fagocítica igual à de macrófagos não estimulados, enquanto que o óleo de soja e o LPS reduzem a fagocitose *in vitro* (Figura S5)

Para o ensaio de fagocitose, macrófagos estimulados com CLA, óleo de soja e Pioglitazona por 18h foram coletados e incubados com *beads* fluorescentes e submetidos à técnica de citometria de fluxo. Esse ensaio também foi realizado após 3h de cultura. (Não há diferença na capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos alimentados com a dieta CLA com ou sem colite nos tempos pesquisados em experiment *in vivo* (suplementar 6 e 7)



Suplementar 6: Efeitos do CLA sobre a capacidade fagocítica de macrófagos F4/80+ *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram estimulados por 18h com 50uM óleo de soja + DMSO (CT), 50uM CLA + DMSO, Pioglitazona (PIO) e LPS (1 mg/mL). A-) Representação gráfica do percentual de *beads* fagocitadas por macrófagos F4/80+. As barras representam a média \pm erro padrão. A barra sombreada representa as células controle sem estímulo (SE), a barra cinza representa as células estimuladas com LPS. A barra branca representa as células submetidas ao estímulo controle (CT), a barra preta representa as células que foram estimuladas com CLA (CLA), a barra pontilhada representa as células estimuladas com pioglitazona (PIO). N=3 Teste *t* de Student *= $p < 0.05$. B-) Macrófagos F4/80+ foram selecionados e submetidos à análise da marcação da fluorescência FL1-*beads yellow gold* para avaliação do percentual de *beads* fagocitadas, o histograma representa os picos representativos da população celular controle (linha azul) e da população positiva para a fluorescência 1 (FL1) que foi estimulada com CLA (linha vermelha).

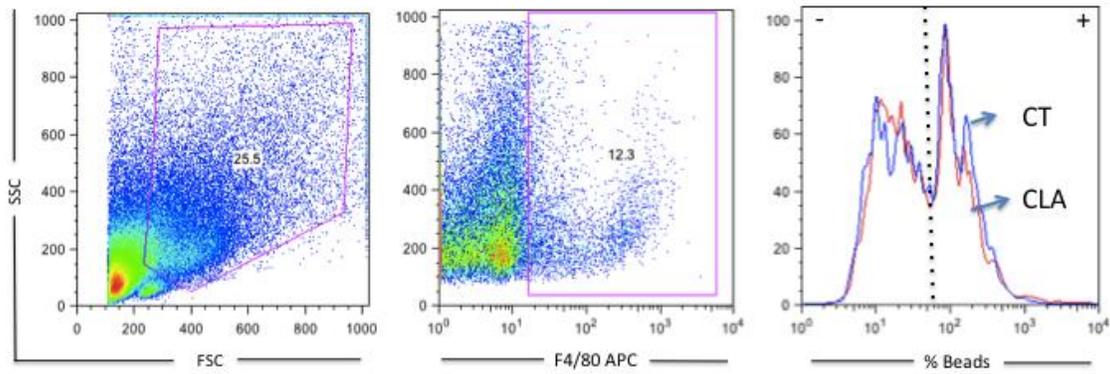


Figura Suplementar 7: *Beads* fluorescentes fagocitadas por macrófagos F4/80+ presentes na lâmina própria do cólon de camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle por 4 semanas. *Dot-plot* representativo N=4.

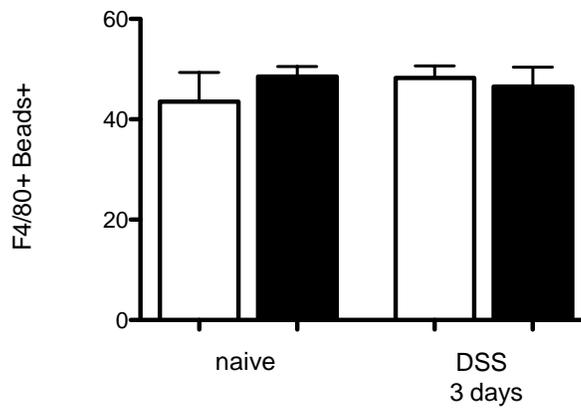


Figura Suplementar 8: Percentual de *beads* fagocitadas por macrófagos F4/80+ no cólon de camundongos alimentados com dieta CLA ou com dieta controle após três dias de administração de DSS. As barras representam a média \pm erro padrão N=5 teste *t de Student*.

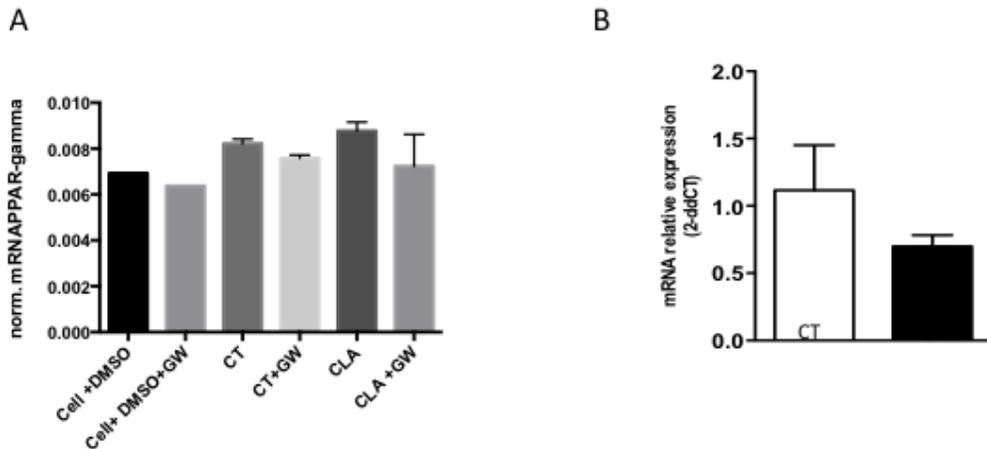


Figura suplementar 9: Efeito do CLA sobre a expressão gênica do PPAR- γ . As barras representam a média \pm erro padrão A-) expressão gênica (RT-PCR) de PPAR-gamma em macrófagos derivados de medula estimulados por 24h com 50uM de CLA, ou ácido Linoléico e antagonista de PPAR-gamma GW9662. B-) expressão gênica (RT-PCR) em extrato de tecido de colon de camundongos C57BL/6 que consumiram dieta CLA e CT por 4 semanas. Barras brancas se referem a grupo CT e barras pretas ao grupo que recebeu dieta contendo 1% CLA.

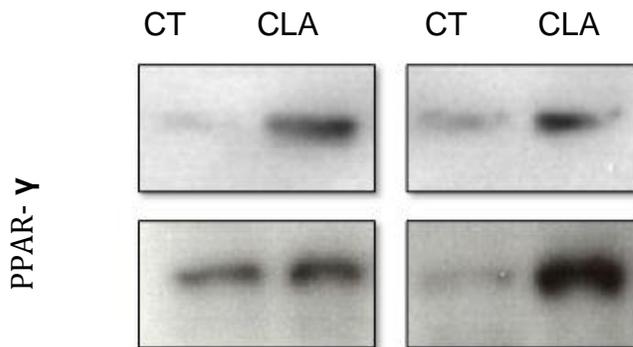
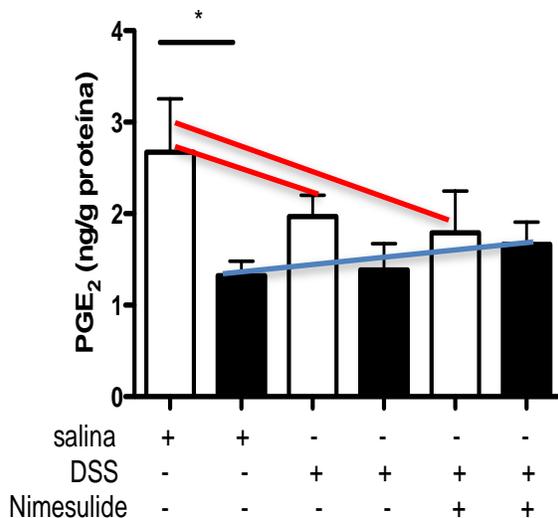


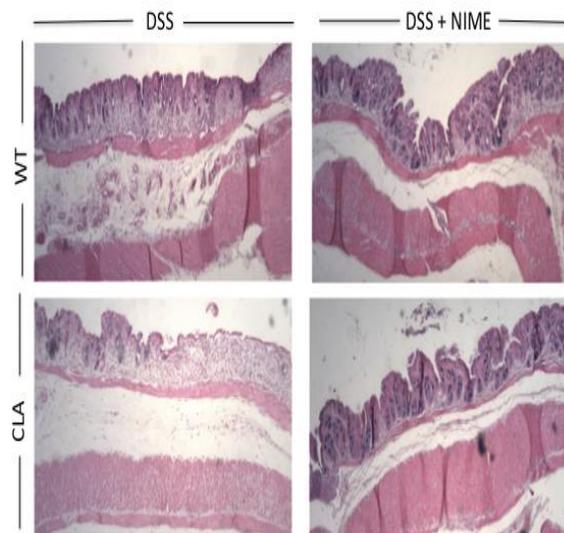
Figura Suplementar 10: Efeito da suplementação com CLA na quantidade de PPAR- γ em enterócitos. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta contendo 1% CLA e controle por 4 semanas. Após eutanásia camundongos foram eutanasiados e enterócitos foram obtidos através da incubação do tecido com DTT. As células foram lisadas e as proteínas utilizadas para *Western-blot*.

Os efeitos da suplementação de CLA sobre o intestino em condições fisiológicas incluíram a redução da produção de PGE2. Para verificar a participação desses efeitos na colite ulcerativa, camundongos C57BL/6 foram submetidos à colite experimental na presença ou na ausência da droga Nimesulide (inibidora das enzimas Cox-1 e Cox-2 que induzem a produção de prostaglandinas).

A-)



B-)



C-)

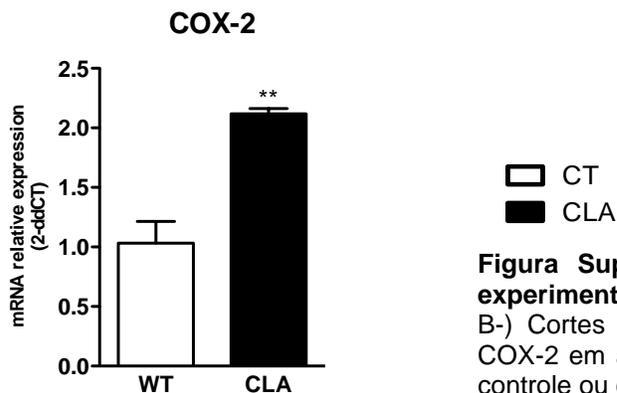


Figura Suplementar 11: Papel da Prostaglandina E2 na colite experimental induzida por DSS. A-) Quantificação de PGE2 por ELISA B-) Cortes Histológicas corados por H&E. C-) Expressão relativa de COX-2 em amostras de cólon de camundongos alimentados com dieta controle ou com dieta CLA. N=5 *Teste T de Student*

A diferença nas concentrações de PGE2 encontradas no cólon de camundongos alimentados com dieta CLA quando comparados aos alimentados com a dieta controle em condições fisiológicas não se manteve com a colite.

No grupo que recebeu dieta controle, podemos observar uma tendência a variações no conteúdo de PGE2 durante a colite (queda), enquanto que, no grupo

que recebeu dieta CLA não há variações na quantidade de PGE2 comparando as condições inflamatória (colite) e não inflamatória (Fig S11 A)

Na histologia, observou-se que o tratamento com Nimesulida reduziu significativamente o dano da mucosa. No entanto, não há diferença entre a concentração de PGE2 medida nos animais do grupo tratado com Nimesulide com colite, o que indica a participação de outros eicosanóides nesse processo.

Observamos um aumento na expressão relativa na COX-2 em camundongos suplementados com CLA na ausência da colite.

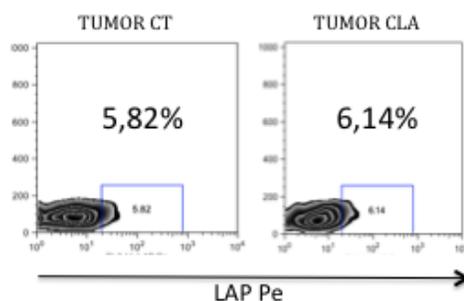


Figura suplementar 12: Células extraídas de tumor de camundongos suplementados com dieta CLA e controle (CT) foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos e analisados pela técnica de citometria de fluxo para imunofenotipagem

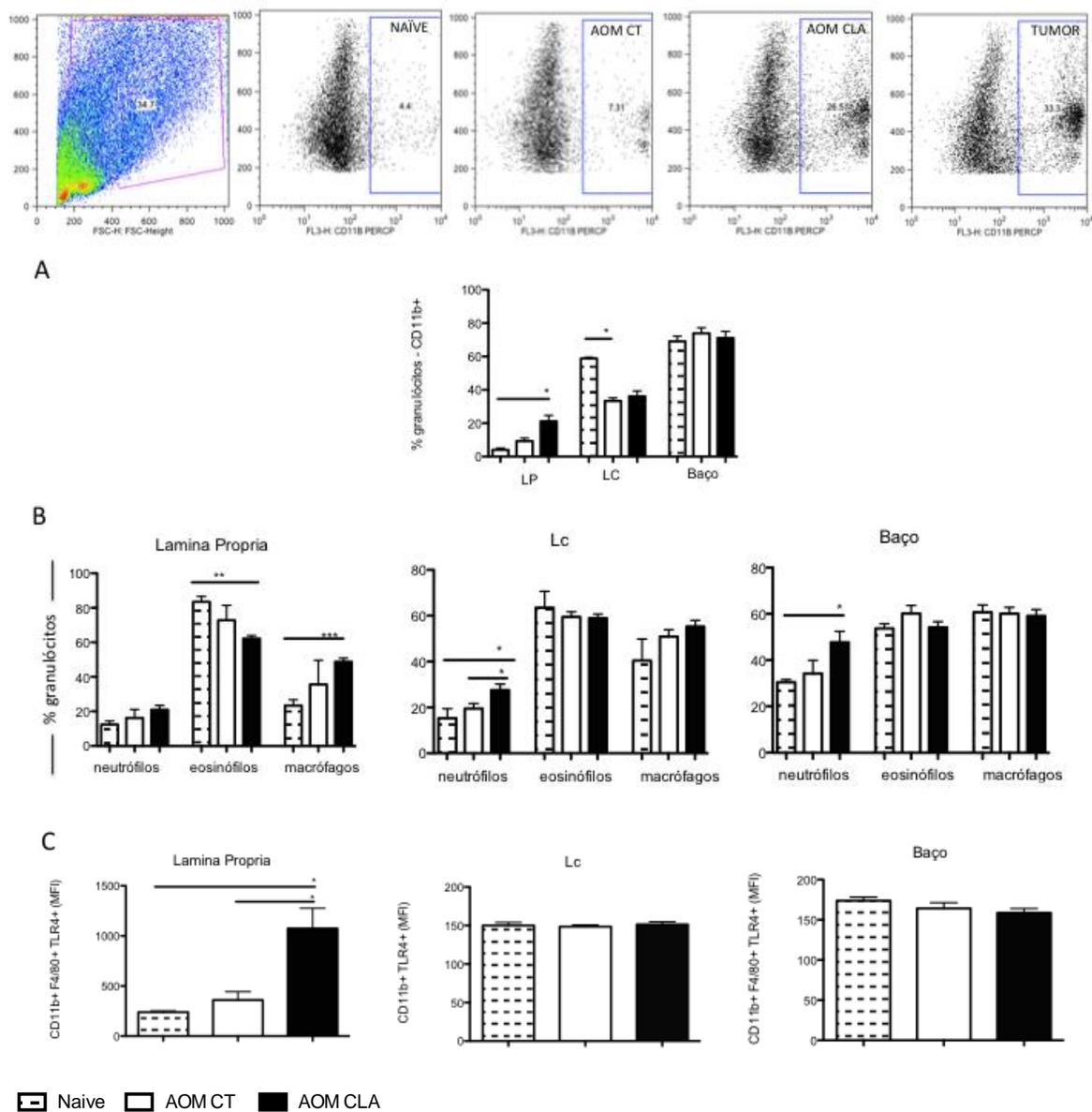


Figura Suplementar 13: Papel da imunidade inata no adenocarcinoma de cólon. Células de baço, linfonodo cecal (LC) e lâmina própria de camundongos submetidos ao protocolo de indução de cancer que receberam a dieta controle (CT) ou dieta CLA e camundongos naïve foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos e analisados citometria de fluxo. A-) dot-plot demonstrando a frequência de células CD11b+ na lâmina própria. B-) Percentual de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos na Lâmina Própria, Linfonoco cecal (LC) e baço de animais alimentados com dieta CLA ou com dieta controle. C-) Expressão de TLR4 em macrófagos nos respectivos órgãos linfóides. As barras representam a média \pm erro padrão. As barras pontilhadas representam o grupo Naive (sem adenocarcinoma e colite), as barras brancas representam o grupo experimental que recebeu dieta controle contendo óleo de soja (CT), as barras pretas representam o grupo que recebeu a dieta suplementada com 1% CLA (CLA)/ N=8 *Teste t de Student*. * $p < 0.05$

Tabela suplementar 1: Imunofenotipagem de células de animais naïve, alimentados com dieta controle ou com dieta CLA

% of parent MLN				% of parent LP				% of parent Lc				% of parent PP			
	wt	wt DSS	CLA DSS		wt	wt DSS	CLA DSS		wt	wt DSS	CLA DSS		wt	wt DSS	CLA DSS
CD4+ FOXP3+	11.4 ± 2.06	13.14 ± 0.78	11.8 ± 0.43	CD4+ FOXP3+	23.6 ± 7.4	25.15 ± 8.6	25.16 ± 7.06	F4/80+	49.92 ± 10.47	45.87 ± 14.03	52.57 ± 9.00	CD4+ FOXP3+	9.52	11.17 ± 6.6	14.82 ± 7.07
CD3- CD49+	17.5 ± 1.94	14.02 ± 5.3	10.33 ± 4.77	CD3- CD49+	50.73 ± 8.94	51.96 ± 6.22	55.83 ± 2.22	LY-6d	20 ± 3.95	25.97 ± 3.55	33.7 ± 9.31	CD3- CD49+	21.5 ± 2.11	32.95 ± 8.2	24.67 ± 4.49
CD3+ CD49+	2.31 ± 0.3	2.87 ± 1.28	2.32 ± 9.95	CD3+ CD49+	7.92 ± 2.67	15.10 ± 8.28	9.01 ± 2.01	F4/80+ CXCCR2+	9.35 ± 3.51	24.8 ± 6.58	31.15 ± 4.85	CD3+ CD49+	4.7 ± 0.69	8.96 ± 2.03	9.5 ± 3.5
CD19+ CD5+	11.64 ± 2.56	9.57 ± 2.84	9.69 ± 1.89	CD19+ CD5+	91.46 ± 3.83	95.17 ± 2.77	91.35 ± 10.39	Ly-6d CXCCR2+	22.67 ± 6.35	37.27 ± 4.09	45.87 ± 5.73	CD19+ CD5+	13.6 ± 2.28	16.7 ± 7.53	18.87 ± 3.85
CD19+ CD5-	88.36 ± 2.57	90.42 ± 2.84	90.32 ± 1.91	CD19+ CD5-	9.59 ± 4.01	5.3 ± 3.06	10.04 ± 12.2	Cd11b+ cd11c- CD103+	30.37 ± 4.7	25.8 ± 0.6	19.82* ± 2.14	CD19+ CD5-	86.4 ± 2.28	83.3 ± 7.54	81.12 ± 3.85
F4/80+ CXCCR2+	26.33 ± 4.66	16.6 ± 5.7	14.7 ± 7.12	F4/80+ CXCCR2+	1.78 ± 0.16	15.72 ± 5.76	8.2 ± 2.5	CD11b+ CD11b+ IL-10+	12.71 ± 4.88	6.57 ± 2.42	4.57 ± 1.92	F4/80+ CXCCR2+	38.7 ± 13.01	53.45 ± 27.17	37.2 ± 14.18
Ly-6d CXCCR2+	19.6 ± 4.7	17.95 ± 1.27	20.17 ± 5.06	Ly-6d CXCCR2+	11.25 ± 0.9	14.66 ± 3.9	10.26 ± 1.04	CD11b+ CD11C- IL-12+	2.38 ± 0.85	1.87 ± 0.22	1.83 ± 0.72	Ly-6d CXCCR2+	5.73 ± 1.35	14.5 ± 5.94	11.6 ± 5.62
F4/80+	60.79 ± 3.94	57.97 ± 13.43	37.7 ± 13.15	F4/80+		59.75 ± 11.96	58.83 ± 6.7	CD11b+ CD11c+ IL-12+	57.77 ± 4.65	57.3 ± 6.25	61.2 ± 7.22				
LY-6d	17.4 ± 5.43	19.45 ± 5.27	18.55 ± 0.35	LY-6d		76.62 ± 9.15	60.95 ± 2.47	CD11b+ CD11c- TNF+	39.3 ± 3.4	55.5 ± 4.84	61.87 ± 2.08				
F4/80+ CXCCR2+	10.68 ± 3.83	17.9 ± 4.3	24.7 ± 3.53	F4/80+ CXCCR2+		44.67 ± 28.49	26.4 ± 8.07								
Ly-6d CXCCR2+	29.63 ± 4.5	42.52 ± 10.34	38.33 ± 10.7	Ly-6d CXCCR2+		43.33 ± 13.17	34.1 ± 5.79								
Cd11b+ cd11c- CD103+	38.95 ± 4.3	41 ± 7.2	36.2 ± 2.3	CD11b+ CD11c- IL-10+	86.08 ± 2.51	76.15 ± 2.7	74.7 ± 4.49								
CD19+ CD5+ IL-10	1.68 ± 1.83	1.26 ± 0.75	2.28 ± 0.29	CD11b+ CD11c- IL-12+	72.9 ± 18.5	10.86 ± 6.18	11.27 ± 1.15								
CD11b+ CD11b+ IL-10+	38.45 ± 7.2	32.45 ± 1.19	28.3 ± 7.04	CD11b+ CD11c + IL-12+	1.48 ± 1.31	0.63 ± 0.18	0.66 ± 0.16								
CD11b+ CD11c- IL-10+	2.45 ± 0.54	2.74 ± 1.84	1.81 ± 0.79	CD11b+ CD11c- TNF+		37.62 ± 3.11	40.27 ± 7.33								
CD11b+ CD11C- IL-12+	2.16 ± 0.71	2.05 ± 0.78	1.14 ± 0.57												
CD11b+ CD11c+ IL-12+	71.53 ± 7.26	73.47 ± 2.81	67.52 ± 6.73												
CD11b+ CD11c- TNF+	20.58 ± 13.95	41.95 ± 16.53	15.6 ± 20.88												

MLN= linfonodo mesentérico, LP= Lamina Propria, LC= linfonodo cecal, PP= placa de peyer

9-REFÊRENCIAS

- Adachi, M., R. Kurotani, K. Morimura, Y. Shah, M. Sanford, B. B. Madison, D. L. Gumucio, H. E. Marin, J. M. Peters, H. A. Young and F. J. Gonzalez (2006). "Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease." Gut **55**(8): 1104-1113.
- Ahmadian, M., J. M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes and R. M. Evans (2013). "PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future." Nat Med **19**(5): 557-566.
- Akiyama, Y., R. Iwanaga, T. Ishikawa, K. Sakamoto, N. Nishi, Z. Nihei, T. Iwama, K. Saitoh and Y. Yuasa (1996). "Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene are strongly related to sporadic proximal colon carcinomas with microsatellite instability." Cancer **78**(12): 2478-2484.
- Annese, V., F. Rogai, A. Settesoldi and S. Bagnoli (2012). "PPARgamma in Inflammatory Bowel Disease." PPAR Res **2012**: 620839.
- Aratani, Y. (2006). "[Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection]." Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi **47**(3): 195-199.
- Ariel, A. and C. N. Serhan (2012). "New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation." Front Immunol **3**: 4.
- Bain, C. C. and A. M. Mowat (2011). "Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment." Eur J Immunol **41**(9): 2494-2498.
- Bain, C. C., C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Williams, B. Malissen, W. W. Agace and A. M. Mowat (2013). "Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors." Mucosal Immunol **6**(3): 498-510.
- Banni, S., A. Petroni, M. Blasevich, G. Carta, L. Cordeddu, E. Murru, M. P. Melis, A. Mahon and M. A. Belury (2004). "Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA." Lipids **39**(11): 1143-1146.
- Barkun, A. N., J. Love, M. Gould, H. Pluta and H. Steinhart (2013). "Bile acid malabsorption in chronic diarrhea: pathophysiology and treatment." Can J Gastroenterol **27**(11): 653-659.
- Barthlott, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. J. Atkins, J. Christensen, A. O'Garra and B. Stockinger (2005). "CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production." Int Immunol **17**(3): 279-288.
- Bassaganya-Riera, J., M. DiGuardo, M. Climent, C. Vives, A. Carbo, Z. E. Jouni, A. W. Einerhand, M. O'Shea and R. Hontecillas (2011). "Activation of PPARgamma and delta by dietary puniceic acid ameliorates intestinal inflammation in mice." Br J Nutr **106**(6): 878-886.
- Bassaganya-Riera, J. and R. Hontecillas (2006). "CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD." Clin Nutr **25**(3): 454-465.
- Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas, W. T. Horne, M. Sandridge, H. H. Herfarth, R. Bloomfield and K. L. Isaacs (2012). "Conjugated linoleic acid modulates immune

responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease." *Clin Nutr* **31**(5): 721-727.

Bassaganya-Riera, J., K. Reynolds, S. Martino-Catt, Y. Cui, L. Hennighausen, F. Gonzalez, J. Rohrer, A. U. Benninghoff and R. Hontecillas (2004). "Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **127**(3): 777-791.

Bassaganya-Riera, J., M. Viladomiu, M. Pedragosa, C. De Simone, A. Carbo, R. Shaykhutdinov, C. Jobin, J. C. Arthur, B. A. Corl, H. Vogel, M. Storr and R. Hontecillas (2012). "Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis." *PLoS One* **7**(2): e31238.

Bassaganya-Riera, J., M. Viladomiu, M. Pedragosa, C. De Simone and R. Hontecillas (2012). "Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria." *PLoS One* **7**(4): e34676.

Baumeister, B., C. Schmidt, A. Helisch and J. Kipnowski (1996). "Increased prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in isolated colonic mucosal cells in inflammatory bowel disease. a preliminary report." *J Clin Gastroenterol* **22**(2): 117-120.

Belury, M. A. (2002). "Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action." *J Nutr* **132**(10): 2995-2998.

Benchimol, E. I., D. R. Mack, G. C. Nguyen, S. B. Snapper, W. Li, N. Mojaverian, P. Quach and A. M. Muijs (2014). "Incidence, Outcomes, and Health Services Burden of Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease." *Gastroenterology*.

Berin, M. C. and L. Mayer (2009). "Immunophysiology of experimental food allergy." *Mucosal Immunol* **2**(1): 24-32.

Bienenstock, J. and A. D. Befus (1980). "Mucosal immunology." *Immunology* **41**(2): 249-270.

Bierie, B. and H. L. Moses (2006). "Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(7): 506-520.

Bissahoyo, A., R. S. Pearsall, K. Hanlon, V. Amann, D. Hicks, V. L. Godfrey and D. W. Threadgill (2005). "Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet." *Toxicol Sci* **88**(2): 340-345.

Biswas, S., M. Guix, C. Rinehart, T. C. Dugger, A. Chytil, H. L. Moses, M. L. Freeman and C. L. Arteaga (2007). "Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression." *J Clin Invest* **117**(5): 1305-1313.

Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." *Nat Immunol* **11**(10): 889-896.

Blankson, H., J. A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein and O. Gudmundsen (2000). "Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans." *J Nutr* **130**(12): 2943-2948.

Borniquel, S., C. Jadert and J. O. Lundberg (2012). "Dietary conjugated linoleic acid activates PPARgamma and the intestinal trefoil factor in SW480 cells and mice with dextran sulfate sodium-induced colitis." *J Nutr* **142**(12): 2135-2140.

Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 521-533.

Bruce, M. G., S. Strobel, D. G. Hanson and A. Ferguson (1987). "Irradiated mice lose the capacity to 'process' fed antigen for systemic tolerance of delayed-type hypersensitivity." Clin Exp Immunol **70**(3): 611-618.

Burdge, G. C., B. Lupoli, J. J. Russell, S. Tricon, S. Kew, T. Banerjee, K. J. Shingfield, D. E. Beever, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob and P. C. Calder (2004). "Incorporation of cis-9,trans-11 or trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid into plasma and cellular lipids in healthy men." J Lipid Res **45**(4): 736-741.

Cammarota, R., V. Bertolini, G. Pennesi, E. O. Bucci, O. Gottardi, C. Garlanda, L. Laghi, M. C. Barberis, F. Sessa, D. M. Noonan and A. Albini (2010). "The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker." J Transl Med **8**: 112.

Canavan, C., K. R. Abrams and J. Mayberry (2006). "Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **23**(8): 1097-1104.

Celinski, K., T. Dworzanski, A. Korolczuk, R. Piasecki, M. Slomka, A. Madro and R. Fornal (2011). "Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **62**(3): 347-356.

Chanmee, T., P. Ontong, K. Konno and N. Itano (2014). "Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment." Cancers (Basel) **6**(3): 1670-1690.

Chen, D. S. and I. Mellman (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." Immunity **39**(1): 1-10.

Chen, Y., C. Wang, Y. Liu, L. Tang, M. Zheng, C. Xu, J. Song and X. Meng (2013). "miR-122 targets NOD2 to decrease intestinal epithelial cell injury in Crohn's disease." Biochem Biophys Res Commun **438**(1): 133-139.

Choi, J. H., A. S. Banks, J. L. Estall, S. Kajimura, P. Bostrom, D. Laznik, J. L. Ruas, M. J. Chalmers, T. M. Kamenecka, M. Bluher, P. R. Griffin and B. M. Spiegelman (2010). "Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5." Nature **466**(7305): 451-456.

Choi, Y., Y. Park, M. W. Pariza and J. M. Ntambi (2001). "Regulation of stearyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells." Biochem Biophys Res Commun **284**(3): 689-693.

Cruz, D., B. C. Sydora, K. Hetzel, G. Yakoub, M. Kronenberg and H. Cheroutre (1998). "An opposite pattern of selection of a single T cell antigen receptor in the thymus and among intraepithelial lymphocytes." J Exp Med **188**(2): 255-265.

Dalton, J. E., S. M. Cruickshank, C. E. Egan, R. Mears, D. J. Newton, E. M. Andrew, B. Lawrence, G. Howell, K. J. Else, M. J. Gubbels, B. Striepen, J. E. Smith, S. J. White and S. R. Carding (2006). "Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection." Gastroenterology **131**(3): 818-829.

Danese, S. and C. Fiocchi (2006). "Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **12**(30): 4807-4812.

de Campos, F. G. and P. G. Kotze (2013). "Burrill Bernard Crohn (1884-1983): the man behind the disease." Arq Bras Cir Dig **26**(4): 253-255.

Dieleman, L. A. and W. D. Heizer (1998). "Nutritional issues in inflammatory bowel disease." Gastroenterol Clin North Am **27**(2): 435-451.

Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, G. S. Tennyson, K. W. Beagley, R. P. Bucy and C. O. Elson (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." Gastroenterology **107**(6): 1643-1652.

Dobrzyn, P., A. Dobrzyn, M. Miyazaki, P. Cohen, E. Asilmaz, D. G. Hardie, J. M. Friedman and J. M. Ntambi (2004). "Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6409-6414.

Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson and P. Desreumaux (2003). "Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis." Gastroenterology **124**(5): 1265-1276.

Dubuquoy, L., C. Rousseaux, X. Thuru, L. Peyrin-Biroulet, O. Romano, P. Chavatte, M. Chamailard and P. Desreumaux (2006). "PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases." Gut **55**(9): 1341-1349.

Eaden, J. A., K. R. Abrams and J. F. Mayberry (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." Gut **48**(4): 526-535.

Eder, K., S. Schleser, K. Becker and R. Korting (2003). "Conjugated linoleic acids lower the release of eicosanoids and nitric oxide from human aortic endothelial cells." J Nutr **133**(12): 4083-4089.

Edwards, J. P., X. Zhang, K. A. Frauwirth and D. M. Mosser (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." J Leukoc Biol **80**(6): 1298-1307.

Elmore, S. A. (2006). "Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue." Toxicol Pathol **34**(5): 687-696.

Elson, C. O., R. B. Sartor, G. S. Tennyson and R. H. Riddell (1995). "Experimental models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **109**(4): 1344-1367.

Evans, N. P., S. A. Misyak, E. M. Schmelz, A. J. Guri, R. Hontecillas and J. Bassaganya-Riera (2010). "Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPARgamma." J Nutr **140**(3): 515-521.

Fakhoury, M., R. Negrulj, A. Mooranian and H. Al-Salami (2014). "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments." J Inflamm Res **7**: 113-120.

Faria, A. M., A. C. Gomes-Santos, J. L. Goncalves, T. G. Moreira, S. R. Medeiros, L. P. Dourado and D. C. Cara (2013). "Food components and the immune system: from tonic agents to allergens." Front Immunol **4**: 102.

Faria, A. M. and H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." Immunol Rev **206**: 232-259.

Faria, L. (2004). "Clinical characteristics of Crohn's disease in a reference center for bowel diseases." Gastroenterol Endosc Dig **23**: 151-164.

Fellig, J. and C. E. Wiley (1959). "The inhibition of pancreatic ribonuclease by anionic polymers." Arch Biochem Biophys **85**: 313-316.

Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." Gastroenterology **115**(1): 182-205.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr and A. Y. Rudensky (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." Immunity **22**(3): 329-341.

Gaburri, P. D., J. M. Chebli, L. E. de Castro, J. O. Ferreira, M. H. Lopes, A. M. Ribeiro, R. A. Alves, E. C. Froede, K. S. de Oliveira, A. K. Gaburri, D. Gaburri, G. S. Meirelles and A. F. de Souza (1998). "[Epidemiology, clinical features and clinical course of Crohn's disease: a study of 60 cases]." Arq Gastroenterol **35**(4): 240-246.

Gaullier, J. M., J. Halse, K. Hoye, K. Kristiansen, H. Fagertun, H. Vik and O. Gudmundsen (2005). "Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans." J Nutr **135**(4): 778-784.

Geissmann, F., S. Gordon, D. A. Hume, A. M. Mowat and G. J. Randolph (2010). "Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity." Nat Rev Immunol **10**(6): 453-460.

Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchenker, F. Martin and L. Zitvogel (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." J Exp Med **202**(8): 1075-1085.

Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett and K. E. Nelson (2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." Science **312**(5778): 1355-1359.

Gismera, C. S. and B. S. Aladren (2008). "Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing?" World J Gastroenterol **14**(36): 5491-5498.

Gomes, D. A., M. A. Rodrigues, M. F. Leite, M. V. Gomez, P. Varnai, T. Balla, A. M. Bennett and M. H. Nathanson (2008). "c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals." J Biol Chem **283**(7): 4344-4351.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.

Halade, G. V., M. M. Rahman and G. Fernandes (2010). "Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice." J Nutr Biochem **21**(4): 332-337.

Hall, L. J., E. Faivre, A. Quinlan, F. Shanahan, K. Nally and S. Melgar (2011). "Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis." Dig Dis Sci **56**(1): 79-89.

Haller, D. (2006). "Intestinal epithelial cell signalling and host-derived negative regulators under chronic inflammation: to be or not to be activated determines the balance towards commensal bacteria." Neurogastroenterol Motil **18**(3): 184-199.

Hassan Eftekhari, M., F. Aliasghari, M. A. Babaei-Beigi and J. Hasanzadeh (2013). "Effect of conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acid supplementation on inflammatory and oxidative stress markers in atherosclerotic patients." ARYA Atheroscler **9**(6): 311-318.

Herrinton, L. J., L. Liu, T. R. Levin, J. E. Allison, J. D. Lewis and F. Velayos (2012). "Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010." Gastroenterology **143**(2): 382-389.

Hollander, D., C. M. Vadheim, E. Brettholz, G. M. Petersen, T. Delahunty and J. I. Rotter (1986). "Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor." Ann Intern Med **105**(6): 883-885.

Hontecillas, R. and J. Bassaganya-Riera (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis." J Immunol **178**(5): 2940-2949.

Hontecillas, R., M. J. Wannemeulher, D. R. Zimmerman, D. L. Hutto, J. H. Wilson, D. U. Ahn and J. Bassaganya-Riera (2002). "Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid." J Nutr **132**(7): 2019-2027.

Hou, J. K., D. Lee and J. Lewis (2013). "Diet and Inflammatory Bowel Disease: Review of Patient-Targeted Recommendations." Clin Gastroenterol Hepatol.

Huang, Y., D. Hutter, Y. Liu, X. Wang, M. S. Sheikh, A. M. Chan and N. J. Holbrook (2000). "Transforming growth factor-beta 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities." J Biol Chem **275**(24): 18234-18242.

Huebner, S. M., J. M. Olson, J. P. Campbell, J. W. Bishop, P. M. Crump and M. E. Cook (2014). "Dietary trans-10,cis-12 CLA reduces murine collagen-induced arthritis in a dose-dependent manner." J Nutr **144**(2): 177-184.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.

Ikushima, H. and K. Miyazono (2010). "TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression." Nat Rev Cancer **10**(6): 415-424.

Ip, C., Y. Dong, M. M. Ip, S. Banni, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, S. Spada, M. P. Melis and A. Saebo (2002). "Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention." Nutr Cancer **43**(1): 52-58.

Itzkowitz, S. H. and N. Harpaz (2004). "Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **126**(6): 1634-1648.

Iwakiri, Y., D. A. Sampson and K. G. Allen (2002). "Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **67**(6): 435-443.

Jayawardena-Wolf, J. and A. Bendelac (2001). "CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation." Curr Opin Immunol **13**(1): 109-113.

Jeffery, N. M., P. Sanderson, E. J. Sherrington, E. A. Newsholme and P. C. Calder (1996). "The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions." Lipids **31**(7): 737-745.

Jess, T., M. Gamborg, P. Matzen, P. Munkholm and T. I. Sorensen (2005). "Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies." Am J Gastroenterol **100**(12): 2724-2729.

Jess, T., C. Rungoe and L. Peyrin-Biroulet (2012). "Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies." Clin Gastroenterol Hepatol **10**(6): 639-645.

Jess, T., J. Simonsen, K. T. Jorgensen, B. V. Pedersen, N. M. Nielsen and M. Frisch (2012). "Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years." Gastroenterology **143**(2): 375-381 e371; quiz e313-374.

Jewell, C., S. Cusack and K. D. Cashman (2005). "The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **72**(3): 163-171.

Johnson, C. M., C. Wei, J. E. Ensor, D. J. Smolenski, C. I. Amos, B. Levin and D. A. Berry (2013). "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors." Cancer Causes Control **24**(6): 1207-1222.

Joossens, M., G. Huys, M. Cnockaert, V. De Preter, K. Verbeke, P. Rutgeerts, P. Vandamme and S. Vermeire (2011). "Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives." Gut **60**(5): 631-637.

Kanai, T., K. Matsuoka, M. Naganuma, A. Hayashi and T. Hisamatsu (2014). "Diet, microbiota, and inflammatory bowel disease: lessons from Japanese foods." Korean J Intern Med **29**(4): 409-415.

Katayama, K., K. Wada, A. Nakajima, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Kadowaki, R. Nagai, Y. Kamisaki, R. S. Blumberg and T. Mayumi (2003). "A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model." Gastroenterology **124**(5): 1315-1324.

Kefalakes, H., T. J. Stylianides, G. Amanakis and G. Kolios (2009). "Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality?" Eur J Clin Pharmacol **65**(10): 963-970.

Kelley, D. S., P. C. Taylor, G. J. Nelson, P. C. Schmidt, A. Ferretti, K. L. Erickson, R. Yu, R. K. Chandra and B. E. Mackey (1999). "Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men." Lipids **34**(4): 317-324.

Kim, E. R. and D. K. Chang (2014). "Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis." World J Gastroenterol **20**(29): 9872-9881.

Kitajima, S., S. Takuma and M. Morimoto (1999). "Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." Exp Anim **48**(3): 137-143.

Kitajima, S., S. Takuma and M. Morimoto (1999). "Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis." J Vet Med Sci **61**(1): 67-70.

Klingenberg, I. L., D. A. Knabe and S. B. Smith (1995). "Lipid metabolism in pigs fed beef tallow or high-oleic acid sunflower oil." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **110**(1): 183-192.

Kohno, H., R. Suzuki, R. Noguchi, M. Hosokawa, K. Miyashita and T. Tanaka (2002). "Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats." Jpn J Cancer Res **93**(2): 133-142.

Kohno, H., R. Suzuki, Y. Yasui, M. Hosokawa, K. Miyashita and T. Tanaka (2004). "Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats." Cancer Sci **95**(6): 481-486.

Kostic, A. D., R. J. Xavier and D. Gevers (2014). "The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead." Gastroenterology **146**(6): 1489-1499.

Koutroubakis, I. E., I. G. Vlachonikolis, A. Kapsoritakis, S. Spanoudakis, M. Roussomoustakaki, I. A. Mouzas, E. A. Kouroumalis and O. N. Manousos (1999). "Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: case-controlled study in Crete." Dis Colon Rectum **42**(2): 225-230.

Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Muller (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.

Laroui, H., S. A. Ingersoll, H. C. Liu, M. T. Baker, S. Ayyadurai, M. A. Charania, F. Laroui, Y. Yan, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2012). "Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon." PLoS One **7**(3): e32084.

Lee, K. N., M. W. Pariza and J. M. Ntambi (1998). "Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression." Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 817-821.

Lee, Y. and J. P. Vanden Heuvel (2010). "Inhibition of macrophage adhesion activity by 9trans,11trans-conjugated linoleic acid." J Nutr Biochem **21**(6): 490-497.

Lei, J., H. Hasegawa, T. Matsumoto and M. Yasukawa (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists together with TGF-beta convert human CD4+CD25- T cells into functional Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **185**(12): 7186-7198.

Linskens, R. K., X. W. Huijsdens, P. H. Savelkoul, C. M. Vandenbroucke-Grauls and S. G. Meuwissen (2001). "The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics." Scand J Gastroenterol Suppl(234): 29-40.

Liu, J. Z., S. van Sommeren, H. Huang, S. C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J. C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abedian, J. H. Cheon, J. Cho, N. E. Daryani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R. C. Juyal, G. Juyal, W. H. Kim, A. P. Morris, H. Poustchi, W. G. Newman, V. Midha, T. R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J. J. Sung, R. Malekzadeh, H. J. Westra, K. Yamazaki, S. K. Yang, C. International Multiple Sclerosis Genetics, I. B. D. G. C. International, J. C. Barrett, A. Franke, B. Z. Alizadeh, M. Parkes, K. T. B, M. J. Daly, M. Kubo, C. A. Anderson and R. K. Weersma (2015). "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations." Nat Genet.

Lopes, D. (2013). "Dietary supplementation of conjugated linoleic acid , added to a drink milk, in women." Asian journal of scientific research

Loscher, C. E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K. H. Mills and H. M. Roche (2005). "Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction." J Immunol **175**(8): 4990-4998.

Lu, C., A. Waugh, R. J. Bailey, R. Cherry, L. A. Dieleman, L. Gramlich, K. Matic, M. Millan, K. I. Kroeker, D. Sadowski, C. W. Teshima, D. Todoruk, C. Wong, K. Wong and R. N. Fedorak (2012). "Crohn's disease genotypes of patients in remission vs relapses after infliximab discontinuation." World J Gastroenterol **18**(36): 5058-5064.

Malle, E., G. Marsche, U. Panzenboeck and W. Sattler (2006). "Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins." Arch Biochem Biophys **445**(2): 245-255.

Mandir, N. and R. A. Goodlad (2008). "Conjugated linoleic acids differentially alter polyp number and diameter in the Apc(min/+) mouse model of intestinal cancer." Cell Prolif **41**(2): 279-291.

Mansen, A., H. Guardiola-Diaz, J. Rafter, C. Branting and J. A. Gustafsson (1996). "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa." Biochemical and biophysical research communications **222**(3): 844-851.

Marion-Letellier, R., M. Butler, P. Dechelotte, R. J. Playford and S. Ghosh (2008). "Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation." Am J Clin Nutr **87**(4): 939-948.

Massironi, S., R. E. Rossi, F. A. Cavalcoli, S. Della Valle, M. Fraquelli and D. Conte (2013). "Nutritional deficiencies in inflammatory bowel disease: therapeutic approaches." Clin Nutr **32**(6): 904-910.

Mastalier, B., C. Tihon, B. Ghita, C. Botezatu, V. Deaconescu, P. Mandisodza, C. Draghici and S. Simion (2012). "Surgical treatment of colon cancer: Colentina surgical clinic experience." J Med Life **5**(3): 348-353.

Meade, C. J. and J. Mertin (1978). "Fatty acids and immunity." Adv Lipid Res **16**: 127-165.

Melgar, S., L. Karlsson, E. Rehnstrom, A. Karlsson, H. Utkovic, L. Jansson and E. Michaelsson (2008). "Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease." Int Immunopharmacol **8**(6): 836-844.

Menezes, J. S., D. S. Mucida, D. C. Cara, J. I. Alvarez-Leite, M. Russo, N. M. Vaz and A. M. de Faria (2003). "Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system." Int Immunol **15**(3): 447-455.

Mills, C. D. (2012). "M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease." Crit Rev Immunol **32**(6): 463-488.

Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman and A. M. Hill (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-6173.

Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy and S. Sakaguchi (2009). "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." Immunity **30**(6): 899-911.

Miyazaki, M., M. T. Flowers, H. Sampath, K. Chu, C. Otzelberger, X. Liu and J. M. Ntambi (2007). "Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis." Cell Metab **6**(6): 484-496.

Miyazawa, F., O. R. Olijnyk, C. J. Tilley and T. Tamaoki (1967). "Interactions between dextran sulfate and Escherichia coli ribosomes." Biochim Biophys Acta **145**(1): 96-104.

Molenaar, R., M. Knippenberg, G. Goverse, B. J. Olivier, A. F. de Vos, T. O'Toole and R. E. Mebius (2011). "Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A." J Immunol **186**(4): 1934-1942.

Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema and G. G. Kaplan (2012). "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." Gastroenterology **142**(1): 46-54 e42; quiz e30.

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.

Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.

Munkholm, P. (2003). "Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **18 Suppl 2**: 1-5.

Murch, S. H. and J. A. Walker-Smith (1998). "Nutrition in inflammatory bowel disease." Baillieres Clin Gastroenterol **12**(4): 719-738.

Murray, P. J., J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A. Fisher, D. W. Gilroy, S. Goerdts, S. Gordon, J. A. Hamilton, L. B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F. O. Martinez, J. L. Mege, D. M. Mosser, G. Natoli, J. P. Saeij, J. L. Schultze, K. A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J. A. van Genderachter, S. N. Vogel and T. A. Wynn (2014). "Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines." Immunity **41**(1): 14-20.

Nakanishi, T., T. Koutoku, S. Kawahara, A. Murai and M. Furuse (2003). "Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E(2) in mice." Neurosci Lett **341**(2): 135-138.

Nebot-Vivinus, M., C. Harkat, H. Bziouche, C. Cartier, R. Plichon-Dainese, L. Moussa, H. Eutamene, D. Pishvaie, S. Holowacz, C. Seyrig, T. Piche and V. Theodorou (2014). "Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models." World J Gastroenterol **20**(22): 6832-6843.

Nell, S., S. Suerbaum and C. Josenhans (2010). "The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models." Nat Rev Microbiol **8**(8): 564-577.

Ng, S. C. (2014). "Epidemiology of inflammatory bowel disease: focus on Asia." Best Pract Res Clin Gastroenterol **28**(3): 363-372.

Ni, J., S. F. Chen and D. Hollander (1996). "Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes." Gut **39**(2): 234-241.

Nishihira, J. (2012). "Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease." Ann N Y Acad Sci **1271**: 53-57.

Nishikawa, H. and S. Sakaguchi (2014). "Regulatory T cells in cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **27**: 1-7.

Nishizaki, Y., K. Shimada, S. Tani, T. Ogawa, J. Ando, M. Takahashi, M. Yamamoto, T. Shinozaki, K. Miyauchi, K. Nagao, A. Hirayama, M. Yoshimura, I. Komuro, R. Nagai and H. Daida (2014). "Significance of imbalance in the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids in patients with acute coronary syndrome." Am J Cardiol **113**(3): 441-445.

Ntambi, J. M., M. Miyazaki, J. P. Stoeber, H. Lan, C. M. Kendziora, B. S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J. M. Friedman and A. D. Attie (2002). "Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11482-11486.

O'Shea, E. F., P. D. Cotter, C. Stanton, R. P. Ross and C. Hill (2012). "Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid." Int J Food Microbiol **152**(3): 189-205.

O'Shea, M., J. Bassaganya-Riera and I. C. Mohede (2004). "Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid." Am J Clin Nutr **79**(6 Suppl): 1199S-1206S.

O'Toole, A. and J. Korzenik (2014). "Environmental triggers for IBD." Curr Gastroenterol Rep **16**(7): 396.

Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. Red Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante and A. Chawla (2007). "Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance." Nature **447**(7148): 1116-1120.

Ogasawara, N., T. Kojima, M. Go, T. Ohkuni, J. Koizumi, R. Kamekura, T. Masaki, M. Murata, S. Tanaka, J. Fuchimoto, T. Himi and N. Sawada (2010). "PPARgamma agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells." Pharmacol Res **61**(6): 489-498.

Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez and J. H. Cho (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-606.

Ohkusa, T. (1985). "[Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]." Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi **82**(5): 1327-1336.

Ohnuki, K., S. Haramizu, K. Oki, K. Ishihara and T. Fushiki (2001). "A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice." Lipids **36**(6): 583-587.

Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki and R. Nakaya (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.

Okayasu, I., M. Yamada, T. Mikami, T. Yoshida, J. Kanno and T. Ohkusa (2002). "Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model." J Gastroenterol Hepatol **17**(10): 1078-1083.

Ono, M., N. Okamoto and T. Saibara (2010). "The latest idea in NAFLD/NASH pathogenesis." Clin J Gastroenterol **3**(6): 263-270.

Opheim, R., M. L. Hoivik, I. C. Solberg, B. Moum and I. S. Group (2012). "Complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease: the results of a population-based inception cohort study (IBSEN)." J Crohns Colitis **6**(3): 345-353.

Ott, C. and J. Scholmerich (2013). "Extraintestinal manifestations and complications in IBD." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(10): 585-595.

Paiotti, A. P., P. Marchi, S. J. Miszputen, C. T. Oshima, M. Franco and D. A. Ribeiro (2012). "The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors on experimental colitis." In Vivo **26**(3): 381-393.

Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield and D. E. Bauman (2005). "Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans." Adv Food Nutr Res **50**: 179-217.

Pariza, M. W. and Y. L. Ha (1990). "Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: mechanism of anticarcinogenic effect." Prog Clin Biol Res **347**: 217-221.

Pariza, M. W., Y. Park and M. E. Cook (2001). "The biologically active isomers of conjugated linoleic acid." Prog Lipid Res **40**(4): 283-298.

Park, H. G., W. Heo, S. B. Kim, H. S. Kim, G. S. Bae, S. H. Chung, H. C. Seo and Y. J. Kim (2011). "Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and its compatibility with CLA-producing rumen bacteria." J Agric Food Chem **59**(3): 984-988.

Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook and M. W. Pariza (1997). "Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice." Lipids **32**(8): 853-858.

Park, Y., M. W. Pariza and Y. Park (2008). "Cosupplementation of dietary calcium and conjugated linoleic acid (CLA) improves bone mass in mice." J Food Sci **73**(7): C556-560.

Perse, M. and A. Cerar (2011). "Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats." J Biomed Biotechnol **2011**: 473964.

Perse, M. and A. Cerar (2012). "Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks." J Biomed Biotechnol **2012**: 718617.

Peterson, L. D., F. Thies and P. C. Calder (1999). "Dose-dependent effects of dietary gamma-linolenic acid on rat spleen lymphocyte functions." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids **61**(1): 19-24.

Platt, A. M., C. C. Bain, Y. Bordon, D. P. Sester and A. M. Mowat (2010). "An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation." J Immunol **184**(12): 6843-6854.

Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner and S. P. Balk (1993). "Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain." J Exp Med **178**(1): 1-16.

Powrie, F., M. W. Leach, S. Mauze, L. B. Caddle and R. L. Coffman (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-1471.

Quattropiani, C., B. Ausfeld, A. Straumann, P. Heer and F. Seibold (2003). "Complementary alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease: use and attitudes." Scand J Gastroenterol **38**(3): 277-282.

Rainer, L. and C. J. Heiss (2004). "Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition." J Am Diet Assoc **104**(6): 963-968, quiz 1032.

Rappaport, R. S. and G. R. Dodge (1982). "Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2." The Journal of experimental medicine **155**(3): 943-948.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen and G. C. Fahey, Jr. (1993). "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 **123**(11): 1939-1951.

Richman, E. and J. M. Rhodes (2013). "Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease." Aliment Pharmacol Ther **38**(10): 1156-1171.

Riserus, U., S. Basu, S. Jovinge, G. N. Fredrikson, J. Arnlov and B. Vessby (2002). "Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative

stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance." Circulation **106**(15): 1925-1929.

Ritzenthaler, K. L., M. K. McGuire, R. Falen, T. D. Shultz, N. Dasgupta and M. A. McGuire (2001). "Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology." J Nutr **131**(5): 1548-1554.

Rivas, M. A., M. Beaudoin, A. Gardet, C. Stevens, Y. Sharma, C. K. Zhang, G. Boucher, S. Ripke, D. Ellinghaus, N. Burtt, T. Fennell, A. Kirby, A. Latiano, P. Goyette, T. Green, J. Halfvarson, T. Haritunians, J. M. Korn, F. Kuruvilla, C. Lagace, B. Neale, K. S. Lo, P. Schumm, L. Torkvist, D. National Institute of, C. Digestive Kidney Diseases Inflammatory Bowel Disease Genetics, C. United Kingdom Inflammatory Bowel Disease Genetics, C. International Inflammatory Bowel Disease Genetics, M. C. Dubinsky, S. R. Brant, M. S. Silverberg, R. H. Duerr, D. Altshuler, S. Gabriel, G. Lettre, A. Franke, M. D'Amato, D. P. McGovern, J. H. Cho, J. D. Rioux, R. J. Xavier and M. J. Daly (2011). "Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease." Nat Genet **43**(11): 1066-1073.

Rivollier, A., J. He, A. Kole, V. Valatas and B. L. Kelsall (2012). "Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon." J Exp Med **209**(1): 139-155.

Roche, H. M., A. M. Terres, I. B. Black, M. J. Gibney and D. Kelleher (2001). "Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells." Gut **48**(6): 797-802.

Roelofs, H. M., R. H. Te Morsche, B. W. van Heumen, F. M. Nagengast and W. H. Peters (2014). "Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer." BMC Gastroenterol **14**: 1.

Rola-Pleszczynski, M. and J. Stankova (1992). "Cytokine gene regulation by PGE(2), LTB(4) and PAF." Mediators of inflammation **1**(1): 5-8.

Russel, M. G. (2000). "Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean?" Eur J Intern Med **11**(4): 191-196.

Saez, E., P. Tontonoz, M. C. Nelson, J. G. Alvarez, U. T. Ming, S. M. Baird, V. A. Thomazy and R. M. Evans (1998). "Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation." Nat Med **4**(9): 1058-1061.

Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi and T. Nomura (2006). "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." Immunol Rev **212**: 8-27.

Sakamoto, N., S. Kono, K. Wakai, Y. Fukuda, M. Satomi, T. Shimoyama, Y. Inaba, Y. Miyake, S. Sasaki, K. Okamoto, G. Kobashi, M. Washio, T. Yokoyama, C. Date, H. Tanaka and J. Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in (2005). "Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan." Inflamm Bowel Dis **11**(2): 154-163.

Samowitz, W. S. and M. L. Slattery (1997). "Transforming growth factor-beta receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas." Am J Pathol **151**(1): 33-35.

Sanduleanu, S. and M. D. Rutter (2014). "Interval colorectal cancers in inflammatory bowel disease: the grim statistics and true stories." Gastrointest Endosc Clin N Am **24**(3): 337-348.

Santos Rocha, C., A. C. Gomes-Santos, T. Garcias Moreira, M. de Azevedo, T. Diniz Luerce, M. Mariadassou, A. P. Longaray Delamare, P. Langella, E. Maguin, V. Azevedo, A. M. Caetano de Faria, A. Miyoshi and M. van de Guchte (2014). "Local and systemic immune mechanisms underlying the anti-colitis effects of the dairy bacterium *Lactobacillus delbrueckii*." PLoS One **9**(1): e85923.

Sarraf, P., E. Mueller, D. Jones, F. J. King, D. J. DeAngelo, J. B. Partridge, S. A. Holden, L. B. Chen, S. Singer, C. Fletcher and B. M. Spiegelman (1998). "Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma." Nat Med **4**(9): 1046-1052.

Schmid, A., M. Collomb, R. Sieber and G. Bee (2006). "Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review." Meat Sci **73**(1): 29-41.

Schmidt, C., E. Kosche, B. Baumeister and H. Vetter (1995). "Arachidonic acid metabolism and intracellular calcium concentration in inflammatory bowel disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **7**(9): 865-869.

Scurr, M., K. Ladell, M. Besneux, A. Christian, T. Hockey, K. Smart, H. Bridgeman, R. Hargest, S. Phillips, M. Davies, D. Price, A. Gallimore and A. Godkin (2014). "Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP(+) Foxp3(-) T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3(+) regulatory T cells." Mucosal Immunol **7**(2): 428-439.

Sehat, N., M. P. Yurawecz, J. A. Roach, M. M. Mossoba, J. K. Kramer and Y. Ku (1998). "Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers." Lipids **33**(2): 217-221.

Sepulveda, S. E., C. J. Beltran, A. Peralta, P. Rivas, N. Rojas, C. Figueroa, R. Quera and M. A. Hermoso (2008). "[Inflammatory bowel diseases: an immunological approach]." Rev Med Chil **136**(3): 367-375.

Shapiro, A. C., D. Wu and S. N. Meydani (1993). "Eicosanoids derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response." Prostaglandins **45**(3): 229-240.

Shariat, S. F., J. H. Kim, B. Andrews, M. W. Kattan, T. M. Wheeler, I. Y. Kim, S. P. Lerner and K. M. Slawin (2001). "Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) strongly predict clinical outcome in patients with bladder carcinoma." Cancer **92**(12): 2985-2992.

Shin, K. H., Y. J. Park and J. G. Park (2000). "Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early-onset colorectal cancer patients." Clin Cancer Res **6**(2): 536-540.

Shintani, N., T. Nakajima, T. Okamoto, T. Kondo, N. Nakamura and T. Mayumi (1998). "Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action." Gen Pharmacol **31**(3): 477-481.

Shiraishi, R., R. Iwakiri, T. Fujise, T. Kuroki, T. Kakimoto, T. Takashima, Y. Sakata, S. Tsunada, Y. Nakashima, T. Yanagita and K. Fujimoto (2010). "Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow." J Gastroenterol **45**(6): 625-635.

Souza, M. B., A.G.S; and J. E. Aguilar-Nascimento (2008). "The Epidemiological Profile of Patients with Inflammatory Bowel Disease in the State of Mato Grosso." Rev bras Coloproct **28**(3).

Souza, M. H., L. E. Troncon, C. M. Rodrigues, C. F. Viana, P. H. Onofre, R. A. Monteiro, A. D. Passos, A. L. Martinelli and U. G. Meneghelli (2002). "[Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]." *Arq Gastroenterol* **39**(2): 98-105.

Spehlmann, M. E., S. M. Dann, P. Hruz, E. Hanson, D. F. McCole and L. Eckmann (2009). "CXCR2-dependent mucosal neutrophil influx protects against colitis-associated diarrhea caused by an attaching/effacing lesion-forming bacterial pathogen." *J Immunol* **183**(5): 3332-3343.

Spooren, C. E., M. J. Pierik, M. P. Zeegers, E. J. Feskens, A. A. Masclee and D. M. Jonkers (2013). "Review article: the association of diet with onset and relapse in patients with inflammatory bowel disease." *Aliment Pharmacol Ther* **38**(10): 1172-1187.

Stachowska, E., B. Dolegowska, V. Dziedziejko, M. Rybicka, M. Kaczmarczyk, J. Bober, M. Rac, B. Machalinski and D. Chlubek (2009). "Prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane A2 (TXA2) synthesis is regulated by conjugated linoleic acids (CLA) in human macrophages." *J Physiol Pharmacol* **60**(1): 77-85.

Stefanson, A., L. E. Hopkins, O. AlZahal, I. R. Ritchie, T. MacDonald, D. C. Wright, B. W. McBride and D. J. Dyck (2014). "Feeding butter with elevated content of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid to lean rats does not impair glucose tolerance or muscle insulin response." *Lipids Health Dis* **13**: 101.

Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." *J Exp Med* **176**(1): 287-292.

Stenson, W. F. (1990). "Role of eicosanoids as mediators of inflammation in inflammatory bowel disease." *Scand J Gastroenterol Suppl* **172**: 13-18.

Stout, R. D. and J. Suttles (2004). "Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments." *J Leukoc Biol* **76**(3): 509-513.

Straus, D. S. and C. K. Glass (2007). "Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms." *Trends Immunol* **28**(12): 551-558.

Strobel, S. (1993). "Mechanisms of mucosal immunology and gastrointestinal damage." *Pediatr Allergy Immunol* **4**(3 Suppl): 25-32.

Strober, W., I. Fuss and P. Mannon (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." *J Clin Invest* **117**(3): 514-521.

Su, C. G., X. Wen, S. T. Bailey, W. Jiang, S. M. Rangwala, S. A. Keilbaugh, A. Flanigan, S. Murthy, M. A. Lazar and G. D. Wu (1999). "A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response." *J Clin Invest* **104**(4): 383-389.

Suzuki, R., Y. Yasui, H. Kohno, S. Miyamoto, M. Hosokawa, K. Miyashita and T. Tanaka (2006). "Catalpa seed oil rich in 9t,11t,13c-conjugated linolenic acid suppresses the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rats." *Oncol Rep* **16**(5): 989-996.

Szanto, A., B. L. Balint, Z. S. Nagy, E. Barta, B. Dezso, A. Pap, L. Szeles, S. Poliska, M. Oros, R. M. Evans, Y. Barak, J. Schwabe and L. Nagy (2010). "STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells." *Immunity* **33**(5): 699-712.

Tanaka, T. (2009). "Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies." *J Carcinog* **8**: 5.

Tanaka, T., H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yamada, S. Sugie and H. Mori (2003). "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." *Cancer Sci* **94**(11): 965-973.

Tilloy, F., E. Treiner, S. H. Park, C. Garcia, F. Lemonnier, H. de la Salle, A. Bendelac, M. Bonneville and O. Lantz (1999). "An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals." *J Exp Med* **189**(12): 1907-1921.

Treiner, E., L. Duban, S. Bahram, M. Radosavljevic, V. Wanner, F. Tilloy, P. Affaticati, S. Gilfillan and O. Lantz (2003). "Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1." *Nature* **422**(6928): 164-169.

Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. C. Calder and P. Yaquob (2004). "Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans." *Am J Clin Nutr* **80**(6): 1626-1633.

Tsushima, H., S. Kawata, S. Tamura, N. Ito, Y. Shirai, S. Kiso, Y. Imai, H. Shimomukai, Y. Nomura, Y. Matsuda and Y. Matsuzawa (1996). "High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression." *Gastroenterology* **110**(2): 375-382.

Tuna, H., R. G. Avdiushko, V. J. Sindhava, L. Wedlund, C. S. Kaetzel, A. M. Kaplan, S. Bondada and D. A. Cohen (2014). "Regulation of the mucosal phenotype in dendritic cells by PPARgamma: role of tissue microenvironment." *J Leukoc Biol* **95**(3): 471-485.

Turpeinen, A. M., M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D. L. Palmquist and J. M. Griinari (2002). "Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans." *Am J Clin Nutr* **76**(3): 504-510.

Urquhart, P., S. M. Parkin, J. S. Rogers, J. A. Bosley and A. Nicolaou (2002). "The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* **1580**(2-3): 150-160.

van Heel, D. A., S. A. Fisher, A. Kirby, M. J. Daly, J. D. Rioux, C. M. Lewis and I. B. D. I. G. C. Genome Scan Meta-Analysis Group of the (2004). "Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs." *Hum Mol Genet* **13**(7): 763-770.

Van Limbergen, J., G. Radford-Smith and J. Satsangi (2014). "Advances in IBD genetics." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**(6): 372-385.

Varley, C. L., M. A. Garthwaite, W. Cross, J. Hinley, L. K. Trejdosiewicz and J. Southgate (2006). "PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation." *J Cell Physiol* **208**(2): 407-417.

Victoria, C. R., L. Y. Sassak and H. R. Nunes (2009). "Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil." *Arq Gastroenterol* **46**(1): 20-25.

Viennois, E., F. Chen, H. Laroui, M. T. Baker and D. Merlin (2013). "Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA." *BMC Res Notes* **6**: 360.

Villar-Tajadura, M. A., L. M. Rodriguez-Alcala, V. Martin, A. Gomez de Segura, J. M. Rodriguez, T. Requena and J. Fontecha (2014). "Production of Conjugated Linoleic and Conjugated alpha-Linolenic Acid in a Reconstituted Skim Milk-Based Medium by

Bifidobacterial Strains Isolated from Human Breast Milk." Biomed Res Int **2014**: 725406.

Wahle, K. W., S. D. Heys and D. Rotondo (2004). "Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?" Prog Lipid Res **43**(6): 553-587.

Wang, J., X. Liu, X. Zhang, J. Liu, S. Ye, S. Xiao, H. Chen and H. Wang (2013). "Induction of apoptosis by c9, t11-CLA in human endometrial cancer RL 95-2 cells via ERalpha-mediated pathway." Chem Phys Lipids **175-176**: 27-32.

Wang, L., B. Waltenberger, E. M. Pferschy-Wenzig, M. Blunder, X. Liu, C. Malainer, T. Blazevic, S. Schwaiger, J. M. Rollinger, E. H. Heiss, D. Schuster, B. Kopp, R. Bauer, H. Stuppner, V. M. Dirsch and A. G. Atanasov (2014). "Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review." Biochem Pharmacol.

West, D. B., J. P. Delany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett and J. Scimeca (1998). "Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse." Am J Physiol **275**(3 Pt 2): R667-672.

Williams, J. A., S. E. Batten, M. Harris, B. D. Rockett, S. R. Shaikh, W. Stillwell and S. R. Wassall (2012). "Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains." Biophysical journal **103**(2): 228-237.

Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-546.

Wirtz, S. and M. F. Neurath (2007). "Mouse models of inflammatory bowel disease." Adv Drug Deliv Rev **59**(11): 1073-1083.

Wojtowicz-Praga, S. (2003). "Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors." Invest New Drugs **21**(1): 21-32.

Wright, M. B., M. Bortolini, M. Tadayyon and M. Bopst (2014). "Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists." Mol Endocrinol: me20131427.

Yamaguchi, T., K. Hirota, K. Nagahama, K. Ohkawa, T. Takahashi, T. Nomura and S. Sakaguchi (2007). "Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor." Immunity **27**(1): 145-159.

Yamasaki, M., H. Chujo, A. Hirao, N. Koyanagi, T. Okamoto, N. Tojo, A. Oishi, T. Iwata, Y. Yamauchi-Sato, T. Yamamoto, K. Tsutsumi, H. Tachibana and K. Yamada (2003). "Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid." J Nutr **133**(3): 784-788.

Yasui, Y., R. Suzuki, H. Kohno, S. Miyamoto, F. Beppu, M. Hosokawa, K. Miyashita and T. Tanaka (2007). "9trans,11trans conjugated linoleic acid inhibits the development of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats." Nutr Cancer **59**(1): 82-91.

Yu, Y., P. H. Correll and J. P. Vanden Heuvel (2002). "Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism." Biochim Biophys Acta **1581**(3): 89-99.

Yu, Y., P. H. Correll and J. P. Vanden Heuvel (2002). "Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism." Biochimica et biophysica acta **1581**(3): 89-99.

Zindl, C. L., J. F. Lai, Y. K. Lee, C. L. Maynard, S. N. Harbour, W. Ouyang, D. D. Chaplin and C. T. Weaver (2013). "IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense

and restitution of colonic epithelial integrity during colitis." Proc Natl Acad Sci U S A
110(31): 12768-12773.