



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

## **EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE DIETA RICA EM SAL NA MUCOSA INTESTINAL**

Orientadora: Professora Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Professora Tatiani Uceli Maioli

**SARAH LEÃO FIORINI DE AGUIAR**

Belo Horizonte, agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE DIETA RICA  
EM SAL NA MUCOSA INTESTINAL**

*Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.*

Sarah Leão Fiorini de Aguiar

Orientadora: Professora Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Professora Tatiani Uceli Maioli

Belo Horizonte, agosto de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia (Lib) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

*“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa.”*

**João Guimarães Rosa**



## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da vida!*

*Ao Paulo, meu companheiro de vida! Por ser meu grande incentivador, pela compreensão durante todos os momentos de ausência, pelos longos fins de semana no ICB, pela paciência em me ouvir e me ajudar a treinar para as apresentações ao longo do doutorado. E por fazer meus dias mais felizes!*

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

*À professora Ana Maria pelo carinho com que abriu as portas do LIB para mim e principalmente pelo incentivo na ciência e exemplo de pesquisadora! Quando penso em como quero ser futuramente como professora e pesquisadora, não consigo pensar em outra pessoa para me inspirar.*

*À professora Tatiani, pela contribuição para minha formação e por compartilhar seus conhecimentos.*

*Aos amigos do LIB que foram fundamentais para a realização de todo esse trabalho: desde discussões científicas, ajuda nos experimentos até as confraternizações, almoços e brincadeiras gostosas que fizeram mais agradáveis os momentos de trabalho.*

*À Mari, pelas discussões e ideias de projeto, pela parceria nos trabalhos, pela lealdade em todos os momentos, pelas noites cansativas no LIB trabalhando, por ser o exemplo de ética no manejo com animais de laboratório, mas principalmente por ser a amiga que precisei durante esses 6 anos de laboratório. Obrigada!*

*À Adna, pela amizade de tantos anos e troca de ideias no laboratório.*

*Ao Maurinho, pelo carinho e por ser tão prestativo!*

*À Nat, pelo carinho, pela amizade, pelas massagens na mão e por organizar minha vida no laboratório!*

*A todos e a cada amigo querido do LIB: Lícia, Luiz, Helder, Ju, Luisa, Pat, Pri, Gui, Dantas, Mini Mari, Caixas, meu muito obrigada! Vocês são a melhor família de laboratório que eu poderia ter!*

*À Pri Cunha pela amizade e pela colaboração de sucesso durante esse trabalho.*

*Às queridas amigas da Nutrição! Vocês sempre foram e serão essenciais. À Nath, que sempre me apoiou na área acadêmica e pacientemente revisou minha tese!*

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

*Aos laboratórios chefiados pelos professores Jacqueline, Sergio Costa, Leda, Denise e Maria Helena pelo empréstimo de reagentes e uso de equipamentos.*

*Aos professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia.*

*Aos camundongos por permitirem que meus experimentos se tornassem realidade!*

## RESUMO

A relação do consumo excessivo de sódio com desenvolvimento de doenças cardiovasculares já foi amplamente relatada. No entanto, alguns estudos recentes mostraram efeitos da dieta rica em sal (NaCl) na ativação de células Th17 e no aumento da severidade de doenças autoimunes. No presente estudo, mostramos que o consumo de dieta rica em sal (HSD) por camundongos C57BL/6 levou à inflamação no cólon associada à produção de IL-23, recrutamento de neutrófilos e aumento da frequência de células da resposta imune inata, *innate lymphoid cells* do tipo 3 (ILC 3), produtoras de IL-17. Além disso, nosso estudo demonstrou que a inflamação no cólon não foi observada quando a dieta rica em sal foi administrada em camundongos que não possuíam o gene que codificava a citocina IL-17 (IL-17<sup>-/-</sup>) mas estava presente, ainda que em menor grau, em camundongos que não possuíam o gene que codificava as enzimas de recombinação gênica de linfócitos (RAG<sup>-/-</sup>). [Estes dados sugerem](#) que os efeitos inflamatórios da dieta rica em sal foram dependentes de IL-17 mas apenas parcialmente dependentes de linfócitos diferenciados em Th17. A expressão de SGK1, quinase envolvida na homeostase do sódio, não teve produção aumentada após o consumo de dieta rica em sal nos tempos testados. Além de observar alteração na mucosa do cólon de camundongos, investigamos também se a dieta rica em sal teria efeito em dois modelos de colite experimental: a colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) e na colite induzida por 2,4,6-ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Observamos que a doença foi exacerbada em ambos modelos pelo consumo da HSD e a piora estava associada ao aumento da frequência de células ROR $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e de neutrófilos na lâmina própria do cólon. Com isso, nossos resultados sugerem que o consumo de uma dieta rica em sal foi suficiente para levar à inflamação na mucosa do cólon de camundongos C57BL/6, além de exacerbar a colite em camundongos por meio de um mecanismo dependente da produção de IL-17 e apenas parcialmente dependente de células T.

## ABSTRACT

Excess intake of sodium is often associated with high risk for cardiovascular disease. More recently, some studies on the effects of high salt diets have also demonstrated that they are able to activate Th17 cells and increase severity of autoimmune diseases. In the present study, we showed that consumption of high salt diet (HSD) by mice triggered a gut inflammatory reaction associated with IL-23 production, recruitment of neutrophils and increased frequency of the IL-17-producing type 3 innate lymphoid cells in the colon. Moreover, gut inflammation was not observed in IL-17<sup>-/-</sup> mice but it was present, although at lower grade, in RAG<sup>-/-</sup> mice suggesting that the inflammatory effects of high salt diet was dependent on IL-17 but only partially on Th17 cells. Expression of SGK1, a kinase involved in sodium homeostasis, was not increased upon HSD ingestion at any of the time points tested. Colitis induced by oral administration of either dextran sodium sulfate (DSS) or 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was exacerbated by HSD consumption and this effect was associated with increased frequencies of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells and neutrophils in the colon. Therefore, our results suggest that consumption of high-salt diet *per se* was able to trigger a mild inflammation in the colon and also to exacerbate colitis in mice by a mechanism dependent on IL-17 production but only partially dependent on Th17 cells.

## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	<b>22</b>
<b>COMPONENTES DIETÉTICOS E O SISTEMA IMUNE</b> .....	<b>23</b>
<b>O SAL (NaCl)</b> .....	<b>25</b>
<b>O SAL COMO COMPONENTE DIETÉTICO</b> .....	<b>27</b>
<b>A MUCOSA INTESTINAL</b> .....	<b>30</b>
<b>O SAL E O SISTEMA IMUNE</b> .....	<b>40</b>
<b>DIETA RICA EM SAL E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>MODELOS ANIMAIS PARA DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS</b> .....	<b>47</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>51</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>ANIMAIS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>53</b>
<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>53</b>
<b>INDUÇÃO DA COLITE POR DSS</b> .....	<b>56</b>
<b>INDUÇÃO DA COLITE POR TNBS</b> .....	<b>57</b>
<b>DIETA</b> .....	<b>57</b>
<b>AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS</b> .....	<b>59</b>
<b>AVALIAÇÃO DO ÍNDICE CLÍNICO DA DOENÇA</b> .....	<b>59</b>
<b>AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA</b> .....	<b>59</b>
<b>AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO DO CÓLON</b> .....	<b>60</b>
<b>AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL</b> .....	<b>60</b>
<b>PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A MEDIDA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO E NAG</b> .....	<b>60</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO CÓLON</b> .....	<b>61</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA N-ACETILGLICOSAMINIDASE (NAG) NO CÓLON E ÓRGÃOS LINFOIDES</b> .....	<b>61</b>
<b>DOSAGEM DE CITOCINAS NOS EXTRATOS DE TECIDO DE BAÇO, LINFONODOS MESENTÉRICOS, LINFONODO CECAL E CÓLON</b> .....	<b>62</b>
<b>ISOLAMENTO DE POPULAÇÕES CELULARES DA LÂMINA PRÓPRIA DO CÓLON DOS CAMUNDONGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	<b>63</b>
<b>ANÁLISE DAS ILCs POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	<b>64</b>
<b>ANÁLISE DE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS T POR CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	<b>65</b>
<b>MEDIDA DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES</b> .....	<b>69</b>
<b>PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)</b> .....	<b>70</b>

<b>DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....</b>	<b>70</b>
<b>EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNASE I .....</b>	<b>70</b>
<b>SÍNTESE DE CDNA E AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR (TRANSCRIÇÃO REVERSA-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) .....</b>	<b>71</b>
<b>ENSAIOS DE QPCR E ANÁLISE DOS DADOS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>O CONSUMO DA DIETA RICA EM SAL POR CAMUNDONGOS C57BL/6 INDUZIU O AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA. ....</b>	<b>75</b>
<b>O CONSUMO DA DIETA RICA EM SAL LEVOU AO SURGIMENTO DE ELEMENTOS CARACTERÍSTICOS DE INFLAMAÇÃO NA MUCOSA DO CÓLON DOS CAMUNDONGOS .....</b>	<b>76</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL RESULTOU EM ALTERAÇÕES NO PERFIL DE CITOCINAS E NA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO CÓLON .....</b>	<b>77</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL INDUZIU AUMENTO NA FREQUÊNCIA DE NEUTRÓFILOS NA LÂMINA PRÓPRIA DO CÓLON .....</b>	<b>78</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL RESULTOU EM ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE SGK1 NO CÓLON .....</b>	<b>80</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL AGRAVOU A COLITE INDUZIDA POR DSS .....</b>	<b>81</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL LEVA AO ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO CÓLON DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA POR DSS .....</b>	<b>83</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL AGRAVOU A COLITE INDUZIDA POR TNBS .....</b>	<b>84</b>
<b>MAIS UMA VEZ O CONSUMO DA DIETA RICA EM SAL LEVOU À PIORA DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL. ASSIM COMO NA COLITE INDUZIDA POR DSS, ANIMAIS ALIMENTADOS COM HSD TRATADOS COM TNBS APRESENTARAM MAIOR ESCORE CLÍNICO DA DOENÇA, MENOR GANHO DE PESO, MAIOR ESCORE HISTOLÓGICO INFLAMATÓRIO, ALÉM DE REDUZIDA SOBREVIVÊNCIA QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS QUE FORAM SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO INTRARRETAL DE TNBS, MAS RECEBERAM DIETA PADRÃO (FIGURA 17).....</b>	<b>84</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL RESULTOU EM ALTERAÇÕES NO PERFIL CELULAR NO CÓLON DE CAMUNDONGOS COM COLITE INDUZIDA POR TNBS .....</b>	<b>86</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM SAL INDUZIU INFLAMAÇÃO INTESTINAL POR MECANISMO DEPENDENTE DE IL-17 E PARCIALMENTE DEPENDENTE DE CÉLULAS T .....</b>	<b>87</b>
<b>O CONSUMO DA DIETA RICA EM SAL RESULTOU EM ALTERAÇÕES NA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS LINFOIDES INATAS (ILCs) NA MUCOSA INTESTINAL.....</b>	<b>89</b>
<b>O CONSUMO DE DIETA RICA EM KCL TAMBÉM LEVOU A ALTERAÇÕES NA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6 .....</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>104</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>129</b>





## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Representação dos elementos formadores do GALT**
- Figura 2. As ILCs são classificadas em três grupos de acordo com suas características funcionais**
- Figura 3. Protocolo experimental I**
- Figura 4. Protocolo experimental II**
- Figura 5. Protocolo experimental III**
- Figura 6. Protocolo experimental IV**
- Figura 7. Estratégia de análise de neutrófilos**
- Figura 8. Estratégia de análise de células T e de macrófagos**
- Figura 9. Estratégia de análise de células linfoides inatas**
- Figura 10. Avaliação da pressão arterial média (MAP)**
- Figura 11. Avaliação do ganho de peso, permeabilidade intestinal e escore histológico do grupo controle e do grupo HSD**
- Figura 12. Avaliação da concentração de citocinas e frequência de células  $CD4^{+}IL-23R^{+}$  e de  $CD4^{+}FoxP3^{+}$  no cólon**
- Figura 13. Avaliação da frequência de neutrófilos no cólon**
- Figura 14. Avaliação da expressão relativa de SGK1 no cólon**
- Figura 15. Avaliação dos efeitos de 3 semanas de dieta rica em sal na colite induzida por DSS**
- Figura 16. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-beta-D-glicosamidase (NAG) e na frequência de neutrófilos e macrófagos no cólon**
- Figura 17. Avaliação dos efeitos de 3 semanas de dieta rica em sal na colite induzida por TNBS**
- Figura 18. Avaliação dos efeitos de 3 semanas de dieta rica em sal no perfil celular em camundongos com colite induzida por TNBS**

**Figura 19. Consumo de HSD induziu inflamação no cólon de camundongos RAG -/- mas não em IL-17 -/-**

**Figura 20. Avaliação da frequência de ILCs na mucosa colônica**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1. Composição da deta AIN 93G**

**Tabela 2. Composição da deta AIN 93G acrescida de NaCl**

**Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos *amplicons***

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHT: *Butylated-Hydroxytoluene*  
CCL20: *C-C motif ligand 20*  
CCR6: *Chemokine receptor 6*  
CD: Doença de Crohn  
CD: *Cluster of differentiation*  
cDNA: DNA complementar  
CSF2: *Colony-stimulating factor 2*  
CT: Controle  
°C: Graus Celsius  
DII: Doenças inflamatórias intestinais  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DNase: Desoxirribonuclease  
DSS: *Dextran sulfate sodium*  
99mTc-DTPA: Ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio  
EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática  
FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*  
FAE: *Follicle-associated epithelium*  
Foxo 1: *Forkhead box protein O1*  
FoxP3: *Forkhead box P3*  
GALT: Gut-associated lymphoid tissue  
GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
GATA 3: *Trans-acting T-cell-specific transcription factor*  
HE: Hematoxilina e eosina  
HSD: *High salt diet* - dieta rica em sal  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
ID2: *inhibitor of DNA binding 2*  
IEL: Linfócito intraepitelial  
IFN- $\gamma$ : *Interferon gamma*  
Ig: Imunoglobulina  
IL: Interleucina  
ILC: *Innate lymphoid cell* – célula linfoide inata  
LPL: Linfócitos da lâmina própria  
LTi: *Lymphoid tissue inducer*  
Lin<sup>-</sup>: Linhagem negativa  
MAP (PAM): *Medium arterial pressure* (Pressão arterial média)  
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*  
MBq: Megabecquerel  
MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*  
mM: milimol  
mL: mililitro  
mRNA: RNA mensageiro

μL: microlitro  
MPO: Mieloperoxidase  
NaCl: Cloreto de sódio  
NFAT5: *Nuclear factor of activated T-cells 5*  
NAG: *N-acetil-D-glicosamina*  
NK: *Natural killer*  
NOD 2: *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*  
ng: Nanograma  
nm: nanômetro  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato de sódio  
OMS: Organização mundial da saúde  
OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*  
Pb: Pares de bases  
PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*  
POF: Pesquisa de [Orçamentos](#) [Famíliares](#)  
RAG: *Recombination-activating gene*  
REG IIIγ: *Regenerating islet-derived protein 3 gamma*  
RNA: Ácido ribonucleico  
RORγt: *RAR-related orphan receptor gamma*  
RT-PCR = qPCR: *Real-time polymerase chain reaction*  
SED: *subepithelial dome*  
SGK1: *serum glucocorticoid regulated kinase 1*  
sIgA: Imunoglobulina A secretória  
STAT 3: *Signal transducer and activator of transcription 3*  
T-bet: *T-box transcription factor*  
TCR-α: *T cell receptor alpha*  
TGF-β: *Transforming growth factor beta*  
TGI: Trato gastrointestinal  
Th: *T helper*  
TLR2: *Toll-like receptor 2*  
TMB: *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*  
TNF-α: *Tumor necrosis fator alpha*  
TNBS: *2,4,6- Trinitrobenzenesulfonic acid*  
Treg: T reguladora  
UC: Colite ulcerativa  
ZO1 e 2: *Zonula ocludens 1 e 2*

## INTRODUÇÃO

---

## INTRODUÇÃO

O sódio é um nutriente indispensável para o funcionamento normal das células e do organismo, mas deve ser consumido nas quantidades adequadas e seguindo as recomendações, que segundo a Organização Mundial da Saúde ([OMS](#)) deve ser inferior a 2 gramas por dia (FARQUHAR et al, 2014; WHO, 2007). Ele é essencial para a manutenção da pressão osmótica, regulação do pH, distribuição de fluidos corporais e para a maioria dos processos metabólicos. Além disso, o influxo de íons de sódio através da membrana plasmática é requerido para o potencial de ação envolvido nos impulsos nervosos e para contração muscular. O cloreto de sódio é avidamente disponível em alimentos processados e industrializados e assim, ingerido em altas quantidades como parte da dieta ocidental (MOZAFFARIAN et al, 2014). Seu consumo excessivo está envolvido no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e essa associação já está bem estabelecida na literatura (MOZAFFARIAN et al, 2014; O'DONNELL et al, 2014; MENTE et al, 2014).

Apesar da [relação entre](#) o alto consumo de sódio com doenças cardiovasculares, como a hipertensão [arterial](#), já ser bem entendida pela comunidade científica, desde 2013 [vêm](#) surgindo alguns estudos mostrando uma nova associação para o sal de adição. Esses trabalhos mostraram que as células do sistema imune desempenham um papel importante como mediadoras dos efeitos deletérios do consumo de altas quantidades de sódio. Foi demonstrado, em estudos *in vitro* e *in vivo*, que a ingestão de elevadas concentrações de cloreto de sódio leva à diferenciação de células pro-inflamatórias Th17 produtoras de IL-17 por meio da ativação da via de sinalização p38/MAPK/NFAT5 e ativação da proteína quinase SGK1 (KLEINWITFELD et al, 2013; WU et al, 2013).

A mucosa intestinal é a maior superfície de contato do organismo com o ambiente externo e interage a todo momento com antígenos do meio ambiente e proteínas da dieta. Em condições fisiológicas, essa interação leva à tolerância oral, estado de supressão de respostas imunes inflamatórias específicas para os antígenos contatados pela via oral (FARIA and WEINER, 2005). Porém, em situações nas quais há rompimento da homeostase intestinal, como desbalanço entre células T reguladoras (Treg) e células T efetoras Th1, Th2 e Th17, ocorre o desencadeamento de respostas inflamatórias a antígenos da dieta ou da microbiota e essas reações estão presentes

especialmente nas alergias alimentares e nas Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), como a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa (KASER et al., 2010). Muitos trabalhos têm demonstrado um aumento nas citocinas características das células Th17 em doenças inflamatórias intestinais (WEI et al, 2017), apesar de ainda não estar esclarecido se essas citocinas estão sendo produzidas exclusivamente por células T.

A composição da dieta tem sido descrita como fator de risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes e de doenças inflamatórias intestinais. Nesse aspecto, um componente da dieta ocidental que deve ser levado em consideração é o cloreto de sódio, consumido em quantidades muito além dos valores recomendados (BINGER et al, 2015).

Alguns estudos têm mostrado que o alto consumo de sódio também pode levar ao surgimento de células Th17 e ao agravamento da colite em modelos experimentais por meio da ativação da quinase SGK1 (WEI et al, 2017; MONTELEONE et al, 2017; TUBBS et al, 2017). Esses trabalhos evidenciaram ainda mais a importância da ativação do eixo SGK1/Th17 nesse processo, mas eles ainda não exploraram extensivamente a possibilidade de que a IL-17 pode estar sendo produzida por outra fonte celular além das células T, como as células linfóides inatas (ILC) do tipo 3, por exemplo.

As células linfóides inatas (ILC) representam um grupo heterogêneo e hematopoiético de células do sistema imune inato que possuem um progenitor linfóide comum. Essas células não apresentam rearranjo de receptores antígeno-específicos, mas expressam vários fatores de transcrição e moléculas efetoras que também são expressas pelas células T auxiliares (TCD4<sup>+</sup> - Th), sugerindo que as ILCs poderiam ser precursores evolutivos das células do sistema imune adaptativo. Além disso, elas possuem funções homólogas às das células Th: as ILC1 expressam t-bet e são homólogas às Th1; as ILC2 expressam GATA3 e são homólogas às Th2; as ILC3 expressam ROR $\gamma$ t e são homólogas às células Th17 (SPITS and DI SANTO, 2011; SPITS et al, 2013).

Considerando que as células Th17 têm sido implicadas na patogenicidade da dieta rica em sal (HSD) em modelos de encefalomielite e colite, e sabendo que as ILC3 são células abundantes na mucosa intestinal, além de estarem aumentadas em cólon de indivíduos com DII, é provável que os efeitos deletérios da HSD na



inflamação intestinal e no desenvolvimento da colite experimental estejam relacionados à produção de IL-17 pelas células Th17 e também pelas ILC3.

Assim, esse estudo teve o objetivo de investigar os efeitos diretos de uma dieta rica em cloreto de sódio na mucosa intestinal de camundongos na ausência de inflamação e também no desenvolvimento de colite experimental murina. Nossa hipótese de trabalho é de que o sódio pode apresentar um efeito inflamatório para a mucosa intestinal *per se* e que tanto as células T quanto as ILCs podem estar envolvidas no processo inflamatório.

## ESTADO DA ARTE

---

## ESTADO DA ARTE

### Componentes dietéticos e o sistema imune

O epitélio intestinal é a maior área de contato do corpo humano com o ambiente externo (MAYER, 2005) e encontra-se em constante interação com uma gama de microorganismos, macromoléculas, componentes da dieta e xenobióticos, o que leva a um contínuo estímulo das células do sistema imune abundantes na submucosa abaixo desse epitélio. A maioria desses contatos acontece na mucosa intestinal, sendo que já foi demonstrado que em torno de 130 a 160 gramas de proteínas são absorvidas no intestino delgado diariamente (BRANDTZAEG, 1998). Além disso, o trato gastrointestinal abriga aproximadamente 10 trilhões de microorganismos de mais de 1000 espécies diferentes (GILL et al, 2006). Dada a enorme relevância da relação entre componentes da dieta e sistema imune, é crescente o número de linhas de pesquisa nessa área e está cada vez mais claro que os nutrientes podem contribuir com muito mais do que a simples nutrição.

Diversos trabalhos envolvendo vias metabólicas desencadeadas por aminoácidos, vitaminas e lipídeos confirmam o papel crítico dos componentes da dieta no funcionamento e modulação do sistema imune (FARIA et al, 2013).

Os primeiros achados envolvendo nutrição e imunologia se deram em investigações clínicas de desnutrição e também em modelos animais de deficiências nutricionais (FARIA et al, 2013). A desnutrição foi associada com a atrofia do timo (CHANDRA, 1992), alterações na produção de IgA secretória (MANHART et al, 2000; BEATYY et al, 1983; GREEN and HEYWORTH, 1980) e alterações no perfil da microbiota intestinal (SMITH et al, 2013). Além disso, observa-se uma forte relação entre desnutrição e susceptibilidade a doenças infecciosas em todo o mundo (CDC, 2008).

Esses resultados lançam luzes sobre o papel crítico da dieta no sistema imune, mas está cada vez mais evidente que os componentes dietéticos desempenham papéis que vão muito além das funções nutritivas no organismo. Nesse contexto, foi demonstrado que a presença de proteínas intactas na dieta cumpre um papel fundamental no desenvolvimento da maturação do sistema imune, independentemente da sua função nutritiva. Camundongos alimentados com dieta contendo aminoácidos

livres em substituição a proteínas intactas desde o desmame até a vida adulta apresentaram alterações imunológicas apesar de não mostrarem sinais de desnutrição (MENEZES et al, 2003). Essas alterações incluíram redução da produção de IgA secretória, alteração no comprimento dos vilos intestinais, redução no número de células caliciformes, redução dos níveis séricos de IgA e IgM e de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-2. Por um lado, os camundongos adultos alimentados com dieta sem proteínas apresentam um perfil imunológico imaturo semelhante ao perfil de neonatos. Isto pode ser comprovado pela dificuldade desses animais em montarem uma resposta imune adequada a infecções por parasitos como *Leishmania major* (AMARAL et al, 2010). Por outro lado, essas alterações observadas na ausência das proteínas da dieta são semelhantes àquelas descritas em camundongos *germ-free* (MENEZES et al, 2003) sugerindo que essas proteínas e os antígenos da microbiota exercem um papel importante na estimulação fisiológica que leva à maturação do sistema imune no período pós-desmame. Em animais adultos, o consumo de dieta rica em aminoácidos livres desencadeia a proliferação de linfócitos da mucosa intestinal por um mecanismo dependente de mTOR<sub>2</sub>, levando a inflamação local e ao agravamento de da colite experimental (SOUZA et al, 2017).

Os resultados demonstrando que as proteínas, atuando como antígenos naturais, exercem papel importante no desenvolvimento do sistema imune levantaram a questão de que outras macromoléculas poderiam também exercer funções imunológicas. De fato, dessa maneira, já se sabe que os lipídeos têm papel relevante na manutenção da homeostase intestinal. Os ácidos graxos de cadeia curta, que são os principais produtos metabólicos da fermentação de bactérias no intestino, foram reconhecidos como potenciais mediadores dos efeitos imunológicos da microbiota intestinal (MASLOWSKI et al, 2009; VINOLO et al, 2011). Outros lipídeos, da mesma forma, apresentam atividade imunológica importante. O consumo de dieta suplementada com ácido linoleico conjugado (CLA), um agonista do receptor nuclear PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), foi capaz de prevenir a colite experimental murina através da indução da produção de TGF- $\beta$  por macrófagos e linfócitos T na lâmina própria do intestino (MOREIRA et al, 2012). Há ainda uma vasta literatura documentando os efeitos anti-inflamatórios e inflamatórios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e ômega 6 (CALDER, 2015). Muitos autores têm demonstrado a ação terapêutica do ômega 3 em doenças autoimunes como a artrite

reumatóide (KIM et al, 2018), doenças inflamatórias intestinais (MARION-LETTIELIER et al, 2013) e na asma (YATES et al, 2014). Estudos do nosso grupo em modelo experimental de mucosite induzida pelo agente químico (5-FU) demonstraram que a suplementação com ácidos graxos linolênicos ômega-3 reduziu os danos causados pelo agente químico no modelo de mucosite (GENEROSO et al., 2015).

Alguns micronutrientes também são foco de estudos na área de imunonutrição, apresentando atividades que afetam as células imunes. Já estão bem esclarecidas as funções antioxidantes de vitaminas e elementos traço (vitamina C, vitamina E, selênio, ferro e zinco) e suas ações no contexto de espécies reativas de oxigênio, produção de citocinas e prostaglandinas (MAGGINI et al, 2007). A deficiência de vitamina A na dieta de camundongos induz um perfil imunológico predominantemente pró-inflamatório, com produção aumentada de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17, TGF- $\beta$  e IL-10 na mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos. A suplementação do micronutriente, por outro lado, induz o aumento de células T reguladoras CD4+LAP+ nos linfonodos mesentéricos e baço, sugerindo que a suplementação de vitamina A poderia ser benéfica em situações patológicas como doenças inflamatórias intestinais (MEDEIROS et al, 2015).

Recentemente, outros micronutrientes como o sal de cozinha (NaCl) foram descritos como agentes capazes de ativar células do sistema imune, levando ao agravamento de doenças inflamatórias como a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (KLEINWIETFIELD et al, 2013; WU et al, 2013) e a colite experimental em camundongos (TUBBS et al, 2017).

## **O sal (NaCl)**

O sal, ou sal de cozinha, é quimicamente o NaCl, formado pela associação do cátion Na<sup>+</sup> e do ânion Cl<sup>-</sup> por meio de uma ligação iônica. A estrutura em cristais do cloreto de sódio é composta por um ânion cloreto interagindo com seis cátions de sódio, sendo que a massa molar corresponde a 60% de cloreto e 40% de sódio. Os cristais do cloreto de sódio são translúcidos e possuem formato cúbico. A massa molar é 58,443g/mol. É solúvel em água em temperatura ambiente (pode-se dissolver até 359 gamas de NaCl em 1 litro de água) (ALDERMAN, 2010).

O sódio é essencial para o balanço fluídico e homeostase celular. Em 1929, Walter Cannon definiu explicitamente homeostase pela primeira vez ao se referir à matriz fluídica do organismo e enfatizou o papel do sódio nesse processo (CANNON, 1929). Desde então, muitos estudos se dedicaram a investigar a atuação do sódio dietético na saúde.

Em termos quantitativos, o sódio e o cloreto são os eletrólitos mais abundantes no fluido extracelular e são osmoticamente ativos nesse espaço, existindo na forma hidrossolúvel no meio extracelular (STRAIN et al, 2009). A concentração do sódio no fluido extracelular é em torno de 140 mEq/L enquanto que a de cloreto é de 104 mEq/L. Ambos os íons, sódio e cloreto, são prontamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, transportados para os rins, onde são filtrados e retornam para o sangue em níveis apropriados (STRAIN et al, 2009; LUFT, 1996). No cólon proximal, acontece a absorção ativa de sódio e a diferença de potencial elétrico gerado pela absorção do sódio promove absorção de cloreto. A absorção destes íons cria um gradiente osmótico através da mucosa do intestino grosso, o que, por sua vez, leva à absorção de água. No intestino delgado de mamíferos, o transporte ativo transmembranar de glicose requer consumo de ATP e é dependente de dois íons de sódio. A glicose é captada ativamente do lúmen intestinal para o interior do enterócito pelo co-transportador de sódio/glicose 1 (SGLT1), localizado na membrana apical. O SGLT1 possui um local de ligação ao sódio e é essa ligação que induz uma alteração conformacional no transportador, tornando-o acessível à glicose. Desse modo, para cada molécula de glicose transportada, dois íons sódio, cujo gradiente transmembranar é gerado pela ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  localizada na membrana basolateral, são transportados na mesma direção. Simultaneamente, durante esse transporte, dois ânions, um cloreto e um bicarbonato, acompanham por outra via da SGLT1, o transporte para que seja mantida a eletroneutralidade (WRIGHT et al, 2003; HEDIGER et al, 1987).

Os íons de sódio e cloreto são cruciais para a manutenção da pressão osmótica, balanço hídrico, equilíbrio ácido-base e afetam o volume extracelular (BAILEY et al, 2014) e a pressão arterial (KOTCHEN, 2005; PREUSS and CLOUATRE, 2012). O teor total de sódio no corpo reflete-se no volume extracelular, que é o principal determinante do volume vascular. Como o rim retém sódio, o conteúdo corporal total de  $\text{Na}^+$  se eleva em uma situação de consumo excessivo, resultando em aumento do

volume vascular, débito cardíaco e da pressão arterial. O sódio é excretado principalmente na urina (aproximadamente 95%), fezes e suor. Sua concentração é controlada através da secreção de hormônios do sistema renina-angiotensina-aldosterona e antidiuréticos. Quando os níveis de sódio no sangue aumentam, ocorre o estímulo de sua excreção urinária e da sensação de sede para que haja aumento da ingestão hídrica, por outro lado, quando os níveis estão baixos, a excreção urinária de sódio diminui para que se amenizem as perdas (MAHAN and SCOTT-STUMP, 2005). Em nível celular, o sódio está envolvido na manutenção do potencial de membrana, facilitando o transporte ativo de moléculas pela membrana celular. O cloreto é essencial para a produção de ácido hidrocloreídrico nas células parietais gástricas. Sendo um componente do suco gástrico, o ácido hidrocloreídrico está envolvido na digestão e nas atividades de defesa contra alguns patógenos inespecíficos (STRAIN et al, 2009).

Apesar de os maiores problemas de saúde relacionados ao sal serem provenientes do seu consumo excessivo, existem complicações decorrentes da deficiência de sódio, ou hiponatremia. A hiponatremia ocorre quando as concentrações de sódio no plasma diminuem para menos de 135 mEq/L e pode ter diversas causas: diminuição do volume circulante efetivo (diarreia, vômitos, etc.), perdas renais (diuréticos), perdas cutâneas (ultramaratonistas, queimaduras, etc.), estados edematosos, depleção de potássio, gravidez, desnutrição grave, insuficiência renal e estados não hipovolêmicos do excesso de ADH (hormônio antidiurético) (BAILEY et al, 2014).

## **O sal como componente dietético**

Durante milhões de anos, os seres humanos consumiram quantidades muito pequenas de sal, em torno de 0,5-1g de sal por dia, sendo este proveniente dos alimentos caçados e colhidos (plantas e carne). Durante o período Paleolítico, o consumo de sal era aproximadamente 1g/dia (MACGREGOR and WARDENER, 1998). As primeiras evidências do processamento de sal datam de 6000 anos atrás quando habitantes da Romênia começaram a ferver água salgada para extrair os sais. Há 5000 anos, os chineses descobriram que o sal poderia ser usado para preservar os

alimentos e, durante milhares de anos, o sal foi utilizado com essa finalidade, tornando-se, assim, de grande importância econômica e viabilizando o estabelecimento de comunidades (PHILLIPS, 2004). 1000 anos atrás, o consumo de sal chegou a 5g/dia (ROBERTS, 2001). O sal chegou a ser tão valorizado quanto ouro e escravos, sendo que no final do século XVII as taxas sobre o sal estavam tão abusivas na França que elas contribuíram para a Revolução Francesa (RITZ, 1996). O sal foi a mercadoria mais taxada e comercializada no mundo, com seu consumo atingindo o pico em meados do século XIX. Entretanto, com a invenção da geladeira por volta do ano 1860, o consumo de sal reduziu drasticamente e só voltou a se elevar novamente nas últimas décadas, com o advento da comida industrializada e altamente processada, atingindo aproximadamente a mesma média de consumo do século XIX (HE and MACGREGOR, 2010). Atualmente, a ingestão de sal está em torno de 9-12 gramas por dia na maioria de países do mundo. A maioria dos produtos alimentícios apresenta grandes quantidades de sódio e mais de 75% do sódio ingerido é proveniente desses produtos (INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1988).

O sódio está presente nas dietas da maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento e, apesar da necessidade de ingestão de uma quantidade mínima desse mineral, seu consumo encontra-se acima do adequado na maioria dos países. Segundo a DRI (Dietary Reference Intakes, Ingestão Dietética de Referência em português), que propõe valores de referências para nutrientes específicos, propostos pelo *Food and Nutrition Board/Institute of Medicine* dos Estados Unidos, a ingestão adequada de sódio é de: 0,12g/d para crianças de 0-6 meses; 0,37g/d para crianças de 6-12 meses; 1g/d para crianças e 1-3 anos; 1,2g/d para crianças de 4-8 anos de idade; 1,5g/d para indivíduos (mulheres e homens) de 9-50 anos; 1,3g/d para pessoas entre 51-70; 1,2g/d para indivíduos acima de 70 anos de idade (FNB, 2003). Já a OMS recomenda o consumo de menos de 2000mg de sódio por dia, o que equivale a 5g de sal (WHO, 2007). As quantidades mínimas estimadas para a manutenção adequada das funções do sódio são de 200-500mg/dia (HOLBROOK et al, 1984). No Brasil, entre 2008-2009, na última [Pesquisa de Orçamentos Familiares \(POF\) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística \(IBGE\)](#), foi constatado que cada brasileiro consumia 1,031kg de alimentos e 4,46g de sódio por dia, o correspondente a 11,38 g de sal. Ou seja, o brasileiro estaria consumindo mais do que o dobro da



recomendação da OMS. Ainda considerando [essaa](#) pesquisa, constatou-se que, apesar de a ingestão de sódio ter se mantido estável desde a pesquisa anterior - POF 2002-2003, a distribuição da origem do sódio sofreu alterações, [visto](#) que a contribuição do sal de mesa e condimentos à base de sal para o consumo total, que correspondia a 76%, passou a ser de 74%. Já o sódio em alimentos industrializados e pratos prontos passou de 17 para 20% (IBGE, 2010). Em uma pesquisa realizada em 2013 pela Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA), observou-se que a principal origem de ingestão de sódio pelo brasileiro é o sal de cozinha, que representou 59,7% do nutriente consumido nos domicílios e 11,8% na alimentação fora do lar, totalizando 71,5% do sódio ingerido no país. A parcela restante do sódio consumido pela população tem origem no nutriente contido nos alimentos industrializados (13,8%), no pão francês (6,0%), nos alimentos *in natura* (4,7%) e nos alimentos semi-elaborados (4,1%), considerando a soma do sódio ingerido nos lares e em restaurantes locais. Nesse mesmo período, os produtos da indústria da alimentação correspondiam a 73,6% do total de alimentos consumidos no país (ABIA, 2013). Esses dados podem diferir do que é observado em outros países do mundo. Mattes e colaboradores, por exemplo, mostraram que o sódio proveniente de alimentos industrializados corresponde a aproximadamente 70% do consumo total, no Estados Unidos (MATTES and DONNELL, 1991).

A maioria das pessoas sente necessidade de adicionar sal de cozinha aos alimentos e preparações. Conceitualmente, existe um ponto de concentração de sódio no qual o efeito do sabor do mineral no alimento é considerado ótimo. Entretanto, esse ponto ótimo é variável, logo, a maioria das pessoas consegue se adaptar à redução do consumo de sódio dietético, bem como a sentir menor necessidade de adicioná-lo aos alimentos (HENRY, 2010; BERTINO, BEAUCHAMP and ENGELMAN, 1982).

Algumas abordagens podem ser consideradas para diminuir o consumo dietético de sódio: 1) redução do conteúdo de sódio dos alimentos; 2) substituição, por parte dos consumidores, de alimentos com alto teor de sódio por alimentos com baixo teor de sódio; 3) evitar o consumo de alimentos processados e ultra-processados; 4) troca do sal de cozinha e temperos industrializados por temperos com menor teor de sódio (MCGUIRE, 2010; KILCAST and ANGUS, 2007); e 5) uso de tecnologia para potencializar o sabor do sódio o que levaria a um sabor salgado com menor utilização

de sódio (HENRY, 2010). É importante observar que o sabor do alimento deve ser mantido, visto que essa é a força por trás do alto consumo de alimentos ricos em sódio (HENRY, 2010; GILLETTE, 1985). A redução no consumo de sódio representaria uma mudança relevante no suprimento alimentício e poderia ter mais sucesso com pequenos passos ao longo de vários anos. A coordenação entre indústrias processadoras de alimentos, restaurantes e grupos de profissionais da saúde é de extrema importância para articular essas modificações, porém, isso [ainda](#) acontece [de maneira incipiente](#) atualmente (HENRY, 2010; CAUVAIN, 2007; GUINEE, 2007).

## **A mucosa intestinal**

O primeiro e mais importante tecido contatado pelos componentes da dieta, como o sal, é a mucosa intestinal. Longe de ser apenas uma via de entrada de elementos nutricionais, essa mucosa tem uma extensão muito grande (10 vezes a superfície da pele) e está povoada por células imunes. O epitélio intestinal é a superfície de maior área do corpo humano em contato direto com o ambiente externo e encontra-se em constante interação com uma gama de microorganismos, macromoléculas, componentes da dieta e xenobióticos, o que leva a um contínuo estímulo do sistema imune (MAYER, 2005). Existe um grande e crescente interesse em se [entender](#) como o conteúdo do intestino (microbiota e componentes da dieta) interfere em processos fisiológicos e patológicos do organismo para que se possa propor estratégias terapêuticas mais adequadas e eficientes para as patologias envolvendo o intestino e sistema imune, como as doenças inflamatórias intestinais por exemplo. Considerando a relevância do entendimento da mucosa intestinal e os diversos efeitos moduladores de nutrientes no intestino, especificamente o cloreto de sódio para este trabalho, é de suma importância a descrição dos processos fisiológicos e imunológicos que compreendem a mucosa intestinal.

A mucosa intestinal é o tecido com maior número de células do sistema imune e está em constante interação com antígenos e potenciais estímulos (como proteínas da dieta e outros componentes dietéticos). Os processos biológicos que coordenam o equilíbrio entre a inflamação e regulação no intestino despertam a atenção dos

pesquisadores, que cada vez mais têm buscado entender a fisiologia desse tecido (MOWAT and AGACE, 2014).

Devido à exposição contínua do intestino aos antígenos da dieta e da microbiota autóctone, é necessária a regulação fina e constante das funções do sistema imune e do tecido linfoide associado à mucosa intestinal para desenvolver uma resposta inflamatória rápida e controlada contra patógenos, mas também manter a homeostase intestinal. As complexas interações entre os diferentes tipos celulares do sistema imune inato e adaptativo regulam o perfil inflamatório da mucosa intestinal. Citocinas pró e anti-inflamatórias aparecem como elementos chave na modulação e manutenção da comunicação entre os vários tipos celulares e o balanço entre esses tipos celulares é crítico para a homeostase intestinal (OKUMURA and TAKEDA, 2018).

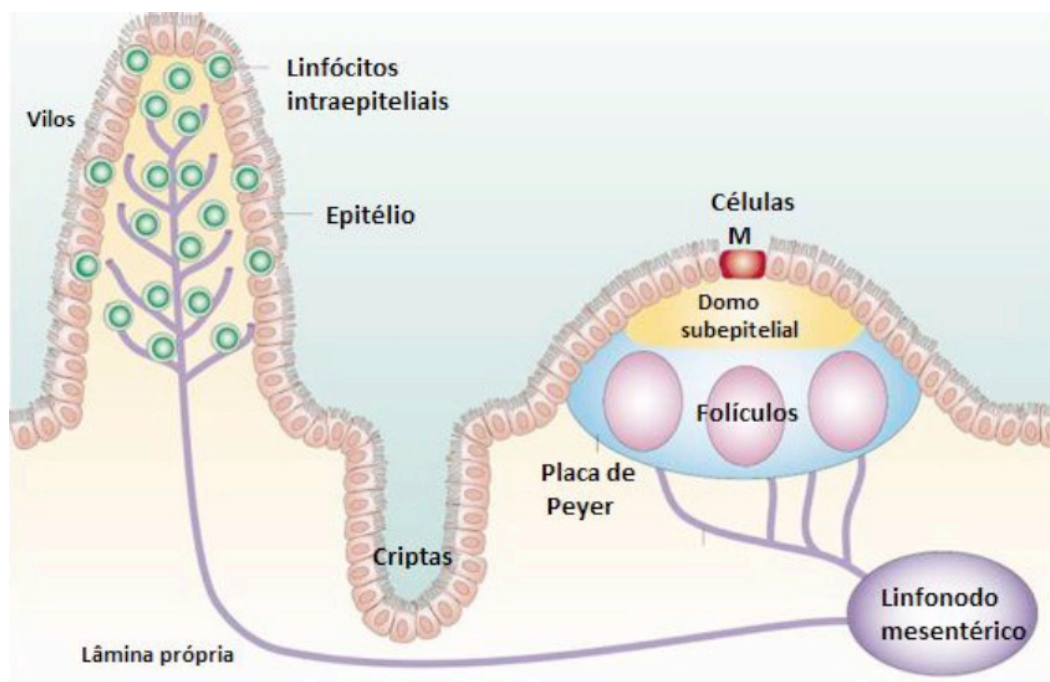
Dessa forma, um dos mecanismos de proteção mais efetivos é o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), que é o maior tecido linfoide do organismo e desempenha um importante papel na manutenção da homeostase intestinal (MOWAT, 2003).

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

As células epiteliais intestinais (IECs) desempenham um papel muito importante na manutenção da homeostase intestinal, que vai além da barreira física formada pela camada única e simples das células. São células heterogêneas e algumas apresentam funções especializadas, como as células de Paneth e células caliciformes, que produzem peptídeos antimicrobianos e muco, respectivamente.

As *tight junctions*, juntamente com os desmossomos (junções adesivas que conectam células epiteliais adjacentes), promovem a forte ligação adesiva que mantém a proximidade celular e são os locais de comunicação intercelular (STROCCHI et al, 1996). A barreira das *tight junctions* regula a relação entre o material luminal e a função imune da mucosa. Na maioria dos indivíduos, esta é uma relação saudável e os antígenos presentes no lúmen têm acesso seletivo e controlado à

lâmina própria do intestino e à circulação. Essa permeabilidade intestinal controlada das células epiteliais permite a absorção de antígenos da dieta ou da microbiota que desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IFN-gamma, bem como a indução de atividades imunorreguladoras.



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

Dentre os componentes imunorreguladores da mucosa intestinal, destacam-se as células T reguladoras (Treg), que desempenham um papel importante no controle das respostas destrutivas nas respostas inflamatórias. A população mais frequentemente estudada é a população de células Treg naturais  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  que se desenvolvem no timo. Essas células são importantes no controle de uma ampla gama de patologias imunomediadas, incluindo autoimunidade, colite e infecção crônica. Não obstante, células T com função reguladora também podem ser geradas

na periferia a partir do *pool* de células T *naive* após, por exemplo, a administração oral de antígeno ou o direcionamento de ligantes peptídicos para DCs *in vivo*. Células T Foxp3<sup>+</sup> também podem ser geradas na presença de TGF-β. A população de células dendríticas (DCs) CD103<sup>+</sup> encontradas nos linfonodos mesentéricos podem converter as células T *naive* em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de maneira dependente de TGF-β e ácido retinóico (RA). Foi demonstrado que essa população de DCs tem a capacidade de secretar a citocina TGF-β e expressa a enzima aldeído-dehidrogenase (AldH) capaz de converter a vitamina A oriunda dos nutrientes em ácido retinoico (COOMBES et al, 2007; MUCIDA et al, 2007).

A geração de células T reguladoras na mucosa intestinal é responsável pela indução de um fenômeno fisiológico fundamental para a manutenção da homeostase intestinal conhecido como tolerância oral. Essa tolerância induzida por antígenos da dieta ou da microbiota garante que não ocorram respostas imunes inflamatórias para esses antígenos (FARIA and WEINER, 2005; WEINER et al, 2011). As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induzidas no intestino, assim como as células T CD4<sup>+</sup> expressando TGF-β na superfície na sua forma de precursor (associado ao *latent associated peptide* ou LAP) têm sido demonstradas como populações de células reguladoras fundamentais para a tolerância oral (DE LAFAILLE et al, 2008; REZENDE et al, 2013). Essa tolerância induzida pela alimentação e por antígenos inócuos provavelmente envolve mecanismos de supressão adicionais e um tônus de regulação negativa semelhante ao que o sistema imune normalmente utiliza para a microbiota residente (ARTIS, 2008; BRANDTZAEG and HELGELAND, 2000). A tolerância oral explica o fato de que a hipersensibilidade persistente aos alimentos seja relativamente rara, apesar desse distúrbio inflamatório estar em ascensão nas sociedades orientais industrializadas (SICHERER, 2009).

Além das células T reguladoras, outros elementos da mucosa intestinal são importantes na manutenção da homeostase intestinal. Um desses elementos é a produção de IgA secretória. A IgA secretória é a imunoglobulina mais abundante na mucosa do trato gastrointestinal. Ela é produzida fisiologicamente em resposta às bactérias comensais e proteínas da dieta que penetram no enterócito ou através das células M presentes em aglomerados linfóides do intestino delgado chamados placas de Peyer. Essas placas constituem áreas macroscópicas de agregação linfóide localizadas na submucosa ao longo do intestino delgado. As placas de Peyer contêm

numerosos folículos compostos por células B expressando IgM, que são precursoras de plasmócitos secretores de IgA (MABBOTT et al, 2013). Após a entrada do antígeno através das células M que recobrem a cúpulas das placas, estes são captados pelas DCs aí presentes. A apresentação desses antígenos a linfócitos T foliculares (TfH) nesse local leva a diferenciação dessas células em produtoras de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-5, necessárias para a estimulação da troca de isotipos para IgA. A ativação dos linfócitos B e o processo de troca de isotipos que torna essas células capazes de produzir IgA ocorre nos centros germinativos desses folículos. Os linfonodos mesentéricos drenam o intestino delgado e, devido às suas características anatômicas específicas, provavelmente são o cruzamento entre as vias de recirculação periférica e da mucosa (CORNER, 1965; MASAHATA et al, 2014). Nesses linfonodos, os linfoblastos B IgA<sup>+</sup> expressando o receptor de migração para as mucosas  $\alpha 4\beta 7$  se expandem e são conduzidos, via circulação linfática e depois circulação venosa, até outros sítios como a lâmina própria do próprio intestino (MORA et al, 2008). Contudo, vale lembrar que nem toda a IgA secretória (sIgA) presente no muco intestinal é produzida pelos linfócitos B2 das placas de Peyer. Pelo menos 50% da produção dessas imunoglobulinas ocorre por linfócitos B1b presentes na lâmina própria que se tornam IgA<sup>+</sup> em um processo independente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (SUTHERLAND and FAGARASAN, 2012).

As sIgA produzidas pelos plasmócitos na *lamina propria* contribuem para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que estas reduzem a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal, um fenômeno conhecido como exclusão imune. A IgA pode ser considerada, então, uma imunoglobulina anti-inflamatória (BRANDTZAEG et al, 2009).

Além da IgA secretória, a mucosa intestinal conta também com uma camada de muco que exerce um papel protetor importante para o epitélio subjacente. O muco intestinal é um gel hidratado formado por mucinas. Essas mucinas são secretadas por células epiteliais especializadas, como as células caliciformes do intestino. É criado, então, um obstáculo que previne o contato direto de grandes partículas, principalmente bactérias, com a camada de células epiteliais (JOHANSSON et al, 2008). A frequência de células caliciformes produtoras de muco aumenta progressivamente ao longo do trato gastrointestinal à medida que se aproxima do reto. Essas células compreendem pelo menos 25% das células do cólon distal enquanto

correspondem a 10% ou menos no alto do intestino delgado. Consequentemente, a camada de muco que cobre a mucosa, conhecida como glicocálix, é mais densa no cólon, sendo composta por duas camadas: uma camada interna e densa que está unida à superfície epitelial, e uma camada externa, solta, que é semelhante à encontrada no intestino delgado. No cólon, as bactérias podem ser encontradas na camada externa do muco, mas normalmente não penetram na camada interna (JOHANSSON et al, 2008; HANSSON, 2012). A produção de muco é controlada por mediadores imunes que incluem leucotrienos, IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13 (BANCOFT et al, 1998; STEENWINCKEL et al, 2009; KLOSE et al, 2013). O muco apresenta papéis antimicrobianos, formando um gel denso que age como barreira física, bem como é composto de glicoproteínas (mucinas) que são diretamente tóxicas para muitas bactérias. No intestino delgado, a camada mais fina de muco permite maior aderência a anticorpos e peptídeos antimicrobianos, formando uma proteção à permeabilidade intestinal. Defeitos na produção do muco aumentam a entrada de bactérias comensais ao epitélio intestinal e então a susceptibilidade à ocorrência de DII e câncer de cólon (JOHANSSON et al, 2008, VELCICH et al, 2002, VAN DER SLUIS et al, 2006).

O equilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e reguladoras pode falhar se houver secreção exagerada das citocinas pró-inflamatórias, o que pode ser decorrente de uma mutação genética, produção insuficiente de IL-10 (FISHER et al, 2008) ou tolerância inadequada a antígenos da dieta ou a produtos microbianos (SARTOR, 2008). Com isso, a ativação descontrolada de células imunes da mucosa com a liberação contínua e aumentada de citocinas como TNF-alfa e IL-13 pode levar a uma perda da barreira intestinal permitindo a entrada de material do lúmen e mantendo o ciclo pró-inflamatório. Esse modelo demonstra os papéis da susceptibilidade do hospedeiro e dos defeitos na função da camada epitelial na patogênese das doenças inflamatórias intestinais e explica o papel crucial da barreira epitelial e das respostas imunes na mucosa (TURNER, 2009).

A mucosa intestinal abriga uma variedade de células imunes inflamatórias e anti-inflamatórias em um equilíbrio dinâmico de modo a assegurar respostas imunes protetoras contra patógenos e, ao mesmo tempo, inibir respostas inflamatórias contra antígenos inócuos como as proteínas da dieta e componentes da microbiota. Assim, encontramos nos vários compartimentos dessa mucosa células da imunidade inata (mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, células NK, várias populações de macrófagos e



de células dendríticas), assim como linfócitos B e linfócitos T CD8 e CD4. Os linfócitos T CD4, em geral, povoam as placas de Peyer e a *lamina propria* onde se diferenciam em células com padrões de produção de citocinas muito diferentes. Células T *helper* 1 (Th1) produtoras de IFN $\gamma$ ; células T *helper* 2 (Th2) produzindo IL-4, IL-5 e IL-13; células T *helper* 17 (Th17), produtoras de IL-17A/IL-17F; células T *helper* 22 (Th22) produzindo IL-22 ou ainda células T reguladoras induzidas (iTreg) produzindo IL-10, estão todas espalhadas pela *lamina propria* do intestino delgado e grosso em frequências diferentes (FARIA, REIS and MUCIDA, 2017). Esses subconjuntos de tipos celulares não são caracterizados apenas pelas citocinas de assinatura que produzem, cada subconjunto é regulado também pela indução de um fator de transcrição distinto de "linhagem específica". O fator de transcrição T-bet é necessário para o desenvolvimento de células Th1, o fator de transcrição Gata-3 é requerido para as Th2, o fator de transcrição ROR $\gamma$ t é o responsável pelo desenvolvimento de Th17 e finalmente, o fator de transcrição FoxP3 é expresso em células iTreg. Antes da indução do fator de transcrição específico de cada linhagem, os membros da família de proteínas STAT transmitem sinais mediados por citocinas e iniciam a diferenciação. Dos sete STATs identificados no camundongo, STAT1/STAT4, STAT6, STAT3 e STAT5a/b executam funções não redundantes na diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e iTreg, respectivamente. Uma vez que cada linhagem é primada e se compromete com um fenótipo, elas expandem-se clonalmente (BETTELLI, KORN and KUCHROO, 2007; MUCIDA et al, 2007).

A diferenciação das células T CD4 na mucosa intestinal é um processo complexo envolvendo a sinalização pela ligação de vários fatores. O ácido retinóico (RA), um metabólito da vitamina A produzido por APCs intestinais, é o co-fator principal que promove o desenvolvimento de iTreg e inibe o desenvolvimento de células Th17 (COOMBES et al, 2007, MUCIDA et al, 2007). Mesmo na presença de IL-6 e TGF $\beta$ , o RA contraria fortemente o programa para diferenciação em células Th17, favorecendo reciprocamente o desenvolvimento do iTreg (LAURENCE et al, 2007; MUCIDA et al, 2007; BASU et al, 2015). Entretanto, apesar da produção robusta de ácido retinóico pelas APCs intestinais, um número exacerbado de células Th17 se desenvolve no intestino em condições inflamatórias (MANGAN et al, 2006). Curiosamente, uma porcentagem substancial de células Th17 na lâmina própria



intestinal expressa FoxP3 em algum momento durante seu desenvolvimento, indicando uma relação dinâmica entre as iTreg e as Th17 (ZHOU et al, 2008).

A identificação da família de células efectoras Th17 foi um grande avanço no entendimento das respostas celulares e para o esclarecimento do desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias. A família de citocinas IL-17 inclui IL-17A, B, C, D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (KOLLS and LINDÉN, 2004). Entretanto, deve-se ressaltar que, além das células T, outras células como NK e neutrófilos podem ser importantes fontes de IL-17. A IL-17A, é a mais importante citocina produzida pelas células Th17, mas essas células também produzem IL-17F, IL-21 e IL-22 (KORN et al, 2007; LIANG et al, 2006; NURIEVA et al, 2007). O receptor A de IL-17 (IL-17RA) é expresso em uma variedade de tipos celulares e é essencialmente envolvido na sinalização de IL-17A e IL-17F (KORN et al, 2007). A IL-17A estimula várias células estromais a expressar mediadores inflamatórios (FOSSIEZ et al, 1996), como quimiocinas tipo CX e CC, como por exemplo, a MCP-1 (TAKAYA et al, 2002; VAN KOOTEN et al, 1998), e citocinas hematopoiéticas, como as GM-CSF (FOSSIEZ et al, 1996). A IL-17A também aumenta a indução de MCP-1 mediada por TNF- $\alpha$  em miofibroblastos intestinais (HATA et al, 2002). Importante lembrar [ainda](#) que várias citocinas pró-inflamatórias são induzidas por IL-17A. Tem sido demonstrado que a IL-17A cumpre papéis cruciais em vários processos inflamatórios, que incluem infiltração das vias aéreas, asma brônquica, artrite reumatoide, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase e gastrite associada à *Helicobacter pylori* (KORN et al, 2007).

Atualmente, sabe-se que as células Th17 desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra certos patógenos, mas que, por outro lado, uma resposta Th17 exagerada pode levar a doenças inflamatórias graves e doenças autoimunes. A resposta Th17 exacerbada, que ultrapassa a função dessas células em manter a integridade da mucosa intestinal pode estar relacionada com o contexto de citocinas do micro-ambiente e a citonina IL-23 parece estar relacionada com a patogenicidade das células Th17 envolvidas em doenças como as Doenças inflamatórias intestinais (DIIs), atrite reumatóide e esclerose múltipla (COOPER, 2007; KOLLS and LINDÉN, 2004).

Nas DIIs (na Doença de Crohn e na Colite Ulcerativa), a expressão de IL-17 encontra-se aumentada (FUJINO et al, 2003). Entretanto, ainda continua controverso

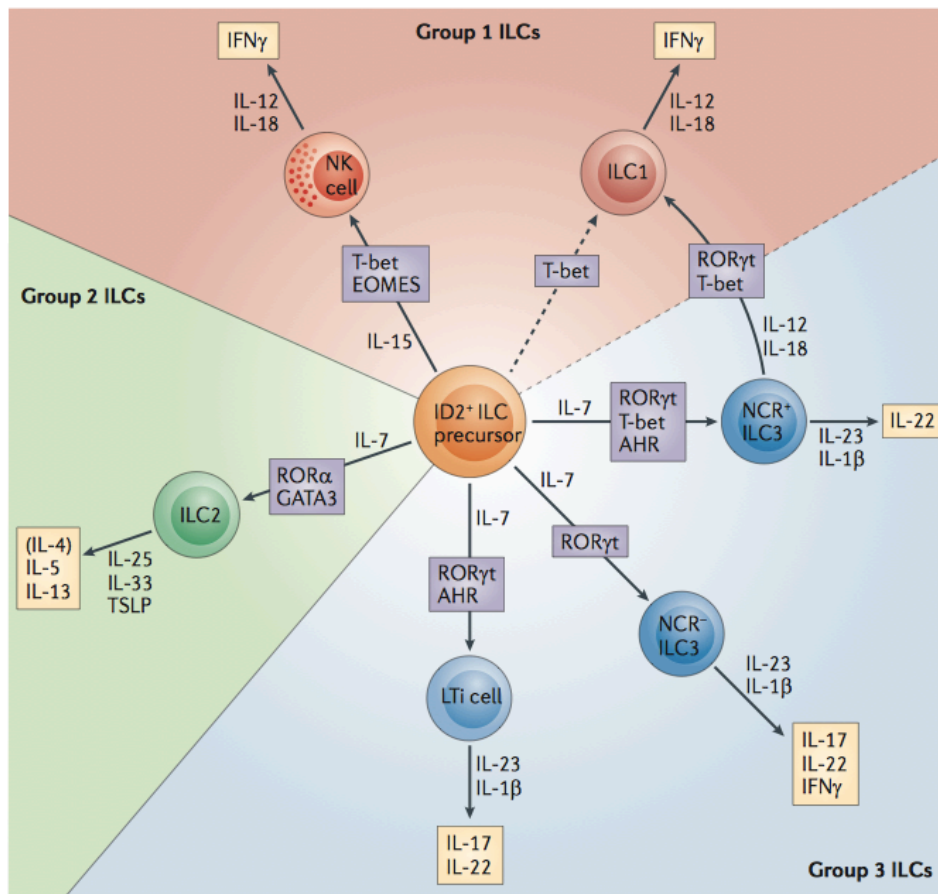
o papel da IL-17 nas DIIs. Enquanto alguns estudos mostram um aumento dessa citocina nos quadros inflamatórios (FUJINO et al, 2003; NIELSEN et al, 2003; ZHANG et al, 2006), em outros, a IL-17 parece proteger da doença inflamatória (KIM et al, 2011; OGAWA et al, 2004), como no caso de colite espontânea em camundongos deficientes em IL-10 (GOMES- SANTOS et al, 2012).

As células linfoides inatas (ILCs), um grupo de células recém caracterizadas que apresenta uma população muito importante no intestino, tanto relacionadas à homeostase intestinal quanto ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, têm estado em foco nos trabalhos mais recentes são as. Essas células fazem parte de uma família de células efectoras hematopoiéticas, que apresentam papéis importantes nas respostas da imunidade inata às infecções, na formação do tecido linfóide, no remodelamento tissular após dano ou injúria, e na homeostase das células do estroma. Curiosamente, as ILCs parecem representar a versão inata das células Th1, Th2 e Th17 (SPITS and DI SANTO, 2011). Essas células são definidas por três principais características: a ausência de RAG (*Recombination Activating Gene*), que é essencial para o rearranjo de receptores de antígenos; falta de marcadores fenotípicos de células mielóides e dendríticas; e sua morfologia linfóide (SPITS and CUPEDO, 2012). Todas as ILCs requerem IL-2R $\gamma$  (*common cytokine receptor  $\gamma$ -chain*) e o Id2 (*transcriptional repressor inhibitor of DNA binding 2*) para o seu desenvolvimento (YOKOTA et al, 1999).

Assim, apesar de cada subtipo de ILC ter características que as distinguem, as três compartilham um progenitor linfóide comum, que foi identificado como Lin<sup>-</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>Kit<sup>+/low</sup>Sca-1<sup>+/low</sup>, além de compartilharem também vias de desenvolvimento comuns (SPITS and DI SANTO, 2011; WONG et al, 2012; ZHOU, 2012). Todas as ILCs requerem sinalização via IL-7 e Id2, um repressor transcricional que regula a sinalização de Notch, para que ocorra o desenvolvimento adequado (SATOHTAKAYAMA et al, 2010; CHERRIER, SAWA and EBERL, 2012; POSSOT, 2011; HUGHES et al, 2014). Entretanto, diversos estudos têm sugerido vias adicionais e que pode existir certa plasticidade no estabelecimento das linhagens de ILCs (HUGHES et al, 2014).

A nomenclatura das ILCs causou algumas discordâncias no meio científico, mas a mais utilizada até o momento é a que classifica as populações considerando as características fenotípicas e funcionais, como proposto por Spits (SPITS et al., 2013)

(Figura 2), a qual utiliza a nomenclatura das células Th como base o que nos leva a 3 subgrupos de ILCs: ILC1, ILC2 e ILC3.



**Figura 2:** As ILCs são classificadas em três grupos de acordo com suas características funcionais. As ILC1 são definidas pela sua capacidade em produzir IFN- $\gamma$ . As ILC2 produzem as citocinas relacionadas com perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). As ILC3 produzem citocinas associadas ao perfil Th17 (IL-17 e IL-22). Acredita-se que todas as ILCs se desenvolvem a partir de um progenitor comum (id2). Adaptação de (SPITS et al, 2013).

O protótipo da ILC1 é a célula NK, que produz IFN- $\gamma$  e expressa T-bet (T-box transcription factor) (STROWIG, BRILOT and MUNZ, 2008; VIVIER et al, 2011). As ILCs2 (anteriormente chamadas de *natural helper* ou nuócito) foram identificadas mais recentemente e produzem IL-5, IL-9 e IL-13, de forma similar à produção de citocinas das células Th2, além de necessitarem do fator de transcrição GATA3. Entre as ILC3, há pelo menos 3 subtipos diferentes: a) *lymphoid tissue inducer* (LTi), que produzem IL-17 e IL-22 (SONNENBERG et al, 2011); b) células produtoras de IL-17, que estão ativas no intestino de pacientes com colite (COCCIA et al, 2012) e

nos tipos de asma relacionados com obesidade (KIM et al, 2014); c) células produtoras de IL-22, presentes na pele (VILLANOVA et al, 2014; TEUNISSEN et al, 2014) e no intestino (TUMANOV et al, 2011).

Sendo células efectoras não-T e não-B, as ILCs não possuem receptores antígeno-específicos, mas elas reagem rapidamente a uma gama de sinais inatos, produzindo uma ampla variedade de citocinas. Há também diversos estudos mostrando o envolvimento de subtipos das ILCs em doenças inflamatórias. Por exemplo, as ILCs produtoras de IL-17 e de IFN- $\gamma$  já foram associadas com desenvolvimento de colite experimental em camundongo (BUONOCORE et al, 2010), enquanto ILCs produtoras de citocinas típicas de Th2 estão envolvidas em inflamação no pulmão em modelos de asma alérgica (CHANG et al, 2011; MORO et al, 2010).

A mucosa intestinal conta, assim, com uma coleção de células imunes muito abundante que compõem o chamado GALT (*gut associated lymphoid tissue*). Como esse tecido está em contato direto com a microbiota intestinal e com os componentes da dieta, as células aí presentes estão, na sua maioria, fisiologicamente ativadas. Nas últimas décadas, as interações da microbiota e dos componentes da dieta com as células imunes da mucosa intestinal têm captado a atenção dos imunologistas e vários estudos existem mostrando que essas interações interferem na atividade imunológica local e sistêmica, assim como no curso de várias doenças inflamatórias. Isto é verdade para os macronutrientes como as proteínas (MENEZES et al, 2003; SOUZA et al, 2017) ou os lipídeos (NAVARINI et al, 2017), mas também para os micronutrientes, como as vitaminas (MUCIDA et al, 2007; COOMBES et al, 2007; MUDAMBI and BASS, 2018), e sais minerais, como o NaCl.

## **O sal e o sistema imune**

Além das funções do sódio relacionadas ao balanço hidroeletrólítico, impulso nervoso e contração muscular, mais recentemente vêm sendo demonstradas atividades do íon associadas ao sistema imune. Em 2009, Macknik e colaboradores mostraram que uma dieta rica em sal levou à elevação de sódio no compartimento intersticial e, por conseguinte, a uma cascata tissular regulatória, dependente de VEGF-C (Vascular endothelial growth factor-C), uma proteína osmosensível que atua diretamente a ação

de macrófagos na manutenção do volume intersticial constante. Macrófagos residentes no interstício da pele modulam, assim, a composição eletrolítica local em resposta à hipertonicidade extracelular mediada por NaCl e sua atividade promove um mecanismo de tamponamento da pressão osmolar sensível ao eletrólito (MACHNIK et al, 2009). Além disso, o bloqueio do sistema renina-angiotensina pode modular a resposta imune e afetar a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (PLATTEN et al, 2009; STEGBAUER et al, 2009).

O estudo do papel do sal nas respostas imunes teve início com os trabalhos mostrando seu papel no desenvolvimento de respostas inflamatórias do tipo Th17 que acompanham algumas doenças autoimunes, como a EAE. Em 2010, foi demonstrado que a citocina IL-23 teria um papel importante na geração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th17 patogênicos na ausência de TGF- $\beta$  (GHORESCHI et al, 2010). Em 2013, dois estudos apontaram uma associação inédita entre o aumento de concentração de sódio e desenvolvimento de células Th17. Kleinewietfeld e colaboradores, mostraram um aumento na produção de IL-17A em culturas de células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs) pela adição de 40mM de NaCl (concentração encontrada no interstício de animais alimentados com dieta rica sal) na presença de citocinas indutoras de Th17 (TGF- $\beta$ 1, IL-1b, IL-6, IL-21, IL-23). Esses autores também mostraram a indução de TNF- $\alpha$  na mesma cultura de células e o aumento da concentração de NaCl ainda levou à morte celular. Nesse mesmo trabalho, os autores mostraram que 40mM de gluconato de sódio também levou à indução de resposta Th17, enquanto que o MgCl<sub>2</sub> teve apenas um ligeiro efeito. A adição de 80mM de ureia, um osmólito capaz de atravessar as membranas celulares, não teve nenhum efeito. Assim, o cátion Na<sup>+2</sup> apareceu como crítico para a indução de IL-17A. Nesse estudo, além da indução de IL-17A, altas concentrações de NaCl também regularam positivamente a expressão de CCL20, IL-17F, RORC, IL23R, CSF2 e CCR6, além da indução de IL-2, IL-9 e TNF- $\alpha$ . Todos esses fatores indicam o papel do aumento das concentrações de NaCl como potente indutor de respostas Th17 altamente patogênicas (KLEINewIETFELD et al, 2013).

Em seguida, os pesquisadores testaram os efeitos do consumo de uma dieta rica em sal na EAE murina e observaram que a dieta foi capaz de agravar a doença nos camundongos. Os animais alimentados com uma dieta rica em sal (NaCl 4%), ou HSD, rapidamente desenvolveram uma forma mais severa de EAE que aqueles que se

alimentaram da dieta normal. Os animais que consumiram HSD apresentaram também frequências mais altas de células Th17 no sistema nervoso central, assim como nos órgãos linfóides (KLEINewIETFELD et al, 2013; WU et al, 2013).

Já havia sido demonstrado que o aumento das concentrações de NaCl associado à hipertonidade pode induzir a ativação do sistema imune (JUNGER et al, 1994; SHAPIRO and DINARELLO, 1995). Da mesma maneira, o estresse hipertônico em mamíferos é sentido por meio da via p38/MAPK (SHAPIRO and DINARELLO, 1995). Corroborando esses achados, os estudos conduzidos por Kleinewietfeld e colaboradores indicaram que altas concentrações de NaCl induzem a expressão de NFAT5 (Nuclear factor of activated T-cells 5) e seu alvo SGK1 (*serum glucocorticoid regulated kinase 1*) ativando a produção de IL-17A de maneira dependente da via p38/MAPK (KLEINewIETFELD et al, 2013). O NFAT5 é um fator de transcrição osmossensível que possui, como alvos, genes que codificam proteínas que atuam aumentando a concentração intracelular de osmólitos compatíveis e, assim, compensando a tonicidade extracelular (KO et al, 1997). A SGK1, por sua vez, desempenha um papel importante nas vias de ativação dos canais de potássio, sódio e cloreto na resposta celular ao estresse (BINGER et al, 2015).

A capacidade evolutivamente conservada de um organismo de se adaptar a mudanças extremas nos níveis de nutrientes, temperatura ou restrição é crucial para a sobrevivência de procariontes unicelulares, bem como para as células eucarióticas que constituem os tecidos dos mamíferos. Várias cascatas de sinalização mostraram desempenhar um papel necessário na detecção e resposta ao estresse ambiental. Uma dessas vias evolutivamente conservadas emprega a ativação da família de proteínas quinases p38 MAPK/HOG1 (WIDMANN et al, 1999), que pode ser desencadeada por desequilíbrios osmóticos, radiação de luz UV, choque térmico, agentes danificadores de DNA, morte celular e exposição ao inibidor da síntese proteica anisomicina (ZANKE et al, 1996; COHEN, 1997). Vários fatores de transcrição e proteínas quinases foram identificados como alvos celulares da p38 MAPK em células de mamíferos. Várias evidências demonstraram um papel para a p38 MAPK na estimulação da transcrição de *sgk*. A estimulação robusta da transcrição do gene *sgk* e da produção da proteína pode ser interrompida pelo tratamento com inibidores farmacológicos específicos da p38 MAPK (BELL et al, 2000).

Já foram descritas várias funções da SGK1 como controladora transcricional em situações agudas de estresse tanto em roedores quanto em humanos (WEBSTER et al, 1993; DELMOLINO and CASTELLOT, 1997; MAIYAR et al, 1996). O grupo de Firestone, em 2000, mostrou pela primeira vez que a SGK1 pode regular diretamente a transcrição de uma via de sinalização de estresse específica envolvendo p38 MAPK em células de mamíferos. Os autores propuseram que a exposição de células epiteliais mamárias NMuMg de camundongo ao meio hiperosmótico ativaria a cascata p38 MAPK que, por sua vez, estimularia a transcrição de *sgk* direcionando um elemento regulado por estresse hiperosmótico no promotor da *sgk*, que é reconhecido pelo fator de transcrição Sp1. A ativação dessa via induz um aumento na produção da proteína quinase SGK ativa que é dependente da via da PI 3-quinase para sua fosforilação e atividade.

Por meio de análise de genes diferencialmente expressos, foi identificado que a SGK1 é uma via crucial para a indução das células Th17 nos experimentos com camundongos alimentados com dieta rica em sal (WU et al, 2013). A indução de células Th17 pró-inflamatórias pela SGK1 se deu por meio da ativação das vias de p38/MAPK e NFAT5 que regularam positivamente a expressão do receptor de IL-23 de maneira dependente de FOXO1, além de reforçarem a cascata inflamatória de IL-17 (WU et al, 2013). A atividade da SGK1 frente à exposição ao NaCl resultou em fenótipo marcado pela supressão da atividade da FOXO1 (após sua fosforilação) que perde sua função de inibir a transcrição de IL-23R mediado pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ t, enquanto que aumenta a proliferação celular e a secreção de citocinas, levando ao aumento da expressão de IL23R mediado por ROR $\gamma$ t. Assim, o excesso de NaCl pode afetar o sistema imune adaptativo, especialmente causando desregulação do balanço entre linfócitos Th17 e Treg, via sinalização de SGK1 (HERNANDEZ et al, 2015). A citocina IL-23, produzida por macrófagos e células dendríticas, é responsável pela expansão e manutenção do fenótipo de respostas Th17 com produção de IL-17 que é a citocina característica desse tipo de resposta. IL-23 já foi associada também com a patogenicidade das células Th17 e com seu envolvimento em doenças autoimunes e inflamatórias como esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide (LANGRISH et al, 2004).



## Dieta rica em sal e doenças inflamatórias intestinais

No atual cenário de modificações de hábitos alimentares tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e com o advento da dieta ocidental, rica em gordura saturada, açúcares simples e sódio, a composição da dieta vem sendo há algum tempo vista como fator de risco para doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais. Certamente um dos componentes da dieta ocidental que pode ser considerado importante nesse cenário é o aumento do consumo de cloreto de sódio além dos valores recomendados. Como descrevemos anteriormente, a ingestão média de sódio atualmente (cerca de 5 gramas/dia) no Brasil e em muitos países do mundo é mais de duas vezes a recomendação da OMS (menos de 2 gramas/dia) e muito acima da Ingestão Adequada (AI) que seria 1,5 gramas/dia e também acima do valor máximo tolerável (UL) de 3,6 gramas/dia, segundo a *Dietary Reference Intake*. Apesar do sódio ser um nutriente essencial para o organismo, um pequeno aumento da sua concentração foi identificado como deletério para a saúde vascular, causando hipertensão [arterial](#) e deficiência nas funções do coração e do rim (FARQUHAR et al, 2014) e para a manutenção da homeostase da mucosa intestinal (TUBBS et al, 2017).

As doenças inflamatórias intestinais, que são um conjunto de doenças que incluem principalmente a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU), já se tornaram problema de saúde pública para muitos países (principalmente os desenvolvidos) e a incidência e prevalência estão aumentando progressivamente, inclusive nos países em desenvolvimento (MOLODECKY et al, 2012). Apesar de não possuírem etiologia totalmente esclarecida, é sabido que o desenvolvimento dessas doenças se associa a fatores genéticos (CONNELLY et al, 2015), fatores ambientais (O'TOOLE and KORZENIK, 2014), alterações das respostas imunes na mucosa, desbalanço da microbiota intestinal, e fatores dietéticos (HALMOS and GIBSON, 2015; ROGGENBUCK et al, 2016; BAUMGART and CARDING, 2007; GEREMIA et al, 2013).

Essas doenças geram condições físicas debilitantes para o paciente, que sofre de dor abdominal e inflamação crônica na mucosa do trato gastrointestinal (KRAFT and KIRSNER, 1971). Elas não afetam diretamente a expectativa de vida da pessoa, apesar do aspecto crônico e dos sintomas reduzirem [sua](#) qualidade de vida. As duas



formas de doenças inflamatórias intestinais compartilham a sintomatologia que inclui náuseas, vômito e diarreia, principalmente após o consumo de alimentos específicos, que varia de indivíduo para indivíduo (DURICOVA et al, 2010). O acometimento anatômico do trato gastrointestinal (TGI) é o que diferencia as doenças. A DC apresenta uma inflamação descontínua que pode aparecer ao longo do TGI, apesar de ser mais frequente no íleo terminal, e atinge as camadas mais profundas da mucosa. Em contrapartida, a CU fica restrita ao cólon e apresenta uma inflamação ascendente contínua que inicia no reto, afetando apenas as camadas superficiais da mucosa (BAUMGART and SANDBORN, 2007).

As doenças inflamatórias intestinais apresentam patogênese complexa, contudo já é muito bem estabelecido que há um desbalanço entre linfócitos T reguladores (Treg) e linfócitos T efetores (Th). Já foi demonstrado que essas doenças se desenvolvem após quebra da homeostase intestinal garantida não somente pelas células T reguladoras, mas por vários mecanismos de proteção da mucosa intestinal tais como a produção de muco, de SIgA e de células anti-inflamatórias tais como macrófagos residentes produtores de IL-10 (LIU et al, 2018). Na presença de bactérias e vírus patogênicos (disbiose), lesão ou xenobióticos, os PAMPs estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e IL-18 (a partir de células epiteliais) e IL-6, IL-12 e IL-23 (de DCs e macrófagos) que induzem o desenvolvimento das células T CD4<sup>+</sup> efectoras Th1 e Th17. Dependendo do *milieu* de citocinas, são geradas células Th2 ou Th9 que medeiam as respostas do tipo Th2 ou comprometem a função de barreira epitelial, respectivamente. Células linfóides inatas intestinais, incluindo células semelhantes a NK, LTI e  $\gamma\delta$ , respondem a citocinas pró-inflamatórias que regulam a IL-22 (que protege a barreira epitelial) e IL-17A e IL-17F (que recrutam neutrófilos para promover inflamação e proliferação epitelial mediada por IL-22) (DE SOUZA and FIOCCHI, 2016).

Muitos estudos têm mostrado que a produção excessiva de IL-17 está envolvida no aparecimento de DII (LEPPKES et al, 2009). As pesquisas que investigam a patogênese de DII têm focado nas células Th17, além de já ter sido documentado que a inibição das células Th17 leva à redução da inflamação e do surgimento de colite aguda. Em pacientes com DII, lesões no cólon mostram excessivo infiltrado celular e dano tecidual causado pelo processo inflamatório, sendo que essa inflamação decorre possivelmente da expressão de STAT3, com consequente

secreção de IL-17. Além disso, outras citocinas também estão aumentadas no cólon de pacientes com DII. Dentre as citocinas pró-inflamatórias envolvidas, podemos citar a família da IL-1 (IL-1 $\beta$  e IL-18 por exemplo), a IL-6 e a TNF- $\alpha$  que aumentam durante o progresso da doença. As citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  muitas vezes se apresentam reduzidas durante as inflamações intestinais. Dada a essa condição, as células Th17 então tornaram-se alvo nas terapias de doenças inflamatórias intestinais (LEE et al, 2018). Contudo, o bloqueio de IL-17 no tratamento de colite experimental teve resultados controversos. Enquanto a deleção do receptor de IL-17 melhorou a colite induzida por TNBS em modelo experimental, em um outro estudo conduzido por Zhang (ZHANG et al, 2006), a inibição de IL-17A na colite experimental induzida por DSS foi capaz de piorar a inflamação (YANG et al, 2008).

Ademais, as células linfoides inatas (ILCs) foram identificadas como importantes mediadoras na fisiopatologia do desenvolvimento das DII (LEE et al, 2015). Powrie e colaboradores foram o primeiro grupo a identificar as ILCs como mediadores de doença inflamatória intestinal. Em seu trabalho de 2010, os autores mostraram que em um modelo de colite inata causada por bactérias, a inflamação foi associada ao aumento da produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  no cólon. A estimulação de leucócitos do cólon com IL-23 induziu a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  exclusivamente por células linfoides inatas expressando Thy1, SCA-1, ROR $\gamma$ t e IL-23R e essas células se acumularam no cólon inflamado. Por fim, a depleção de células linfoides inatas anulou completamente a colite inata aguda e crônica. Esses resultados identificaram uma nova população linfóide inata responsiva à IL-23 que medeia a patologia imune intestinal (BUONOCORE et al, 2010).

O reconhecimento das principais vias ativadoras das ILCs oferece o potencial para identificar possíveis alvos moleculares terapêuticos para as DII. Essas células respondem rapidamente a estímulos ambientais, incluindo mudanças na dieta e exposição a patógenos (GOLDBERG et al, 2015).

Os reguladores mais conhecidos do comportamento das ILCs são as citocinas. No intestino, a IL-23 é a citocina canônica responsável por desencadear a secreção de IL-17 e / ou IL-22 por ILC3. Além disso, a produção de citocinas induzida pela IL-23 é sinergicamente aumentada por outras citocinas, incluindo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-15 e TL1A. A TNF, uma citocina chave implicada na patogênese da DII, também aumenta a produção de IL-17 induzida pela IL-23 na ILC3 de camundongos

com colite (POWELL et al, 2012; ERMANN et al, 2014). A produção de citocinas por ILC1 é estimulada por IL-12 em sinergia com IL-15 e IL-18 (BERNINK et al, 2013; FUCHS et al, 2013). TL1A também potencializa a produção de IL-22 induzida por IL-1 e IL-23 (LONGMAN et al, 2014), atuando de forma homóloga às células Th17 (KAMADA et al, 2010).

As ILCs apresentam uma característica muito importante para o desenvolvimento das DIIs: a plasticidade, que é orquestrada principalmente pelas citocinas do meio. A conversão de um subconjunto de ILC em outro é um conceito emergente na biologia de ILC com implicações prováveis de serem relevantes em estados inflamatórios crônicos. Sob condições de homeostase, a opção mais eficaz de conservação de recursos seria favorecer o acúmulo de ILCs responsáveis por supervisionar a manutenção epitelial basal e limitar a expansão de subconjuntos inflamatórios na ausência de uma ameaça de patógenos. Uma vez exposta a um patógeno, a promoção rápida da diferenciação de ILCs homeostáticas residentes em direção a subgrupos mais inflamatórios prontos para o combate pode oferecer algumas vantagens de sobrevivência. Na doença de Crohn, o equilíbrio dinâmico parece perdido com a tendência desequilibrada em direção à NKp44-ILC1 inflamatória, produtora de IFN- $\gamma$ , à custa de NKp44<sup>+</sup> ILC3 produtora de IL-22 (ROVEDATTI et al, 2009; TAKAYAMA et al, 2010; BERNINK et al, 2013). As citocinas IL-12 e A IL-23 provavelmente contribuem para a regulação desse processo. Em cultura de ILC3 humanas estimuladas com IL-12, essas se diferenciam em ILC1. Da mesma forma, parece possível que a ILC1 também possa se diferenciar em ILC3 sob a influência da IL-23, mas os estudos ainda estão muito precoces e não há dados suficientes para essa confirmação, já que os experimentos são limitados por dificuldades na manutenção da ILC1 na ausência de IL-12 (BERNINK et al, 2013). As citocinas desencadeadoras da ativação da ILC2 incluem IL-25, IL-33, TSLP e TL1A. Mas ainda não foi definido um papel claro para a ILC2 ou para as citocinas secretadas por essas células nas DIIs (GOLDBERG et al, 2015).

## **Modelos animais para Doenças Inflamatórias Intestinais**

A semelhança dos mecanismos imunológicos básicos entre os mamíferos e a conservação das principais vias de sinalização intracelular são boas justificativas da escolha de modelos murinos para o estudo de inflamação intestinal. Um bom modelo animal deve permitir uma visão simplificada da complexa patologia da doença em humanos, prover um sistema tratável e reprodutível para identificar as vias inflamatórias. Os modelos murinos têm redesenhado e refinado o entendimento da interação da microbiota no intestino e têm sido usados com sucesso para definir vias imunes que induzem a inflamação intestinal (POWRIE et al, 1994).

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

Diversas modificações genéticas em animais podem levar ao desenvolvimento espontâneo de inflamação intestinal, como nos camundongos deficientes para IL-10, TGF- $\beta$ , IL-2 e TCR- $\alpha$  (STROBER, FUSS and BLUMBERG, 2002). Camundongos deficientes para IL-10 desenvolvem colite espontânea, com resposta Th1 que é inibida pelo tratamento com anti-IL-12. A resposta inicial nos camundongos da linhagem 129Sv/Ev tem um componente misto Th1 e Th17, sendo que a citocina IL-17 prevalece no início da doença. Assim como em outros modelos, o camundongo deficiente para IL-10 não desenvolve colite sob condições *germ-free*, o que demonstra o papel da microbiota na patogênese da doença (DIELEMAN et al, 1994; ELSON et al, 2001; KULLBERG et al, 1998, GOMES-SANTOS et al, 2012).

Na classe de modelos animais de colite induzida por agentes químicos, estão aquelas causadas pela exposição a ácido acético, éster de forbol, carrageina, polímeros de polissacarídeos glicano, sulfato de sódio dextrano (DSS) e ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (STROBER, FUSS and BLUMBERG, 2002). Uma característica comum a esses modelos parece ser a capacidade de romper a barreira de células epiteliais e posteriormente promover o aumento da exposição celular à microbiota, como no caso do modelo de colite induzida por DSS, onde foi mostrada uma alteração na barreira da mucosa antes mesmo do estabelecimento da colite (KITAJIMA, TAKUMA and MORIMOTO, 1999). Outra característica da colite em

modelos induzidos por agentes químicos é o fato da colite, nesses casos, ser relativamente independente de respostas mediadas por linfócitos. Assim, na colite induzida por DSS, na falta de linfócitos B, linfócitos T ou células NK, ainda é possível o desenvolvimento de inflamação. Porém, na presença de um sistema imune intacto, contendo esses elementos celulares, o DSS leva à ativação de linfócitos e à indução de respostas Th1 ou Th2 (AXELSSON et al, 1996). O modelo de colite induzido pelo TNBS foi desenvolvido em 1995 por Neurath e colaboradores, que mostraram que o hapteno administrado de forma intra-retal juntamente com o álcool resultaria em inflamação severa, transmural e granulomatosa no cólon distal. Nesse caso, o modelo foi proposto como apresentando inflamação mediada por resposta Th1 (NEURATH et al, 1995). Contudo, com a posterior identificação das células Th17, ficou bem clara a crucial participação das células Th17 nesse modelo (KARABOGA DEMIRTAS and KARACA, 2017).

Esses modelos têm sido muito úteis no estudo das doenças inflamatórias intestinais e dos fatores que interferem no seu desenvolvimento.

Neste estudo, utilizamos dois modelos de doenças inflamatórias intestinais (induzida por DSS e por TNBS) para estudar os efeitos imunológicos do consumo de uma dieta rica em sal na mucosa intestinal. Nossa hipótese de trabalho é que, por ser importante na diferenciação de células Th17, a presença de altas concentrações de sal no intestino pode induzir a quebra da homeostase imunológica da mucosa intestinal em favor de um padrão inflamatório do tipo Th17 e, assim sendo, piorar o curso de doenças inflamatórias intestinais.

## OBJETIVOS

---

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do consumo de dieta rica em cloreto de sódio (NaCl - sal) na mucosa intestinal de camundongos.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar se o consumo da dieta rica em sal altera os parâmetros cardiovasculares em camundongos C57BL/6: pressão arterial média (PAM), pressão sistólica, pressão diastólica, frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo;
- ✓ Verificar se o consumo da dieta rica em sal modifica os aspectos histológicos do cólon de camundongos C57BL/6;
- ✓ Avaliar se o consumo da dieta rica em sal modifica o balanço da secreção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no cólon de camundongos C57BL/6;
- ✓ Examinar as alterações do perfil de células do sistema imune presente na lâmina própria do cólon de camundongos que receberam a dieta rica em sal;
- ✓ Verificar se existe relação do consumo de sódio com inflamação intestinal dependente de células Th17 e ILCs;
- ✓ Medir se o consumo da dieta rica em sal altera a expressão relativa da quinase SGK1 no cólon;
- ✓ Após o consumo da dieta rica em sódio, pretende-se avaliar se há modificação na patologia da colite experimental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---



## **Materiais e Métodos**

### **Animais experimentais**

Para o desenvolvimento desse projeto, foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com aproximadamente 18 gramas e 6-8 semanas de vida. Para os experimentos de indução de colite por TNBS, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com aproximadamente 18 gramas e 6-8 semanas de vida. Os camundongos C57BL/6 foram utilizados nos experimentos sem indução de colite e em todos os experimentos de colite induzida por DSS. Esses animais foram obtidos no Centro de Bioterismo (CeBio) da Universidade Federal de Minas Gerais. Camundongos C57BL/6 RAG<sup>-/-</sup> e IL-17<sup>-/-</sup> foram gentilmente cedidos pelos Profs. Ricardo Gazzinelli (Depto. Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG) e Prof. João Santana (Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP), respectivamente. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas durante os períodos de experimento no biotério do laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

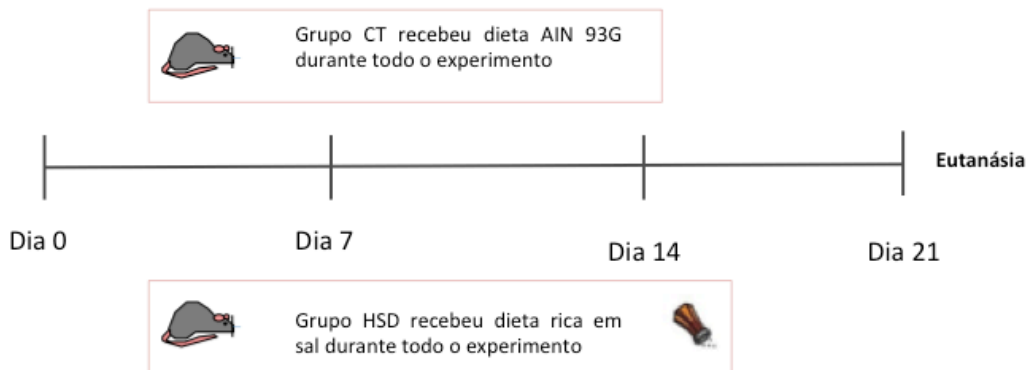
Os procedimentos experimentais utilizados nesse estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFMG (protocolo 50/2014).

### **Desenho Experimental**

Os experimentos foram conduzidos seguindo protocolos diferentes de acordo com a fase do projeto e o interesse investigativo. Na primeira fase do projeto, os animais foram submetidos à dieta rica em sal por três semanas e depois foram eutanasiados para posteriores análises. Em seguida, foi feito um estudo cinético, no qual os animais foram submetidos à mesma dieta rica em sal por 48 (2 dias), 72 (3 dias), 120 (5 dias) e 168 horas (7 dias), além de 2 semanas. Para esses experimentos, os camundongos não foram submetidos à indução de colite.

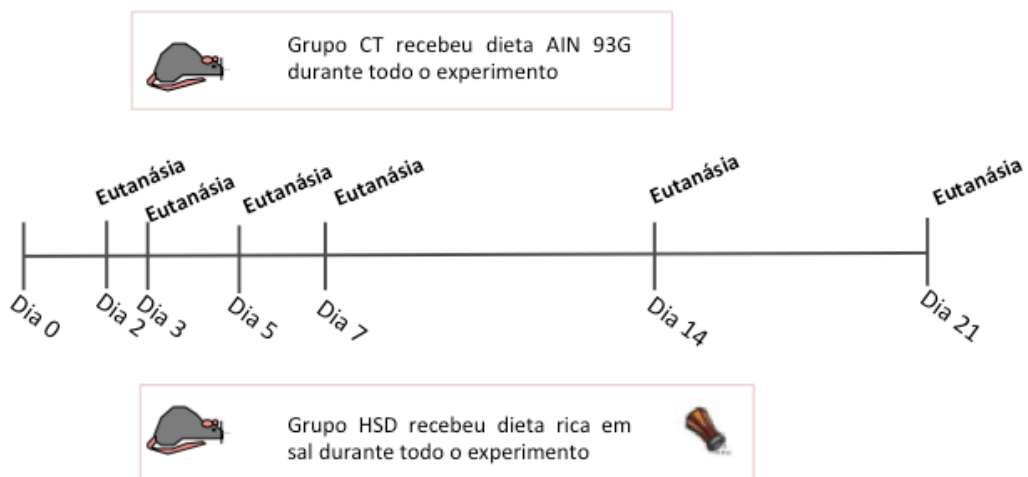
Camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de 6 semanas e peso corpóreo de aproximadamente 18 gramas foram separados de maneira homogênea em dois grupos: grupo controle que recebeu dieta padrão AIN 93G durante todo o experimento e grupo HSD (*High Salt Diet*) que recebeu dieta rica em sal ao longo do experimento.

**Protocolo experimental I**  
**Estudo do efeito da dieta rica em sal na mucosa colônica**



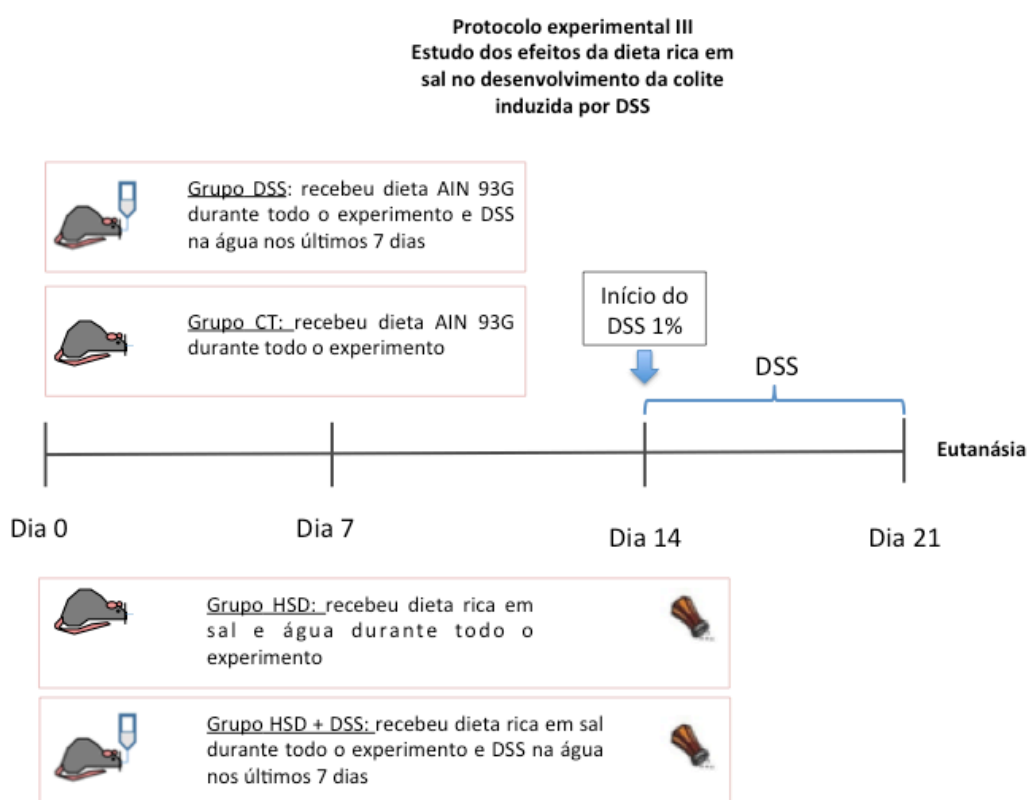
**Figura 3: Protocolo experimental I.** Camundongos C57BL/6 do grupo controle (CT), que receberam dieta AIN93G durante as 3 semanas de experimento, e camundongos C57BL/6 do grupo HSD, que receberam dieta rica em sal (acréscimo de 4% de NaCl) durante as 3 semanas de experimento, foram sacrificados no dia 21 para posteriores análises.

**Protocolo experimental II**  
**Estudo cinético dos efeitos da dieta rica em sal na mucosa colônica**



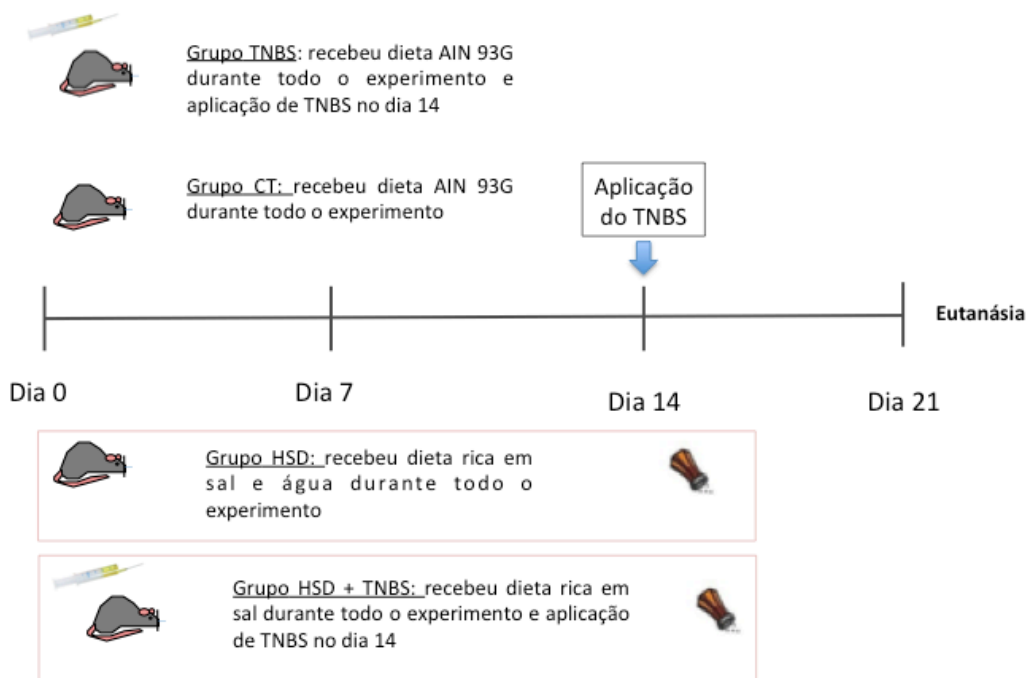
**Figura 4: Protocolo experimental II.** Camundongos C57BL/6 do grupo controle (CT), que receberam dieta AIN93G no período de experimento, e camundongos C57BL/6 do grupo HSD, que receberam dieta rica em sal (acréscimo de 4% de NaCl) no período do experimento, foram sacrificados nos dias 2, 3, 5, 7, 14 ou 21 para posteriores análises de estudo cinético.

Para os experimentos envolvendo a colite, foram utilizados dois modelos: 1) colite induzida por meio da administração de DSS 1% na mamadeira dos animais nos últimos 7 dias de experimento; 2) colite induzida por meio de uma administração intrarretal de TNBS 7 dias antes da eutanásia. Em ambos os protocolos, os experimentos tiveram duração de 3 semanas e os animais foram divididos em 4 grupos: 1) controle 2) HSD 3) DSS ou TNBS 4) HSD + DSS ou TNBS.



**Figura 5: Protocolo experimental III.** Camundongos C57BL/6 do grupo controle (CT) receberam água e dieta AIN93G durante as 3 semanas de experimento; camundongos HSD receberam água e dieta rica em sal (NaCl 4%) durante as 3 semanas de experimento; camundongos do grupo DSS receberam dieta AIN93G durante as 3 semanas de experimento e DSS 1% na água da mamadeira por livre demanda do dia 14 ao dia 21 do experimento; grupo HSD + DSS recebeu dieta rica em sal (acréscimo de NaCl 4%) durante as 3 semanas de experimento e DSS 1% na água da mamadeira por livre demanda durante os últimos 7 dias de experimento.

**Protocolo experimental IV**  
**Estudo dos efeitos da dieta rica em sal no desenvolvimento da colite induzida por TNBS**



**Figura 6: Protocolo experimental IV.** Camundongos BALB/c do grupo controle (CT) receberam dieta AIN93G durante as 3 semanas do experimento e aplicação de 100 $\mu$ L intra-retal de salina no dia 14; camundongos BALB/c do grupo HSD alimentados com dieta rica em sal (NaCl 4%) durante as 3 semanas de experimento e aplicação de 100 $\mu$ L intra-retal de salina no dia 14; camundongos do grupo TNBS receberam dieta AIN93G durante as 3 semanas de experimento e aplicação de 100 $\mu$ L TNBS 2,5% no dia 14; grupo HSD + TNBS recebeu dieta rica em sal (acréscimo de NaCl 4%) durante as 3 semanas de experimento e aplicação de 100 $\mu$ L TNBS 2,5% no dia 14.

### **Indução da colite por DSS**

A indução da colite foi realizada por meio da administração de dextrana sulfato de sódio (DSS) a 1%, ofertado na mamadeira, como única fonte líquida durante sete dias, conforme adaptação do protocolo desenvolvido por Okayasu e colaboradores em 1990. A solução de DSS era renovada e mensurada diariamente durante o período de indução da colite (OKAYASU et al, 1990). O DSS usado para a indução de colite foi da marca MP Biobedicals, lote M5975, com peso molecular de 36 kDa.

## Indução da colite por TNBS

A colite aguda induzida por TNBS nesse trabalho foi feita por meio da aplicação intrarretal de 100 µL de uma solução contendo 2,5 mg de TNBS e 35% álcool com o auxílio de um cateter de 3.5 F de espessura e uma seringa de 1mL. Os animais encontravam-se sob efeito de anestesia por meio da inalação de Isoflurano. O protocolo utilizado para a aplicação de TNBS foi adaptado do protocolo indicado pela Nature Protocols (WIRTZ et al, 2007). Os camundongos foram mantidos na posição vertical (de cabeça para baixo) durante aproximadamente 1 minuto após a aplicação intrarretal do TNBS para que a solução fosse completamente internalizada para o cólon. Os animais do grupo sem colite receberam solução salina ao invés de TNBS.

## Dieta

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

A dieta rica em sal foi feita a partir da dieta AIN-93G com o acréscimo de 4% de NaCl. Ambas as dietas foram preparadas no laboratório de Imunobiologia a partir dos componentes referidos na **Tabela 1**, após a mistura dos ingredientes, aproximadamente 200 mL de água por quilo de dieta foram adicionados para facilitar a manufatura dos *pellets*. A composição de micro e macronutrientes das dietas padrão e rica em sal são idênticas, com exceção da composição de sódio, que é acrescentado na dieta rica em sal, conforme apresentado nas **Tabelas 1 e 2**.

**Tabela 1 – Composição da dieta AIN 93G**

Componente da dieta	Quantidade em mg/Kg de dieta
<b>Amido de milho</b>	397,96
<b>Caseína</b>	200
<b>Amido dextrinizado</b>	132
<b>Açúcar</b>	100
<b>Óleo de soja</b>	70
<b>Celulose</b>	50
<b>Mix mineral</b>	35
<b>Mix vitamínico</b>	10
<b>Cisitina</b>	3
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5
<b>Bht</b>	0,014

Adaptado de (REEVES et al, 1993)

**Tabela 2 – Composição da dieta AIN 93G acrescida de NaCl**

Componente da dieta	Quantidade em mg/Kg de dieta
<b>Amido de milho</b>	397,96
<b>Caseína</b>	200
<b>Amido dextrinizado</b>	132
<b>Açúcar</b>	100
<b>Óleo de soja</b>	70
<b>Celulose</b>	50
<b>NaCl</b>	42,5
<b>Mix mineral</b>	35
<b>Mix vitamínico</b>	10
<b>Cisitina</b>	3
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5
<b>Bht</b>	0,014

Adaptado de (REEVES et al, 1993)

## **Avaliação do peso corpóreo dos animais**

Durante o período experimental, os animais foram pesados no dia inicial e a cada semana até o dia do início da indução da colite com DSS, após esse momento, os camundongos foram pesados diariamente sempre no mesmo horário. O peso foi utilizado para a curva de crescimento, tendo sido feita a média de cada grupo em cada dia avaliado, além de ter sido calculado o percentual de variação de peso (utilizado para obtenção do escore clínico da doença). O percentual de variação de peso foi obtido a partir do peso inicial no experimento e o peso do dia da eutanásia, a partir da fórmula abaixo:

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

## **Avaliação do Índice Clínico da doença**

O escore clínico da colite foi obtido por meio de valores atribuídos aos seguintes parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. Essa avaliação foi realizada no momento da eutanásia dos animais, após a retirada e abertura do cólon. A diarreia foi classificada como ausente, moderada ou severa, conforme a consistência das fezes. O sangramento foi classificado como ausente, oculto (se presente nas fezes) ou aparente (se visível no ânus do animal).

## **Avaliação Histológica**

O escore histológico foi avaliado por meio de pontuações atribuídas de acordo com os seguintes parâmetros analisados: depleção de células caliciformes, erosão/ulceração/destruição da camada muscular da mucosa, infiltrado celular na mucosa, edema na submucosa; para cada parâmetro, foi atribuída uma pontuação que poderia ir de 0-3 dependendo da intensidade do evento, totalizando um máximo de 15 pontos. Esses parâmetros foram estabelecidos a partir das principais alterações observadas após a intervenção.

## **Avaliação do comprimento do cólon**

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

## **Avaliação da permeabilidade intestinal**

Após 24 ou 72 horas da indução da mucosite, alíquotas contendo 18,5 Megabecquerel (MBq) de ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA) em 0,1 mL de solução foram administradas, por gavagem, a todos os animais. Após 4 horas, os camundongos foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de cloridrato de xilazina (15 mg/kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso vivo). Em seguida, 300 $\mu\text{L}$  de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade utilizando contador-gama (GENEROSO et al, 2011; MAIOLI et al, 2014). Para o cálculo do percentual de dose no sangue, utilizou-se um padrão contendo a mesma dose de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA administrada aos camundongos. A seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo de dose:

$$\% \text{ dose de } ^{99m}\text{Tc-DTPA no sangue} = [(\text{cpm do sangue} \times 100) / \text{cpm da dose (Padrão) administrada}]$$

Onde: cpm= contagem por minuto

## **Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG**

Inicialmente, amostras de cólons isolados dos animais foram homogeneizadas na solução Buffer 1 gelada ( $\text{NaCl}$  0,1M,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,02M e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,015M), numa proporção de 1,9 mL/100mg de tecido e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em solução de  $\text{NaCl}$  0,2% e  $\text{NaCl}$  1,6% acrescida de 5% de glicose, ambas geladas, numa proporção de 1,5mL/100mg de tecido. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado em Buffer 2 ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  e HETAB 0,5% p/v) solução esta



armazenada à temperatura ambiente, numa proporção de 1,9 mL/100mg. As amostras foram homogeneizadas e metade do volume foi retirado para a dosagem da atividade da enzima NAG. A outra metade do homogenato foi utilizada para a determinação da atividade da MPO. A partir desta etapa, as amostras receberam tratamentos distintos.

### **Quantificação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no cólon**

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

Em microplaca de 96 poços, foram pipetados, em duplicata, 25 µL de cada amostra. Posteriormente, foram adicionados 25 µL do substrato TMB, previamente diluído em DMSO. A placa foi colocada em estufa a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,002% e as amostras foram novamente incubadas a 37°C por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura da absorbância foi feita a 450nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para a determinação da atividade da enzima.

### **Quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) no cólon e órgãos linfoides**

Após a divisão do homogenato, a avaliação da atividade da NAG foi feita separadamente. Para isso, foi acrescentada ao homogenato a solução Salina/Triton (Salina 0,9% e Triton x-100 0,1%), numa proporção de 2mL/100mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 3000 RPM. Cem microlitros (100 µL) do sobrenadante foram coletados e diluídos em tampão citrato fosfato (ácido cítrico 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M) para proceder ao ensaio de NAG. Na microplaca, foram pipetados 100 µL de cada amostra diluída. Foram

acrescentados 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluídos em tampão citrato fosfato. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados às amostras para paralisar a reação. A absorbância foi lida a 400nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

### **Dosagem de citocinas nos extratos de tecido de baço, linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e cólon.**

As amostras de cólon, baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal foram pesadas e adicionados 1mL de solução tampão (0,05% de Tween-20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzotônio, 10mM de EDTA e 20 KIU de aprotinina A) para cada 100mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador de tecidos e centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Durante o período de manipulação, as amostras foram mantidas em gelo e as amostras foram plaqueadas no mesmo dia.

A determinação da concentração de citocinas foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático ELISA. As placas de 96 poços (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp) foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra INF-γ, IL-10, IL-17 e IL-23 diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram lavadas com salina Tween. Em seguida, foram adicionadas as amostras, assim como o padrão (do qual foi realizada diluição seriada) e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No terceiro dia, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as citocinas já citadas e marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/mL. Posteriormente, uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (100 µL/poço) (Southern Biotechnology Associate Inc.) foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A reação enzimática foi revelada incubando-se as placas, ao abrigo da luz, com uma solução contendo 0,2 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/mL de

ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. As absorbâncias ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ) das amostras foram obtidas pelo leitor de ELISA automático (Asys- modelo Expert plus). Os valores das absorbâncias foram convertidos em ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

### **Isolamento de populações celulares da lâmina própria do cólon dos camundongos por citometria de fluxo**

Após o sacrifício dos animais, o cólon foi cuidadosamente coletado e toda a gordura aparente foi retirada. O intestino foi transferido para uma placa de Petri com *Buffer A* para que fosse realizada lavagem e retirada das fezes. O cólon foi aberto longitudinalmente e agitado vigorosamente no *Buffer A* para maior eficácia da lavagem. O *Buffer A* deve ser trocado quantas vezes forem necessárias para melhor limpeza do tecido. Posteriormente, o cólon foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 cm e estes são transferidos para tubos de 50 mL. O tubo foi agitado vigorosamente para remoção de muco. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado com a utilização de uma redinha de metal. Repeti esse processo até que o sobrenadante estivesse limpo. Os pedaços de tecido foram transferidos para um novo tubo de 50 mL com *Buffer B* que foi agitado e o sobrenadante novamente descartado com auxílio da redinha de metal. Os pedaços de tecido foram então incubados com *Buffer C* pré-aquecido a 37°C em banho-maria por 15 minutos e foram agitados a cada 5 minutos. Para remoção da camada epitelial, após incubação, os tubos foram agitados vigorosamente e o sobrenadante foi removido usando a redinha de metal. Tal procedimento foi repetido diversas vezes com *Buffer A* até que o sobrenadante estivesse claro. Todo o tecido foi transferido para uma nova placa de Petri com novo *Buffer A* e cortado em pedaços menores ainda. Depois, transferido para um tubo de 50 mL, centrifugado a 1500 RPM, 7 minutos, 4°C e ressuspenso em *Buffer B*. Novamente, o tecido foi centrifugado a 1500 RPM, 7 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante.

O tecido foi deixado para digerir em meio Iscove completo pré-aquecido a 37°C, contendo Colagenase (100U/100 mL de meio) e DNase (30µg/mL) por 60 minutos em shaker, sendo que os tubos foram agitados a cada 15 minutos. Mais uma vez, o tecido foi centrifugado a 1500 rpm, 7 minutos, 4°C e descartado o sobrenadante. Ressuspendi o tecido em *Buffer A* gelado. O tecido foi passado em redinha de 100µm, pressionando com êmbolo de seringa de 1 mL. O filtrado foi guardado, centrifugado a 1500 RPM, 7 minutos, 4°C e o pellet ressuspendido em *Buffer B*. A solução foi passada em redinha de 40 µm e novamente o filtrado guardado para centrifugação a 1500 RPM, 7 minutos, 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 5 mL de *Buffer A* para contagem das células.

Para a contagem das células, as suspensões de células foram diluídas 20 vezes, foram homogeneizadas com eritrocina para marcação das células inviáveis. Para tal procedimento, 50 µL de solução de células foram misturados a 50 µL de eritrocina. Posteriormente, as células foram colocadas na Câmara de Neubauer para contagem em microscópio óptico. Após contar as células não coradas (viáveis), o número de células foi expresso de acordo com a fórmula:  $n^{\circ}$  de células/mL = [(células viáveis x diluição x 10<sup>4</sup>) / n<sup>o</sup> campos contados na Câmara de Neubauer] x volume inicial da suspensão celular. A partir do número de células obtido, as concentrações das suspensões foram todas padronizadas pela adição do volume necessário de meio completo para se obter um número mínimo de 10<sup>6</sup> células/mL. Para a leitura em citômetro de fluxo, foram utilizadas placas de 96 poços com fundo em U.

### **Análise das ILCs por citometria de fluxo**

Cem microlitros (100 µL) de solução de solução contendo um mínimo de 10<sup>6</sup> células foram adicionados a cada poço da placa juntamente com 50 µL de um mix de anticorpos extracelulares diluídos em tampão para citometria. Após a pipetagem, a placa ficou incubada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de tampão para citometria em cada poço e a placa foi centrifugada a 1500 RPM, 10 minutos, 10° C. Posteriormente, a placa foi vertida e as células ressuspendidas no agitador ao adicionar 100 µL de FixPerm. A placa foi incubada por 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. E, após esse tempo, foram adicionados 100 µL de Perm Wash. A placa foi centrifugada a 1500

RPM, 10 minutos, 10° C e novamente vertida e as células ressuspensas no agitador. Foram adicionados, então, 50 µL de Mix de Anticorpos para marcação intracelular diluído em Perm Wash. A placa foi incubada por 45 minutos, ao abrigo da luz, a 4°C e posteriormente, adicionei 100 µL de Perm Wash. Novamente, a placa foi centrifugada a 1500 RPM, 10 minutos, 10° C, vertida e agitada para ressuspender as células. Foram adicionados 200 µL de Perm Wash. A placa foi centrifugada novamente como feito anteriormente e ressuspensa em 200 µL de tampão para citometria. O conteúdo foi, então, transferido para tubinhos de citometria para posterior leitura no Citômetro FACS Fortessa na Escola de Farmácia da UFMG.

Para a análise das células linfóides inatas (ILC), as seguintes moléculas foram marcadas: CD14, CD16, CD11c, FcεR1a, CD127, ckit, CD45, GATA3, Tbet, RORγt, CD8, CD4, CD3. A estratégia de análise para definição dessas células é demonstrada na figura 9.

### **Análise de neutrófilos e células T por citometria de fluxo**

Em cada poço da placa de 96 poços com fundo em U, foram adicionados 100 µL de solução contendo um mínimo de 10<sup>6</sup> células e 10 µL de mix de anticorpos. A placa ficou incubada por 30 minutos, ao abrigo da luz, a 4° C.

Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de tampão fosfato wash em cada poço e posteriormente, as placas foram levadas para centrifugação a 1200 RPM, durante 10 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo sedimentado foi homogeneizado cuidadosamente. Esse procedimento foi repetido. As células foram ressuspensas com 100 µL de MAC-FACS (paraformaldeído diluído 1/20 em tampão fosfato 1x) e incubadas por 30 minutos em geladeira (4°C). Após esse tempo, as placas foram lavadas e as células ressuspensas com 200 µL de tampão fosfato 1x. Finalmente, as células suspensas em tampão fosfato 1x foram transferidas para tubos para leitura de FACS e armazenadas em geladeira a 4°C *overnight*.

Para as células marcadas com Foxp3, foram necessárias outras etapas referentes à marcação intracelular além dessas citadas acima. Após o plaqueamento com solução contendo 10<sup>6</sup> células e os anticorpos marcadores de superfície, a placa foi incubada durante 30 minutos em geladeira ao abrigo da luz. Em seguida, foi

lavada em tampão fosfato-wash e levada para centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Essa última etapa foi repetida. Nesse ponto, inicia-se o protocolo de fixação e permeabilização específico para marcação intracelular de Foxp3. Para essa marcação, foi utilizado o Kit da BD para marcação intracelular de Foxp3. As células foram então ressuspensas utilizando 100 µL/poço de Tampão de Fixação da BD (solução 4% de paraformaldeído). A placa ficou incubada por 30 minutos, a 4°C ao abrigo da luz. A placa foi posteriormente levada para centrifugação (1200 RPM por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, a placa foi lavada 1 vez com o Tampão de Permeabilização da BD e incubada durante 30 minutos a 37°C (na estufa), ao abrigo da luz. As células foram novamente centrifugadas (1200 RPM por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante desprezado. A placa foi lavada com tampão fosfato-wash e novamente levada para centrifugação. O sobrenadante foi descartado.

Após todas essas etapas, o *pellet* pode receber 10 µL de solução de anti-Foxp3 diluído em tampão fosfato-wash e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A placa foi então lavada com Tampão Fosfato e levada para centrifugação. O sobrenadante foi desprezado. Esse último passo foi repetido e a placa incubada por 30 min à temperatura ambiente com 200 µL/poço de MAC FACS. A placa foi novamente lavada, centrifugada e o sobrenadante descartado. As células foram finalmente ressuspensas em µL/poço de tampão fosfato 1x e armazenadas em tubos para leitura de FACS em geladeira.

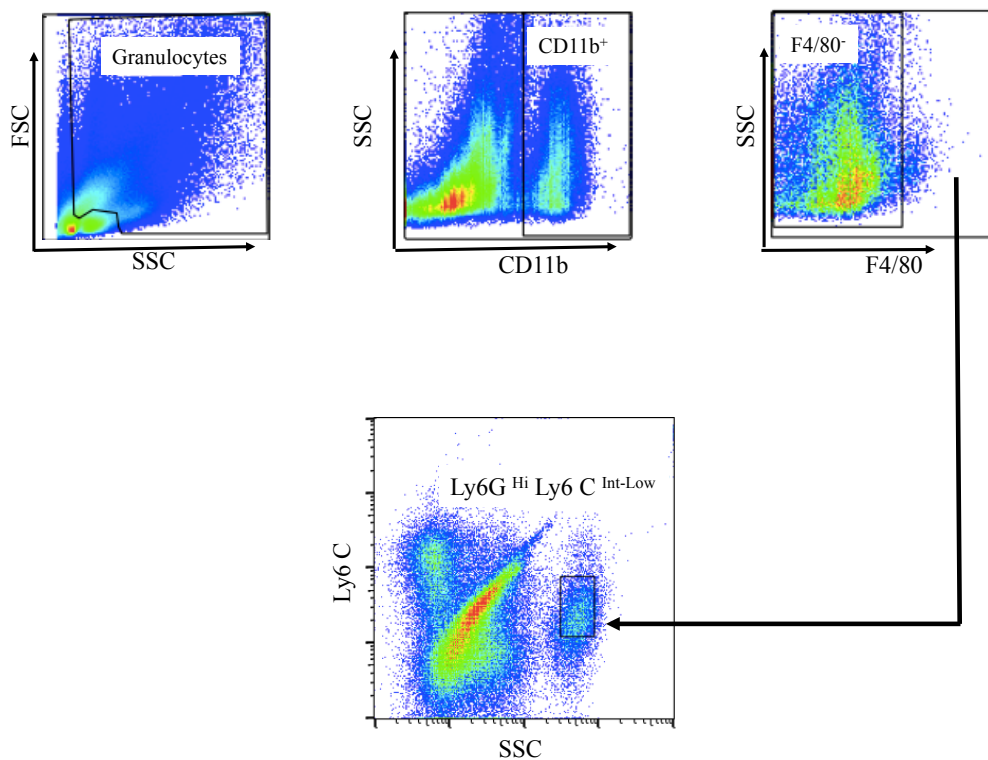
A análise dos dados foi realizada utilizando um citômetro de fluxo FACScan e FACScantoII (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). O percentual de células positivas foi analisado através do software FlowJo versão 7.0.

As células extraídas da lâmina própria foram marcadas com anticorpos anti-CD4, Foxp3, IL-23R, neuropilina e RORγt para análise de células T e a estratégia de análise dessas células é mostrada na figura 8A.

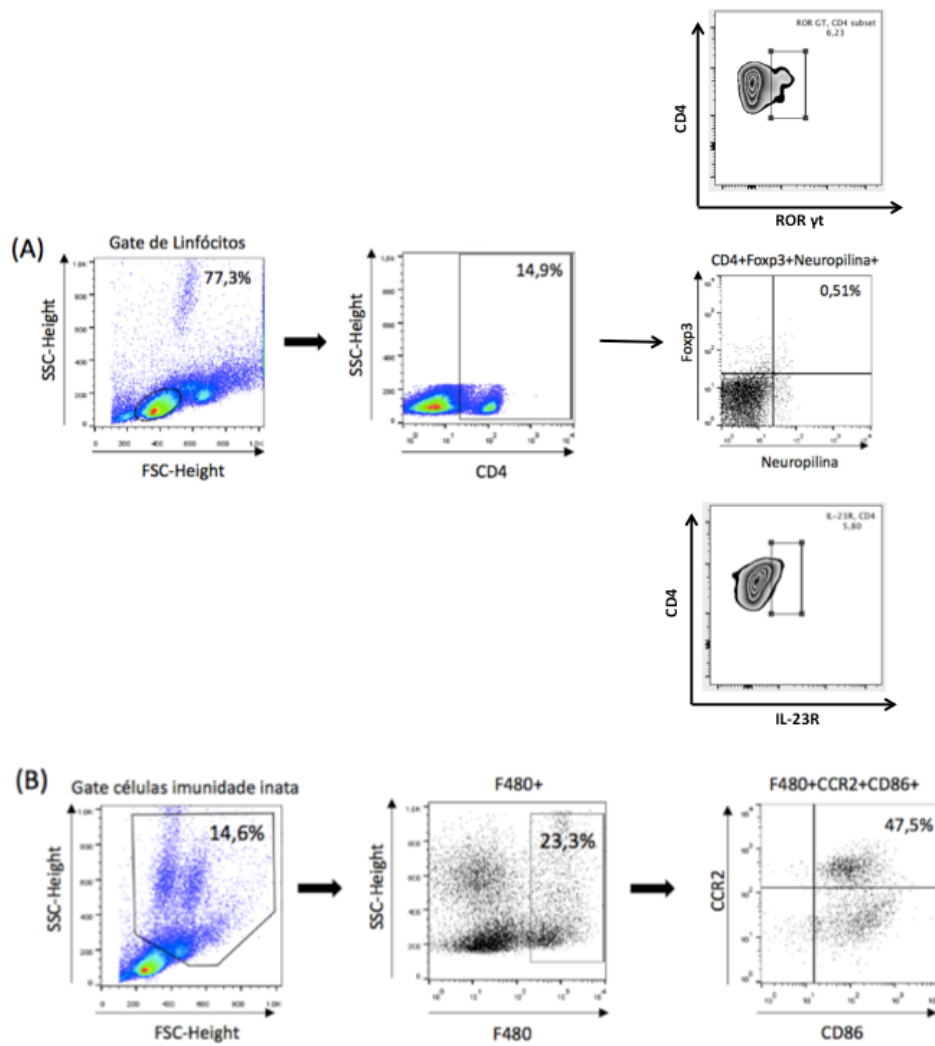
Para análise de macrófagos, as células foram marcadas com anticorpos anti-F4/80, CCR2 e CD86 e a estratégia de análise utilizada é mostrada na figura 8B.

Para determinação dos neutrófilos, as células extraídas da lâmina própria foram marcadas com CD11b, F4/80, Ly6G e Ly6C e a estratégia de análise dessas células é esquematizada na figura 7.

A estratégia de análise e os anticorpos utilizados para as marcações das células linfoides inatas estão mostrados na Figura 9.

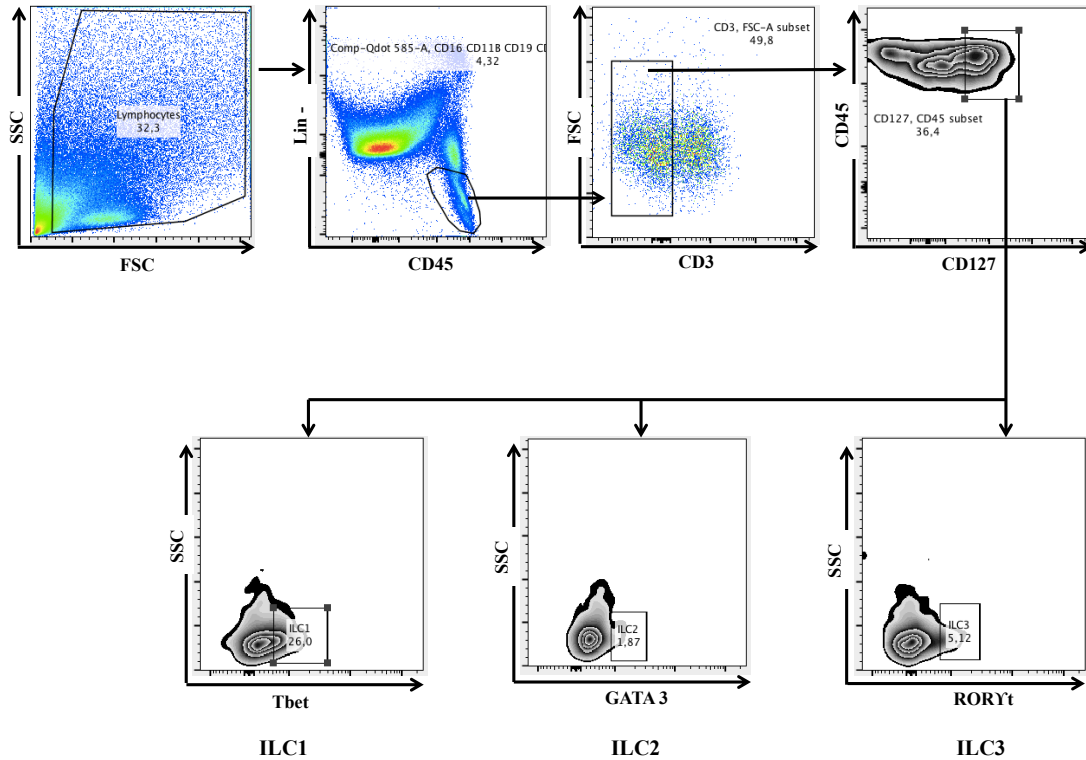


**Figura 7: Estratégia de análise de neutrófilos da lâmina própria do cólon por citometria de fluxo.** Para análise da frequência de neutrófilos, as células extraídas da lâmina própria do cólon dos animais foram marcadas com CD11b, F4/80, Ly6G e Ly6C. A partir do gate de granulócitos, a população de células CD11b<sup>+</sup> foi selecionada e dentro dessa população, as células F4/80<sup>-</sup> foram então usadas para definir a população de interesse que seriam as células Ly6G<sup>Hi</sup> Ly6C<sup>Int-Low</sup>



**Figura 8: Estratégia para análise de células T e macrófagos da lâmina própria do cólon por citometria de fluxo.** (A) Para análise de células T reguladoras, dentro da região de CD4<sup>+</sup> da população de linfócitos, foram consideradas as células F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup>neuropilina<sup>+</sup>. A análise de células RORγt<sup>+</sup> foi feita considerando as células dentro do gate de linfócitos CD4<sup>+</sup>, assim como as células CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> (B) Para a determinação de macrófagos, dentro da região de células F4/80<sup>+</sup>, foram consideradas as células CCR2<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>.





**Figura 9: Estratégia de análise das células linfoides inatas da lâmina própria do cólon por citometria de fluxo.** Para a análise das ILCs, dentro da região de células inatas, foram selecionadas as células Lin<sup>-</sup> (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FcεR1a)CD45<sup>+</sup>, posteriormente, dentro do gate de células CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>, foram definidas as ILC1 (Tbet<sup>+</sup>), ILC2 (GATA3<sup>+</sup>) e ILC3 (RORγt<sup>+</sup>).

## Medida de parâmetros cardiovasculares

A pressão arterial média (PAM), pressão sistólica, pressão diastólica, frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo foram avaliadas por um pletismógrafo. Este sistema utiliza um manguito com sensor para medir, de forma não invasiva, parâmetros cardiovasculares através da cauda de camundongos. (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, Estados Unidos) (HARTMAN et al, 2012). Os animais foram aclimatados duas semanas antes do início do experimento. A plataforma de retenção foi mantida com temperatura entre 31-34°C. Em cada sessão, os animais foram colocados em uma caixa de retenção de acrílico e a cauda foi envolvida pelo manguito. A seguir, a pressão arterial foi mensurada 8 vezes e a média de cada animal foi obtida. Estes parâmetros foram avaliados semanalmente, a partir do início da dieta, nos dias 0, 7, 14 e 21 do experimento.

## PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

### Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os ensaios de qPCR foram realizados com o gene alvo SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) e para normalização dos dados foi utilizado o gene de referência GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer3, versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e análises de parâmetros tais como conteúdo GC, formação de homodímero, heterodímero e hairpins foram realizadas usando o software OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A especificidade das sequências desenhadas foi confirmada usando o programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), de forma a garantir que os iniciadores amplificam somente a região genômica de interesse em *Mus musculus*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho esperado de cada amplicon são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos amplicons**

Gene	Número de acesso	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
GAPDH	GU214026.1	F: 5'- CATCTTCCAGGAGCGAGACC- 3'	150
		R: 5'- GAAGGGGCGGAGATGATGAC- 3'	
SGK1	NM_001161847.2	F: 5'- CAAATCAACCTGGGTCCGTC- 3'	87
		R: 5'- TCCAAAACTGCCCTTCCG-3'	

*Pb = pares de bases GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)*

### Extração de RNA total e tratamento com DNase I

A extração de RNA total do cólon dos camundongos C57BL/6, tratados ou não com sal, foi realizada usando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Promega), conforme as recomendações do fabricante. Foram adicionados 3 µg de RNA, tampão RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer, 2 U da enzima RQ1 RNase-Free DNase e água nuclease-free totalizando um volume de 10 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, seguido da extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Aos 10 µL de amostra, foram acrescentados 90 µL de água nuclease-free, totalizando 100 µL, ao qual foi adicionado igual volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (SIGMA-ALDRICH). Após breve mistura, foi realizada centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos (temperatura ambiente). A fase aquosa contendo o RNA foi removida e transferida para novo tubo, seguido da adição de um volume 10 vezes menor de acetato de sódio (3M, pH 5). Ao volume obtido, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado com posterior incubação a -80°C por 30 minutos. Posteriormente, foi feita uma centrifugação a 11.000 rpm por 20 minutos (4°C), o sobrenadante foi descartado e foram realizadas duas lavagens com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos (4°C). Após esta etapa, o microtubo foi mantido à temperatura ambiente para completa evaporação do álcool e o pellet foi ressuscitado em 15 µL de água nuclease-free. As amostras foram quantificadas usando o aparelho Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### Síntese de cDNA e amplificação por RT-PCR\_(transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), de acordo com instruções do fabricante. As amostras de RNA tratado (1 µg) foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)18 (0,5 µg/µL), em um volume final de 12,5 µL, a 65°C por 5 minutos, seguido de incubação no gelo por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 4 µL do tampão 5X Reaction Buffer, 2 µL de dNTPs (10 mM cada), 20 U de RiboLock RNase Inhibitor e 200 U de RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. As reações foram incubadas a

42°C por 60 minutos e, em seguida, a enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos. As amostras foram quantificadas usando o aparelho Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Aproximadamente 100 ng de cDNA foi usado em reações de PCR com 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,25 µM de primers específicos para cada gene e 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), totalizando um volume final de 20 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). Uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, onde água estéril foi acrescentada no lugar de cDNA. Os produtos de PCR e o marcador 50 pb DNA Step Ladder (Sigma) foram aplicados em géis de agarose (2,5%) corados com brometo de etídeo para confirmação do tamanho dos amplicons.

## **Ensaio de qPCR e análise dos dados**

Cada reação de qPCR continha 5 µL de KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix 2X (Kapa Biosystems); 0,2 µL de 50X ROX High; 200 ng de cDNA; cada par de oligonucleotídeos iniciadores em sua concentração ótima e água nucleas-free, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram de uma etapa inicial a 50°C por 2 minutos, uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de: 95°C por 15 segundos (desnaturação) e uma etapa única de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Após os 35 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação (melting curve). Em todas as reações de qPCR foi feito um controle branco de amplificação para cada par de primers, onde água estéril foi acrescentada no lugar de cDNA. As corridas de qPCR foram feitas no equipamento ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) e os dados processados utilizando o software SDS v2.4 (Applied Biosystems).

A concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador foi determinada por meio do teste de concentração de primers, em que foram testadas as concentrações 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6  $\mu\text{M}$ . A partir desse teste, foram padronizadas as concentrações de cada iniciador forward (F) e reverse (R) a serem utilizadas nos ensaios de qPCR: 0,3  $\mu\text{M}$  (F)/0,3  $\mu\text{M}$  (R) para GAPDH e 0,4  $\mu\text{M}$  (F)/0,4  $\mu\text{M}$  (R) para SGK1.

Curvas padrão para cada marcador foram obtidas por meio de reações envolvendo diluições logarítmicas seriadas de cDNA (teste de eficiência de amplificação da reação) de qPCR): 103, 102, 101 e 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Os valores de slope (coeficiente angular da reta) foram utilizados no cálculo da eficiência de amplificação da reação de qPCR para cada marcador [Eficiência =  $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ ]. A partir desse teste, padronizou-se a quantidade de cDNA a ser utilizada em todos os ensaios de qPCR (200 ng/amostra).

A especificidade de amplificação de cada par de oligonucleotídeos iniciadores foi confirmada por meio de análises das curvas de dissociação.

Os dados de qPCR foram analisados usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001) e as análises estatísticas foram realizadas usando o software PRISMA.

### **Análises estatísticas**

Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o test t de Student. Já a comparação do peso corporal, consumo de dieta e outros parâmetros entre mais de dois grupos foi realizada através do teste two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . O programa utilizado para fazer os testes foi o GraphPad Prism versão 6.

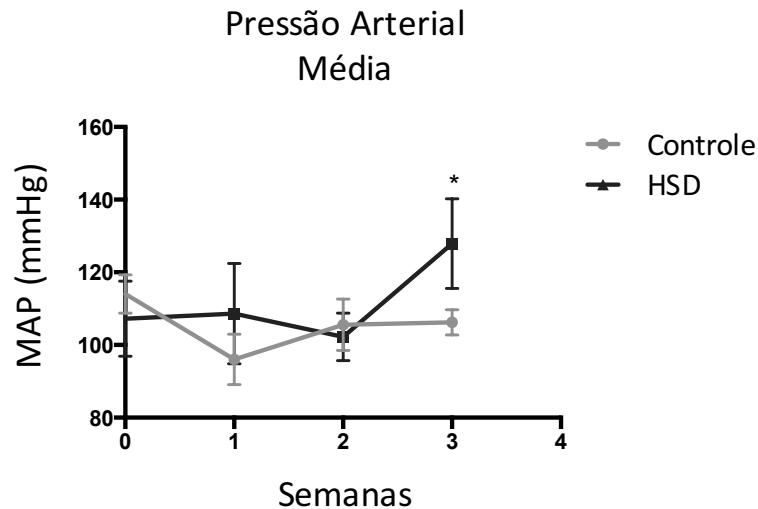
## RESULTADOS

---

## RESULTADOS

### O consumo da dieta rica em sal por camundongos C57BL/6 induziu o aumento da pressão arterial média.

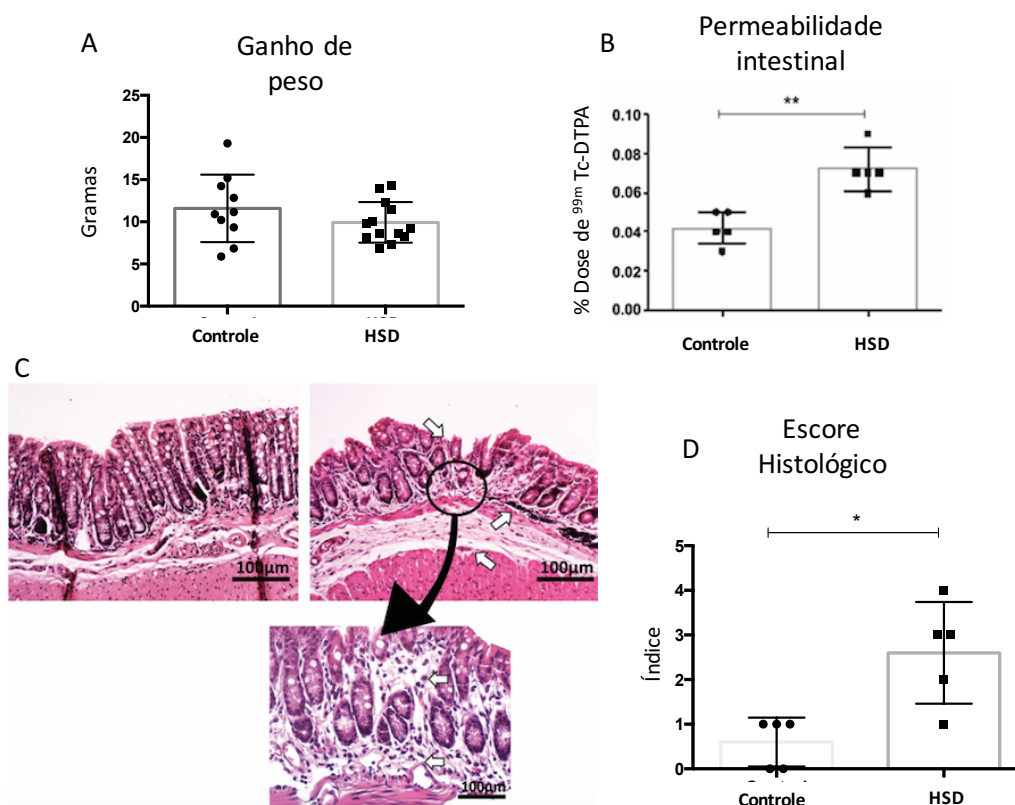
Como o efeito adverso mais conhecido do consumo de dietas ricas em sal (NaCl) é o aumento da pressão arterial, decidimos avaliar inicialmente se esse efeito era observado em camundongos que consumiram a dieta utilizada neste trabalho por períodos crescentes de tempo.



**Figura 10: Avaliação da pressão arterial média (MAP).** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) por 3 semanas e sua pressão arterial foi medida ao longo do período de consumo da dieta. A média foi feita entre 8 medidas do pletismógrafo realizadas nos tempos 0, 1 semana, 2 semanas e 3 semanas de dieta. Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . HSD= High salt diet, grupo que recebeu dieta rica em sal durante três semanas; Controle= grupo controle que recebeu dieta padrão durante três semanas.

O consumo da dieta rica em sal por 3 semanas resultou em elevação da pressão arterial média dos camundongos quando comparados aos animais que consumiram a dieta padrão. Esse resultado demonstra que a dieta rica em sal utilizada neste estudo resultou em efeitos biológicos esperados para uma dieta com alto teor de NaCl.

## O consumo da dieta rica em sal levou ao surgimento de elementos característicos de inflamação na mucosa do cólon dos camundongos



**Figura 11. Avaliação do ganho de peso, permeabilidade intestinal e escore histológico dos camundongos após o consumo da dieta rica em sal (HSD).** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) por 3 semanas. (A) Os camundongos foram pesados semanalmente durante o período de consumo da dieta e o ganho de peso dos animais em cada grupo experimental foi avaliado ao final das três semanas de experimento (ganho de peso= peso final – peso inicial). Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). (B) Permeabilidade intestinal de cólon de camundongos C57BL/6 após 3 semanas de dieta controle ou HSD. Os animais foram gavados com tecnécio e o sangue retirado após 4 para dosagem de <sup>99m</sup>Tc-DTPA. (C) Análises histológicas mostram seções do cólon dos grupos estudados coradas com hematoxilina e eosina (HE). Foi usado um aumento de 10x nas figuras representativas acima e 40x na figura abaixo. A figura acima à esquerda representa um cólon de animal controle e a figura acima à direita representa o cólon de um animal alimentado com dieta rica em sal, a figura abaixo representa um aumento do detalhe do cólon do grupo HSD. (D) O escore das alterações morfológicas da mucosa colônica em animais de ambos os grupos foi obtido por um índice gerado a partir da pontuação dos seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . (C e D)

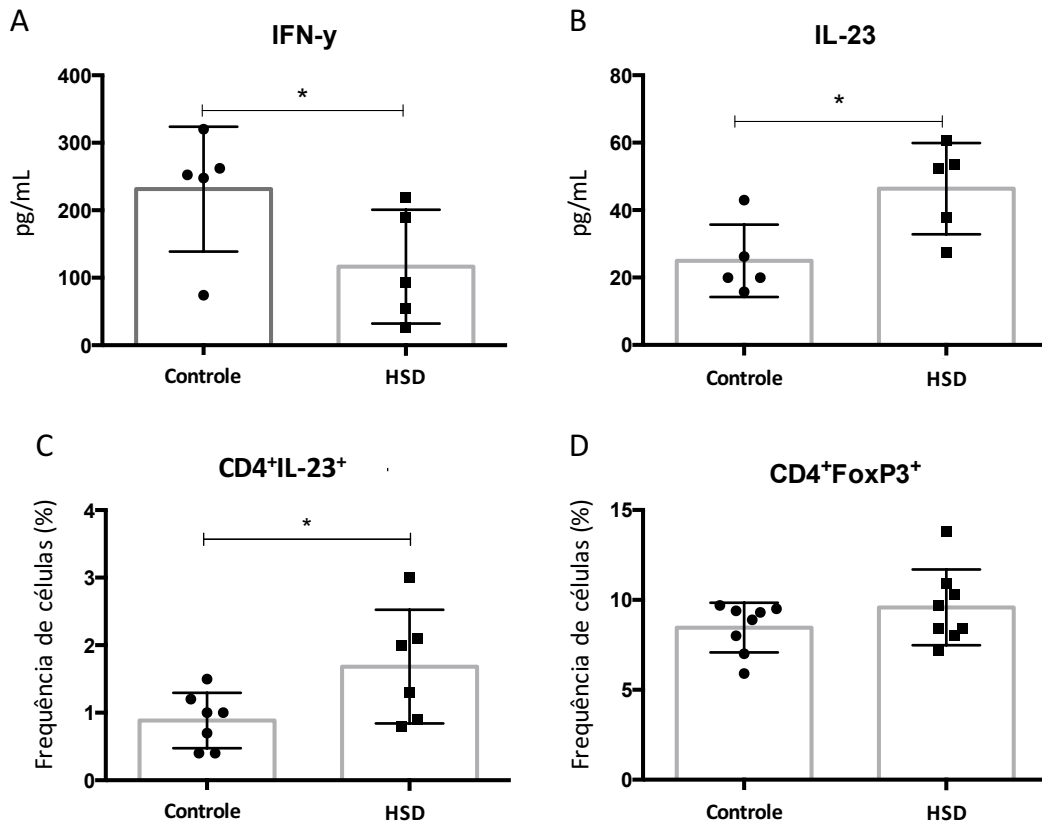


Investigamos, primeiramente, sinais que poderiam nos indicar alterações intestinais que pudessem ser decorrentes da ingestão excessiva de NaCl. De fato, observamos que, após 3 semanas de consumo da dieta rica em sal, os camundongos apresentaram aumento de permeabilidade intestinal (LLEWELLYN et al, 2017), além de uma reação inflamatória leve na mucosa colônica identificada pelo aumento do escore histológico, medido pela maior presença de infiltrado celular e edema na submucosa, assim como depleção de células caliciformes (Figura 11), quando comparado ao dos camundongos que receberam a dieta controle.

### **O consumo de dieta rica em sal resultou em alterações no perfil de citocinas e na frequência de células inflamatórias no cólon**

Como já havia sido descrito anteriormente que a dieta rica em sal seria capaz de induzir à diferenciação de linfócitos Th17 via produção de IL-23 e sua ligação aos receptores IL-23R presentes nas células T CD4<sup>+</sup> na medula espinhal (KLEINWIETFIELD et al, 2013; WU et al, 2013), decidimos avaliar as possíveis alterações nos níveis das citocinas IL-17, IL-23 e na expressão de IL-23R por linfócitos T CD4<sup>+</sup> no colon. Além disto, medimos também a produção local de IFN- $\gamma$ , uma citocina característica de respostas Th1 e ILC1, que pode ser regulada negativamente em presença de altos níveis de IL-17 (DA MATTA et al, 2010).

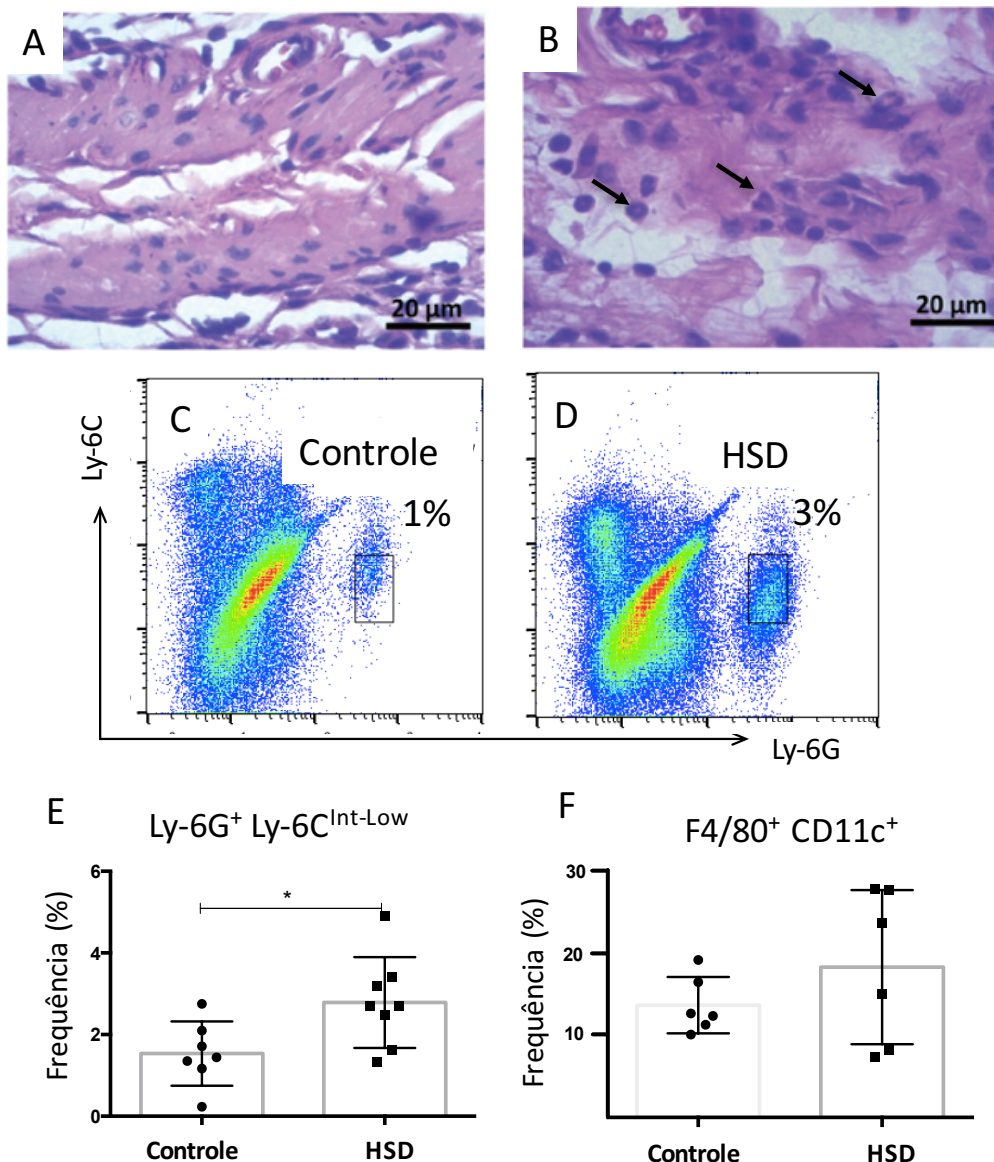
Os camundongos que receberam a HSD por 3 semanas apresentaram níveis aumentados de IL-23 e reduzidos de IFN- $\gamma$  no extrato de cólon quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta padrão (Figura 12 A e B). Não conseguimos detectar IL-17 no extrato de cólon. Acreditamos que isto pode se dever ao fato de que IL-17 é uma citocina instável quando secretada, com meia vida muito curta no meio extracelular (YANG et al, 2014). Os camundongos alimentados com dieta rica em sal apresentaram aumento na frequência das células T CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> na lâmina própria do cólon (Figura 12).



**Figura 12. Avaliação da concentração de citocinas e frequência de células CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> no cólon.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com HSD por 3 semanas e, após esse tempo de consumo da dieta, foram retiradas células e extrato do cólon para análise. As citocinas IFN- $\gamma$  (A) e IL-23 (B) foram mensuradas em extrato de tecido através da técnica de ELISA. A frequência das células CD4<sup>+</sup>IL-23<sup>+</sup> (C) e células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (D) foram avaliadas por meio de citometria de fluxo das células extraídas da lâmina própria do cólon dos camundongos. Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## O consumo de dieta rica em sal induziu aumento na frequência de neutrófilos na lâmina própria do cólon

Um dos efeitos inflamatórios importantes da citocina IL-17 é induzir o recrutamento de neutrófilos (KOLLS and LINDEN, 2004). A dieta rica em sal, ofertada durante 3 semanas, induziu o aumento na frequência de células F4/80<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int-low</sup> (neutrófilos) na lâmina própria de cólon (Figura 13).



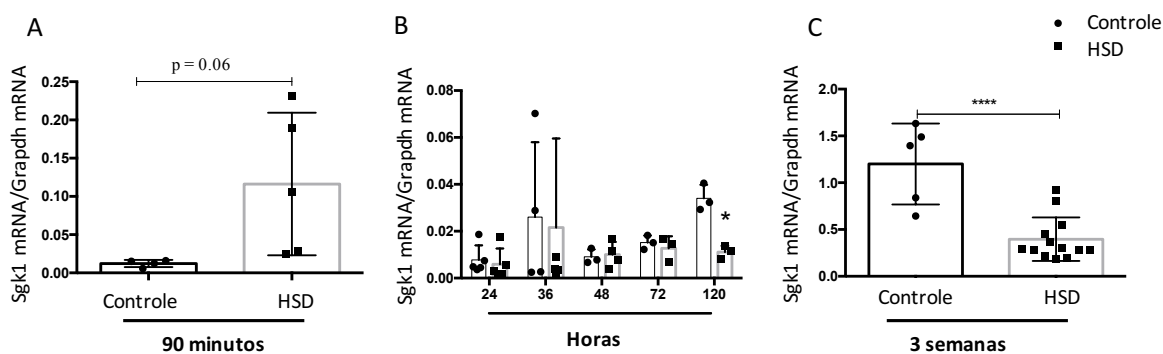
**Figura 13. Avaliação da frequência de neutrófilos no cólon de camundongos alimentados com HSD.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com HSD por 3 semanas e, após esse tempo de consumo da dieta, o cólon foi retirado para avaliação histológica. Análises histológicas mostram seções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE), foi usado um aumento de 10x. (A) Seção histológica do cólon de um camundongo do grupo controle que recebeu dieta padrão. (B) Seção histológica do cólon de um camundongo do grupo HSD que recebeu dieta rica em sal. As setas indicam neutrófilos encontrados no campo histológico em questão. A frequência de monócitos foi considerada a partir das células  $F4/80^+CD11c^+$  (C e D) Gráficos de dot plots de citometria de fluxo representativo dos grupos de estudo realizada para avaliação da frequência de células  $F4/80^+Ly6G^+Ly6C^{int-low}$  na lâmina própria do cólon do grupo controle (C) e do grupo HSD (D). (E) Frequências de neutrófilos  $F4/80^+Ly6G^+Ly6C^{int-low}$  na lâmina própria do cólon dos grupos de estudo (F) Frequências de macrófagos  $F4/80^+CD11c^+$  na lâmina própria do cólon dos grupos de estudo. Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

Contudo, não foi observada diferença na frequência de células F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (macrófagos). Esses resultados estão de acordo com nossa hipótese de que o sódio leva a um aumento da expressão de IL-23R (que observamos na Figura 12C) e na produção de IL-23 (Figura 12B) levando assim ao aumento na frequência ou na atividade de células Th17 e ILC3, que liberam IL-17 e recrutam, então, neutrófilos para o local.

### **O consumo de dieta rica em sal resultou em alterações na expressão de SGK1 no cólon**

A SGK1 (*serum and glucocorticoid-inducible kinase*), é uma molécula importante na sinalização de respostas a mudanças extracelulares na concentração de Na<sup>+</sup> e foi clonada como sendo o gene regulado pelo estado de hidratação da célula (FIRESTONE et al, 2003). A SGK1 tem, como alvo, o fator ligado a via responsiva à tonicidade, o NFAT5 (Nuclear Factor of activated T cells) (CHEN et al, 2009). Em condições fisiológicas, a SGK1 é expressa em baixos níveis, mas aumenta significativamente após excesso de glucocorticoide ou mineralocorticoide, hiperglicemia, isquemia, inflamação, hipertonicidade ou desidratação de célula (LANG and VOELKL, 2013). Dois estudos deram nova luz sobre o papel do sódio, SGK1 e sobre a diferenciação de células T naïve para células Th17 (KLEINWIEFELD et al, 2013; WU et al, 2013). Wu e colaboradores (2013) realizaram uma análise de *microarray* para verificar quais RNAs mensageiros (mRNA) as células T naïves estariam alterados durante sua diferenciação em células Th17. Surpreendentemente, a SGK1 foi um dos principais genes cuja regulação transcricional foi claramente associada à sinalização de IL-23 e altamente induzida com diferenciação Th17. Assim, acreditamos que, em nosso modelo, também encontraríamos alterações na expressão de SGK1 e, para investigar isso, realizamos ensaios de PCR quantitativo em tempo real no cólon de camundongos em diferentes momentos após o consumo de dieta rica em sal: 90 minutos, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 120 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias. Diferente do que esperávamos, encontramos somente uma tendência de aumento de SGK1 com o consumo da dieta rica em sal logo após a ingestão do mineral. Após esse tempo, a expressão deixa de ter

diferença entre os dois grupos (dieta padrão e dieta rica em sal) e, a partir de 120 horas de consumo, passamos a observar uma redução na expressão de SGK1 no grupo que consome dieta rica em sal quando comparado ao grupo que recebe dieta padrão. Essa redução permanece até o tempo de 3 semanas (Figura 14).



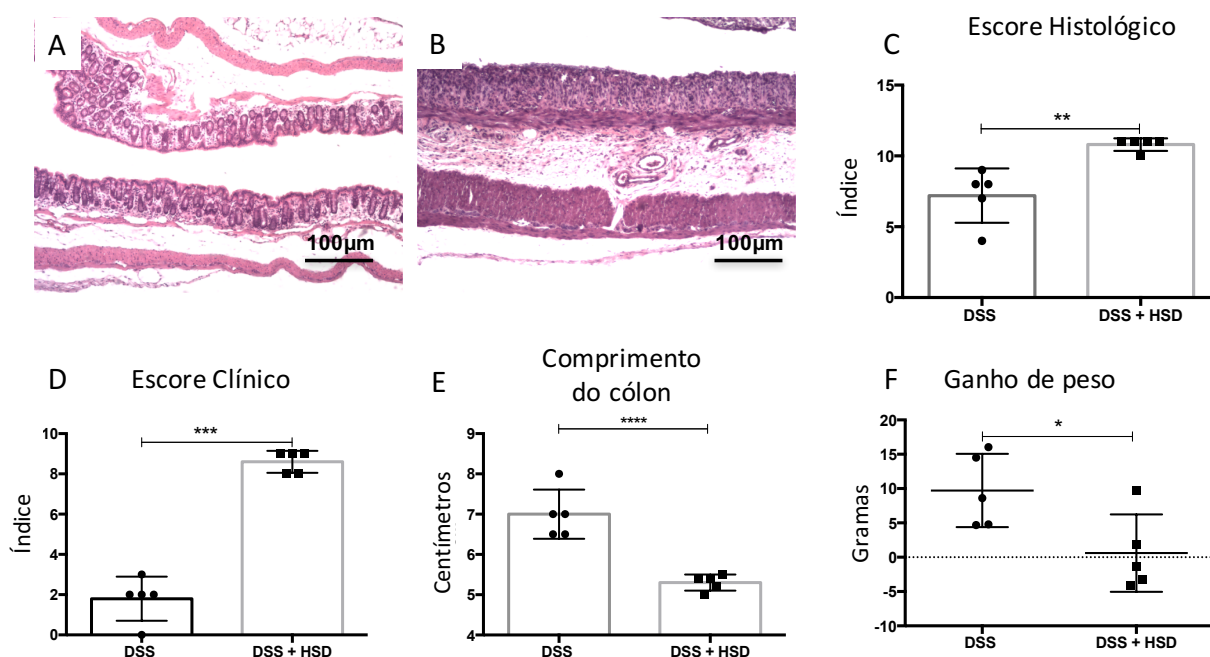
**Figura 14. Avaliação da expressão relativa de SGK1 no cólon.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) ou tratados com solução concentrada de NaCl (50%) por gavagem intragástrica; os cólons desses animais foram retirados e extraído mRNA desse tecido nos tempos indicados: (A) 90 minutos após a gavagem, (B) 24h, 36h, 48h, 72h ou 120h após o consumo de dieta padrão ou dieta rica em sal, (C) após 3 semanas de consumo de dieta padrão ou dieta rica em sal. A expressão relativa de SGK1 foi quantificada por PCR em tempo real a partir do extrato do cólon dos camundongos. Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes. Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## O consumo de dieta rica em sal agravou a colite induzida por DSS

Após verificarmos que a dieta rica em sal induziu alterações no cólon de camundongos saudáveis, decidimos avaliar o efeito no desenvolvimento de uma doença inflamatória intestinal utilizando dois modelos de colite.

Neste trabalho, observamos piora da colite induzida pelo DSS quando aliada à dieta rica em sal. Os camundongos que receberam a dieta com acréscimo de NaCl apresentaram maior índice histológico (no qual atribuímos pontuação de 0-3 para os seguintes parâmetros; destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes) além de apresentarem também maior escore clínico (percentual de perda de peso, diarreia e

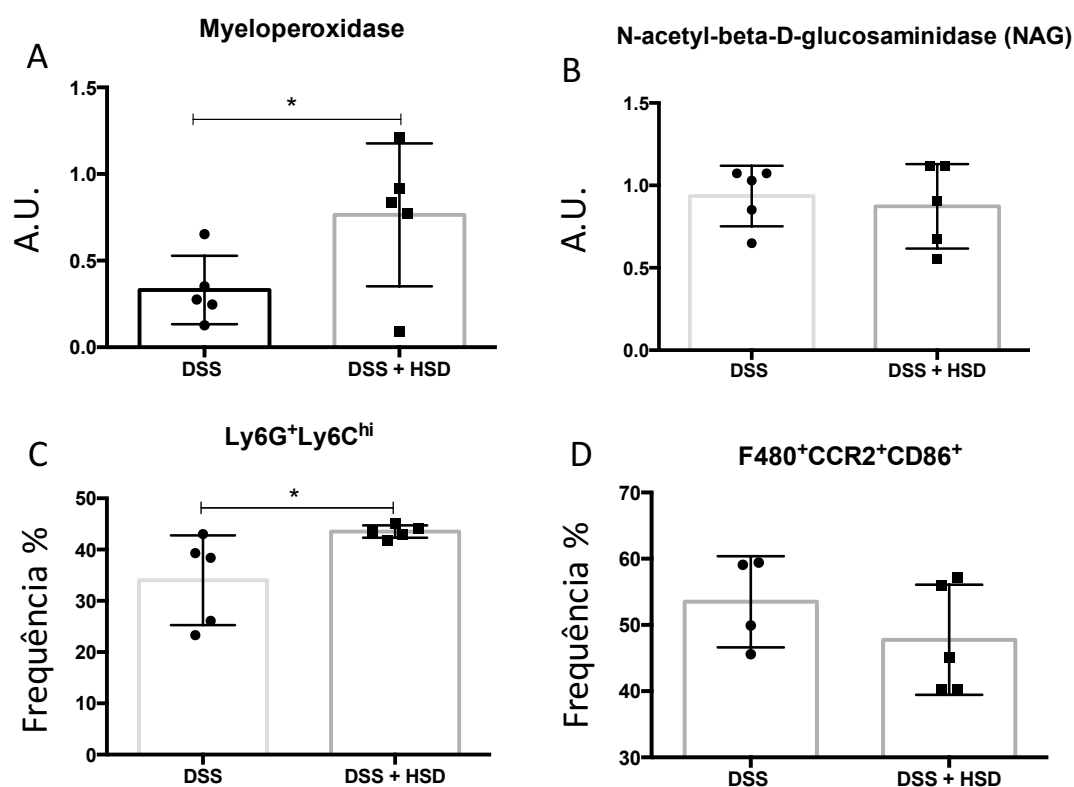
sangramento), menor comprimento de cólon (parâmetro importante para avaliar a gravidade da doença, quanto menor o cólon, mais severa é a colite) e maior perda de peso quando comparados aos camundongos que foram submetidos à administração de DSS mas receberam dieta padrão (Figura 15).



**Figura 15. Avaliação dos efeitos do consumo de dieta rica em sal (HSD) na colite induzida por DSS.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com HSD por 3 semanas. Durante os 7 últimos dias dessas 3 semanas de consumo de dieta rica em sal, foi induzida a colite experimental pela administração de solução contendo 1% de DSS na mamadeira. Os cólons dos animais foram retirados para estudo histológico ao final desse período. Análises histológicas mostram seções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE) em aumento de 4x. (A) Seção histológica do cólon de camundongo do grupo que recebeu DSS e dieta padrão (B) Seção histológica do cólon de camundongo do grupo que recebeu DSS e dieta rica em sal. (C) A avaliação das alterações morfológicas do cólon foi medida por um índice obtido a partir da pontuação dos seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. (D) Avaliação do índice clínico da doença foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos seguintes parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. (E) O comprimento do cólon foi medido com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto e foi representado em centímetros (cm). (F) O ganho/perda de peso dos animais em cada grupo experimental foi calculado a partir da diferença do valor do peso inicial dos camundongos e peso final. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (\*). Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. O nível de significância mínimo foi  $p < 0,05$ .

## O consumo de dieta rica em sal leva ao acúmulo de neutrófilos no cólon de camundongos com colite induzida por DSS

Além de piorar os parâmetros micro e macroscópicos da colite induzida por DSS, a HSD também levou ao aumento de mieloperoxidase no cólon. Essa enzima é produzida por neutrófilos e utilizada como medida indireta da atividade dessas células.



**Figura 16. Quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-beta-D-glicosamidase (NAG) e frequência de neutrófilos e macrófagos no cólon.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com HSD por 3 semanas. Durante os 7 últimos dias dessas 3 semanas de consumo de dieta rica em sal, foi induzida a colite experimental pela administração de solução contendo 1% de DSS na mamadeira. Ao final do tratamento com DSS, os cólons dos animais foram retirados, extratos preparados para quantificação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-beta-D-glicosamidase (NAG) e células colônicas isoladas da lâmina própria para análise por citometria de fluxo. Foi feito um ensaio enzimático e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 500nm. (A) Quantificação da atividade de MPO e (B) NAG. Para verificação da frequência de neutrófilos e macrófagos, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo consideradas as frequências de células neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> e macrófagos F4/80<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (C) Frequência de células Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> nos grupos DSS e DSS + HSD (D) Frequência de células F4/80<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> nos grupos DSS e DSS + HSD. Níveis de significância baseados no Teste *t* de Student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo foi  $p < 0,05$ .

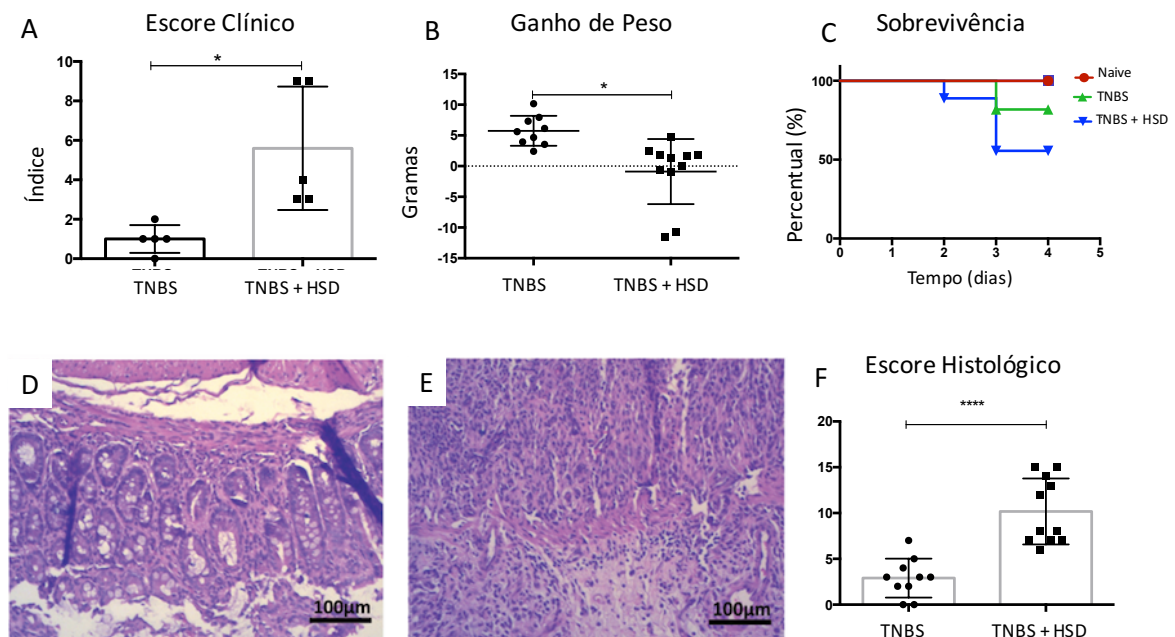
Observamos um aumento nos níveis dessa enzima no cólon de animais que consumiram a dieta HSD por 3 semanas após o consumo de DSS (Figura 13), nos quais a frequência de células colônicas Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> também estava aumentada. Já a N-acetil-beta-glucosamidase (NAG), enzima produzida por macrófagos, não foi alterada com a dieta rica em sal, assim como a frequência de células F4/80<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (macrófagos) também não sofreu alteração (Figura 16).

### **O consumo de dieta rica em sal agravou a colite induzida por TNBS**

Avaliamos também os efeitos do consumo de dieta rica em sal no modelo de colite por TNBS, para verificar a consistência dos nossos resultados. Esse é um modelo de inflamação intestinal no qual a produção de IL-17 tem papel central na patogenia da doença.

Mais uma vez o consumo da dieta rica em sal levou à piora da inflamação intestinal. Assim como na colite induzida por DSS, animais alimentados com HSD tratados com TNBS apresentaram maior escore clínico da doença, menor ganho de peso, maior escore histológico inflamatório, além de reduzida sobrevivência quando comparados aos animais que foram submetidos à administração intrarretal de TNBS, mas receberam dieta padrão (Figura 17).

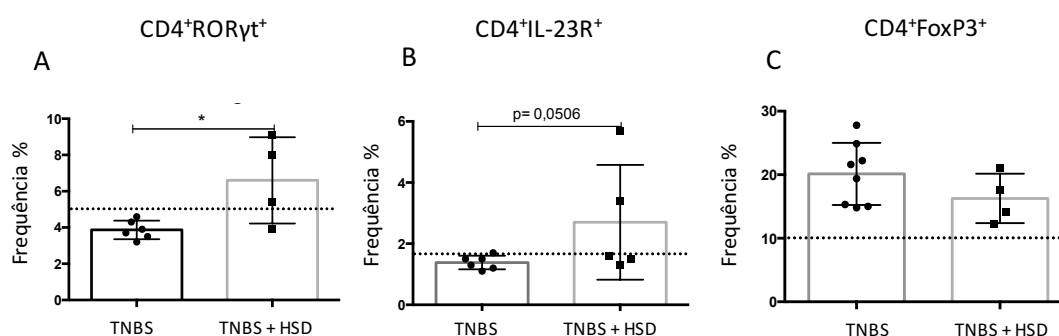




**Figura 17. Avaliação dos efeitos de 3 semanas de dieta rica em sal na colite induzida por TNBS.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) por 3 semanas e, no dia 14 do tempo de consumo da dieta, foram submetidos à administração retal de solução contendo 2,5mg de TNBS em etanol 35% por 7 dias para indução de colite. O índice clínico, o ganho de peso, assim como a sobrevivência dos animais foram acompanhados ao longo do desenvolvimento da colite. Ao final do tratamento com TNBS, os cólons dos animais foram retirados para análise histológica. (A) Avaliação do índice clínico da doença foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. (B) O ganho/perda de peso dos animais em cada grupo experimental foi calculado a partir da diferença do valor do peso inicial dos camundongos e peso final durante os dias a partir da aplicação de TNBS (C) Percentual de sobrevivência dos camundongos após a aplicação do TNBS. Análises histológicas mostram seções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE), foi usado um aumento de 4x. (D) Seção histológica do cólon de camundongo do grupo que recebeu TNBS intrarretal e dieta padrão ou (E) TNBS intrarretal e dieta rica em sal. (F) A avaliação das alterações morfológicas do cólon por um índice obtido a partir da pontuação dos seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (\*). Níveis de significância baseados no Teste *t* de Student. O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## O consumo de dieta rica em sal resultou em alterações no perfil celular no cólon de camundongos com colite indizada por TNBS

Ao verificarmos quais células estavam envolvidas nas alterações inflamatórias observadas, notamos que o consumo da dieta rica em sal (HSD) foi capaz de aumentar a frequência das células T  $CD4^+ROR\gamma t^+$  e de células T  $CD4^+IL23R^+$  no cólon de animais alimentados com essa dieta. Esses dados reforçaram a hipótese de que haveria a participação de células Th17 no processo inflamatório nesse modelo de colite. Contudo, não houve diferença de frequência de células T reguladoras ( $CD4^+Foxp3^+$ ).

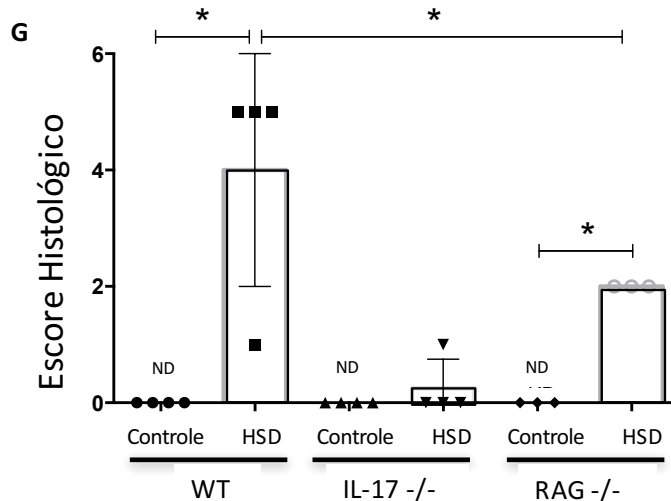
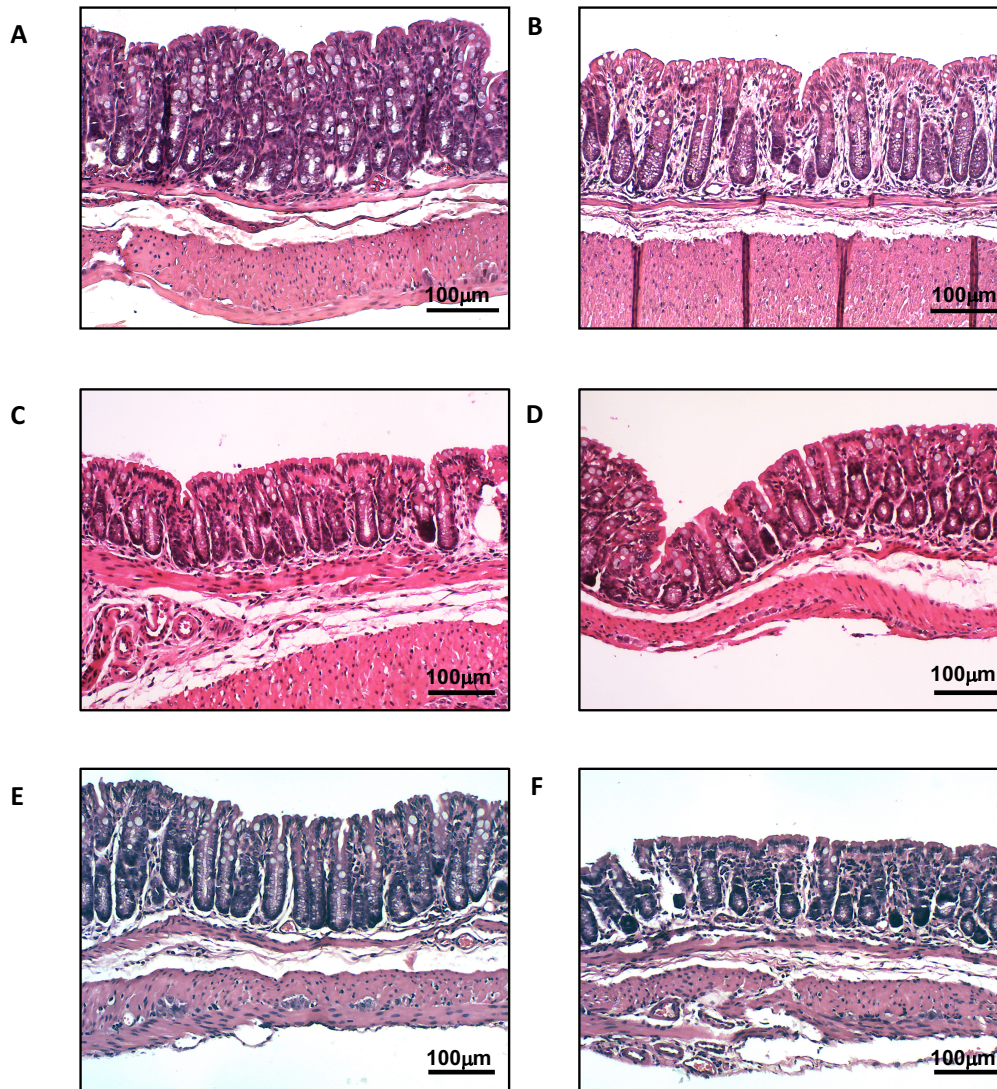


**Figura 18. Avaliação dos efeitos de 3 semanas de dieta rica em sal no perfil celular de camundongos com colite induzida por TNBS.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) por 3 semanas e, no dia 14 do tempo de consumo da dieta, foram submetidos à administração retal de solução contendo 2,5mg de TNBS em etanol 35% por 7 dias para indução de colite. O índice clínico, o ganho de peso, assim como a sobrevivência dos animais foram acompanhados ao longo do desenvolvimento da colite. Ao final do tratamento com TNBS, os cólons dos animais foram retirados e as células da lâmina própria desse tecido isoladas para análise por citometria de fluxo. As frequências de células (A)  $CD4^+ROR\gamma t^+$ , (B)  $CD4^+FoxP3^+$  e (C)  $CD4^+IL-23R^+$  foram avaliadas por citometria de fluxo. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (\*). Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## **O consumo de dieta rica em sal induziu inflamação intestinal por mecanismo dependente de IL-17 e parcialmente dependente de células T**

Após verificarmos que o consumo de HSD foi capaz de levar a uma leve inflamação no cólon de camundongos e que esse processo estava associado ao aumento na produção de IL-23, decidimos investigar o papel da IL-17 na inflamação observada em nosso modelo. Para isso, lançamos mão de camundongos C57BL/6 que não possuem o gene para codificação da citocina IL-17 (IL-17<sup>-/-</sup>). Verificamos que, após 3 semanas de consumo de dieta acrescida de NaCl, os camundongos IL-17<sup>-/-</sup> não apresentaram alterações inflamatórias no cólon quando comparados aos camundongos selvagens (Figuras 16 C, D) sugerindo que os efeitos da dieta rica em sal observados no cólon de camundongos selvagens (Figura 16 A, B) seriam dependentes de IL-17.

As células Th17 são produtoras eficientes de IL-17 e estão presentes em abundância na mucosa intestinal. Em seguida, resolvemos investigar se a inflamação encontrada no cólon seria exclusivamente dependente de células T. Para tal, utilizamos camundongos C57BL/6 RAG<sup>-/-</sup>, que não possuem linfócitos de qualquer tipo (nem B nem T) que foram também alimentados com a dieta adicionada de NaCl durante 3 semanas. Observamos que os camundongos RAG<sup>-/-</sup> alimentados com HSD desenvolveram sinais histológicos de inflamação no cólon quando comparados aos controles (Figura 19 E, F), embora significativamente menos extensos do que aqueles apresentados pelos camundongos selvagens tratados com a mesma dieta (Figura 19 G). Assim, esses resultados sugerem que a inflamação causada pela dieta rica em sal é dependente de IL-17, mas apenas parcialmente dependente de linfócitos Th17.



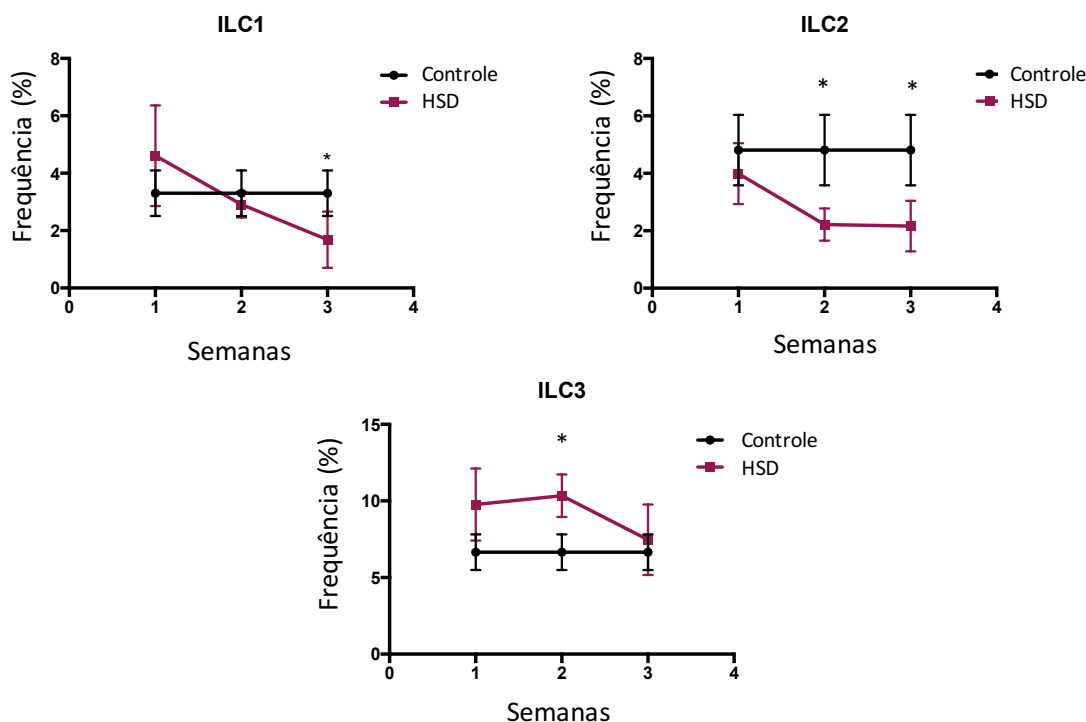
**Figura 19. Consumo de HSD induziu inflamação no cólon de camundongos RAG<sup>-/-</sup> mas não em camundongos IL-17<sup>-/-</sup>.** Camundongos C57BL/6 selvagens (WT), IL-17<sup>-/-</sup> e RAG<sup>-/-</sup> receberam dieta padrão (grupo controle) ou dieta acrescida de 4% de NaCl (HSD) durante 3 semanas. Depois desse período, os cólons desses animais foram retirados e preparados para

exame histológico. Imagens representativas de secções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE) de camundongos WT (A,B), IL-17<sup>-/-</sup> (C,D), RAG<sup>-/-</sup> (E,F) alimentados com a dieta padrão ou com a dieta rica em sal (HSD) respectivamente. Escore histológico dos animais dos mesmos grupos (G). Para o escore, foram considerados os seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Níveis de significância baseados no Teste *t de Student*. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## **O consumo da dieta rica em sal resultou em alterações na frequência de células linfoides inatas (ILCs) na mucosa intestinal**

Por fim, após constatar que as alterações inflamatórias deletérias induzidas pelo consumo de sal não seriam devidas exclusivamente à participação de linfócitos T e ainda com a indicação da dependência da citocina IL-17 nesse processo, decidimos investigar quais células poderiam estar envolvidas além das células T.

Entre as possíveis células também produtoras de IL-17 estão as ILC3 que são muito abundantes na mucosa colônica e estão presentes em frequência aumentada em indivíduos com doenças inflamatórias crônicas do intestino (COCCIA et al, 2012). Analisamos o efeito do consumo da dieta rica em sal na frequência dessas células no cólon dos animais. A dieta rica em sal alterou a frequência de células linfoides inatas (ILCs), sendo que foi observada uma redução das ILC1 nos camundongos que consumiram a dieta acrescida de NaCl no tempo de 2 semanas. A frequência das ILC2 também se mostrou reduzida nos tempos 2 e 3 semanas após a introdução da dieta HSD. Por outro lado, a frequência das ILC3, responsáveis pela produção de IL-17, se apresentou elevada após 2 semanas de dieta rica em sal quando comparado ao grupo que consumiu dieta padrão (Figura 20). Esses resultados estão de acordo com os dados anteriores mostrando que não só as células Th17 seriam responsáveis pela inflamação intestinal causada pela HSD e sugerem que as ILC3 podem ter participação ativa nesse processo.



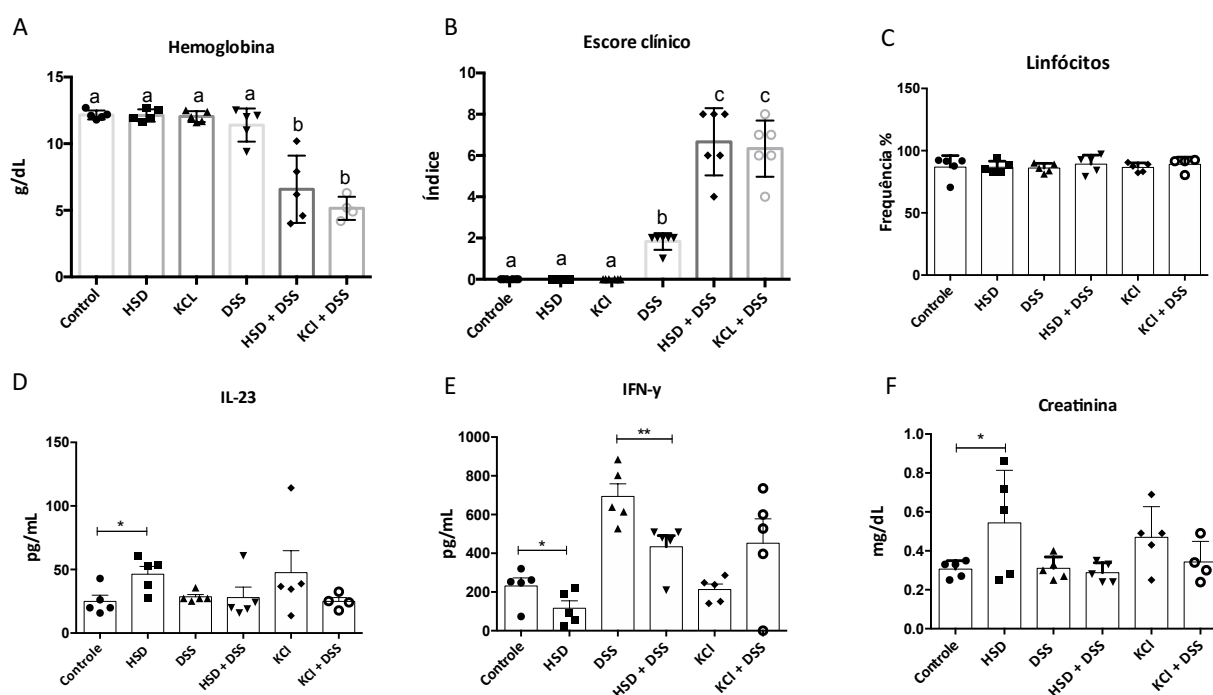
**Figura 20. Avaliação da frequência de ILCs na mucosa colônica.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta rica em sal (HSD) por 3 semanas. Após esse tempo de consumo da dieta, o cólon desses animais foi retirado e as células da lâmina própria isoladas e analisadas por citometria de fluxo. A frequência de células linfoides inatas (ILC) foi considerada a partir das células Lin(CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FcεR1a)<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup> para ILC1 (A); Lin(CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FcεR1a)<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup> para ILC2 (B); Lin(CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FcεR1a)<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>RORγT<sup>+</sup> (C). Os camundongos foram eutanasiados após 1, 2 e 3 semanas de dieta AIN93G (grupo controle) ou dieta rica em sal (grupo HSD). Níveis de significância baseados no Teste *t* de Student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

## O consumo de dieta rica em KCl também levou a alterações na mucosa intestinal de camundongos C57BL/6

Considerando os resultados obtidos com a dieta rica em NaCl, resolvemos investigar se as alterações observadas após a ingestão de altas concentrações de cloreto de sódio seriam exclusivas desse sal ou poderiam ocorrer na presença de um composto distinto. Para isso, utilizamos o cloreto de potássio (KCl) como sal controle nesse experimento. Analisamos tanto o cólon de camundongos alimentados com dieta



rica em KCl sem colite quanto aqueles alimentados com essa dieta e que receberam solução contendo 1% DSS na mamadeira. Observamos que os camundongos que receberam o cloreto de potássio também apresentaram algumas alterações decorrentes da dieta. Os animais do grupo KCl + DSS, assim como aqueles do grupo NaCl + DSS, apresentaram escore clínico aumentado da doença do que os animais que receberam dieta padrão. Também foi observada redução de hemoglobina nos dois grupos submetidos com colite induzida por DSS, o que pode ter ocorrido devido ao intenso sangramento retal presente nos animais desses grupos (Figura 22).



**Figura 22. Alterações em camundongos C57BL/6 após consumo de dieta rica em KCl.** Camundongos C57BL/6 submetidos à dieta padrão e sem colite (grupo controle), ou submetidos à dieta HSD (rica em NaCl) mas sem colite (grupo HSD), camundongos submetidos à dieta rica em KCl mas sem colite (grupo KCl), camundongos que receberam dieta padrão e DSS 1% na mamadeira durante 7 dias (grupo DSS), camundongos que receberam dieta rica em NaCl e DSS 1% durante 7 dias (grupo HSD + DSS) e camundongos que receberam dieta rica em KCl e DSS % durante 7 dias (grupos KCl + DSS) foram submetidos a um protocolo de 3 semanas e foram eutanasiados ao final. (A) Hemoglobina (B) O índice clínico da doença foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento (C) Linfócitos totais. As citocinas IL-23 (D) e IFN- $\gamma$  (E) foram mensuradas em extrato de tecido através da técnica de ELISA (F) Creatinina plasmática. Níveis de significância baseados no Teste *t* de Student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (\*). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ .

Com o mesmo propósito, foram testadas ainda uma dieta rica em  $MgCl_2$  e outra dieta com acréscimo de manitol (dados não mostrados). Após o consumo de ambas as dietas pelo período de 3 semanas, os camundongos ficaram gravemente doentes e não foi possível dar continuidade aos experimentos. Embora os dados desses experimentos não estejam analisados, os resultados preliminares mostraram que esses agentes também tiveram efeito deletério quando administrados em excesso na dieta dos animais.



## DISCUSSÃO

---

## DISCUSSÃO

O conhecimento acerca da associação da dieta rica em cloreto de sódio com doenças cardiovasculares, hipertensão [arterial](#), danos aos rins, com possível declínio nas funções renais, já está bem estabelecido (OHTA et al, 2013). Contudo, pouco se sabe sobre a influência da dieta rica em sal em fatores imunológicos. Em 2013, dois trabalhos importantes foram publicados mostrando uma associação inédita entre aumento na concentração de NaCl e desenvolvimento de células Th17. Esses estudos mostraram ainda que o consumo de uma dieta com acréscimo de NaCl resultava no agravamento de uma doença autoimune, a Esclerose Autoimune Experimental (EAE) em camundongos (KLEINWIETFIELD et al, 2013; WU et al, 2013). A partir de então, alguns autores têm tentado mostrar os mecanismos envolvidos nesse processo (BINGER et al, 2015; TUBBS et al, 2017; WEI et al, 2017; WILLEBRAND and KLEINWIETFIELD, 2018).

Considerando que o primeiro contato dos componentes dietéticos é o intestino, no presente estudo, decidimos investigar a influência do consumo de dieta rica em sal na mucosa colônica de camundongos. Alguns estudos recentes mostraram que a administração de uma dieta rica em sal (HSD), além de induzir a diferenciação de células Th17, também foi capaz de agravar a colite experimental em camundongos por meio da via de sinalização da SGK1 (WEI et al, 2017; MONTELEONE et al, 2017; TUBBS et al, 2017). Entretanto, nenhum desses estudos examinou o efeito danoso direto causado pelo NaCl na mucosa colônica sem indução prévia de inflamação. Além disso, todos eles propõem as células Th17 como únicas responsáveis pela inflamação dependente de IL-17 causada pelas altas concentrações de cloreto de sódio.

No presente estudo, utilizamos uma dieta com concentração elevada de NaCl (4%) que nomeamos de dieta rica em sal (HSD). Esse teor de NaCl é o mesmo utilizado por diferentes autores em trabalhos anteriores (KLEINWIETFIELD et al, 2013; TUBBS et al, 2017). Inicialmente, demonstramos que o consumo da dieta rica em sal por 3 semanas resultou em elevação da pressão arterial média dos camundongos quando comparados aos animais que consumiram a dieta padrão. Esse resultado mostrou que a dieta utilizada neste estudo resultou em efeitos biológicos esperados para uma dieta com alto teor de NaCl, visto que já é bem estabelecido que a

ingestão de sódio além do recomendado pode levar ao desenvolvimento de hipertensão arterial (FARQUHAR et al, 2015).

Com relação aos seus efeitos diretos na mucosa do intestino, observamos que o consumo de HSD por 3 semanas levou a uma leve inflamação na mucosa do cólon de camundongos C57BL/6 constatada pela depleção de células caliciformes, ulceração, erosão, destruição da camada muscular da mucosa bem como edema na camada submucosa. Além disso, os camundongos alimentados com HSD também apresentaram aumento na permeabilidade intestinal, outro sinal típico de inflamação intestinal (ANTONI et al, 2014).

Os efeitos inflamatórios desencadeados pelo consumo da dieta rica em NaCl (HSD) na mucosa do cólon incluíram ainda produção de grandes quantidades de IL-23, mas não de IFN- $\gamma$ , frequência aumentada de células T CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> e de neutrófilos, sugerindo a ativação local do eixo de sinalização da citocina IL-17. Confirmando essa hipótese e a dependência dessa citocina para o desencadeamento do processo inflamatório no nosso modelo, não foram detectados sinais de inflamação no cólon de camundongos C57BL/6 deficientes para IL-17. Todos os estudos até o momento sobre o papel de dietas ricas em sal (NaCl) na EAE ou em modelos de colite, mostram a participação essencial da IL-17 nesse processo e atribuem às células Th17 a produção exclusiva dessa citocina no processo (KLEINWITZFELD et al, 2013). No entanto, vale lembrar ainda que a IL-23 é uma citocina importante para o desenvolvimento e estabilização de células Th17 e também para as células linfoides inatas do tipo 3 produtoras de IL-17 (HARRINGTON et al, 2005). Além disto, ambas as populações celulares, Th17 e ILC3, são muito abundantes na mucosa intestinal (UENO et al, 2017; MAO et al, 2018).

Para averiguar se a IL-17 necessária para o processo de inflamação intestinal induzida pela HSD provinha exclusivamente de células Th17, testamos os efeitos do consumo da dieta em camundongos RAG<sup>-/-</sup>, que não produzem linfócitos B nem linfócitos T. Após 3 semanas de consumo de HSD, esses camundongos desenvolveram uma inflamação identificável histologicamente na mucosa colônica indicando que as células T não são necessárias para o processo inflamatório desencadeado pela dieta acrescida de sal. No entanto, essas alterações eram de uma intensidade significativamente menor que aquelas apresentadas pelos camundongos selvagens. Esse resultado demonstrou, assim, que embora as células Th17 sejam

importantes nos efeitos inflamatórios da HSD, outras células participavam do processo. Além disto, observamos que o consumo da dieta rica em sal induziu o aumento da frequência de células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) na lâmina própria colônica. Esse aumento ocorreu concomitantemente com a redução na frequência de ILC1 e ILC2, o que pode ter acontecido devido a um mecanismo compensatório. As ILC3 são conhecidas por terem funções homólogas às células Th17, sendo produtoras de IL-17, IL-22 e desenvolvidas na presença de IL-23 além de serem dependentes do fator de transcrição ROR $\gamma$ t. De maneira análoga, as ILC1 são ditas como as versões inatas das Th1 e as ILC2 das células Th2 (GASTEIGER and RUDENSKY, 2014). Assim como as Th17, as ILC3 são muito abundantes na mucosa do intestino e apresentam funções de homeostase ao produzirem IL-22/IL-17 em resposta a IL-23 e IL-1 $\beta$  (FORKEL and MJOSBERG, 2016). Contudo, em situações de quebra da homeostase, as ILC3 podem induzir efeitos patogênicos na mucosa como é o caso das doenças inflamatórias intestinais nas quais a frequência de ILC3 está muito aumentada (PEARSON et al, 2016). Atualmente, o papel das ILCs na patogênese de doenças inflamatórias intestinais já é bem estudado e essas células já são consideradas potenciais alvos terapêuticos para o tratamento dessas doenças (XIONG and TURNER, 2018). O papel das ILCs também está descrito em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal associado com dano epitelial e secreção de IL-1 $\beta$  por células intestinais epiteliais. Quantidades excessivas de cloreto de sódio podem agir diretamente nas células epiteliais intestinais estimulando a secreção de IL-1 $\beta$ . Foi relatado que essa citocina promove a resposta imune inata na inflamação intestinal desencadeada por *Helicobacter hepaticus* por meio do recrutamento de granulócitos e acúmulo e ativação de ILCs. Nesse estudo, a IL-1 $\beta$  promoveu resposta Th17 tanto por meio de células CD4<sup>+</sup>Th17 quanto por ILC3 no intestino, e uma relação de sinergia entre os sinais de IL-1 $\beta$  e IL-23 sustentou as respostas inatas e adaptativas no intestino (COCCIA et al, 2012). No nosso caso, a participação de células Th17 nos efeitos induzidos pela HSD é clara, visto que o escore histológico de camundongos RAG<sup>-/-</sup> é mais baixo do que de camundongos selvagens. Entretanto, nossos resultados também mostraram que a inflamação intestinal dependente de IL-17 após consumo de HSD continua ocorrendo na ausência de linfócitos. Assim, o mais provável é que ambas as células, Th17 e ILC3, participem da inflamação desencadeada pela dieta rica em sal no nosso modelo.

É sabido que a IL-17 induz a liberação células epiteliais e endoteliais a liberarem quimiocinas e outros quimioatrativos, o que aumenta a resposta inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos (LAAN et al, 1999). Efeitos protetores da IL-17, nas doenças inflamatórias por exemplo, também são reportados. Essa dicotomia foi recentemente explicada pela observação de que a IL-17 promove a função de barreira intestinal na ausência de IL-23 (MAXWELL et al, 2015; LEE et al, 2015). Conseqüentemente, a produção de IL-17 independente de IL-23 é considerada protetora, enquanto a produção de IL-17 na presença da IL-23 pode ser deletéria. No nosso estudo, a inflamação causada pela HSD aconteceu de forma associada com o aumento da produção de IL-23 assim como na presença de aumento da frequência de células CD4<sup>+</sup> expressando o receptor IL-23R da citocina e de ILC3, o que nos sugere um papel patogênico dessas células no cólon dos camundongos. Ao mesmo tempo, não foram encontradas alterações nas frequências de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) na mucosa do cólon de camundongos alimentados com dieta rica em NaCl.

Dois estudos provavelmente iniciados concomitantemente ao nosso, mas publicados antes, mostram que o consumo da dieta rica em sal (NaCl) pode levar ao agravamento da colite experimental (WEI et al, 2017; TUBBS et al, 2017). Wei e colaboradores, utilizando um modelo de colite experimental induzida por TNBS, mostraram que o consumo de dieta rica em sal (4% NaCl), foi capaz de exacerbar a inflamação intestinal e que esse efeito estava associado ao aumento na produção de IL-17 e da frequência de células Th17. Além disto, o consumo da dieta inibiu a capacidade supressora das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e a produção de IL-10 no cólon (WEI et al, 2017). Tubbs e colaboradores também mostraram o potencial de exacerbação da inflamação intestinal em camundongos deficientes de IL-10 que desenvolvem espontaneamente colite, na colite induzida por DSS e também em camundongos infectados com *Salmonella typhimurium*. A inflamação da mucosa colônica foi agravada pelo consumo de dieta rica em sal por um mecanismo envolvendo a via de sinalização de TLR4 via MAPK e SGK1 (TUBBS et al, 2017). Nesses trabalhos a concentração de NaCl utilizada na dieta, assim como o tempo de consumo foram semelhantes ao que utilizamos no nosso estudo.

Em nosso estudo, o consumo de HSD também agravou a colite induzida tanto por DSS quanto por TNBS em camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente.

Investigando os mecanismos envolvidos na exacerbação da colite, observamos que o efeito estava associado à diferenciação de células Th17, com aumento da expressão de IL-23R e do fator de transcrição ROR $\gamma$ t por células T CD4<sup>+</sup>, como anteriormente descrito para os efeitos do consumo da HSD no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (KLEINWIETFIELD et al, 2013).

Em nenhum dos estudos anteriores, no entanto, foi examinado o efeito da HSD na mucosa intestinal íntegra como mostramos. Nossa hipótese é que o evento inflamatório inicial desencadeado pelo consumo da HSD seja um gatilho precoce que deixaria a mucosa colônica predisposta a um aumento da produção de IL-17. Um segundo insulto como o DSS ou TNBS teria seu efeito inflamatório, então, potenciado. Nossos dados sugerem ainda que o evento inicial desencadeado na mucosa íntegra seria dependente de IL-17 produzida tanto por ILC3 quanto de células Th17.

Como citado anteriormente, alguns estudos já relacionaram a diferenciação das células Th17 com o agravamento da colite experimental após o consumo de HSD (WEI et al, 2017; MONTELEONE et al, 2017; TUBBS et al, 2017). No entanto, nosso trabalho foi o único até o momento mostrando que, além das células T, outras células, como as ILC3, também estão envolvidas na inflamação intestinal desencadeada pelo consumo de sal. Considerando que as ILCs são a versão inata das células Th e que ambas estão envolvidas na produção de IL-17, é muito plausível que essas células tenham participação no processo inflamatório que se seguiu à ingestão crônica de NaCl. É também possível que os receptores e a via de sinalização utilizada por esses dois subtipos celulares, Th17 e ILC3, sejam compartilhados. Essa é uma hipótese ainda a ser testada.

Já foi descrito que as células Th17 são induzidas pela HSD por meio da via de sinalização da enzima SGK1 (*serum and glucocorticoid kinase*) (KLEINWIETFIELD et al, 2013; WU et al, 2013). A habilidade das células em detectar mudanças dinâmicas em seu ambiente e de então montar respostas fisiologicamente apropriadas requer comunicação entre moléculas reguladoras que podem integrar de maneira coordenada os sinais intracelulares que emanam de diferentes cascatas de sinalização de receptores. A SGK1, como um desses componentes intracelulares, é reconhecida como um interruptor crítico dependente de estímulo, que controla as respostas celulares a uma variedade de sinais extracelulares

distintos. Estudos recentes têm implicado o papel da SGK1 na transdução de sinais vitais para a sobrevivência celular e respostas proliferativas (WEBSTER et al, 1993; BUSE et al, 1999; MIKOSZ et al, 2001; XU et al, 2001), no controle da atividade do canal de sódio epitelial (ENaC) e na homeostase do sódio na nefropatia associada à diabetes (KUMAR et al, 1999; LANG et al, 2000), bem como na doença inflamatória (FILLON et al., 2002) e na reparação de feridas por fibroblastos (IYER et al, 1999). A SGK1 tem sido associada à função de vários canais iônicos, como o canal de cloreto dependente de regulador transmembrana da fibrose cística (WAGNER et al, 2001) e certos canais de potássio dependentes de voltagem envolvidos na excitabilidade neuronal (WÄRNTGES et al, 2002), além do ENaC. Consistente com sua função osmorregulatória adaptativa, um estudo mostrou que camundongos deficientes para SGK1 apresentam capacidade prejudicada de diminuir adequadamente a excreção de  $\text{Na}^+$  durante a restrição dietética de NaCl (WULFF et al., 2002).

Em nosso estudo, analisamos a expressão da SGK1 em extratos do cólon dos camundongos em diferentes momentos: 90 minutos após gavagem gástrica de solução rica em NaCl (50%) e em diversos tempos após o consumo de dieta rica em sal (24h, 36h, 48h, 72h, 120h e 3 semanas). Surpreendentemente, não observamos aumento na expressão de SGK1, apenas uma tendência de aumento no tempo de 90 minutos e redução significativa após 3 semanas de dieta. A SGK1 é uma enzima de ação precoce, sua expressão aumenta a partir do estado de repouso em poucos minutos (CORIC et al, 2004), sendo que esse efeito ocorre logo após o consumo de elevadas quantidades de sal. Isto sugere que a ativação de SGK1, assim como outros pontos da sua via de sinalização, podem participar dos efeitos inflamatórios da HSD, especialmente no caso do envolvimento de ILCs, mas em momentos iniciais do processo. Além disso, a expressão de SGK1 pode aumentar após alguns minutos de consumo de HSD e depois ser revertida por meio de um mecanismo compensatório, o que explicaria a redução de SGK1 no grupo que consumiu HSD por 3 semanas no presente estudo. Os resultados de análises da associação de HSD e expressão de SGK1 também são ambíguos em outros estudos. Em um estudo utilizando ratos, os autores detectaram a redução de SGK1 em resposta ao consumo de HSD, enquanto que, em outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo, ratos alimentados durante 5 semanas com HSD não apresentaram diferenças na expressão de SGK1 (CORIC et al, 2004; BHARGAVA et al, 2001). Em trabalho similar investigando os efeitos de dieta

rica em sal, a expressão de SGK1 estava reduzida em cólon de animais após adrenalectomia, mas permaneceu inalterada com depleção de sódio ou injeção de aldosterona (SHIGAEV et al, 2000). Outros autores, no entanto, relataram aumento da expressão dessa enzima sob as mesmas condições (LIENHARD et al, 2012; PEARCE and KLEYMAN, 2007).

Em nosso estudo, o consumo de dietas contendo altas concentrações de outros sais como cloreto de potássio também levou à exacerbação da colite induzida por DSS, sugerindo que o cloreto de sódio e a ativação de SGK1 podem não ser os únicos mecanismos desencadeadores da inflamação por HSD. Avaliamos alterações provocadas pelo KCl com o intuito de verificar se inflamação decorrente do consumo aumentado de NaCl seria exclusivo desse sal. Observamos resultados semelhantes com relação ao escore clínico, citocinas e hemograma. Uma possível justificativa para a semelhança nos resultados obtidos com o KCl e o NaCl seria a WNK (*with no lysine K*) uma proteína quinase deficiente em lisina presente em todos os eucariotos que apresenta conexões com transportadores e canais de íons, co-transportadores de KCl e NaCl, canal renal de potássio e canal epitelial de sódio (ENaC). Sabe-se que a WNK ativa outras proteínas quinases que modulam o transporte de íons, inclusive a SGK1 (XU et al, 2005).

Testamos ainda o efeito do consumo de uma dieta rica em MgCl<sub>2</sub> na colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6 para avaliarmos um sal sem influência do potássio que poderia estar ativando a WNK e outra dieta com acréscimo de manitol para avaliarmos os efeitos da osmolalidade (dados não mostrados). Após o tratamento por 3 semanas com ambas as dietas, os camundongos foram desafiados com solução contendo 1% de DSS por 7 dias para avaliar o efeito dessas dietas na colite experimental. Os animais ficaram gravemente doentes e não foi possível dar continuidade aos experimentos. Aparentemente então, essa dieta também levou a um agravamento da colite embora os resultados sejam preliminares. Nos estudos conduzidos por Kleinewietfeld e colaboradores mostrando a piora da EAE após aumento de NaCl na dieta, a dieta rica em MgCl<sub>2</sub> não levou ao agravamento da doença da mesma maneira que o NaCl (KLEINEWIETFELD et al, 2013). No nosso caso, precisamos investigar se outras moléculas podem desencadear as alterações inflamatórias causadas pelo NaCl. Além da osmolaridade e do sal utilizado, ainda há outros fatores que podem estar envolvidos no desencadeamento da inflamação. Um



estudo recente mostrou que o alto consumo de sal induz ativação de Th17 e à piora de EAE (Encefalomielite autoimune experimental) ao afetar a microbiota intestinal, particularmente ao depletar *Lactobacillus murinus* (WILCK et al, 2017). Além do mais, parece existir mais do que um mecanismo ativado após a ingestão de altas concentrações de NaCl resultando em eventos inflamatórios dependentes de IL-17. Assim, não podemos excluir a possibilidade de que a mudança da microbiota intestinal ocasionada pelo consumo de grandes quantidades de sal também estaria agindo na indução de inflamação intestinal e na piora da colite no nosso modelo.

Não realizamos a análise de microbiota nos camundongos submetidos ao consumo de HSD, mas outros autores já demonstraram que a microbiota pode responder a flutuações na composição da dieta, levando a alterações na microbiota intestinal. Miranda e colaboradores mostraram que a exacerbação da colite experimental pela dieta rica em sal (HSD) foi associada com a redução de *Lactobacillus sp* e redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os autores acreditam que essas mudanças alteraram a homeostase do sistema imune intestinal levando a uma maior vulnerabilidade e à ocorrência de inflamação (MIRANDA et al, 2018). As células Th17 são particularmente afetadas pela abundância de bactérias comensais. Ivanov e colaboradores mostraram que a colonização do cólon de camundongos com um único tipo de microorganismo comensal, a bactéria filamentosa segmentada (SFB), é suficiente para induzir o desenvolvimento de células Th17 produtoras de IL-17 e IL-22 na lâmina própria. O SFB adere firmemente à superfície das células epiteliais no íleo terminal de camundongos com células Th17, mas está ausente dos camundongos que possuem poucas células Th17. A colonização com SFB foi correlacionada com o aumento da expressão de genes associados à inflamação e defesas antimicrobianas (IVANOV et al, 2009). Outro estudo, publicado em 2017 na *Nature*, demonstra que a dieta rica em sal afeta o microbioma intestinal em camundongos, particularmente depletando *Lactobacillus murinus*. Em humanos, esses autores observaram que a HSD levou à redução de *Lactobacillus sp*, aumento da frequência de células Th17, além do aumento de hipertensão arterial (WILCK et al, 2017). Esses resultados sugerem uma conexão entre alta ingestão de sal e o eixo sistema imune intestinal com ênfase no microbioma intestinal como potencial alvo terapêutico. Ainda nesse sentido, Gury-Benari e colaboradores discutem que a população de ILCs do intestino podem agir de

formas muito mais diversas do que pensamos e essa plasticidade de ação requer constante sinalização pela microbiota local. Seus resultados sugerem que a colonização comensal no estado de homeostase pode suprimir os elementos reguladores envolvidos na determinação do destino das ILC3 e a execução do programa transcricional associado, ou seja, a microbiota no estado de homeostase pode inibir a ação patogênica das ILC3 (GURY-BENARI et al, 2016). Diante dos dados recentes disponíveis na literatura, podemos supor que as alterações na homeostase do sistema imune, o aumento da frequência de Th17 e ILC3 e a piora da colite observadas no nosso podem também estar associados a alteração na microbiota.

Observamos também que animais submetidos ao consumo crônico de dieta rica em sal apresentavam níveis reduzidos de IgA secretória no cólon. Sabemos que a IgA é uma imunoglobulina importante na proteção da mucosa intestinal e no estabelecimento da tolerância imunológica. Mudanças na composição da microbiota intestinal podem desencadear alterações nas respostas imunes de diversas maneiras, incluindo efeitos na maturação e na produção de anticorpos por células B (PETTA et al, 2018). Galdeano e Perdigon, em 2006, e Holsher, em 2012, mostraram que a administração de *Lactobacillus casei* levou ao aumento da frequência de células B produtoras de IgA (GALDEANO and PERDIGON, 2006; HOLSCHER et al, 2012). Assim, a redução na produção de IgA no cólon de animais alimentados com HSD pode ser o resultado do impacto dessa dieta na microbiota intestinal.

Ainda há muito o que explorar nessa área. Um dos desafios é definir qual evento desencadeia qual: dieta rica em sal altera a microbiota levando a alterações imunes como o incremento na frequência de células Th17 e ILC3 assim como redução na IgA secretória? Ou, alternativamente, tais alterações imunológicas são diretamente induzidas pela dieta e podem inclusive levar a mudanças na microbiota?

O alto teor de sódio na dieta ocidental e os resultados surpreendentes dos últimos anos sobre os efeitos inflamatórios do sal criam a necessidade de estudos mais avançados no tema. Será importante determinar se os efeitos do sal abrangem outras doenças crônicas. Lanaspá e colaboradores mostraram, por exemplo, que a dieta rica em sal pode facilitar o desenvolvimento de doenças como obesidade e diabetes tipo 2 levando ao aumento da produção de leptina, além de resistência à leptina (que antecede o ganho de peso) (LANASPA et al, 2018).

Nossos achados, juntamente com os trabalhos recentemente publicados que investigam a ação do cloreto de sódio no sistema imune apresentam o sal como um agente cujas diversas ações em sistemas biológicos merecem investigação mais detalhada.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

---

## Conclusão

Nossos resultados indicam que o consumo de dieta rica em sal (NaCl) foi capaz de iniciar um processo inflamatório na mucosa colônica de camundongos e de exacerbar o desenvolvimento da colite experimental. As alterações induzidas por HSD foram associadas ao aumento na frequência de células T CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> e também de células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3). A inflamação induzida pela HSD foi dependente de IL-17, mas apenas parcialmente dependente de linfócitos.

## Perspectivas

Os efeitos das altas concentrações de sal no sistema imune e no desenvolvimento de doenças inflamatórias é um fenômeno que merece ser investigado mais detalhadamente pelo potencial de descobertas que ele anuncia.

Nosso grupo pretende investigar outros aspectos da ação do cloreto de sódio na mucosa intestinal e no sistema imune. As próximas perspectivas para nosso trabalho são as seguintes:

- ✓ Esclarecer melhor o papel da SGK1 no desenvolvimento das células Th17, investigando diferentes tempos;
- ✓ Esclarecer a participação das ILC3 nos efeitos do sal na mucosa intestinal utilizando camundongos C57BL/6 deficientes no gene que codifica a cadeia  $\gamma$ c comum dos receptores de citocinas IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (esses animais não possuem linfócitos nem ILCs);
- ✓ Investigar se a via de sinalização utilizada pelo NaCl nas células Th17 é a mesma utilizada nas ILC3;
- ✓ Analisar as medidas de IL-17 no cólon dos camundongos que foram submetidos à dieta rica em sal;
- ✓ Avaliar os efeitos da dieta rica em sal no intestino delgado;
- ✓ Analisar se a depleção da microbiota (por coquetel de antibióticos) altera a ação inflamatória da dieta rica em NaCl na mucosa íntegra;

- ✓ Investigar os efeitos do alto consumo de sal na obesidade, diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2.

## BIBLIOGRAFIA

---

## Bibliografia

AHMED, Shakil et al. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7435-7442, 2007.

ALDERMAN, MH: Reducing dietary sodium: the case for caution. **JAMA** 303:448-449, 2010.

AMARAL, Joana F. et al. Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 455-464, 2010.

ANTONI, Lena et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 5, p. 1165, 2014.

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

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

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO (Abia, et al: Cenário do consumo de sódio no Brasil. **Abia – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação**, 2013.

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

AZEVEDO, V., MIYOSHI, A, FARIA, A. M. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. **Journal of Autoimmunity**, v. 40, p. 45-57, 2012.

BANCROFT, A. J., MCKENZIE, A. N. and GRENCIS, R. K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3453-3461, 1998.

BAUMGART, D. C., CARDING, S. R. Inflammatory Bowel Disease: cause and immunobiology. **Lancet**, n. 369, v. 9573, p. 1627-40, 2007.

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



BAILEY JL, SANDS JM, FRANCH HA: Water, electrolytes, and acid-base metabolism; in Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR (eds): **Modern Nutrition in Health and Disease**, ed 11. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014, pp 102– 132.

BASU, Rajatava et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the T H 17 cell–iT reg cell balance. **Nature immunology**, v. 16, n. 3, p. 286, 2015.

BEATTY, D. W. et al. Secretory IgA synthesis in Kwashiorkor. **Journal of clinical & laboratory immunology**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 1983.

BELKAID, Yasmine; HAND, Timothy W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.

BELL, Lisa M. et al. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum-and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 33, p. 25262-25272, 2000.

BERNINK, Jochem; MJÖSBORG, Jenny; SPITS, Hergen. Th1- and Th2- like subsets of innate lymphoid cells. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 133-138, 2013.

BERNINK, J. H., PETERS, C. P., MUNNEKE, M., TE VELDE, A. A., MEIJER, S. L., WEIJER, K. et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nature Immunology**, v.14, p. 221-9, 2013.

BERTINO, Mary; BEAUCHAMP, Gary K.; ENGELMAN, Karl. Long-term reduction in dietary sodium alters the taste of salt. **The American journal of clinical nutrition**, v. 36, n. 6, p. 1134-1144, 1982.

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

BHARGAVA, A., FULLERTON, M. J., MYLES, K., PURDY, T. M., FUNDER, J. W., PEARCE, D., et al. The serum- and glucocorticoid induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*, v. 142, p. 1587-94, 2001.

BHAUMIK, Suniti; BASU, Rajatava. Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 254, 2017.

BETTELLI, Estelle et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235, 2006.

- BINGER, Katrina J. et al. Sodium chloride, SGK1, and Th17 activation. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 467, n. 3, p. 543-550, 2015.
- BRAGULAT, E. and DE LA SIERRA, A. Salt intake, endothelial dysfunction, and salt sensitive hypertension. **Journal of Clinica Hypertension**, v. 4, n. 1, p. 41-46, 2002.
- BRANDTZAEG, Per. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 1, p. S5-S18, 1998.
- BRANDTZAEG, Lars Helgeland, Per. Development and function of intestinal B and T cells. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. 2, p. 110-127, 2000.
- BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scandinavian journal of immunology**, v. 70, n. 6, p. 505-515, 2009.
- BROWN, I. J. et al. Salt intakes around the world: implications for public health. **International journal of epidemiology**, v. 38, n. 3, p. 791-813, 2009.
- BONGERS, Gerold et al. Interplay of host microbiota, genetic perturbations, and inflammation promotes local development of intestinal neoplasms in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 3, p. 457-472, 2014.
- BUONOCORE, S. et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-2-dependent innate intestinal pathology. **Nature** v. 464, P. 1371–1375, 2010.
- BUSE, Patricia et al. Cell Cycle and Hormonal Control of Nuclear-Cytoplasmic Localization of the Serum-and Glucocorticoid-inducible Protein Kinase, Sgk, in Mammary Tumor Cells A NOVEL CONVERGENCE POINT OF ANTI-PROLIFERATIVE AND PROLIFERATIVE CELL SIGNALING PATHWAYS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7253-7263, 1999.
- CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.
- CANNON, Walter Bradford et al. Some aspects of the physiology of animals surviving complete exclusion of sympathetic nerve impulses. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 89, n. 1, p. 84-107, 1929.
- CARIO, E.; GERKEN, G.; PODOLSKY, D. K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1359-1374, 2007.
- CAUVAIN, S. P. et al. Reduced salt in bread and other baked products. **Reducing salt in foods: Practical strategies**, p. 283-295, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION- CDC. Rotavirus Surveillance Worldwide, 2001-2008. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023263>. Acesso em: 01 fev 2018.

CELLA et al., M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. **Nature**, v. 457, p. 722-725, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. Vital signs: food categories contributing the most to sodium consumption-United States, 2007-2008. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 61, n. 5, p. 92, 2012.

CHEN, S., GRIGSBY, C. L., LAW, C. S., NI, X. NEKREP, N., OLSEN, K., HUMPHREYS, M. H., GARDNER, D. G. Tonicity-dependent induction of SGK1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1647-1658, 2009.

CLEVERS, H. C. and BEVINS, C. L. Paneth cells: Maestros of the small intestine crypts. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 289-311, 2013.

CHANDRA, Ranjit Kumar. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **The Journal of nutrition**, v. 122, n. suppl\_3, p. 597-600, 1992.

CHANG, Y. J. et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 12, p. 631-638, 2011.

CHERRIER, Marie; SAWA, Shinichiro; EBERL, Gérard. Notch, Id2, and ROR $\gamma$ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 4, p. 729-740, 2012.

CHOI, J. H. Banks AS Estall JL Kajimura S. Bostrom P. Laznik D. Ruas JL Chalmers MJ Kamenecka TM Bluher M. Griffin PR Spiegelman BM Anti-diabetic drugs inhibit obesitylinked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. **Nature**, v. 466, p. 451-456, 2010.

COCCIA, Margherita et al. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4<sup>+</sup> Th17 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 9, p. 1595-1609, 2012.

COHEN, Philip. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. **Trends in cell biology**, v. 7, n. 9, p. 353-361, 1997.

CONNELLY, T. M., BERG, A. S., HARRIS, L. III, BRINTON, D. DEILING, S., KOLTUN, W. A. Genetic determinants associated with early age of diagnosis of IBD. **Diseases of the colon and rectum**, v. 58, n. 3, p. 321-7, 2015.

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

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

CORNES, J. S. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. **Gut**, v. 6, n. 3, p. 225, 1965.

CORIC, T., HERNANDEZ, N., ALVAREZ DE LA ROSA, D., SHAO, D., WANG, T., CANESSA, C. M. Expression of ENaC and serum-glucocorticoid induced kinase 1 in the rat intestinal epithelium. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, p. 663-70, 2004.

CROSNIER, Cécile; STAMATAKI, Despina; LEWIS, Julian. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349, 2006.

DA MATTA GUEDES, Paulo Marcos et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010.

DE LAFAILLE, Maria A. Curotto et al. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and-independent control of allergic inflammation. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 114-126, 2008.

DE SOUZA, Heitor SP; FIOCCHI, Claudio. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13, 2016.

DELMOLINO, Laurie M.; CASTELLOT JR, John J. Heparin suppresses *sgk*, an early response gene in proliferating vascular smooth muscle cells. **Journal of cellular physiology**, v. 173, n. 3, p. 371-379, 1997.

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

DURICOVA, D., PEDERSEN, N., ELKJAER, M. et al. Overall and causespecific mortality in Crohn's disease: A meta-analysis of population-based studies. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, p. 347-353, 2010.

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

ERMANN, Joerg et al. Nod/Ripk2 signaling in dendritic cells activates IL-17A-secreting innate lymphoid cells and drives colitis in T-bet<sup>-/-</sup>. Rag2<sup>-/-</sup>(TRUC) mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201408540, 2014.

FARQUHAR, W. B. et al. Dietary sodium and health: more than just blood pressure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 10, p. 1042-1050, 2014.

FARIA A. M., WEINER HL. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, V. 206, P. 232-59, 2005.

FARIA A. M. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. **Journal of Autoimmunity**, v. 40, p. 45-57, 2013.

FARIA, A. M. C.; Gomes-Santos, Ana Cristina ; GONÇALVES, JULIANA LAUAR; Moreira, Thais Garcias ; MEDEIROS, SAMARA RABELO ; DOURADO, Luana Pereira Antunes ; Cara, Denise Carmona ; CARA, D. C. . Food Components and the Immune System: From Tonic Agents to Allergens. *Frontiers in Immunology (Online)* , v. 4, p. article 102, 2013.

FARIA, Ana MC; REIS, Bernardo S.; MUCIDA, Daniel. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 5, p. 1211-1226, 2017.

FILLON, Sophie et al. Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. **Cellular physiology and biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 47-54, 2002.

FIRESTONE, G. L., GIAMPAOLO, J. R., O'KEEFFE, B. A. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK1) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2003.

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

FNB, Food Nutrition Board. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulphate. 2003.

FORKEL, M. and MJOSBERG, J. Dysregulation of group 3 innate lymphoid cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, 2016.

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

FUCHS, Anja et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12-and IL-15-responsive IFN- $\gamma$ -producing cells. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 769-781, 2013.

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

GALDEANO, C. Maldonado; PERDIGON, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 2, p. 219-226, 2006.

- GASTEIGER, Georg; RUDENSKY, Alexander Y. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 9, p. 631, 2014.
- GENEROSO, S. V., VIANA, M. L., SANTOS, R. G., ARANTES, R. M., MARTINS, F. S., NICOLI, J. R., MACHADO, J. A., CORREIA, M. I., CARDOSO, V. N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition*, v. 50, n. 4, p. 261-9, 2011.
- GENEROSO, Simone et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 54, 2015.
- GEREMIA, A., BIANCHERI, P., ALLAN, P., CORAZZA, G. R., DI SABATINO, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel diseases. **Autoimmunity Review**, v. 13, n. 1, p. 3-10, 2013.
- GILL, Steven R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2006.
- GREEN, F.; HEYWORTH, B. Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis. **Archives of Disease in childhood**, v. 55, n. 5, p. 380-383, 1980.
- GOMES-SANTOS, Ana Cristina et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- GOLDBERG, Rimma et al. The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 5, p. 271, 2015.
- GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967-71, Oct 21 2010.
- GILLETTE, Marianne. Flavor effects of sodium chloride. **Food technology (USA)**, 1985.
- GUINEE, T. P. et al. Reducing salt in cheese and dairy spreads. **Reducing salt in foods: Practical strategies**, p. 316-357, 2007.
- GURY-BENARI, M., THAIS, C. A., SERAFINI, N., WINTER, D. R., GILADI, A., LARA-ASTIASO, D. et al. The spectrum and regulatory landscape of intestinal innate lymphoid cells are shaped by microbiome. **Cell**, v. 166, p. 231-46, 2016.
- HALIM, T. Y., KRAUSS, R. H., SUN, A. C. and TAKEI, F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. **Immunity**, v. 36, p. 451-463, 2012.

HALMOS, E. P. and GIBSON, P. R. Dietary management of IBD – insights and advice. **Nature review in Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 3, p. 133-46, 2015.

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

HARRIS, Timothy J. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 7, p. 4313-4317, 2007.

HARTMAN, Howard L. et al. **Mine ventilation and air conditioning**. John Wiley & Sons, 2012.

HANSSON, G. C. Role of mucus layer in gut infection and inflammation. **Current opinion in Microbiology**, v. 15, p. 57-62, 2012.

HATA, K. et al. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, n. 6, p. G1035-44, 2002.

HE, Feng J.; MACGREGOR, Graham A. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 52, n. 5, p. 363-382, 2010.

HEDIGER, Matthias A. et al. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. **Nature**, v. 330, n. 6146, p. 379, 1987.

HELANDER, H. F and FANDRIKS, L. Surface area of the digestive tract – revisited. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, p. 1-9, 2014.

HENRY, J. E. et al. (Ed.). **Strategies to reduce sodium intake in the United States**. National Academies Press, 2010.

HERNANDEZ, Amanda L. et al. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 11, p. 4212-4222, 2015.

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

HOLSCHER, Hannah D. et al. Effects of prebiotic-containing infant formula on gastrointestinal tolerance and fecal microbiota in a randomized controlled trial. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, n. 1\_suppl, p. 95S-105S, 2012.

HUANG, Q., SEILLET, C. and BELZ, G. T. Shaping Innate Cell Diversity. **Frontiers in Immunology**, v.8, p. 1569-78, 2017.

HUGHES, Tiffany et al. The transcription factor AHR prevents the differentiation of a stage 3 innate lymphoid cell subset to natural killer cells. **Cell reports**, v. 8, n. 1, p. 150-162, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**; 2010.

Intersalt Cooperative Research Group: Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 h urinary sodium and potassium excretion. **BMJ** 297:319-328, 1988.

IVANOV, Ivaylo I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-498, 2009.

JAENSSON-GYLLENBÄCK, Elin et al. Bile retinoids imprint intestinal CD103+ dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 4, p. 438, 2011.

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

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

KAMADA, Nobuhiko et al. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 4, p. 568-575, 2009.

KARABOGA, I.; DEMIRTAS, S.; KARACA, T. Investigation of the relationship between the Th17/IL-23 pathway and innate-adaptative immune system in TNBS-induced colitis in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20:870-879 . doi: 10.22038/IJBMS.2017.9108

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573-621, 2010.

KIESSLING, R; KLEIN, E; PROSS, H. and WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. II Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of killer cell. **European Journal of Immunology**, v. 5, p. 117-121, 1975.

KILCAST, D., ANGUS, F. **Reducing salt in foods: Practical strategies**. Elsevier, 2007.

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



- KIM, Hye Young et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. **Nature medicine**, v. 20, n. 1, p. 54-61, 2014.
- KIM, Ji Young et al. N-3 polyunsaturated fatty acids restore Th17 and Treg balance in collagen antibody-induced arthritis. **PLoS one**, v. 13, n. 3, p. e0194331, 2018.
- KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental animals/Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 137, 1999.
- KLEINewietfeld, M. et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. **Nature**, 2013.
- KLOSE, C. S. et al. a T-bet gradient controls the fate and functions of CCR6-ROR $\gamma$ <sup>+</sup> innate lymphoid cells. **Nature**, v. 494, p. 261-265, 2013.
- KLOSE, C. S., FLACH, M., MOHLE, L., ROGELL, L., HOYLER, T., EBERT, K. et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineage. **Cell**, v. 157, p. 340-56, 2014.
- KO, B. C. et al. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16431-16437, 1997.
- KOLLS, Jay K.; LINDÉN, Anders. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.
- KORN, T. et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. **Seminars in immunology**, Elsevier, p.362-371, 2007.
- KOTCHEN, Theodore A. Contributions of sodium and chloride to NaCl-induced hypertension. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 849-850, 2005.
- KRAFT, S. C. and KIRSNER, J. B. Ulcerative Colitis. In: Immunological Disease, 2<sup>nd</sup> edition. Little, Brown and Company, p. 1346-1366, 1971.
- KULLBERG, M. C. et al. Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12-and gamma interferon-dependent mechanism. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5157-5166, 1998.
- KUMAR, Janet M. et al. Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2488-2494, 1999.
- PHILLIPS, William D. Kurlansky Mark, Salt: A World History. New York: Penguin Books, 2002. 484 pp. ISBN 0-14-200161-9. **Itinerario**, v. 28, n. 1, p. 110-111, 2004.

- LANASPA, Miguel A. et al. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 12, p. 3138-3143, 2018.
- LANG, Florian et al. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 8157-8162, 2000.
- LAAN, Martti et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via CXC chemokine release in the airways. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2347-2352, 1999.
- LANG, F. and VOELKL, J. Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, n. 6, p. 701-714, 2013.
- LANGRISH, Claire L. et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunological reviews**, v. 202, n. 1, p. 96-105, 2004.
- LAURENCE, Arian et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. **Immunity**, v. 26, n. 3, p. 371-381, 2007.
- LEE, Jacob S. et al. Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 727-738, 2015.
- LEE, S. Y., LEE, S. H., YANG, E. J. et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the STAT3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg balance. **Plos One**, v. 10, 2015.
- LEE, S. H., KWON J. E., CHO, M. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Intestinal Research**, v. 16, n. 1, p. 26-42, 2018.
- LEPPKES, M., BECKER, C., IVANOV, II et al. ROR gamma- expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. **Gastroenterology**, v. 136, p. 257-267, 2009.
- LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271-2279, 2006.
- LIENHARD, D., LAUTERBURG, M., ESCHER, G., FREY, F. J., FREY, B. M. High salt intake down-regulates colonic mineralocorticoid receptors, epithelial sodium channels and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **Plos One**, v. 7, 2012.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LITTMAN, Dan R.; RUDENSKY, Alexander Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 845-858, 2010.

- LIU, Yue-Hong et al. Functional macrophages and gastrointestinal disorders. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 11, p. 1181, 2018.
- LLEWELLYN, S. R. et al. Interactions between diet and the intestinal microbiota alter intestinal permeability and colitis severity in mice. **Gastroenterology**, v. 17, 2017.
- LONGMAN, Randy S. et al. CX3CR1+ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20140678, 2014.
- LUFT, Friedrich C. Salt water, and extracellular volume regulation. 1996.
- MABBOTT, Neil A. et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal immunology*, v. 6, n. 4, p. 666, 2013.
- MACDONALD, T. T. The mucosal immune system. **Parasite immunology**, v. 25, n. 5, p. 235-246, 2003.
- MacGregor GA, de Wardener HE: Salt, Diet and Health: Neptune's Poisoned Chalice; The origin of High Blood Pressure, Cambridge, Cambridge University Press, 1998, p233
- MACHNIK, A. et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent Buffering mechanism. **Nature medicine**, v. 15, n. 5, p. 545-552, 2009.
- MAGGINI, Silvia et al. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. S1, p. S29-S35, 2007.
- MAHAN, M.L.; SCOTT-STUMP, S.E. Alimentos, nutrição & dietoterapia. 11.ed. São Paulo: Roca, 2005.
- MAIOLI, T. U., DE MELO SILVA, B., DIAS, M. N., PAIVA, N. C., CARDOSO, V. N., FERNANDES, S. O., CARNEIRO, C. M., DOS SANTOS MARTINS, F., DE VASCONCELOS GENEROSO, S. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of negative results in Biomedicine**, v. 13, 2014.
- MAIYAR, Anita C. et al. p53 stimulates promoter activity of the sgk serum/glucocorticoid-inducible serine/threonine protein kinase gene in rodent mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12414-12422, 1996.
- MALIK, T. A. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology, and risk factors. **Surgical Clinis of North America**, v. 95, p. 1105-1122, 2015.

- MANHART, Nicole et al. Influence of short-term protein malnutrition of mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. **Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 197-201, 2000.
- MANGAN, Paul R. et al. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T H 17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231, 2006.
- MAO, Kairui et al. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. **Nature**, v. 554, n. 7691, p. 255, 2018.
- MARION-LETELLIER, Rachel et al. Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: a reappraisal of effects and therapeutic approaches. **Inflammatory bowel diseases**, v. 19, n. 3, p. 650-661, 2013.
- MATTES, R. D.; DONNELLY, Diana. Relative contributions of dietary sodium sources. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 383-393, 1991.
- MASAHATA, Kazunori et al. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. **Nature communications**, v. 5, p. 3704, 2014.
- MASLOWSKI, Kendle M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282, 2009.
- MAYER, L. Mucosal immunity. **Immunol.Rev**, 206,5, 2005.
- MAXWELL, Joseph R. et al. Differential roles for interleukin-23 and interleukin-17 in intestinal immunoregulation. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 739-750, 2015.
- MCGUIRE, S. Institute of Medicine. 2010. Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States. Washington, DC: The National Academies Press. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 1, n. 1, p. 49-50, 2010.
- MEBIUS, R. E.; RENNERT, P. and WEISSMAN, I. L. Developing lymph nodes collect CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>LT $\beta$ <sup>+</sup> cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not to T or B cells. **Immunity**, v.7, p. 493-504, 1997.
- MEDEIROS, Samara R. et al. Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup> T cells in mice. **Nutrition**, v. 31, n. 10, p. 1260-1265, 2015.
- MENEZES, Juscilene et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International immunology**, v. 15, n. 3, p. 447-455, 2003.
- MENTE, A., O'DONNELL, M., RANGARAJAN, S., MCQUEEN, M. J., POIRIER, P., WIELGOSZ, A. et al. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. **New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 601-611, 2014.

- MIKOSZ, Christina A. et al. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16649-16654, 2001.
- MIRANDA, Pedro M. et al. High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 57, 2018.
- MOLODECKY, N. A., SOON, I. S., RABI, D. M., GHALI, W. A., FERRIS, M., CHERNOFF, G. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54, 2012.
- MONTELEONE, I., MARAFINI, I., DINALLO, V., DI FUSCO, D., TRONCONE, E., ZORZI, F. et al. Sodium chloride-enriched diet enhanced inflammatory cytokine production and exacerbated experimental colitis in mice. **Journal of Chron's and Colitis**, v. 11, p. 237-45, 2017.
- MORA, J. Rodrigo; VON ANDRIAN, U. H. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. **Mucosal immunology**, v. 1, n. 2, p. 96, 2008.
- MOREIRA, T.G., GOMES-SANTOS, A.C., HORTA, L.S., HORTA, B.C., GONÇALVES, J.L., CASTRO-JUNIOR, A.B. et al. Conjugated linoleic acid ameliorates mucosal damage and prevents weight loss in a murine model of colitis, in: **XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology**, (São Paulo: Brazilian Society of Immunology), 23, 2012.
- MORO, K. et al. Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue associated c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. **Nature**, v. 463, p. 540-544, 2010.
- MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331-341, 2003.
- MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667, 2014.
- MOZAFFARIAN, D., FAHIMI, S., SINGH, G. M., MICHA, R., KHATIBZADEH, S., ENGELL, R. E. et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 624-634, 2014.
- MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-260, 2007.
- MUDAMBI, Kiran; BASS, Dorsey. Vitamin D: a brief overview of its importance and role in inflammatory bowel disease. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 5, 2018.
- NAVARINI, Luca et al. Polyunsaturated fatty acids: any role in rheumatoid arthritis?. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 197, 2017.

- NEURATH, M. F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1281-1290, 1995.
- NIELSEN, O. et al. Upregulation of interleukin-12 and-17 in active inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 38, n. 2, p. 180-185, 2003.
- NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480-483, 2007.
- O'DONNELL, M., MENTE, A., RANGARAJAN, S., MCQUEEN, M. J., WANG, X., LIU, L. et al. Urinary sodium and potassium excretion, mortality and cardiovascular events. **New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 612-623, 2014.
- OGAWA, A. et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Clinical immunology**, v. 110, n. 1, p. 55-62, 2004.
- OHTA, Y., TSUCHIHASHI, T., KIYOHARA, K., ONIKI, H. High salt intake promotes a decline in renal function in hypertensive patients: a 10-year observational study. **Hypertension Research**, v. 36, p. 172-6, 2013.
- OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.
- OKUMURA, Ryu; TAKEDA, Kiyoshi. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. **Inflammation and regeneration**, v. 38, n. 1, p. 5, 2018.
- O'TOOLE, A. and KORZENIK, J. Environmental triggers for IBD. **Current Gastroenterology reports**, v. 16, n. 7, p. 396, 2014.
- OUELLETTE, A. J. Paneth cells and innate mucosal immunity. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 547-53, 2010.
- PLATTEN, M. et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1-and TH17-mediated autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14948-14953, 2009.
- PEARCE, D. and KLEYMAN, T. R. Salt, sodium channels, and SGK1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 592-5, 2007.
- PEARSON, Claire et al. ILC3 GM-CSF production and mobilisation orchestrate acute intestinal inflammation. **Elife**, v. 5, p. e10066, 2016.
- PETTA, Ioanna et al. Interrelation of Diet, Gut Microbiome, and Autoantibody Production. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 439, 2018.

- POSSOT, Cécilie et al. Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of ROR [gamma] t+ innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 10, p. 949-958, 2011.
- POWELL, Nick et al. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 674-684, 2012.
- POWRIE, F. et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. **Immunity**, v. 1, n. 7, p. 553-562, 1994.
- PREUSS HG, CLOUATRE DL: Sodium, chloride, and potassium; in Erdman JW, MacDonald IA, Zeisel SH (eds): **Present Knowledge in Nutrition**, ed 10. Oxford, Wiley-Blackwell, 2012, pp 475–492.
- RAKOFF-NAHOUM, Seth et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229-241, 2004.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.
- REZENDE, Rafael M. et al. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. **Journal of autoimmunity**, v. 40, p. 45-57, 2013.
- RITZ, Eberhard. The history of salt-aspects of interest to the nephrologist. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, n. 6, p. 969-975, 1996.
- ROBERTS, William Clifford. High salt intake, its origins, its economic impact, and its effect on blood pressure. 2001.
- RÖDER, Pia V. et al. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e89977, 2014.
- ROGGENBUCK, D. et al. Autoimmunity in Crohn's Disease—A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. In: **Advances in clinical chemistry**. Elsevier, 2016. p. 77-101.
- ROVEDATTI, Laura et al. Differential regulation of interleukin-17 and interferon- $\gamma$  production in inflammatory bowel disease. **Gut**, 2009.
- SARTOR, R. Balfour. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008.
- SATOH-TAKAYAMA, Naoko et al. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3<sup>-</sup> NKp46<sup>+</sup> cell subsets from Id2-dependent precursors. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 2, p. 273-280, 2010.

SAVICA, Vincenzo; BELLINGHERI, Guido; KOPPLE, Joel D. The effect of nutrition on blood pressure. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 365-401, 2010.

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

SHIGAEV, Alexander et al. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na<sup>+</sup> channel. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 278, n. 4, p. F613-F619, 2000.

SHILS, Maurice E. et al. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2016.

SMITH, Michelle I. et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 548-554, 2013.

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

STRAIN, J.J.; CASHMAN, K.D. Minerals and trace elements. In: GIBNEY, M.J. et al. (eds): **Introduction to Human Nutrition**. 2.ed The Nutrition Society Textbook Series. Chichester, Wiley-Blackwell, 2009, pp. 188–237.

STROBER, Warren; FUSS, Ivan; MANNON, Peter. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 3, p. 514-521, 2007.

STROBER, Warren; FUSS, Ivan J.; BLUMBERG, Richard S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 495-549, 2002.

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

SONNENBERG, Gregory F. et al. CD4<sup>+</sup> lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 122-134, 2011.

SOUZA, Adna L. et al. Consumption of Diet Containing Free Amino Acids Exacerbates Colitis in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1587, 2017.

SPITS, Hergen; DI SANTO, James P. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. **Nature immunology**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2011.

SPITS, H. and CUPEDO, T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships and function. **Annual Review Immunology**, v. 30, p. 647-675, 2012.



SPITS, Hergen et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 145, 2013.

STEENWINCKEL Valérie et al. IL-9 promotes IL-1-dependent Paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 4737-4743, 2009.

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

STROWIG, Till; BRILOT, Fabienne; MÜNZ, Christian. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 7785-7791, 2008.

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

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

TAKAYAMA, Tetsuro et al. Imbalance of NKp44+ NKp46- and NKp44- NKp46+ natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 139, n. 3, p. 882-892. e3, 2010.

TEUNISSEN, Marcel B.M. et al. Composition of Innate Lymphoid Cell Subsets in the Human Skin: Enrichment of NCR&plus; ILC3 in Lesional Skin and Blood of Psoriasis Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 9, p. 2351-2360, 2014.

TUBBS, Alan. L. et al. Dietary salt exacerbates experimental colitis. **Journal of Immunology**, v. 199, p. 1051-9, 2017.

TUMANOV, Alexei V. et al. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 1, p. 44-53, 2011.

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

UENO, Aito et al. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. **Journal of autoimmunity**, 2017.

VAN DER SLUIS, Maria et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117-129, 2006.

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

VELCICH, Anna et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science*, v. 295, n. 5560, p. 1726-1729, 2002.

VILLANOVA, Federica et al. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 134, n. 4, p. 984-991, 2014.

VINOLO, Marco AR et al. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PloS one*, v. 6, n. 6, p. e21205, 2011.

VIVIER, Eric et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, v. 331, n. 6013, p. 44-49, 2011.

VONARBOURG, Cedric et al. Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$ t+ innate lymphocytes. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 736-751, 2010.

XIONG, Tingting; TURNER, Jan-Eric. Innate lymphoid cells in autoimmunity and chronic inflammatory diseases. In: *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2018. p. 1-14.

XU, Jun et al. Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides. *J Cell Biol*, v. 154, n. 4, p. 699-706, 2001.

XU, Bing-e et al. WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 29, p. 10315-10320, 2005.

ZHOU, Liang et al. IL-6 programs T H-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*, v. 8, n. 9, p. 967, 2007.

ZHOU, Liang et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature*, v. 453, n. 7192, p. 236-240, 2008.

ZHOU, Liang. Striking similarity: GATA-3 regulates ILC2 and Th2 cells. *Immunity*, v. 37, n. 4, p. 589-591, 2012.

WAGNER, Carsten et al. Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 11, n. 4, p. 209-218, 2001.

WÄRNTGES, S. et al. Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum-and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflügers Archiv*, v. 443, n. 4, p. 617-624, 2002.

- WEBSTER, Melanie K. et al. Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and cellular biology*, v. 13, n. 4, p. 2031-2040, 1993.
- WEI, Yingfeng et al. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. ***Oncotarget***, v. 8, n. 1, p. 70, 2017.
- WEINER, Howard L. et al.. Oral tolerance. ***Immunological Reviews***, v. 241, n.1, p. 241-59, 2011.
- WIDMANN, Christian et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. ***Physiological reviews***, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.
- WILCK, Nicola et al. Salt-responsive gut commensal modulates Th17 axis and disease. ***Nature***, v. 551, p. 585-9, 2017.
- WILLEBRAND, Ralf; KLEINewIETFELD, Markus. The role of salt for immune cell function and disease. ***Immunology***, 2018.
- WIRTZ, Stefan et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. ***Nature protocols***, v. 2, n. 3, p. 541-546, 2007.
- WONG, See Heng et al. Transcription factor ROR [alpha] is critical for nuocyte development. ***Nature immunology***, v. 13, n. 3, p. 229-236, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of cardiovascular disease**. World Health Organization, 2007.
- WRIGHT, Ernest M.; MARTÍN, Martín G.; TURK, Eric. Intestinal absorption in health and disease—sugars. ***Best practice & research Clinical gastroenterology***, v. 17, n. 6, p. 943-956, 2003.
- WU, Chuan et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. ***Nature***, v. 496, n. 7446, p. 513-7, Apr 25, 2013.
- WULFF, Peer et al. Impaired renal Na<sup>+</sup> retention in the *sgk1*-knockout mouse. ***The Journal of clinical investigation***, v. 110, n. 9, p. 1263-1268, 2002.
- YANG, Xuexian O. et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. ***Journal of Experimental Medicine***, v. 205, p. 1063-1075, 2008.
- YANG, Jianfei et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. ***Trends in pharmacological sciences***, v. 35, n. 10, p. 493-500, 2014.
- YAO, Z. et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. ***The Journal of Immunology***, v. 155, n. 12, p. 5483-5486, 1995.
- YATES, Clara M.; CALDER, Philip C.; RAINGER, G. Ed. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. ***Pharmacology & therapeutics***, v. 141, n. 3, p. 272-282, 2014.

IYER, Vishwanath R. et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**, v. 283, n. 5398, p. 83-87, 1999.

YOKOTA, Yoshifumi et al. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix–loop–helix inhibitor Id2. **Nature**, v. 397, n. 6721, p. 702, 1999.

YOSEF, Nir et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 461-468, 2013.

YU, Y.; CORRELL, P. H.; HEUVEL, JP Vanden. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1581, n. 3, p. 89-99, 2002.

ZANKE, Brent W. et al. Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29876-29881, 1996.

ZENG, Rong et al. The molecular basis of IL-21–mediated proliferation. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4135-4142, 2007.

ZHANG, Zili et al. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 5, p. 382-388, 2006.

## APÊNDICE

---