

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA

**Microbiota, Dieta e Sistema Imune: um diálogo constante
via ativação do receptor acoplado à proteína-G 43 (Gpr43)**

Angélica Thomáz Vieira

Belo Horizonte - MG

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA

**Microbiota, Dieta e Sistema Imune: um diálogo constante
via ativação do receptor acoplado à proteína-G 43 (Gpr43)**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
(Depto. de Bioquímica e Imunologia)

Angélica Thomáz Vieira

Belo Horizonte- MG

2011

*À minha mãe por tanto amor e incentivo.
Ao VV pelo carinho, pelo incentivo e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Essa tese, sem dúvida, marcou a minha vida, não só pelo que ela representa para mim; mas, principalmente, pelos incentivos múltiplos que partiram de todos os lados, principalmente daqueles que acreditaram que eu conseguiria. Chego até aqui, com o sentimento de dever cumprido, mas não satisfeita. Pois, o desejo do conhecimento, ainda persiste.

A todo o grupo de Imunofarmacologia, em especial aos meus grandes amigos:

Kátia (Katita), Lucíola (Lu), Maria Cecília (Ciça), Caio (Caio Brito), Daniel (Daniels), Tiago (da Lu) Patrícia (Tica), Norine (Noris), Flávio (Flavão), Cris (Cristiana), Lívia (Livinha), Marina (Meuri), Remo (Remito), Ana Letícia (Aninha), Luciana (Lu), Bárbara (Ba), Cristiano (Cris), Lirlândia (Landa), Flávio Lopes (Flopes), Fernanda Ferraz (Fer loira), Juliana Lauar (Ju) e Louisa (Lou).

Aos que já não estão presentes no laboratório, porém contribuíram muito para minha formação: Letícia (Lets), Carol (Carols), Adriano (Dri), Ester, Adriana Soares (Dri), Adriana (Dri-eae) e Maria Clara (Meuri Clara).

Ao Lilaj, pelos prazerosos momentos juntos, pelas trocas de experiências e pelas ajudas de última hora e de todos os momentos.

Aos professores Jacques Nicoli, Leda Quércia e especialmente ao Flaviano Martins (Flavs) e seus alunos, por sempre abrirem as portas do laboratório, pelas boas discussões, por sempre estarem disponíveis e principalmente, por disponibilizarem os animais germ-free.

À Frank, Ilma e Mirla pelo apoio técnico.

Aos amigos do Garvan Institute, com quem aprendi e vivenciei diversas experiências: Heidi Schilter, Ellen de Leon, Dóris Shim, Bernice Tan, Louis Tsai e Nina Chilaver.

Ao meu orientador e colaborador do Doutorado Sandwish, Dr. Charles Mackay, pela confiança, apoio, pela grande oportunidade e também por ter contribuído com os animais deficientes de Gpr43 e com grande parte destes trabalhos. Obrigada também a Kendle Maslowisk com quem compartilhei e participei do projeto Gpr43.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, professores e em especial à Celise, Grazziele e Polyanna.

A turma de Bases I e II, pela convivência e troca de experiências.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe, Miriam, que não mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu Vinicius (VV), que acompanhou toda a minha ansiedade, angústia e que sempre me apoiou. A ele, mais do que nunca, peço desculpas pela ausência.

A CAPES, CNPq e CRC, pelo financiamento do trabalho e bolsas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador e mestre, Mauro Martins Teixeira, simplesmente por tudo!!! Pela confiança, pela oportunidade, pela dedicação, generosidade, entusiasmo, pelas análises críticas e, principalmente, pela paciência. Obrigada até mesmo pelos “puxões de orelha”. Eles foram muito importante para o meu crescimento. Obrigada por fazer parte da minha formação!!!!

“Se vi mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

“Só sei... que nada sei”

Sócrates

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Microbiota humana: “Um superorganismo”.....	16
1.2 Sistema Imune.....	19
1.3 Dieta.....	26
1.3.1 SCFAs e Gpr43.....	31
1.4 Fatores que interferem na composição microbiana.....	33
1.5 Microbiota como alvo terapêutico: uso de probióticos e prebióticos.....	37
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL.....	40
3-TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	41
3.1 Trabalho Científico -1.....	42
3.2 Trabalho Científico - 2.....	64
3.3 Revisão Científica -3.....	105
4- CONCLUSÕES GLOBAIS.....	130
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
6- ANEXOS.....	147
6.1 Anexo-1.....	148
6.2 Anexo-2.....	159
6.3 Anexo- 3.....	175
6.4 Anexo- 4.....	184
6.5 Anexo- 5.....	194

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição microbiana do trato gastrointestinal humano.....	17
Figura 2: Interação microbiota e hospedeiro na homeostase intestinal e no desenvolvimento de IBD.....	21
Figura 3: Fases do processo inflamatório.....	23
Figura 4: A microbiota moldando a imunidade adaptativa do hospedeiro.....	25
Figura 5: Fermentação bacteriana no intestino.....	29
Figura 6: Microbiota e o balanço entre simbiose e disbiose.....	34
Figura 7: Mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias intestinais.....	36
Figura 8: Microbiota, dieta e sistema imune: um diálogo constante via ativação do Gpr43.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CV- Convencionais

DSS - "*Dextran Sulphate de Sodiun*" (Sulfato de sódio Dextran)

ELISA - "*Enzyme- linked immunosorbent assay*" (Ensaio imunoenzimático)

EPO – "*Eosinophil peroxidase*" Peroxidase eosinofílica

GF- "*Germ free*" (isentos de germe)

GPR43- "*G- protein couplet receptor 43*" (Receptor 43 acoplado à proteína G)

H&E - Hematoxilina e eosina

IBD - "*Inflammatory Bowel Disease*" (Doença inflamatória intestinal)

IL-1 - Interleucina – 1

IL-10 –Interleucina -10

KC – « *Keratinocyte chemokine* » (Quimiocina derivada de queratinócito CXCL1-2)

LPS – Lipopolissacarídeo

MSU – Monossódio de Urato

MCP-1(JE) – «*Monocyte chemotactic protein 1*»(Proteína quimiotática de monócitos 1)

MPO – Mieloperoxidase

PMNs - Polimorfonucleares

ROS – "*Reactive oxygen species*" (Espécies reativas de oxigênio)

SCFAs – "*Short chain fatty acids*" (Ácidos graxos de cadeia curta)

Th – Linfócito T helper

TLR – "*Toll-like receptor*" (Receptores do tipo Toll)

TNBS – "*2,4,6-Trinitrobenzene sulphonic acid*" (Ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico)

TNF- α - "*Tumor Necrosis Factor alpha*" (Fator de necrose tumoral alfa)

Treg- Linfócito T regulador

UC – “*Ulcerative Colitis*” (Colite Ulcerativa)

SFB – Bactérias filamentosas segmentadas

BF – *Bifidobacterium*

RESUMO

As bactérias comensais do trato gastrointestinal modulam o desenvolvimento do sistema imune. A microbiota intestinal produz fatores que são benéficos pois regulam a resposta imune do hospedeiro. Um desses fatores são os “*short-chain fatty acids (SCFA)*” do português: ácidos graxos de cadeia curta, que são produzidos pela fermentação de fibras solúveis da dieta pela microbiota “saudável”, tais quais os gêneros *Bifidobacterium* e *Bacteroides*. Os SCFAs se ligam ao receptor acoplado à proteína G-43 (GPR43), também conhecido como FFAR2), e nesse trabalho demonstramos que a interação SCFA–GPR43 exerce efeitos modulatórios nas respostas inflamatórias. A estimulação do GPR43 pelo SCFA é necessária para a resolução da resposta inflamatória. Animais deficientes de GPR43 (*Gpr43*^{-/-}) mostraram uma exacerbada e não-resolutiva inflamação tanto no modelo de colite, quanto nos modelos de artrite e asma. Interessantemente, os animais *Gpr43*^{-/-} apresentaram uma resposta ineficiente a gota devido à inabilidade em ativar o complexo inflamassoma. Entretanto, o tratamento com acetato (o mais abundante SCFA) antes e depois da indução da gota nos animais selvagens, aboliu o dano tecidual, promovendo a resolução da resposta induzida pela gota. Além disso, animais alimentados com dieta rica em fibras ou com o próbiotico *Bifidobacterium longum* apresentaram uma redução do infiltrado celular nos animais desafiados com monossódio de urato (MSU). Animais germ-free (GF), que não possuem bactérias e, desse modo, não produzem SCFAs, mostraram uma resposta similar aos animais *Gpr43*^{-/-}. Animais GF apresentaram uma resposta exacerbada na colite, na asma, e na artrite reumatóide. No entanto, se tratarmos previamente os animais GF com acetato, observamos uma resposta inflamatória reduzida nesses modelos. Além disso, animais GF desafiados com MSU apresentaram uma “hiporresponsividade” similar ao *Gpr43*^{-/-} com reduzido recrutamento celular. Entretanto, tratamento prévio com acetato reverteu esta “hiporresponsividade”. Assim, esses dados sugerem a habilidade do acetato em primar o sistema imune permitindo o recrutamento de células durante a resposta induzida por MSU. Em resumo, esse trabalho sugere que a microbiota modula a habilidade do hospedeiro em responder aos estímulos inflamatórios e, a interação entre SCFA-GPR43 representa um mecanismo central entre dieta, microbiota e resposta imune, provendo um importante link entre eles.

ABSTRACT

The commensal bacterial of the gastrointestinal tract shapes the development of the immune system. The gut microbiota produces factors that are beneficial to the host for the regulation of immune responses. One of these factors may be the short-chain fatty acids (SCFA), which are produced by fermentation of dietary fiber by ‘healthy’ microbiota such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides*. SCFAs bind to G-protein coupled receptor 43 (GPR43, also known as FFAR2), and in this work we show that SCFA–GPR43 interactions exerts modulator effects in inflammatory responses. Stimulation of GPR43 by SCFA was necessary for the resolution of inflammatory responses. GPR43-deficient (*Gpr43*^{-/-}) mice showed exacerbated or unresolving inflammation in models of colitis, arthritis and asthma. Interestingly, the *Gpr43*^{-/-} mice showed impair response to gout by the inability to activate inflammasoma complex. However, acetate treatment before and after gout induction in wt mice abolished tissue injury promoting resolution of the inflammation. Furthermore, mice fed with higher fiber diet or with *Bifidobacterium longum* reduced cells infiltrate in mice challenged with MSU. Germ-free mice (GF), which are devoid of bacteria and no or little SCFAs production, showed a similar response to *Gpr43*^{-/-} mice. GF mice showed an exacerbated response in colitis, asthma and rheumatoid arthritis models. However, if we treated GF with acetate (the most abundant SCFA) before such diseases, a protective effect was observed. Furthermore, GF mice MSU challenged showed a similar “hiporresponsive” and inhibited recruitment of cells when compared to *Gpr43*^{-/-} mice. Although, when we treated GF with acetate before challenged with MSU this “phenotype” was reversed. Thus, these data suggested an ability of acetate to prime the immune system and allow inflammatory cell recruitment during response to MSU challenge. In summary, this work suggests that endogenous microbiota shapes the host’s ability to respond to inflammatory stimuli and SCFA-GPR43 interactions could represent a central mechanism to account for affects of diet and gut microbiota on immune responses providing a molecular link between diet, gastrointestinal bacterial metabolism and inflammatory responses.

PREFÁCIO

Iniciar uma tese contando um pouco da história da mesma é para mim bastante interessante. Afinal, são 10 anos de dedicação, experiências e descobertas que rodeiam toda essa trajetória. Não considero os resultados apenas dados impressos, mas sim reflexos de muitas fases da minha carreira científica, seja da época da iniciação científica, seja do mestrado, do sandwish, do então... doutorado! As idéias foram sempre surgindo...

Desde a iniciação científica a importância do papel das bactérias comensais influenciando as respostas imunes do hospedeiro, me fascinava. É um complexo evolutivo deslumbrante! E compreender essa relação de simbiose entre hóspede e hospedeiro era para mim tão intrigante! Utilizando animais isentos de germe e trabalhando com o modelo de colite, uma doença inflamatória intestinal crônica, pude observar nesses animais, um fenótipo interessante: eles apresentavam maior susceptibilidade à doença quando comparado com os animais convencionais (que possuem microbiota normal), demonstrando assim, um papel relevante das bactérias comensais na proteção à colite experimental em camundongos.

Enquanto, durante o mestrado, estudava o papel dos eosinófilos na colite (Vieira AT, 2009), sendo essas, primariamente conhecidas por participarem na resposta contra parasitas, surgiu a oportunidade de aprofundar mais nos mecanismos envolvidos na patogênese da colite em conjunto com o grupo da Austrália coordenado pelo Doutor Charles Mackay. Este grupo havia trabalhado com o papel do receptor acoplado a proteína G-43 (GPR43), que tem como ligante um produto metabólico (acetato) produzido pelas bactérias comensais a partir da fermentação de fibras solúveis. Interessantemente, esse receptor é encontrado altamente expresso em colonócitos e principalmente nos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Essas células são primordiais em uma resposta imune. Dessa forma, a junção dos dois trabalhos transformou-se em um grande achado, no qual, desvendamos e estabelecemos um elo importante entre a dieta, a microbiota e o sistema imune.

A presente Tese possui um formato alternativo de apresentação, de acordo com o permitido pelo Art. 50 do regulamento do Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. O formato apresentado compreende uma introdução abrangente sobre o objetivo do estudo da

tese, um conjunto de trabalhos científicos (1 publicado, 1 submetido e 1 revisão) com contribuição original e relevante na área de estudo seguido por uma conclusão global. Em anexo, seguem alguns trabalhos científicos já publicados, que correlacionam com a presente tese com os seguintes temas (colite, probióticos e animais germ-free), porém com objetivos distintos, dos quais sou co-autora. Dessa forma, esses trabalhos representam apenas documentos comprobatórios da publicação de artigos científicos durante o período do doutorado (necessários para a apresentação no formato de tese apresentado) não constituindo, portanto, objeto de análise dessa tese.

Angélica Thomáz Vieira

1-INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota humana: “Um superorganismo” (Bik, 2009)

Os micro-organismos são integrantes fundamentais na construção da Terra e tem sido como já sabemos essenciais na evolução da vida muito antes do surgimento dos Eucariotos. Esses microorganismos vivem em todas as partes da biosfera e são muito bem organizados. A associação entre a comunidade microbiana e seu hospedeiro eucarioto tem demonstrado, atualmente, uma forte interação que vai além de uma simples relação física e que permite uma variedade de benefícios fisiológicos.

Bactérias e vertebrados tem co-evoluído há milhares de anos vivendo em relação de simbiose. Mamíferos são colonizados por microorganismos comensais tanto na pele, na vagina, mas a grande maioria vive no trato gastrointestinal (Bik, 2009). Por definição, essa relação consiste em benefícios mútuos entre hóspede e hospedeiro, na qual as bactérias se beneficiam pela aquisição de um ambiente estável e com rico suplemento de nutrientes, enquanto o hospedeiro (homem), ganha de diversas formas: na habilidade de digerir, metabolizar e sintetizar produtos, no desenvolvimento do sistema imune, bem como, na proteção contra patógenos por meio de competição (Backhed et al., 2005; Ley et al., 2006b). Nas últimas décadas, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de elucidar melhor essa intrínseca relação (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Endt et al., 2010; Lee and Mazmanian, 2010; Salzman, 2011).

O trato gastrointestinal é constituído por uma extensa variedade de microorganismos, sendo que todo o conteúdo genético microbiano excede o complexo genoma humano, e este grande número de bactérias é 10 vezes superior ao número

total de células do indivíduo humano (Gill et al., 2006; Turnbaugh et al., 2007). Dessa forma, podemos considerar a existência de um “superorganismo” dentro do organismo humano. Esse conjunto de linhagens microbianas que vivem em um ambiente particular é denominado microbiota. Com relação à microbiota intestinal, cerca de 10^{14} bactérias (mais de 1000 espécies diferentes) estão distribuídas por todo o trato gastrointestinal (Figura 1), sendo a maior parte concentrada no intestino grosso.

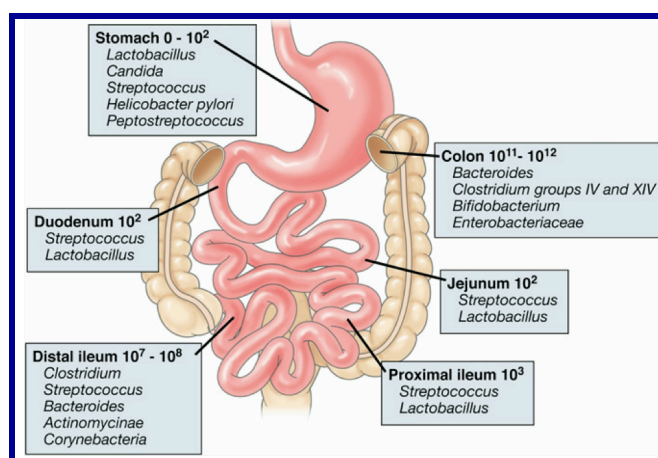


Figura 1: Composição microbiana do trato gastrointestinal humano. Retirado de (Costello et al., 2009; Sartor, 2008)

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas como a metagenômica, que identifica por meio do 16S rRNA microbiano, tem possibilitado o estudo do genoma microbiano. O projeto de elucidação do genoma da microbiota humana (microbioma) tem sido desenvolvido desde 2007 (Turnbaugh et al., 2007) e permite identificar bactérias antes não identificadas por não serem essas, cultiváveis. Estima-se que o genoma da nossa microbiota ultrapasse em 100 vezes o número de nossos genes (Ley et al., 2006a; Ley et al., 2006b).

A composição da microbiota intestinal varia dependendo da localização no trato gastro-intestinal (Figura 1), do micro-ambiente específico e também entre

indivíduos (Costello et al., 2009). A microbiota intestinal é altamente variável nos primeiros anos de vida do hospedeiro, no entanto, sua composição em nível de Filo vai se estabilizando no final do primeiro ano de vida (Palmer et al., 2007). Dentre os filos que dominam a microbiota intestinal em um humano adulto, destacam-se os Gram-negativos Bacteroidetes e os Gram-positivos Firmicutes, ambos compreendem cerca de 90% dos filos presentes na microbiota intestinal de mamíferos (Gill et al., 2006; Vacharaksa and Finlay, 2010). Embora exista uma alta diversidade de espécies microbiana e uma variação dessa entre indivíduos, a composição gênica das bactérias é relativamente consistente entre os indivíduos (Vacharaksa and Finlay, 2010).

A importância da microbiota, não somente no desenvolvimento, na saúde e em diversas funções para com o seu hospedeiro, é demonstrada claramente pelos animais isentos de microbiota: os animais germ-free (GF). Esses animais exibem inúmeros defeitos que podem ser compensados pela colonização microbiana (Macpherson and Harris, 2004; Souza et al., 2004). Grande parte desses defeitos estão relacionados com a função e o desenvolvimento do sistema imune (Sekirov et al., 2010; Willing et al., 2010). O papel do sistema imune de bebês recém-nascidos é muito semelhante aos dos animais GF. Uma vez que o trato gastrointestinal do feto é estéril (não colonizado por bactérias e outros organismos) é a partir do nascimento que se inicia o processo de colonização e formação da microbiota bem como da maturação do sistema imunológico (Stockinger et al., 2011). Dessa forma, a utilização de animais GF tem contribuído imensamente para a elucidação da relação entre a microbiota e o sistema imune.

1.2 Sistema Imune

O sistema imune tem se desenvolvido e co-evoluído de uma maneira bem eficiente para controlar e viver com a população de microorganismos com o qual está associado. Para que exista essa relação, o hospedeiro se protege contra invasões microbianas, lesões e também a reações indesejadas contra antígenos presentes nos alimentos, enquanto os microorganismos intestinais necessitam de proteção contra microorganismos competitivos e contra a própria resposta imune do hospedeiro. A mucosa intestinal participa ativamente no processo de reconhecimento da microbiota. Ela funciona como uma barreira física, impedindo a invasão dos micro-organismos mantendo a microbiota no lúmen intestinal, e produzindo substâncias (peptídeos antimicrobianos, defensinas, imunoglobulina A, muco) que inibem o crescimento excessivo de bactérias indesejáveis e, principalmente, contendo uma resposta exacerbada contra esses microorganismos permitindo com que eles colonizem o trato gastrointestinal (Backhed et al., 2005; Chung and Kasper, 2010; Hooper and Macpherson, 2010). Devido ao fato de que no cólon humano vive uma densa e complexa população de microorganismos, é particularmente difícil para o sistema imune reconhecer e lidar com os organismos que são comensais, mutualísticos e mesmo os patógenos oportunistas. As células epiteliais são extremamente importantes nesse contexto, e tem crescido muito o interesse no entendimento de como as células epiteliais comunicam com o sistema imune para a manutenção da integridade epitelial (Pull et al., 2005; Rakoff-Nahoum et al., 2004; Rimoldi et al., 2005). Muito desses mecanismos são mediados por meio do reconhecimento de sinais provenientes das bactérias, como, componentes da parede celular e segmentos de DNA ou metabólitos, foco dessa tese, que são reconhecidos por uma variedade de “*pattern-recognition*

receptors (PRRs)” expressos tanto nas células mielóides, quanto nas células epiteliais. Estes receptores, tais quais, TLRs, NOD-like (NLRs) e mesmo os GPCRs estão relacionados com o reconhecimento de motivos associados com parte microbianas (PAMPs), danos derivados do hospedeiro (DAMPs) e são necessários para a regeneração e reparo tecidual do intestino (Lavelle et al., 2010). A sinalização por meio desses receptores é capaz de desencadear uma resposta inflamatória fisiológica que favorece a proliferação de células progenitoras, bem como a sobrevivência das células epiteliais, permitindo, assim, a integridade intestinal (Saleh and Trinchieri, 2011). Falhas nesses mecanismos podem levar a uma resposta não controlada desencadeando um processo inflamatório inadequado (Figura 2). O modelo de colite induzido por Sulfato de sódio dextrana (DSS) possui efeito citotóxico aos enterócitos levando a um dano da barreira epitelial e permitindo a translocação bacteriana (Dieleman et al., 1994). Vários estudos utilizando esse modelo têm demonstrado a importância dos TLRs (Rakoff-Nahoum et al., 2004), dos NLRs (Nlrp3, Nlpr6) incluindo as moléculas envolvidas com inflamasoma (caspase-1, L-18-IL-18R e MyD88), na proteção da colite por participar do reparo tecidual do intestino (Dupaul-Chicoine et al., 2010; Elinav et al., 2011; Salcedo et al., 2010; Zaki et al., 2010). Consistente com esses achados, que demonstram a importância do reconhecimento microbiano pelo sistema imune na homeostase intestinal, a depleção da microbiota intestinal por meio de antibióticos e subsequente indução de colite por DSS, acentua o dano tecidual no intestino, exacerbando a colite (Maslowski et al., 2009; Saleh and Trinchieri, 2011).

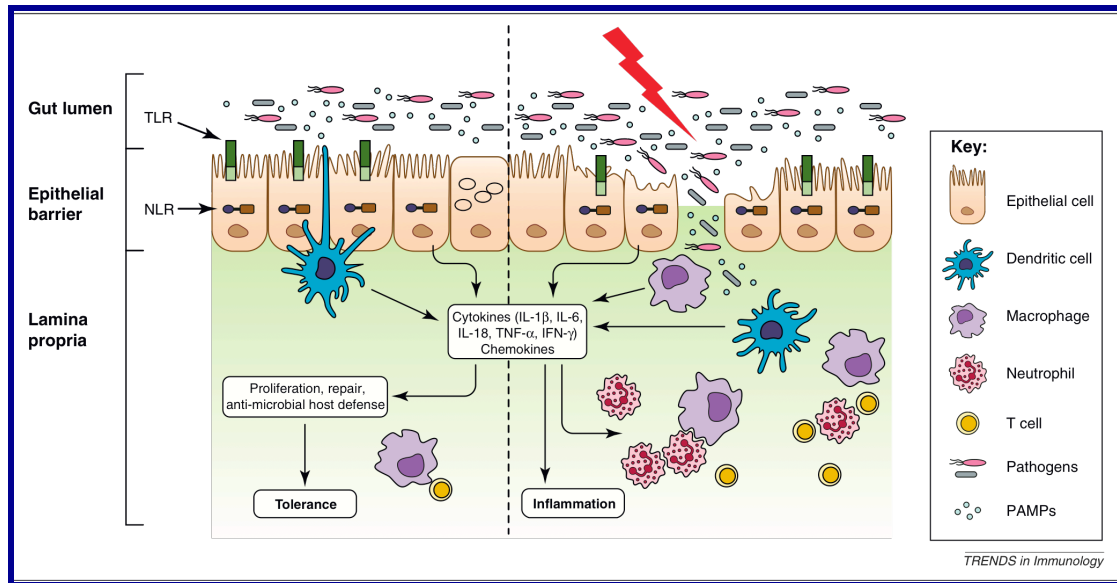


Figura 2: Interação microbiota e hospedeiro na homeostase intestinal e no desenvolvimento de IBD. Em indivíduos saudáveis, um estado de tolerância é mantido permitindo que bactérias não-patogênicas vivam no intestino com uma resposta imune controlada. Quando a barreira epitelial é comprometida, as bactérias comensais invadem a mucosa interagindo com macrófagos, células dendríticas e neutrófilos via ativação de receptores da imunidade inata tais quais TLRs e NLRs. A ativação desses receptores induz a produção de citocinas pro-inflamatórias recrutando mais células inflamatórias e desencadeando o desenvolvimento de IBD. Retirado de (Zaki et al., 2011).

Os eventos que iniciam a resposta inflamatória em uma doença são diferentes. No entanto, a progressão de uma doença é mediado por mecanismos similares. As células da imunidade inata, especialmente os neutrófilos (polimorfonucleares), exercem um efeito importante na lesão tecidual durante a inflamação. Essas células são recrutadas e acumulam em excesso no tecido afetado. Consequentemente, grandes quantidades de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases e citocinas pro-inflamatórias, são liberadas, podendo causar degradação da matriz extracelular, amplificando a resposta inflamatória. Por causa disso, o processo de resolução da resposta inflamatória é uma das fases mais importantes de todo o processo inflamatório, pois os eventos da resolução (apoptose

do neutrófilo e fagocitose por macrófagos, liberação de mediadores anti-inflamatórios) direcionam para a homeostase tecidual (Figura 3)

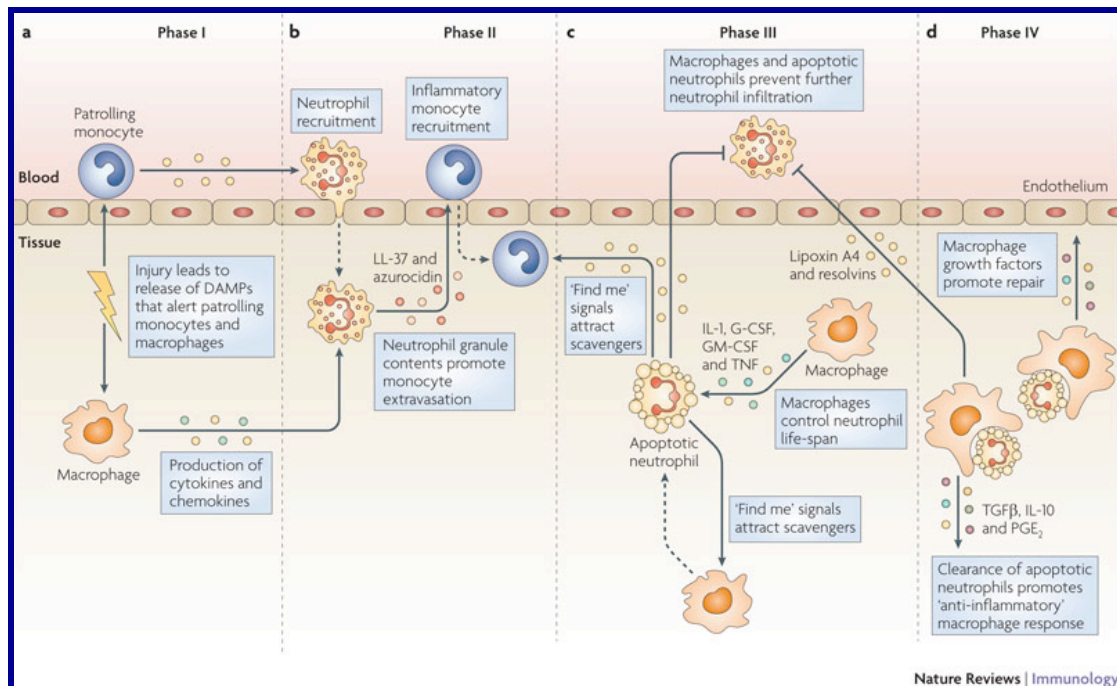


Figura 3: Fases do processo inflamatório. Na primeira fase sinais de alerta estimulam a liberação de citocinas e quimiocinas e recrutamento de células inflamatórias. Na segunda, neutrófilos e monócitos são recrutados. A partir da terceira e da quarta fases, as células inflamatórias entram em processo apoptótico e liberação de mediadores pró-resolutivos que impedem que os neutrófilos continuem infiltrando-se, retornam o endotélio para um estado de repouso. Retirado de (Soehnlein and Lindbom, 2010)

A regulação da resposta imunológica é crucial. Uma resposta inflamatória intestinal insuficiente pode ser crítica na resposta contra as infecções, e uma resposta exagerada pode levar a uma inflamação crônica resultando em várias doenças, inclusive, as autoimunes, como doença de Crohn (Maloy and Powrie, 2011; Tanoue et al., 2010).

Dos diversos mediadores inflamatórios, as citocinas tem um papel essencial na homeostase intestinal. Enquanto, as citocinas pro-inflamatórias, tais quais, IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α promovem a eliminação de microorganismos invasores, a proliferação e sobrevivência das células epiteliais. As citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , limitam a amplitude da inflamação e favorecem a produção e secreção de imunoglobulina A, que é importante na imunidade da mucosa (Macpherson et al., 2000; Peterson et al., 2007).

Destacando a influência da microbiota no sistema imune, bactérias comensais regulam a produção dos mediadores citados acima. Por exemplo, espécies comensais de *Clostridium* induzem a produção de TGF- β , promovendo o acúmulo de células Treg no cólon e, conseqüentemente, resistência à colite (Atarashi et al., 2011).

Um estudo recente demonstrou a participação de bactérias comensais na indução de uma resposta imune adaptativa, em um modelo de infecção pulmonar pelo vírus da Influenza, por meio da estimulação da resposta imune inata via ativação de inflamasoma (Ichinohe et al., 2011).

Muitos trabalhos sugerem a participação de células T CD4+, incluindo Th1, Th17 e principalmente as Foxp-3+ T reguladoras (Treg), como sendo importantes para a homeostase intestinal na presença de bactérias comensais (Barnes and Powrie, 2009) (Figura 4). Por exemplo, as células Th17, e também as Th1, são constitutivamente presentes diante a presença da microbiota, entretanto, estão ausentes em animais GF (Ivanov et al., 2008).

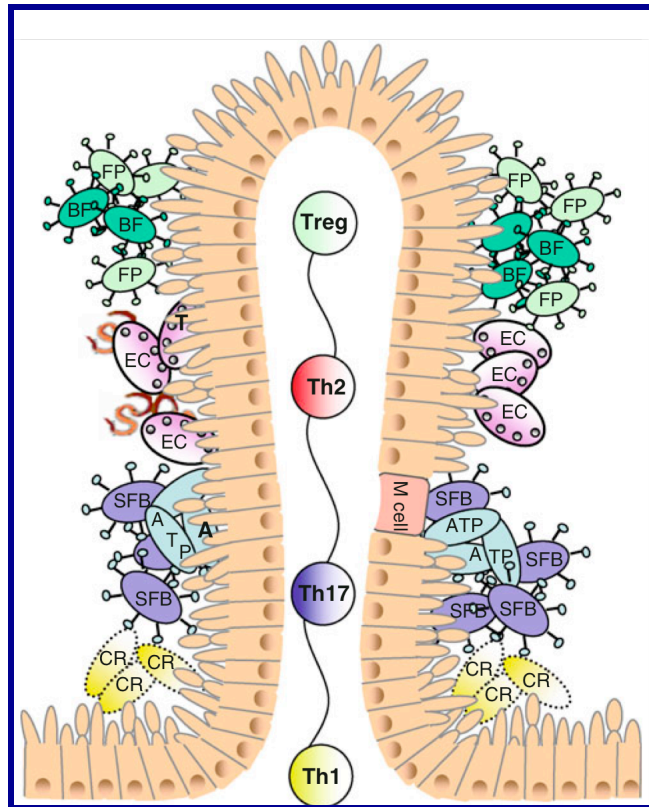


Figura 4: A microbiota moldando a imunidade adaptativa do hospedeiro. A *Francisella prustnitz* (FP), algumas cepas de *Bifidobacterium* (BF) induz Treg. Bactérias filamentosas segmentadas (SFB) favorecem respostas por Th17 enquanto as respostas por Th1 é induzida por *Citrobacter rodentium* (CR). Retirado de (Stephani et al., 2011).

Estudos com animais monocolonizados (utilizando-se espécies individuais e isoladas), apesar desses estudos revelarem mecanismos que são importantes apenas no contexto de uma espécie específica; demonstram por exemplo, que espécies de bactérias filamentosas segmentadas (SFB) são importantes indutoras de células Th17 intestinais que participam protegendo as células epiteliais de invasões microbianas (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). Mesmo os componentes microbianos isolados, como por exemplo, o polissacarídeo A (PSA) de *Bacteroides fragilis* é capaz de estimular o sistema imune suprimindo a produção de IL-17 e promovendo a produção de IL-10 pelas células CD4⁺ (Mazmanian et al., 2008; Round and Mazmanian, 2010). Nos últimos anos, as pesquisas voltadas para o papel da microbiota têm destacado a importância da microbiota nas resposta imunes

sistêmicas. Apesar da microbiota esta compartimentalizada no lúmen do intestino, fica cada vez mais claro que ela pode afetar a imunidade periférica e, recentemente, os mecanismos pelos quais isso ocorre começaram a ser elucidados, incluindo parte dessa tese. Estudos com animais GF sugerem o papel da microbiota influenciando a atividade das células imunes periféricas. Muitas doenças inflamatórias são piores nos animais GF (Chervonsky, 2010; Chinen et al., 2010). Entretanto, algumas doenças não desenvolvem nesses animais (Amaral et al., 2008; Souza et al., 2004). Este fenótipo caracterizava a microbiota como patogênica e causadora da progressão das doenças, porém, dados recentes, incluindo os dados do presente trabalho, sugerem que esse fenótipo nos animais germ-free estão relacionados a deficiência desses animais em montar uma resposta imune adaptativa devido a defeitos na imunidade inata e não pela ausência da microbiota em si (Chervonsky, 2010).

Recentemente, (Sydora et al., 2011) demonstrou que a injeção intravenosa de um lizado fecal, reduziu a produção sistêmica de citocinas pro-inflamatórias protegendo os camundongos dos danos causados pela colite induzida por DSS.

Um estudo recente demonstrou, também que, peptidoglicano (PTGN) derivado da microbiota pode modular a resposta imune periférica (Clarke et al., 2010). Esses PTGN (presentes predominantemente em bactérias Gram-Negativas), via sinalização de Nod-1 entram na circulação sanguínea e tornam os neutrófilos mais eficientes na eliminação das bactérias como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Outro fator derivado da microbiota que é importante na regulação do sistema imune é o polissacarídeo A (PSA) de *Bacteroides fragilis* como mencionado anteriormente. Essa espécie anaeróbica abundante no intestino dos mamíferos expressa diferentes cápsulas de polissacarídeos capazes de induzir linfócitos T (Liu et al., 2008). PSA purificado, dado oralmente ou

intraperitonealmente, induz também efeitos positivos na células T e na microarquitetura do baço, além de aumentar a expressão de MHC II em células dendríticas. Além disso, dados do nosso grupo demonstrou que animais GF são mais susceptíveis à infecção pulmonar induzida por *Klebsiela pneumoniae*; no entanto, injeção de lipopolissacarídeo (LPS) previamente a infecção protege os animais germ-free da infecção (Fagundes et al., 2011).

A relação entre microbiota e o sistema imune do hospedeiro é muito dinâmica e repleta de benefícios mútuos. A idéia da microbiota em primar e auxiliar a maturação do sistema imune, e da mesma maneira o próprio sistema imune regular o tipo de microbiota que estará presente, é fascinante. É importante ressaltar que muitos desses benefícios não se restringem apenas ao intestino, mas sim, a todo o hospedeiro.

1.3 Dieta

Nos mamíferos principalmente, a dieta tem influência significativa no aumento da diversidade bacteriana intestinal observados em indivíduos carnívoros, onívoros e herbívoros (Ley et al., 2006a). Dessa forma, os hábitos alimentares têm sido considerados um dos maiores fatores que contribuem para a diversidade da microbiota intestinal no homem (Backhed et al., 2005). Um estudo recente publicado na Science (Wu et al., 2011) demonstrou que pessoas que comiam mais proteínas e gorduras saturadas tinham prevalência para a população de *Bacteroides* enquanto as populações de *Ruminococcus* tendiam para pessoas que ingeriam bebidas alcoólicas e consumiam gorduras poliinsaturadas. No entanto, o grupo das bactérias benéficas *Prevotella* era encontrada em pessoas que tinham a dieta baseada em grandes

quantidades de polissacarídeos. E além disso, esse estudo demonstrou também que as modificações na dieta alteravam a composição microbiana mesmo com 1 dia, porém para alterações na composição de bactérias benéficas é necessário um maior tempo de modificação da dieta. Somando-se a isso, os hábitos alimentares ocidentais podem ser propostos como uma das principais causas envolvidas no aumento de doenças inflamatórias nesses países. As dietas ocidentais são muito calóricas e pobres em nutrientes, principalmente macronutrientes, como fibras e mesmo em Omega-3 (presentes em sementes e em alguns peixes). O modo de vida ocidental reflete em uma alimentação baseada em “fast foods”, o que ocasiona uma deficiência desses componentes importantes para a saúde humana. Avanços recentes têm sido feitos no reconhecimento de que a dieta representa um grande efeito na composição da microbiota intestinal (De Filippo et al., 2010; Turnbaugh et al., 2006). Turnbaugh *et al.* 2006 analisaram mudanças na microbiota intestinal de camundongos após a troca da dieta enriquecida em fibras e com baixo teor de gordura, pela dieta “ocidentalizada” rica em gordura e açúcares e com baixo teor de fibras. Com apenas 1 dia de dieta “ocidentalizada”, esses camundongos apresentaram mudanças na composição microbiana, nas vias metabólicas, expressão gênica e em 2 semanas tinham aumento de adiposidade. Populações que consomem quantidades adequadas e aumentada de dieta com fibra tem incidência diminuída de doenças, como colite, diabetes do tipo 2 e câncer de cólon (Noverr and Huffnagle, 2004).

As fibras solúveis são carboidratos (polissacarídeos) que não são hidrolisadas no intestino delgado, e estão, presentes em frutas, vegetais, legumes e cereais. No entanto, as bactérias anaeróbicas dos gêneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, estão presentes no intestino grosso do homem e são os principais gêneros que sintetizam polimerases e glicosidases produzindo os ácidos graxos de cadeia curta (Cummings

and Macfarlane, 1991). Os produtos intermediários e finais da fermentação realizada pela microbiota dependem em parte pela composição química do carboidrato. Por exemplo, a fermentação do amido produz maiores quantidades de butirato, enquanto a pectina (que é mais oxidado) produz maior quantidade de acetato (Topping and Clifton, 2001). A produção de SCFAs pela microbiota intestinal tem vários efeitos já conhecidos (Cook and Sellin, 1998): diminuição do pH do cólon protegendo este contra carcinogênese por meio da redução de aminas tóxicas, aumento da absorção de cálcio e magnésio, aumento da absorção de íons pela estimulação do transporte de eletrólitos no cólon prevenindo a diarreia, e aumento do fluxo sanguíneo venoso porta-hepático e do cólon, além da diminuição do crescimento de bactérias patogênicas. Os destinos metabólicos dos ácidos graxos de cadeia curta são variáveis (Figura 5). No entanto, grande parte da absorção é feita através da membrana celular dos colonócitos por difusão passiva. O butirato é metabolizado principalmente pelo epitélio do cólon e regula várias funções dos colonócitos, como o crescimento e diferenciação celular. O Propionato é purificado pelo fígado e é um possível precursor de glicogênio podendo suprimir a síntese de colesterol. Já o acetato, é metabolizado em vários órgãos como músculo, rim, coração, no cérebro e também no cólon(topping 1996; cummings e Macfarlane 1991; Chen 1984;) .

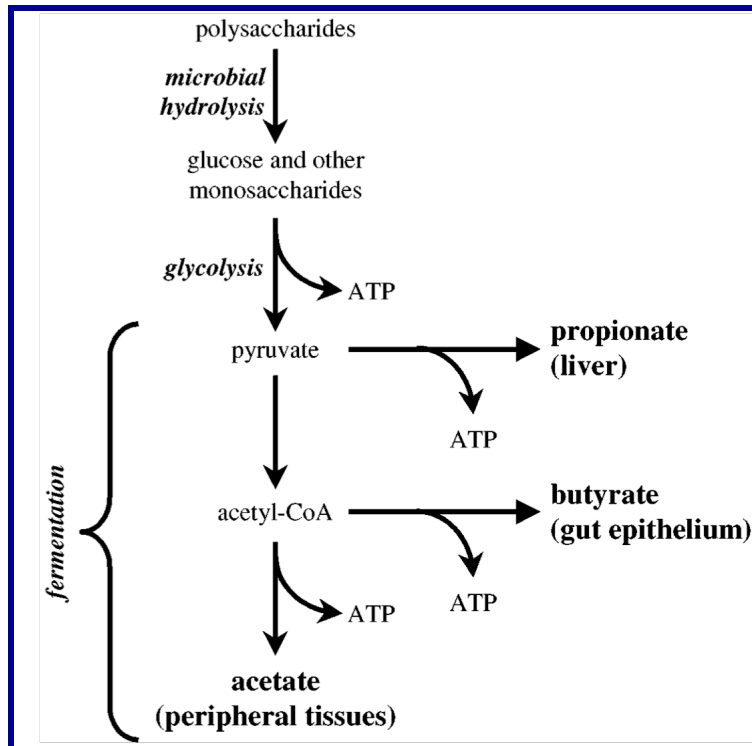


Figura 5: Fermentação bacteriana no intestino - produção de ácidos graxos de cadeia curta. Retirado de Hooper, LV; 2002.

Os benefícios de uma alimentação rica em fibras para a saúde humana não é limitada apenas aos efeitos do aumento do bolo fecal e laxativos. Os benefícios podem ser divididos de duas maneiras: os efeitos não-fermentativos e os fermentativos. Atualmente, os benefícios de uma alimentação enriquecida em fibras é reconhecido em inúmeras funções fisiológicas, assim como na prevenção e tratamento de diversas doenças do trato gastrointestinal (Galvez et al., 2005; Ramberg et al., 2010). É importante ressaltar que as consequências da deficiência da ingestão de fibras também não podem ser ignoradas, uma vez que, o consumo diminuído de fibras tem sido associado com o aumento de doenças cardiovasculares (King et al., 2007), diabetes do tipo 2 (Brennan, 2005; Vinik and Jenkins, 1988), doenças inflamatórias intestinais (Galvez et al., 2005) e alguns tipos de câncer (Rose et al., 2007; Trock et al., 1990). Adicionalmente, alguns estudos têm reportado efeitos positivos dos SCFAs,

principalmente do butirato, em pacientes com inflamações intestinais (Di Sabatino et al., 2005; Hallert et al., 2003). Enquanto os efeitos de uma dieta com alto teor de fibras em pacientes com artrite não tem sido diretamente estudado, existem alguns trabalhos demonstrando os efeitos benéficos de uma dieta Vegan (vegetariana rica em fibra) na redução da artrite (Kjeldsen-Kragh, 1999; Peltonen et al., 1994; Peltonen et al., 1997). Esses trabalhos sugerem então, que dietas rica em fibras podem ser benéficas para pacientes com artrite reumatóide. Além disso, alguns pacientes com colite ulcerativa têm apresentados reduzidos níveis de SCFAs (Treem et al., 1994). Isso é provavelmente devido à redução de bactérias anaeróbicas. E tratamento com SCFAs tem apresentado efeitos positivos, tanto em modelos animais de colite, quanto em pacientes com inflamações intestinais (Cook and Sellin, 1998; Di Sabatino et al., 2005; Sina et al., 2009).

Muitos fatores afetam a produção de SCFA, incluindo dieta, o uso de antibiótico, a composição microbiana do intestino e o tempo do transito intestinal (Duncan et al., 2007; Hoverstad, 1986; Hoverstad et al., 1986). Um dos papéis importantes da microbiota é a quebra de complexos de polissacarídeos oriundos das dietas, destacando-se aqui os SCFAs. Assim, qualquer alteração na composição microbiana intestinal terá efeito na produção de SCFAs. A importância da microbiota intestinal na produção dos SCFAs é demonstrado em animais GF que possuem pouco ou quase nada da concentração de SCFAs no cólon e no soro (Hoverstad and Midtvedt, 1986).

1.3.1 SCFAs and Gpr43

Os SCFAs são estruturas de carbono compostas de 1 a 6 carbonos com um grupo carboxila. O menor SCFA é o formato com 1 carbono e o maior é o succinato,

com 6 carbonos. Os mais abundantes SCFAs produzidos no cólon intestinal são os ácidos monocarboxílicos: acetato (com 2 carbonos), propionato (com 3 carbonos) e butirato (com 4 carbonos). No entanto, outros SCFAs, tais como os ácidos diacaboxílicos, lactato e succinato são também produzidos. As concentrações de SCFAs no cólon variam em concentrações de milimolar entre 30mM até 150mM, enquanto no sangue essas concentrações alcançam cerca de 50 micromolar (Cook and Sellin, 1998). O mais estudado dos SCFAs é o butirato. O butirato é a maior fonte de energia para as células epiteliais do cólon, afetando a sua proliferação e função, como por exemplo, reduzindo os danos oxidativos no DNA (Rosignoli et al., 2001; Vecchia et al., 1997). Esses efeitos do butirato estão aparentemente associados com a proteção no desenvolvimento do câncer do cólon (Augenlicht et al., 2002; Vecchia et al., 1997; Yu et al., 2011). E alguns trabalhos tem tentado esclarecer os mecanismos pelos quais o butirato exerce seus efeitos. O butirato tem sido demonstrado capaz de inibir a deacetilação de histonas (HDAC) (Sekhavat et al., 2007), bem como se ligar no GPR109A (Thangaraju et al., 2009), porém os mecanismos ainda estão sendo elucidados.

Tanto acetato quanto o propionato, apesar de serem produzidos em maior quantidade que o butirato, têm suas funções menos documentadas e menos compreendidas. Os SCFAs exercem papel na redução da produção de citocinas. A produção de Il-6 em cultura de colonócitos com acetato, propionato e butirato foi diminuída. Da mesma forma, em cultura de neutrófilos estimulados com LPS e tratados com SCFAs foi observado uma redução na produção de TNF- α (Tedelind et al., 2007).

Entretanto, muitos outros trabalhos têm demonstrado a função dos SCFAs em outros processos celulares como, por exemplo, induzindo migração de células

inflamatórias (Vinolo et al., 2009), inibindo a ativação de NF- κ B, afetando, portanto, vários processos celulares fisiológicos e imunológicos (Meijer et al., 2010; Tang et al., 2011; Vinolo et al., 2009).

Em 2003, vários grupos identificaram o GPR41 e o GPR43 como sendo os receptores para propionato e acetato (Nilsson et al., 2003). Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) compreendem um grande grupo de receptores com 7 domínios transmembranas que se ligam a ligantes extracelulares e induzem sinalização intracelular. Os GPCRs são receptores importantes que exercem diversas funções, como sensores de hormônios, odores e neurotransmissores, regulam as funções imunes por meio da regulação dos movimentos celulares por exercerem papel importante na quimiotaxia. (Vinolo et al., 2011) demonstrou *in vitro* que o GPR43 tem um papel importante no recrutamento de neutrófilos. Além disso, (Sina et al., 2009) tem demonstrado que animais deficientes para Gpr43 apresentaram menos lesões na colite, devido ao menor recrutamento de neutrófilo para o intestino.

Acetato, o mais abundante SCFAs, se liga ao GPR43, que também é conhecido como FFAR2, com maior afinidade e especificidade que o propionato (Nilsson et al., 2003). O GPR41 é expresso no tecido adiposo e nos colonócitos e tem como principal ligante o butirato. Também tem uma expressão bem reduzida em células mononucleares periféricas (Le Poul et al., 2003). Entretanto, a expressão de GPR43 é quase que exclusivo nas células do sistema imune, particularmente nos macrófagos e polimorfonucleares: neutrófilos e eosinófilos (Brown et al., 2003). Dessa forma, o estudo das funções provenientes da interação do acetato com seu receptor, o Gpr43, na respostas imunes, tornam-se bastante relevantes.

1.4 Fatores que interferem na composição microbiana

A microbiota intestinal se relaciona com o sistema imune em um estado de equilíbrio visando a homeostase. Qualquer alteração na relação entre microbiota/sistema imune pode desencadear uma resposta inflamatória, assim como um desequilíbrio da microbiota, favorecendo o surgimento de patógenos e mesmos patobiontes (bactérias comensais que em determinadas situações podem causar danos ao hospedeiro) podendo, então, desencadear várias doenças (Figura 6).

Embora a composição da microbiota intestinal seja estável em indivíduos saudáveis, ela pode ser alterada por diversos fatores, como mudanças da dieta, doenças, estresse, envelhecimento, drogas e estado imunológico provocando, inicialmente, diferentes tipos de problemas gastrointestinais (Abt and Artis, 2009; Biagi et al., 2010; Fleshner, 2011; Round and Mazmanian, 2009; Sekirov et al., 2010). Uma grande variedade de fatores ambientais afetam a composição da microbiota intestinal. Várias evidências sugerem que o ambiente tem uma influência significativa no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Uma vez que a microbiota regula as respostas inflamatórias, e sendo a microbiota afetada por fatores ambientais, torna-se evidente que o ambiente influencia nossa susceptibilidade à doenças por meio de alterações da microbiota intestinal.

Interessantemente, a composição microbiana varia consideravelmente entre diferentes populações, particularmente entre países ocidentais versus desenvolvidos (De Filippo et al., 2010). Certamente, essas alterações poderiam ser uma explicação atrativa para o aumento da incidência de asma, colite, diabetes do tipo 1 e obesidade, em países desenvolvidos (Maslowski and Mackay, 2011).

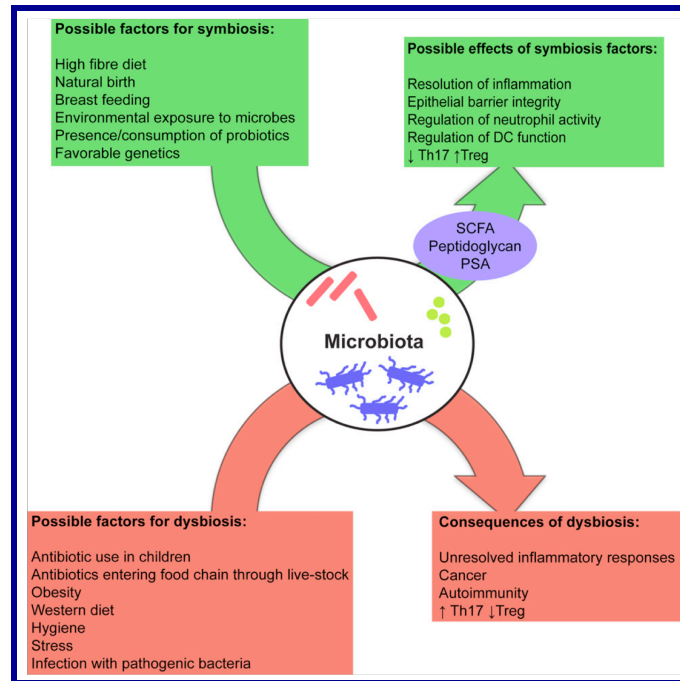


Figura 6: Microbiota e o balanço entre simbiose e disbiose. Possíveis fatores e efeitos/consequências para situações de simbiose e disbiose entre microbiota e hospedeiro. Retirado de (Kranich et al., 2011)

Embora a microbiota seja benéfica e necessária para várias respostas fisiológicas no hospedeiro, cada vez mais tem sido discutido a influência de fatores externos que interferem na composição da microbiota e predisõem os indivíduos a várias mudanças no seu estado imunológico. Por exemplo, estudos têm demonstrado que crianças nascidas por parto cesariano, tem um atraso na colonização bacteriana, com aumento de espécies como *Clostridium difficile* e diminuição das espécies de *Bifidobacterium* e *Bacteróides* (Palmer et al., 2007; Penders et al., 2006). A falta do aleitamento materno nos primeiros meses de vida também leva ao atraso na colonização microbiana e as populações mais presentes são *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (Harmsen et al., 2000; Penders et al., 2006). O uso contínuo de antibióticos em crianças diminui a população de *Bifidobacterium* e *Bacteroides fragilis* e aumenta a população de *Campylobacter* (Penders et al., 2006). A idade, o gênero e as espécies de hospedeiros também

modificam o tipo de microbiota presente no intestino (Hayashi, 2003). Os fatores genéticos também tem impacto na colonização da microbiota. Um estudo recente demonstrou que camundongos deficientes para Nlpr6 são colonizados por uma população diferenciada de bactérias com potencial de causar colite quando transferida para os animais selvagens (Elinav et al., 2011).

Dentre as doenças mais afetadas pela composição da microbiota, as doenças inflamatórias intestinais são desencadeadas por inúmeros fatores que estão intimamente relacionados com um descontrole da composição microbiana intestinal e com uma resposta imune descontrolada (Figura 7). Grande parte das terapias que objetivam a manipulação da microbiota, sejam com o uso de probióticos ou prebióticos, visam os efeitos benéficos nas manifestações intestinais consequentes das IBD. Levando-se em consideração o que foi mencionado até aqui, é importante, contudo, extrapolarmos essas terapias, tendo como alvo outras doenças que não somente as doenças intestinais.

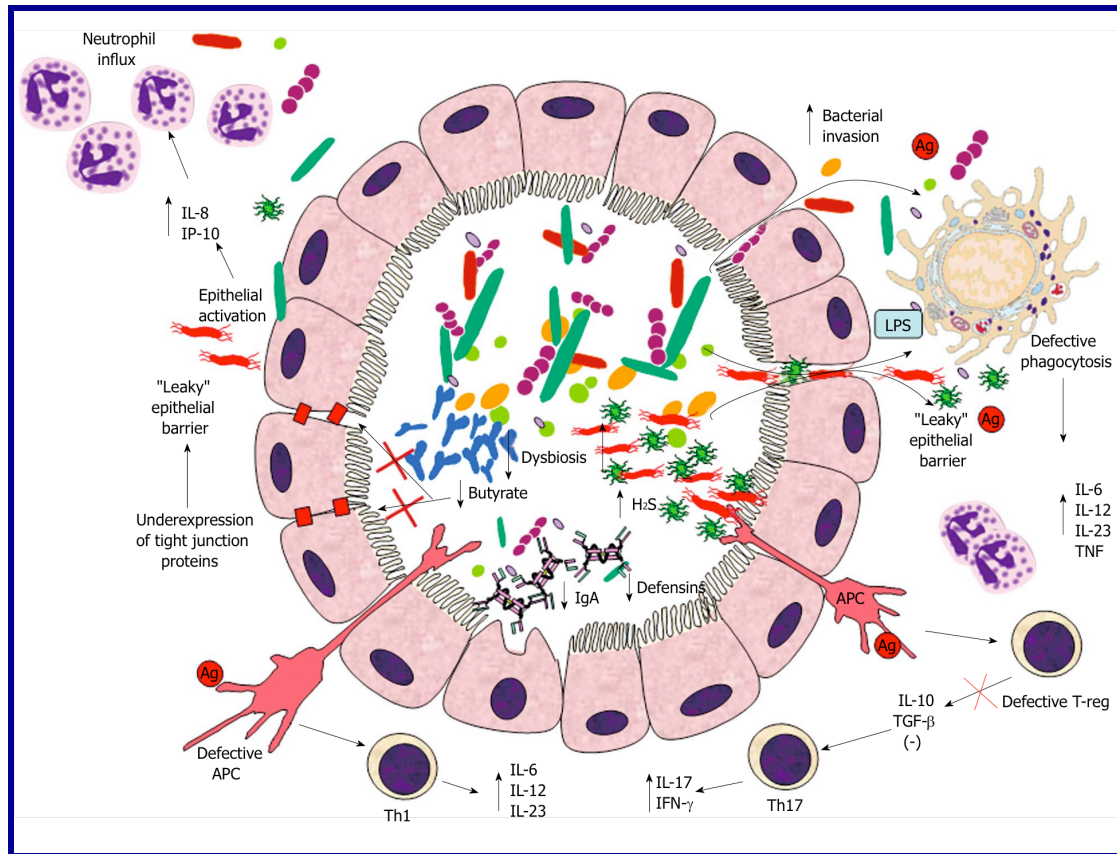


Figura 7: Mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. Disbiose intestinal na IBD leva a uma diminuição de bactérias benéficas (ex: Bifidobacterias) e ao aumento concomitante de bactérias patogênicas. Esse desbalanço causa uma redução na produção de SCFAs e uma diminuição da expressão de proteínas envolvidas na junção das células epiteliais favorecendo assim a invasão de bactérias do lúmen para o interior da mucosa através das células epiteliais devido ao aumento da permeabilidade. Essa invasão bacteriana leva a uma estimulação excessiva dos TLRs, secreção de citocinas pro-inflamatórias e ativação da imunidade adaptativa. Essa resposta é amplificada com o recrutamento de mais células inflamatórias para o sítio de lesão intensificando a resposta inflamatória. Retirado de (Fava and Danese, 2011)

1.5 Microbiota como alvo terapêutico: uso de probióticos e prebióticos

Considerando todas as evidências que conectam a dieta, a microbiota intestinal e as respostas imunes, a utilização de terapias que regulam esse sistema, tais como uso de próbioticos e prébioticos, é extremamente interessante. A idéia de que bactérias intestinais poderiam participar da manutenção da homeostase surgiu com o cientista russo Elie Metchnikoff no início do século XX. Metchnikoff, juntamente

com outros pesquisadores, observou que bactérias que produziam ácido e azedavam o leite, inibiam o crescimento de outras bactérias que deterioravam o leite devido a formação de um ambiente de baixo pH. Dessa forma, Metchnikoff propôs que essas bactérias produtoras de ácido láctico seriam benéficas ao hospedeiro por reduzir o crescimento de bactérias dentro do intestino e produtos tóxicos promovendo a saúde do hospedeiro. Assim surgiu o iogurte como a primeira idéia de microorganismo vivo em benefício da saúde do homem (Podolsky, 1998).

De acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (WHO) e da Organização de Alimentos e Agricultura (FAO), probióticos são “microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidade suficiente conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Para que um microorganismo seja considerado probiótico para o uso humano, os seguintes critérios são levados em consideração: isolado de humano, ter propriedades não patogênicas, capacidade de persistir no trato gastrointestinal e possuir estabilidade na presença de ácido e bile. Os microorganismos mais utilizados como probiótico são as bactérias do ácido láctico, como as do gênero *Lactobacillus* (maiores efeitos no intestino delgado), e as *Bifidobacterium* (maiores efeitos no intestino grosso).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis que promovem a saúde do hospedeiro ao estimular a multiplicação ou a ação de uma espécie bacteriana - ou um grupo delas - benéfica no trato digestivo (Roberfroid, 2001). É interessante salientar que o desenvolvimento dos prebióticos veio da descoberta dos fatores “bifidus”, grupo de oligossacarídeos presentes em maior quantidade no leite humano e que favorecem a multiplicação de *Bifidobacterium* de recém-nascidos amamentados no seio (Vieira et al., 2008). Muitas evidências já relatam o efeito protetor dos

probióticos e prebióticos em humanos, em várias doenças inflamatórias e infecções (Coudeyras and Forestier, 2010).

Apesar da ampla evidência envolvendo o tratamento com probióticos e prebióticos, a falta de conhecimento dos mecanismos moleculares de ação desses, tem sido um dos problemas que impedem a melhor utilização dos probióticos e prebióticos. Recentemente, um grupo Japonês (Fukuda et al., 2011) identificou um fator produzido por uma linhagem do probiótico *Bifidobacterium longum* que promovia proteção contra a infecção causada por uma linhagem patogênica de *Escherichia coli*. Eles identificaram acetato como o único fator produzido pelo *Bifidobacterium longum* que levava a proteção. Acetato atua, também, nas células epiteliais do intestino, afetando sua integridade e função, prevenindo a translocação de toxinas de *Shigella*. Dessa maneira, o acetato poderia ser um dos principais fatores provenientes do uso de probióticos que promoveria a proteção contra patógenos, como demonstrado nesse estudo.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Visto que a manipulação da microbiota intestinal apresenta-se atualmente como uma importante e promissora forma de tratamento de diversas doenças que não se restringem apenas ao trato gastrointestinal; e, uma vez que os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) produzidos pela fermentação de fibras presentes nas dietas pelas bactérias comensais do intestino, se ligam ao Gpr43, esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual a dieta e a microbiota regulariam as funções do sistema imune. Dessa forma, é nossa **hipótese de trabalho** que a microbiota é um regulador essencial do sistema imune via modulação do receptor acoplado a proteína G (GPR43) que está presente, principalmente, nos neutrófilos, eosinófilos e macrófagos.

Tendo em mente esta hipótese, o **presente trabalho** tem como **objetivo geral** estudar os mecanismos da ativação do Gpr43 por meio do metabolismo microbiano intestinal nas respostas imune do hospedeiro em modelos de colite e de gota, bem como elucidar os efeitos envolvidos na regulação dessa microbiota utilizando estratégias terapêuticas que elevem os níveis de SCFAs, com o uso de próbióticos e prébióticos.

3-TRABALHOS CIENTÍFICOS

3.1 Trabalho Científico -1

Maslowski KM, **Vieira AT**, Ng A, Kranich J, Sierra F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. ***Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43.*** **Nature** 2009 461(7268):1282-6.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1- Elucidar os mecanismos moleculares que os “*Short Chain Fatty Acids*” exercem nas respostas imunes;
- 2- Estudos recentes tem demonstrado que o receptor acoplado a proteína G-43 (Gpr43), parece ser um forte candidato para os efeitos exercidos pelos SCFAs. Para confirmar isso, animais deficientes de Gpr43 foram utilizados para avaliar se a ativação do Gpr43 via SCFAs exercia efeito na resposta imune;
- 3- SCFAs são produtos do metabolismo de fibras, provenientes da dieta, por bactérias comensais do intestino. E, uma vez que, acetato (SCFA) esta presente no soro, é nosso objetivo também avaliar se os efeitos no sistema imune pelos SCFAs não se aplicam apenas na mucosa intestinal, mas também se poderia afetar sistemicamente a resposta imune. Assim, foram utilizados modelos experimentais de colite, de artrite induzida por soro KBx/N e asma induzida por ovalbumina, em camundongos, para determinar a importância da ligação de SCFAs –GPR43 nas respostas inflamatórias.

3.2 Trabalho Científico - 2

^{1,2}Angélica T. Vieira, ³Lauren Binge, ¹Ellen De Leon, ¹Doris Shim, ¹Kendle Maslowski, ¹Heidi Shiltler, ²Flávio A. Amaral, ⁴Jacques Nicoli, ⁴Flaviano S. Martins, ²Leda Q. Vieira, ⁵Jacque L. Harper, ²Mauro M. Teixeira and ³Charles R. Mackay. *A role for commensal bacterial metabolites and GPR43 in inflammasome activation and the pathogenesis of gout. Immunity* (Draft)

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1- Primeiramente, avaliar o papel da microbiota e dos SCFAs em um modelo murino de Gota, que tem como principal mecanismo a ativação do complexo intracelular de proteínas, o inflammasoma. Para isso, utilizamos o modelo de Gota induzido por MSU em animais isentos de germe (germ-free).
- 2- Tendo em vista o importante papel antiinflamatório do receptor Gpr43, o qual está diretamente correlacionado com a produção de acetato pela metabolismo microbiano e, como dados obtidos no nosso trabalho anterior sugerem um papel benéfico dessa interação em diversos tipos de respostas inflamatórias, como na artrite (Th1), asma (Th2) e, principalmente, na colite, nosso próximo objetivo foi avaliar a importância do receptor Gpr43, na Gota e avaliar a sua participação na ativação do inflamassoma.
- 3- Uma vez que o acetato tem efeitos antiinflamatórios importantes em diversas doenças, objetivamos buscar estratégias que pudessem favorecer a produção deste SCFA. Para isso, objetivamos comparar os efeitos de uma dieta rica em fibra (prebiótico) versus dieta deficiente em fibra, na resposta inflamatória no modelo experimental de Gota induzida por cristais de ácido úrico.

- 4- Ainda como estratégia de aumentar as concentrações de acetato, nosso objetivo foi, também, tratar animais com o próbioico *Bifidobacterium longum* e avaliar os possíveis efeitos antiinflamatórios no modelo experimental de gota.
- 5- Avaliar a cinética da resposta inflamatória nos animais com Gota objetivando estudar a resposta resolutive da gota nos animais tratados com acetato.

3.3 Revisão Científica -3

Laurence Macia, Alison N. Thorburn, Lauren Binge, Eliana Mariano, Kate Rogers, Kendle Maslowski, **Angelica T. Vieira**, Jan Kranich , Charles R. Mackay. *Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases*. Immunological Reviews. 2011

4- CONCLUSÕES GLOBAIS

4- CONCLUSÕES GLOBAIS

A interação hospedeiro/micro-organismo tem grande relevância sobre diversos aspectos, principalmente em relação a patogêneses desencadeadas por micro-organismos invasores. Por outro lado, a íntima relação entre os micro-organismos que convivem simbioticamente com seu hospedeiro é de fundamental importância para a sobrevivência de ambos mediante as adversidades externas (Casadevall and Pirofski, 2003a, b). Assim, a microbiota intestinal torna-se indispensável no que diz respeito à habilidade do hospedeiro em produzir mediadores inflamatórios, tornando-o adaptado, não somente para o controle da eliminação de patógenos, mas também para responder a vários estímulos danosos ao organismo, como por exemplo, aos cristais de ácido úrico. Nos concluímos, nesse trabalho, que a produção de acetato e de outros SCFAs no colón, e sua distribuição para os tecidos periféricos, foi importante para a regulação das respostas inflamatórias na colite, na asma, na artrite e na gota (Maslowski et al., 2009). E estratégias que regulem e favoreçam a produção de SCFAs nos indivíduos tornam-se estratégias terapêuticas fascinantes para as doenças aqui citadas.

Considerando que a resposta inflamatória é um processo imunológico essencial ao indivíduo, indo muito além do combate aos patógenos - a manutenção da homeostase do organismo; as respostas inflamatórias exacerbadas e não controladas levam a um aumento da intensidade e duração da resposta, originando dano tecidual e desencadeando várias doenças. Assim, demonstramos nesse trabalho que, o tratamento com SCFAs leva à indução de uma resposta inflamatória; entretanto, essa

resposta é tempo limitada, no qual os mecanismos pró-inflamatórios passam a ser inibidos e os mecanismo de resolução da resposta passam a ser ativados, diminuindo, dessa forma, a duração da resposta inflamatória, bem como a lesão tecidual, como observamos no modelo experimental de gota. Isto faz do acetato uma promissora estratégia terapêutica para doenças infecciosas, no qual a resposta inflamatória é fundamental para conter o agente infeccioso; porém, não deve ser prolongada para não causar danos ao hospedeiro. Além do mais, a ativação do Gpr43 é de suma importância na ativação do inflamassoma para a indução da resposta imune ao estímulo por MSU. Esses fenômenos são bastante interessantes, se levarmos em consideração que componentes das bactérias comensais, e mesmo seus produtos metabólicos (SCFAs), auxiliam na maturação do sistema imune do hospedeiro, ensinando-o (primando) as células do sistema imune a responder a um determinado estímulo e, também, controlando as respostas imunológicas que muitas vezes podem ser até mesmo prejudiciais a própria microbiota, levando ao seu desequilíbrio (Fagundes et al, 2011).

Contudo, vale destacar que a ativação do GPR43 por SCFAs é, provavelmente, apenas um dos vários mecanismos pelo qual a dieta ou a microbiota regulam as respostas inflamatórias, uma vez que outras moléculas, tais quais, os polissacarídeos A produzidos por bactérias comensais, como *Bacteroides fragilis*, também tem demonstrado um forte efeito anti-inflamatório (Mazmanian et al., 2008), assim como a ativação dos receptores do tipo toll pelos componentes bacterianos também tem demonstrado um grande efeito modulador das respostas imunes sistêmicas.

As estratégias nesse trabalho, de manipulação da microbiota e aumento das fontes produtoras de SCFAs, utilizando-se tanto um probiótico (a linhagem de

bactéria produtora de acetato, o *Bifidobacterium longum*), quanto um prebiótico (uma dieta enriquecida em fibra), apresentaram efeitos anti-inflamatórios eficazes na redução da resposta induzida pelos cristais de ácido úrico.

Baseado nos dados acima, a compreensão de como bactérias comensais afetam as respostas imunes do homem pode revolucionar e movimentar as indústrias de probióticos e prebióticos, levando a novas abordagens para prevenir e tratar as doenças inflamatórias e até mesmo as doenças infecciosas. Além disso, a população mundial tem elevado o interesse na busca de alternativas saudáveis que aumente a qualidade de vida. Dentre essa busca, incluem preocupações com dietas que tragam benefícios à saúde. Sabendo-se que as dietas ricas em fibras regulam a microbiota comensal em função do benefício do hospedeiro, a manipulação da dieta também é uma estratégia natural, tornando-se uma alternativa bastante promissora no combate de diversas doenças.

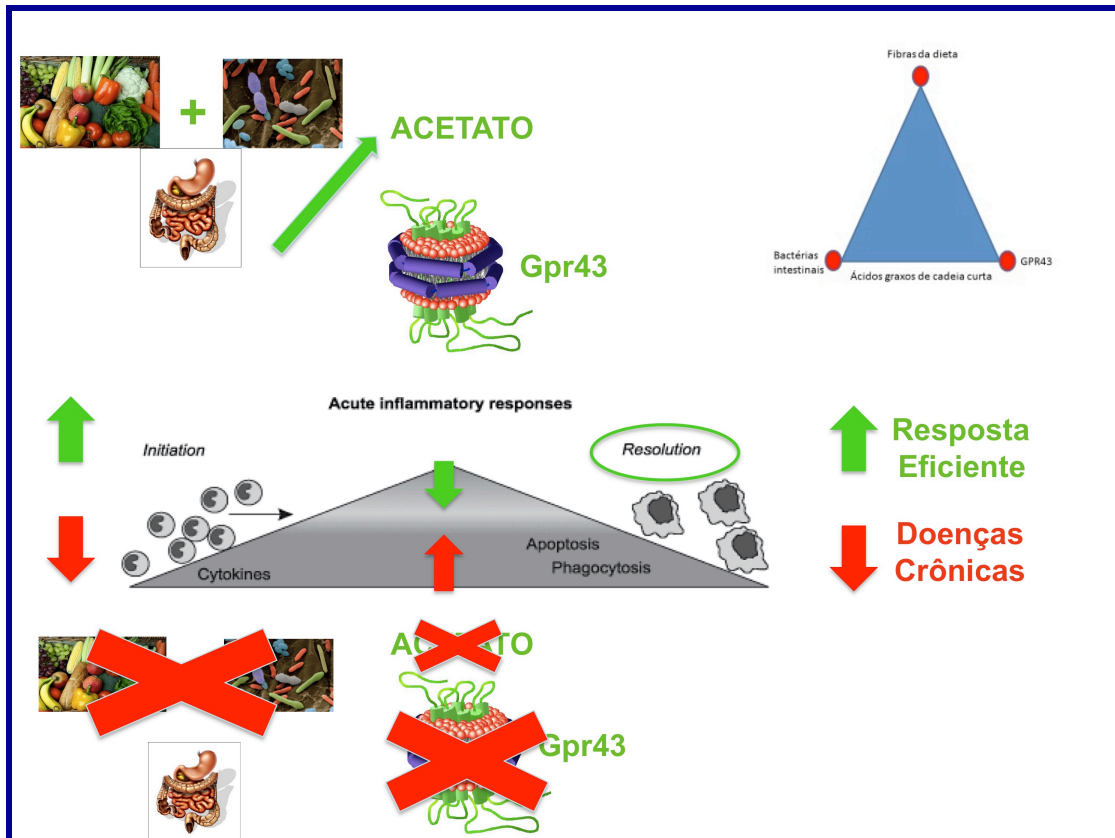


Figura 8: Microbiota, dieta e sistema imune: um diálogo constante via ativação do Gpr43. A produção de acetato, pela fermentação das fibras presentes na dieta, por bactérias comensais, ativa o receptor Gpr43 presente principalmente nos neutrófilos e macrófagos. A ativação de Gpr43 facilita a início da resposta inflamatória e modula a resposta inflamatória induzindo a resolução da inflamação. Estratégias que aumentam a produção de acetato como, por exemplo, dieta enriquecida em fibras ou mesmo probióticos, são alternativas promissoras para o tratamento de diversas doenças inflamatórias. Na ausência da ativação de Gpr43, seja em animais GF (ausentes de SCFAs) ou em Gpr43 $-/-$, as respostas inflamatórias são descontroladas ou até mesmo inexistentes e essa falha leva ao desencadeamento de diversas doenças crônicas. Assim, o receptor acoplado a proteína G-43 é um link importante entre dieta, microbiota e sistema imune.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abt, M.C., and Artis, D. (2009). The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 25, 496-502.

Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Fagundes, C.T., Cisalpino, D., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Silva, T.A., Nicoli, J.R., *et al.* (2008). Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2193-2197.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-341.

Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Wilson, A., Arango, D., Yang, W., Heerdt, B.G., and Velcich, A. (2002). Short chain fatty acids and colon cancer. *J Nutr* 132, 3804S-3808S.

Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.

Barnes, M.J., and Powrie, F. (2009). Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 31, 401-411.

Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., *et al.* (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 5, e10667.

Bik, E.M. (2009). Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr Rev* 67 *Suppl* 2, S164-171.

Brennan, C.S. (2005). Dietary fibre, glycaemic response, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* 49, 560-570.

Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., *et al.* (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278, 11312-11319.

Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2003a). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1, 17-24.

Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2003b). Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. *Trends Microbiol* 11, 157-158; author reply 158-159.

Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2010). The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 10, 735-744.

Chervonsky, A.V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 11, 28-35.

Chinen, T., Volchkov, P.Y., Chervonsky, A.V., and Rudensky, A.Y. (2010). A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota. *J Exp Med* 207, 2323-2330.

Chung, H., and Kasper, D.L. (2010). Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol* 22, 455-460.

Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., and Weiser, J.N. (2010). Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* 16, 228-231.

Cook, S.I., and Sellin, J.H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 12, 499-507.

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., and Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694-1697.

Coudeyras, S., and Forestier, C. (2010). [Microbiota and probiotics: effects on human health]. *Can J Microbiol* 56, 611-650.

Cummings, J.H., and Macfarlane, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70, 443-459.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14691-14696.

Di Sabatino, A., Morera, R., Ciccocioppo, R., Cazzola, P., Gotti, S., Tinozzi, F.P., Tinozzi, S., and Corazza, G.R. (2005). Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 22, 789-794.

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

Duncan, S.H., Louis, P., and Flint, H.J. (2007). Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett Appl Microbiol* 44, 343-350.

Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K.S., McIntire, C.R., LeBlanc, P.M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., *et al.* (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* 32, 367-378.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., *et al.* (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745-757.

Endt, K., Stecher, B., Chaffron, S., Slack, E., Tchitchek, N., Benecke, A., Van Maele, L., Sirard, J.C., Mueller, A.J., Heikenwalder, M., *et al.* (2010). The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS Pathog* 6.

Fava, F., and Danese, S. (2011). Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 17, 557-566.

Fleshner, M. (2011). The gut microbiota: a new player in the innate immune stress response? *Brain Behav Immun* 25, 395-396.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., *et al.* (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677-689.

Galvez, J., Rodriguez-Cabezas, M.E., and Zarzuelo, A. (2005). Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 49, 601-608.

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

Hallert, C., Bjorck, I., Nyman, M., Pousette, A., Granno, C., and Svensson, H. (2003). Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 9, 116-121.

Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., and Welling, G.W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30, 61-67.

Hayashi, T. (2003). [Bacterial genome analysis and its implications on the researches of pathogenic bacteria]. *Nihon Rinsho* 61 Suppl 3, 414-422.

Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10, 159-169.

Hoverstad, T. (1986). Studies of short-chain fatty acid absorption in man. *Scand J Gastroenterol* 21, 257-260.

Hoverstad, T., Carlstedt-Duke, B., Lingaas, E., Norin, E., Saxerholt, H., Steinbakk, M., and Midtvedt, T. (1986). Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short-chain fatty acid excretion in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 21, 997-1003.

Hoverstad, T., and Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J Nutr* 116, 1772-1776.

Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5354-5359.

Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.

Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4, 337-349.

King, D.E., Egan, B.M., Woolson, R.F., Mainous, A.G., 3rd, Al-Solaiman, Y., and Jesri, A. (2007). Effect of a high-fiber diet vs a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. *Arch Intern Med* 167, 502-506.

Kjeldsen-Kragh, J. (1999). Rheumatoid arthritis treated with vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* 70, 594S-600S.

Kranich, J., Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Semin Immunol* 23, 139-145.

Lavelle, E.C., Murphy, C., O'Neill, L.A., and Creagh, E.M. (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol* 3, 17-28.

Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., Lannoy, V., Decobecq, M.E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., *et al.* (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 278, 25481-25489.

Lee, Y.K., and Mazmanian, S.K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330, 1768-1773.

Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006a). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006b). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.

Liu, C.H., Lee, S.M., Vanlare, J.M., Kasper, D.L., and Mazmanian, S.K. (2008). Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3951-3956.

Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-2226.

Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 478-485.

Maloy, K.J., and Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298-306.

Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol* 12, 5-9.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., *et al.* (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282-1286.

Mazmanian, S.K., Round, J.L., and Kasper, D.L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625.

Meijer, K., de Vos, P., and Priebe, M.G. (2010). Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13, 715-721.

Nilsson, N.E., Kotarsky, K., Owman, C., and Olde, B. (2003). Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1047-1052.

Noverr, M.C., and Huffnagle, G.B. (2004). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 12, 562-568.

Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5, e177.

Peltonen, R., Kjeldsen-Kragh, J., Haugen, M., Tuominen, J., Toivanen, P., Forre, O., and Eerola, E. (1994). Changes of faecal flora in rheumatoid arthritis during fasting and one-year vegetarian diet. *Br J Rheumatol* 33, 638-643.

Peltonen, R., Nenonen, M., Helve, T., Hanninen, O., Toivanen, P., and Eerola, E. (1997). Faecal microbial flora and disease activity in rheumatoid arthritis during a vegan diet. *Br J Rheumatol* 36, 64-68.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P.A., and Stobberingh, E.E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521.

Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., and Gordon, J.I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2, 328-339.

Podolsky, S. (1998). Cultural divergence: Elie Metchnikoff's *Bacillus bulgaricus* therapy and his underlying concept of health. *Bull Hist Med* 72, 1-27.

Pull, S.L., Doherty, J.M., Mills, J.C., Gordon, J.I., and Stappenbeck, T.S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 99-104.

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241.

Ramberg, J.E., Nelson, E.D., and Sinnott, R.A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutr J* 9, 54.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.

Roberfroid, M.B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am J Clin Nutr* 73, 406S-409S.

Rose, D.J., DeMeo, M.T., Keshavarzian, A., and Hamaker, B.R. (2007). Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: importance of fermentation pattern. *Nutr Rev* 65, 51-62.

Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Spinozzi, F., Agea, E., Pelli, M.A., and Morozzi, G. (2001). Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 22, 1675-1680.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313-323.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12204-12209.

Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'HUigin, C., *et al.* (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 207, 1625-1636.

Saleh, M., and Trinchieri, G. (2011). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* 11, 9-20.

Salzman, N.H. (2011). Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Curr Opin Microbiol* 14, 99-105.

Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577-594.

Sekhavat, A., Sun, J.M., and Davie, J.R. (2007). Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. *Biochem Cell Biol* 85, 751-758.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90, 859-904.

Sina, C., Gavrilova, O., Forster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., *et al.* (2009). G protein-coupled receptor 43 is

essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol* *183*, 7514-7522.

Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* *10*, 427-439.

Souza, D.G., Vieira, A.T., Soares, A.C., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., and Teixeira, M.M. (2004). The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol* *173*, 4137-4146.

Stephani, J., Radulovic, K., and Niess, J.H. (2011). Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *59*, 161-177.

Stockinger, S., Hornef, M.W., and Chassin, C. (2011). Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cell Mol Life Sci*.

Sydora, B.C., Albert, E.J., Foshag, R.R., Doyle, J.S., Churchill, T.A., and Fedorak, R.N. (2011). Intravenous Injection of Endogenous Microbial Components Abrogates DSS-Induced Colitis. *Dig Dis Sci*.

Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., and Nie, D. (2011). The role of short-chain fatty acids in orchestrating two types of programmed cell death in colon cancer. *Autophagy* *7*, 235-237.

Tanoue, T., Umesaki, Y., and Honda, K. (2010). Immune responses to gut microbiota-commensals and pathogens. *Gut Microbes* *1*, 224-233.

Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., and Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* *13*, 2826-2832.

Thangaraju, M., Cresci, G.A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J.P., Browning, D.D., Mellinger, J.D., Smith, S.B., Digby, G.J., Lambert, N.A., *et al.* (2009). GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res* *69*, 2826-2832.

Topping, D.L., and Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064.

Treem, W.R., Ahsan, N., Shoup, M., and Hyams, J.S. (1994). Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 18, 159-164.

Trock, B.J., Lanza, E., and Greenwald, P. (1990). High fiber diet and colon cancer: a critical review. *Prog Clin Biol Res* 346, 145-157.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., and Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.

Vacharaksa, A., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota: metagenomics to study complex ecology. *Curr Biol* 20, R569-571.

Vecchia, M.G., Carnelos Filho, M., Felli, C.R., Curi, R., and Newsholme, E.A. (1997). Acetate and propionate potentiate the antiproliferative effect of butyrate on RBL-2H3 growth. *Gen Pharmacol* 29, 725-728.

Vieira, L.Q., dos Santos, L.M., Neumann, E., da Silva, A.P., Moura, L.N., and Nicoli, J.R. (2008). Probiotics protect mice against experimental infections. *J Clin Gastroenterol* 42 Suppl 3 Pt 2, S168-169.

Vinik, A.I., and Jenkins, D.J. (1988). Dietary fiber in management of diabetes. *Diabetes Care* 11, 160-173.

Vinolo, M.A., Ferguson, G.J., Kulkarni, S., Damoulakis, G., Anderson, K., Bohlooly, Y.M., Stephens, L., Hawkins, P.T., and Curi, R. (2011). SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* 6, e21205.

Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Hatanaka, E., Hebeda, C.B., Farsky, S.H., and Curi, R. (2009). Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond)* *117*, 331-338.

Willing, B.P., Gill, N., and Finlay, B.B. (2010). The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut Microbes* *1*, 213-223.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., *et al.* (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* *334*, 105-108.

Yu, D.C., Bury, J.P., Tiernan, J., Waby, J.S., Staton, C.A., and Corfe, B.M. (2011). Short-chain fatty acid level and field cancerization show opposing associations with enteroendocrine cell number and neuropilin expression in patients with colorectal adenoma. *Mol Cancer* *10*, 27.

Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* *32*, 379-391.

Zaki, M.H., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* *32*, 171-179.

6- ANEXOS

6.1 Anexo-1

Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM. *Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis.* **Am J Pathol.** 2009 175(6):2382-91

6.2 Anexo-2

Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, **Vieira AT**, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Fierro IM, Teixeira MM. *The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice.* **J Immunol.** 2007 Dec 15; 179(12): 8533-43.

6.3 Anexo- 3

Martins FS, Silva AA, **Vieira AT**, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, Nicoli JR. *Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties.* Arch Microbiol. 2009 Aug;191(8):623-30

6.4 Anexo- 4

Martins AK, Martins FS, Gomes DA, Elian SD, **Vieira AT**, Teixeira MM, Cara DC, Nardi RM, Nicoli JR. *Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of Bifidobacterium animalis var. lactis.* Arch Microbiol. 2010 Dec;192(12):995-1003.

6.5 Anexo- 5

Martins FS, Elian SD, **Vieira AT**, Tiago FC, Martins AK, Silva FC, Souza EL, Sousa LP, Araújo HR, Pimenta PF, Bonjardim CA, Arantes RM, Teixeira MM, Nicoli JR.

Oral treatment with Saccharomyces cerevisiae strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. Int J Med Microbiol. 2011

Apr;301(4):359-64