

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Lauane Gomes Moreno

**EFEITOS DA INGESTÃO DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) NA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS**

Diamantina

2019

Lauane Gomes Moreno

**EFEITOS DA INGESTÃO DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) NA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabete Adriana Esteves
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito
Alvim de Melo

Diamantina

2019

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

M843e Moreno, Lauane Gomes
 Efeitos da ingestão do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) na
 resposta imune da mucosa intestinal de camundongos / Lauane Gomes
 Moreno, 2019.
 160 p. : il.

 Orientadora: Elizabethe Adriana Esteves
 Coorientador: Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

 Tese (Doutorado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
 Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do
 Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

 1. Óleo de pequi. 2. *Caryocar brasiliense*. 3. Resposta imune de
 mucosa. 4. Propriedades imunomodulatórias. 5. Colite ulcerativa.
 I. Esteves, Elizabethe Adriana. II. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de.
 III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
 Mucuri.

CDD 611.3

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LAUANE GOMES MORENO

**EFEITOS DA INGESTÃO DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) NA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, nível
DOUTORADO, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Elizabethe
Adriana Esteves

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo
Eustáquio Brito Alvim de Melo

Data da aprovação : 12/06/2019


Prof.Dr.^a ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES - UFVJM


Prof.Dr. GUSTAVO EUSTAQUIO BRITO ALVIM DE MELO - UFVJM


Prof.Dr. KINULRE HONORATO SAMPAIO - UFVJM


Prof.Dr. ANDRE TALVANI PEDROSA DA SILVA - UFOP


Prof.Dr.^a TATIANI UCELIN MAIOLI - UFMG


Prof.Dr. WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico este trabalho a todos que contribuíram de alguma forma para a sua realização, em especial à minha orientadora e amiga Bethe e ao meu coorientador Gustavo, pela excelência na orientação e por terem sido grandes conselheiros. E aos meus pais, que me apoiaram incondicionalmente nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado meu caminho e me amparado nos momentos de dificuldade. À minha Nossa Senhora, por ser meu “escudo protetor”.

Aos meus pais, Leandro e Cida pelos incentivos na vida escolar e acadêmica, pela “herança intelectual”, pelos conselhos, pelo amor incondicional e pela vida. E a meu irmão Lucas pela amizade, companheirismo, boa vontade e por ter “salvado” meu computador, várias vezes.

À professora Dra. Elizabethe Adriana Esteves (Bethe), inicialmente minha orientadora, mas isso posso dizer que é só um detalhe, porque em todos esses anos de caminhada juntas, alcançou um lugarzinho muito maior e especial em minha vida. Sempre foi e sempre será uma grande amiga e conselheira. Agradeço pela imensa torcida e confiança, e principalmente por fazer parte do que eu sou hoje. Tenho certeza que levarei pra minha vida um pouquinho de você Bethe!

Ao professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, meu coorientador que também se tornou um amigo. Agradeço por me encaminhar na imunologia, pela qual fiquei apaixonada e por ter acreditado no meu trabalho e potencial. Obrigada por repassar para nós, seus alunos, essa paixão pela pesquisa e pelos “lindos” dados. Espero levar aos meus futuros alunos um pouco do que você nos ensinou em todos esses anos.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFVJM pela disponibilização da estrutura física e pelos ensinamentos. Agradeço especialmente à professora Dra. Etel Rocha Vieira, pela orientação e pela amizade. A professora Etel é um verdadeiro guia para todos os alunos de quaisquer áreas.

Aos professores Dr. Danilo Bretas de Oliveira e Dr. Wagner de Fátima Pereira. Ao Danilo, por ter sido uma luz no fim do túnel, foi ele quem me deu a ideia de estudar colite ulcerativa, e tem contribuído desde então para realização e finalização desse trabalho. Ao Wagner, primeiramente por seu bom humor; é sempre bom entrar em um laboratório onde existem pessoas bem humoradas. Também agradeço por toda orientação, ensinamentos e ajuda com insumos, material e reagentes que possibilitaram a realização dos meus estudos pilotos.

À professora Dra Maria Letícia, pelas instruções nas análises histopatológicas e contribuições para o trabalho.

Ao professor Dr. Robson Campos Silva e à equipe do Laboratório de Histologia, do DCB-UFVJM. Agradeço pelo auxílio enquanto professora voluntária de Histologia e por terem me recebido no laboratório para realização de todas as técnicas histológicas

apresentadas nesse trabalho. Agradecimento especial ao técnico e amigo Samuel Giordani, pelos ensinamentos não só para mim, mas para todos os alunos de iniciação científica do LABMET.

À professora Dra. Ana Maria Caetano de Faria da UFMG, por ter me recebido e me apresentado à equipe do Laboratório de Imunobiologia. Agradeço à doutoranda Luisa, que me recebeu, e demais alunos do laboratório que me mostraram suas técnicas, me treinaram e contribuíram ao longo de todos esses anos para realização da minha pesquisa.

Agradeço também à pós-doutoranda Dra. Patrícia Aparecida Vieira de Barros e aos professores Dr. Kinulpe Honorato Sampaio, Dr. André Talvani Pedrosa da Silva e Dra. Tatiani Uceli Maioli pelas contribuições para meu trabalho.

Ao professor Dr. Márcio Leles da UFVJM, pelas orientações nas análises estatísticas.

À “família” do Laboratório de Estudos Metabólicos – LABMET; com certeza não haveria uma linha deste trabalho sem vocês, formamos uma equipe. Agradecimento especial aos que dividiram comigo responsabilidades e experimentos noturnos com muita disposição e amor, sem os quais não teria conseguido ficar por 21 horas em um laboratório: Nilma, Paulo, Mateus, Rodrigo, Edivânia, Gardênia, Arteniázia e Ana Maria.

À equipe do Laboratório de Imunologia – LABIMUNO, especialmente ao Lucas, Josué, Marcelo, Micaele, Valéria, Betânia e Agnes, por terem me repassado também o que aprenderam com o prof. Gustavo, pelos inúmeros ensinamentos, treinamentos, auxílio em experimentos e longas conversas, especialmente pelo sorriso no rosto de cada um, que motiva o dia a dia de trabalho dentro do Laboratório.

Ao Dirceu, pela amizade e irmandade de sempre e para sempre, por ter aberto as portas da sua casa para me receber, por me motivar e acolher sempre e por ser meu exemplo. Mesmo à distância, seu apoio e amor são incondicionais sempre, não tenho nem como expressar com palavras o que você representa pra mim.

Aos amigos que fiz na pós graduação, Rosa, Vinícius, Karine, Bruna, Camila, Sueli, Cíntia, Liliane, Talita, Bruno e Caíque, pelas conversas, distrações e sorrisos. Agradecimento especial pra Rosa e Vinícius que além de amigos me ensinaram e apoiaram em muitas técnicas de laboratório.

Às amigas eternas Dani e Isabela, pelo companheirismo e por dividirem as alegrias e angústias.

Ao meu namorado Luis, por todo amor e companheirismo ao longo desses 5 anos, por compreender minhas ausências e por ter servido de motorista, psicólogo, cozinheiro,

mecânico, redator de referências bibliográficas, entre outras atribuições. A você dedico meu amor.

À toda a minha família pelo apoio e incentivo, em especial aos meus avós, vó Iracema pela torcida e inúmeras orações e vô Chico pelos conselhos e exemplo de simplicidade, inteligência e paciência. E a minha vó Iza, que me acompanhou por toda vida e apesar de ter nos deixado, sei que está muito feliz com esta conquista.

À tia Dionízia e prima Carla, por terem me recebido com muito carinho em Belo Horizonte, no momento das disciplinas e treinamentos.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, minha instituição de graduação, de mestrado e agora de doutorado, pelo acolhimento, em particular ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação de Ciências Fisiológicas.

Ao departamento de Nutrição da UFVJM, pelo apoio durante minha trajetória como professora substituta.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílio financeiro ao projeto, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológica (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Aos animais experimentais, sem os quais, não seria possível a realização deste estudo.

A todos que, involuntariamente, omiti e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso
passará pela vida sem ver nada”.*

Albert Einstein

RESUMO

Atualmente, diversas áreas científicas têm focado suas pesquisas em propriedades funcionais de alimentos e produtos alimentícios, das quais destacam-se efeitos imunomoduladores. Dentre esses alimentos está o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), que apresenta diversos efeitos biológicos tais como melhoria do metabolismo lipídico, melhoria da função cardiovascular e atividade antioxidante. Esse óleo contém em sua composição química um alto conteúdo de carotenoides e ácidos graxos monoinsaturados, que de acordo com estudos prévios, isoladamente, podem alterar a resposta imune, em especial a resposta imune da mucosa intestinal. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da ingestão do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) na resposta imune de mucosa intestinal de camundongos. Para isso foram investigados os efeitos da ingestão diária de 280mg de óleo de pequi em elementos da resposta imune da mucosa intestinal em duas condições: 1) na mucosa íntegra e 2) na ruptura da integridade da mucosa, representada por uma doença inflamatória intestinal. Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6 machos, que após o período de adaptação (7 dias), iniciaram a Fase 1 do estudo (suplementação com óleo de pequi, 28 dias). Tais animais foram divididos em: Grupo Controle (C) que recebeu apenas ração comercial e água filtrada *ad libitum* e grupo Óleo de Pequi (OP) que recebeu diariamente, além da ração e água, 280 mg de óleo de pequi homogeneizados em 1,11g de ração triturada, na forma de um *pellet*. Após esse período, cada um dos dois grupos experimentais foi sub-dividido em grupos C, Controle com Colite (CC), OP e Óleo de Pequi com Colite (OPC). Deu-se início então à Fase 2 do estudo referente à continuidade da suplementação e indução da doença inflamatória intestinal por 8 dias. Na Fase 2, os grupos CC e OPC passaram a receber, além dos tratamentos iniciais, solução aquosa de dextran sulfato de sódio (DSS), a 1,5%, *ad libitum*. A ingestão alimentar e o peso corporal foram monitorados durante todo o experimento. No nono dia, após a fase 2, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras. Foi avaliado o fenótipo de leucócitos isolados das superfícies das mucosas do intestino delgado (ID) e cólon, dos linfonodos mesentéricos e do baço. Determinou-se também as concentrações de Imunoglobulina A (IgA) no plasma e de IgA secretória (IgAs) nos lavados de ID, cólon, e fezes, das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ , IL-17, IL-10 no plasma e em homogenatos de ID e cólon e de proteína C reativa (*C reactive protein* - CRP) no plasma. Durante a indução da colite foi calculado o Índice de Atividade de Doença (*scores* médios de diarreia, sangramento retal e perda de peso) e ao final foi avaliado o *score* histopatológico total na mucosa colônica. Na integridade da mucosa, a ingestão do óleo de pequi (OP vs C, $p < 0,05$) induziu no ID redução de linfócitos de superfície T totais, T auxiliares e de IFN γ ; no cólon, redução de linfócitos de superfície T citotóxicos e IgAs; nos linfonodos, redução de linfócitos T citotóxicos; no baço, redução de linfócitos T auxiliares e citotóxicos; e no plasma redução de IL-2, CRP e do % de neutrófilos e aumento de IL-10 e do % de linfócitos. Em condições de ruptura da integridade da mucosa intestinal, a ingestão do óleo de pequi (OPC vs CC, $P < 0,05$), reduziu a perda de peso e diarreia. No ID elevou linfócitos de superfície T $\gamma\delta$ e reduziu IL-6, no cólon também elevou os linfócitos de superfície T $\gamma\delta$ e reduziu os T citotóxicos e a perda de criptas e células calciformes; nos órgãos linfoides essa ingestão reduziu linfócitos T citotóxicos e no plasma reduziu a IL-17 e a CRP. Assim, a ingestão do óleo de pequi parece ter reforçado a resposta reguladora do sistema imune de mucosa, o que possivelmente contribuiu para que, em condições de ruptura da integridade intestinal, houvesse melhoria do quadro clínico e histopatológico, elevação de células com potencial de ação regulatória e redução de mediadores pró-inflamatórios e de células com atividade citotóxica.

Palavras chave: Óleo de pequi. *Caryocar brasiliense*. Resposta imune de mucosa. Propriedades imunomodulatórias. Colite ulcerativa.

ABSTRACT

Currently, several scientific areas have focused their research on functional properties of foods and food products, especially their immunomodulatory effects. Among these foods is pequi oil (*Caryocar brasiliense*), which has several biological effects such as improvements in lipid metabolism, cardiovascular function and antioxidant activity. This oil is high in carotenoids and monounsaturated fatty acids. These dietary compounds solely may alter the immune response, such as in the gut mucosal immune system. Thus, the objective of this work was to investigate immunomodulatory properties of pequi oil in the gut mucosal immune system of mice. The effects of a 280mg dose of pequi oil were investigated in two conditions: 1) homeostasis of gut mucosal immune response and 2) disruption of homeostasis of gut mucosal immune response, which was represented by an inflammatory bowel disease. For that, sixty male C57BL/6 mice were used. After an adaptation period (7 days), Phase I of the study was started (pequi oil supplementation, 28 days). For that, animals were divided into: Control Group (C) fed only commercial chow and filtered water *ad libitum* and the Pequi Oil group (OP), fed commercial chow and filtered water plus 280 mg of pequi oil into a 1.11g of grounded chow, in a pellet. After this period, the two experimental groups were spliced into C, Control Colitis (CC), OP and Pequi Oil Colitis (OPC) groups for the Phase 2 of the study (pequi oil supplementation and colitis induction for 8 days). For that, CC and OPC groups received, in addition to the initial treatments, aqueous sodium dextran sulfate (DSS) solution at 1.5%, *ad libitum*. Food intake and body weight were monitored for all experimental protocol. On the ninth day after this phase, the animals were euthanized for sample collection. Leukocyte phenotype isolated from the spleen, lymph nodes and intraepithelial compartments of the small intestine (SI) and colon were evaluated. Immunoglobulin A (IgA) concentrations in plasma and ID wasps, colon, and faeces, IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ , IL-17, IL-10 cytokines in plasma and colon homogenates and C reactive protein (CRP) were also determined. During the induction of colitis, the Disease Activity Index (diarrhea, rectal bleeding and weight loss) was calculated and the total histopathological score in the colonic mucosa was evaluated. In mucosal integrity conditions, pequi oil intake (OP vs C, $p < 0.05$) induced a reduction of total T surface cells, helper T and IFN γ in SI; a reduction of cytotoxic T surface cells and IgA in colon; a reduction of cytotoxic T cells in lymph nodes; a reduction of helper and cytotoxic T cells in spleen and systemic reduction of IL-2, CRP and neutrophils percent and an increase of IL-10 and lymphocytes percent. Under conditions of disruption of integrity of gut mucosal, the intake of pequi oil (OPC vs CC, $P < 0.05$), reduced weight loss and diarrhea. In SI, it elevated $\gamma\delta$ T surface cells and reduced IL-6. In the colon, it elevated $\gamma\delta$ T surface cells and reduced T cytotoxic surface cells and promoted a loss of crypts and goblet cells. In the lymphoid organs, it also reduced T cytotoxic cells, and in plasma it reduced IL-17 and CRP. Thus, pequi oil seems to have strengthened the regulatory response of gut mucosal immune system, which possibly contributed to that under conditions of disruption of integrity of gut mucosal, improvement of the histopathological clinical condition, elevation of cells with regulatory action potential and the reduction of pro-inflammatory mediators and cells with cytotoxic activity.

Keywords: Pequi oil. *Caryocar brasiliense*. Mucosal immune response. Immunomodulatory properties. Ulcerative colitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia do cólon: regiões da mucosa, da submucosa, do músculo, da adventícia/serosa e seus componentes.....	46
Figura 2 - Localização dos componentes imunológicos do intestino delgado e cólon e aspectos diferenciais.....	47
Figura 3 - Vias de diferenciação e ativação dos linfócitos intraepiteliais (LIE) naturais e induzidos.....	52
Figura 4 - Diferenças entre a resposta imune dos linfócitos de superfície de mucosa em condições de integridade da mucosa, e da resposta imune no dano à mucosa subjacente à inflamação da mucosa intestinal.....	56
Figura 5 - Representação da atuação do DSS sobre a barreira epitelial da mucosa intestinal, para indução da colite ulcerativa aguda.....	61
Figura 6 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental.....	68
Figura 7 - Esquema ilustrativo da fase 2 – indução da colite ulcerativa aguda com solução aquosa de DSS a 1,5%.....	70
Figura 8 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo.....	77
Figura 9 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos B e T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo.....	79
Figura 10 - Fotomicrografia ilustrativa da análise da espessura total do cólon e de suas camadas: mucosa +submucosa e muscular.....	84
Figura 11- Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T totais e suas subpopulações e linfócitos T $\gamma\delta$ presentes na superfície da mucosa intestinal.....	89
Figura 12- Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações, de linfócitos B e linfócitos T $\gamma\delta$ presentes em órgãos linfoides dos animais experimentais.....	90
Figura 13- Concentrações de citocinas das mucosas do intestino delgado e cólon.....	91
Figura 14- Concentrações de IgAs nos lavados de cólon, intestino delgado e fezes.....	92
Figura 15- Fotomicrografias representativas da análise histopatológica dos animais experimentais.....	93
Figura 16- Concentrações plasmáticas de citocinas dos animais experimentais.....	94

Figura 17-	Concentrações plasmáticas de proteína C reativa e imunoglobulina A dos animais experimentais.....	94
Figura 18-	Perfil leucocitário hematológico dos animais experimentais.....	95
Figura 19-	Representação das alterações imunológicas após ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal.....	104
Figura 20-	Indicadores das alterações no peso corporal dos animais experimentais durante e ao final da indução da colite ulcerativa.....	106
Figura 21-	Scores de sangramento e diarreia dos animais acometidos pela colite ulcerativa ao final e durante a fase 2.....	107
Figura 22-	Índice de atividade de doença (IAD) dos animais acometidos pela colite ulcerativa ao final e durante a fase 2.....	108
Figura 23-	Fotomicrografias representativas de alterações histopatológicas no cólon, em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	109
Figura 24-	Fotomicrografias representativas de alterações histopatológicas em criptas e células caliciformes no cólon em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	110
Figura 25-	Análise da espessura total do cólon e de suas camadas em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	112
Figura 26-	Análise do comprimento do cólon e do peso relativo do baço em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	110
Figura 27-	Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T totais e suas subpopulações e linfócitos $T\gamma\delta$ presentes na superfície da mucosa intestinal, em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	116
Figura 28-	Percentual de leucócitos totais, linfócitos T totais e subpopulações, linfócitos B e $T\gamma\delta$ presentes nos linfonodos mesentéricos e baço em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	118
Figura 29-	Concentrações de citocinas da mucosa do intestino delgado e cólon em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	119
Figura 30-	Concentrações de IgAs dos lavados de ID, cólon e fezes em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	121
Figura 31-	Concentrações plasmáticas de citocinas (pg/mg de proteína) em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	122
Figura 32-	Concentrações plasmáticas de Proteína C reativa (pg/mg de proteína) e de imunoglobulina A (ng/mg de proteína) em condições de ruptura da integridade da mucosa.....	123

Figura 33-	Perfil leucocitário hematológico em condições de ruptura da integridade da mucosa intestinal.....	124
Figura 34-	Representação das alterações imunológicas após ingestão do óleo de pequi na ruptura da integridade da mucosa intestinal.....	132
Quadro 1-	Descrição dos grupos experimentais, conforme a Fase do protocolo: Fase 1: Fase de suplementação com óleo de pequi e Fase 2: Fase de suplementação com óleo de pequi e indução da colite ulcerativa aguda.....	69
Quadro 2-	Avaliação histopatológica da parte distal dos cólons dos animais experimentais.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Perfil de ácidos graxos do óleo de pequi (g.100g ⁻¹)*.....	36
Tabela 2-	Scores atribuídos as manifestações clínicas do modelo de colite ulcerativa aguda induzida por DSS*	71
Tabela 3-	Anticorpos monoclonais <i>anti-mouse</i> conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações leucocitárias.	76
Tabela 4-	Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégia de análise.....	80
Tabela 5-	Características gerais dos animais experimentais ao final da Fase 1.....	87
Tabela 6-	Análise histopatológica do cólon após indução da colite ulcerativa.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
C	Grupo Controle
CC	Grupo Controle com colite
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CIPq	Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRP	<i>C reactive protein</i> – Proteína C reativa
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DNBS	<i>Dinitrobenzene sulfonic acid</i>
DSS	Dextra sulfato de sódio
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
GP	Ganho de peso
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution-</i>
IA	Ingestão alimentar
IAD	Índice de atividade de doença
ID	Intestino Delgado
IFN γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulina
Ig A	Imunoglobulina A
Ig As	Imunoglobulina A secretória
Ig E	Imunoglobulina E
Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LEB	Laboratório de Ensaio Biológicos
LIE	Linfócitos intraepiteliais
LLP	Linfócitos da Lâmina Própria
LMN	Linfonodos mesentéricos
LPS	Lipopolissacarídeos
LTaux.	Linfócito T auxiliar

LTcit	Linfócito T citotóxico
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MUFA	<i>Monounsaturated fat acids</i> – Ácidos graxos monoinsaturados
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NLRP3	<i>NLR domain-containing protein 3</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2 – like 2</i>
OEA	Oleoiletanolamida
OP	Grupo Óleo de Pequi
OPC	Grupo Óleo de Pequi com colite
PBS	Tampão fosfato de salina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> – Ácidos graxos poliinsaturados
SCD1	<i>Stearoyl-coa desaturase 1</i>
SERCA2a/PBL	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase/phospholamban</i>
SFA	<i>Saturated fat acids</i> – Ácidos graxos saturados
SFB	Soro fetal bovino
SIRT1	Sirtuína 1
TCR	<i>T cell receptor</i> – Receptor de célula T
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNBS	Ácido trinitro benzeno sulfônico
TNFα	<i>Tumor necrosis tumoral α</i> – Fator de necrose tumoralα
TGF β	Transforming growth factor beta
TRM	Tissue-Resident Memory
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1. Compostos alimentares/alimentos e imunomodulação.....	31
2.2. O óleo de <i>Caryocar brasiliense</i> e seu potencial protetor.....	35
2.3. Principais compostos bioativos do óleo de pequi e suas propriedades imunomodulatórias.....	40
2.3.1. Ácidos graxos monoinsaturados.....	40
2.3.2. Carotenoides.....	43
2.4. Anatomia da mucosa intestinal e fisiologia do seu sistema imune.....	46
2.4.1. Linfócitos de superfície da mucosa intestinal.....	51
2.5. Doenças inflamatórias intestinais.....	54
2.5.1 Colite ulcerativa e seus modelos de indução.....	58
3. JUSTIFICATIVA.....	63
4. OBJETIVOS.....	65
4.1. Objetivo geral	65
4.2 Objetivos específicos.....	65
5. METODOLOGIA.....	67
5.1. Obtenção do óleo de pequi e preparo da amostra.....	67
5.2. Ensaio biológico.....	67
5.2.1. Animais e condições experimentais.....	67
5.2.2 Dietas e protocolo experimental.....	67
5.2.2.1. Suplementação com óleo de pequi.....	69
5.2.2.2 Indução da colite ulcerativa.....	69
5.2.2.3 Avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar.....	70
5.2.2.4. Avaliação do índice de atividade de doença.....	70
5.3. Eutanásia e coleta de amostras.....	71
5.4. Obtenção dos lavados das fezes, do intestino delgado e do cólon.....	72
5.5. Análises de imunofenotipagem celular nos tecidos.....	72

5.5.1 Coleta de tecidos.....	72
5.5.2. Isolamento das células dos tecidos.....	73
5.5.3. Análise ex-vivo de leucócitos do baço, linfonodos, intestino delgado e cólon.....	74
5.5.4. Estratégia de análise.....	76
5.6. Dosagem de citocinas.....	80
5.7. Dosagem de Imunoglobulina.....	80
5.8. Dosagem de proteína C reativa.....	81
5.9. Leucograma global e diferencial.....	82
5.10. Análises histopatológicas.....	82
5.10.1 Preparação do tecido, confecção das lâminas e coloração.....	82
5.10.2. Análise Histopatológica do cólon.....	83
5.11. Análises Estatísticas.....	84
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
6.1. Características gerais dos animais experimentais.....	87
6.2. Efeitos da ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal.....	88
6.2.1. Imunofenotipagem de células de superfície da mucosa intestinal e de órgãos linfoides.....	88
6.2.2. Perfil de citocinas e concentração de imunoglobulina A secretória (IgAs) da mucosa intestinal.....	91
6.2.3. Análise histológica do cólon	92
6.2.4. Biomarcadores imunológicos sistêmicos.....	93
6.3. Efeitos da ingestão do óleo de pequi sobre elementos da resposta imune de mucosa em condições de ruptura da integridade intestinal.....	105
6.3.1. Quadro clínico e manifestações histopatológicas da colite na mucosa colônica.....	105
6.3.2. Imunofenotipagem de linfócitos das superfícies das mucosas do intestino delgado e do cólon e dos órgãos linfoides.....	115
6.3.3. Perfil de citocinas e a concentração de IgAs na mucosa intestinal.....	119
6.3.4. Biomarcadores imunológicos sistêmicos.....	121
6.4. Resumo dos principais resultados.....	133

7. CONCLUSÃO.....	135
REFERÊNCIAS	137

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, diversas áreas científicas têm focado suas pesquisas nas potencialidades funcionais de alimentos e produtos alimentícios, das quais destacam-se aquelas relacionadas aos efeitos imunomoduladores. Já foi demonstrado em diversas partes do mundo, a existência de propriedades imunomoduladoras de compostos presentes na castanha de caju (PEREIRA *et al.*, 2018), grãos de milho (DUVICK *et al.*, 1992), queijo (FAURE *et al.*, 2006), brócolis (BESSLER e DJALDETTI, 2018), cacau em pó (MASSOT-CLADERA *et al.*, 2014), mel (KHAN *et al.*, 2017), óleo de oliva (GORZYNIK-DEBICKA *et al.*, 2018), entre outros. No Brasil, tem sido estudado efeitos anti-inflamatórios de alimentos tais como açaí (MARTINO *et al.*, 2016), camu camu (INOUE *et al.*, 2008), jaboricaba (LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012), dentre outros, em virtude de suas elevadas concentrações de compostos bioativos, principalmente antioxidantes.

Nesse contexto um alimento que merece destaque é o fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*), conhecido popularmente como pequi e amplamente encontrado e consumido em diversas regiões brasileiras. O fruto é de baixo custo, e tem como parte comestível a polpa, que apresenta características sensoriais e nutricionais que podem contribuir com o suprimento de parte das exigências nutricionais da população. A polpa do pequi apresenta elevado conteúdo de lipídeos (66,76 g.100g⁻¹), fibras (19,19 g.100g⁻¹), carotenoides (43,3 mg.100g⁻¹) (MORENO *et al.*, 2016), vitamina C (14,33mg100g⁻¹) e vitamina A (514,38 RAE.100g⁻¹) (CARDOSO *et al.*, 2013).

Da polpa do pequi, é extraído o óleo que tem sido utilizado como ingrediente em preparações culinárias, na indústria cosmética e na medicina popular, para reparo de feridas, como anti-inflamatório e para tratamento de doenças do trato respiratório (PIANOVSKI *et al.*, 2008).

Do ponto de vista nutricional, o óleo de pequi é composto majoritariamente por ácidos graxos monoinsaturados (*Monounsaturated fat acids* - MUFA, 58,49 g.100g¹), especialmente ácido oleico (57,42g.100g¹) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Evidências sugerem que MUFA podem reduzir a magnitude da resposta inflamatória (CÂNDIDO *et al.*, 2018; FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017). Eles estão envolvidos na citoproteção em macrófagos (KIM *et al.*, 2017), diminuição da secreção de citocinas (FINUCANE *et al.*, 2015), redução de proteínas plasmáticas pró-inflamatórias (VAN DIJK *et al.*, 2012), regulação microbiana intestinal (DE WIT *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013), entre outros, o que sugere seu papel na regulação imunológica.

O óleo de pequi também é rico em diversos compostos bioativos, dos quais destacam-se os carotenoides (328-420 mg/kg) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2016). Entre os carotenoides presentes no óleo de pequi estão a anteraxantina, a zeaxantina, a violaxantina, a luteína, o β -caroteno, o licopeno, a criptoflavina, a β -criptoxantina e a neoxantina (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; CARDOSO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PALMEIRA *et al.*, 2015). Esses carotenoides são amplamente conhecidos por sua atividade antioxidante e mais recentemente por sua atividade imunomoduladora. Eles podem minimizar efeitos negativos de grandes quantidades de radicais livres produzidos por células imunes (tais como macrófagos), durante a eliminação de patógenos (SORCI e FAIVRE, 2009), exercendo um efeito modulador sobre o sistema imune (DHINAUT *et al.*, 2017). A β -criptoxantina, por exemplo, foi associada ao aumento da contagem de linfócitos T CD4+ bem como das concentrações sanguíneas das imunoglobulinas G (IgG), M (IgM), A (IgA) e interleucina 4 (IL-4) (GHODRATIZADEH *et al.*, 2014). Além disso, alguns carotenoides são pró-vitamina A, sendo, portanto, convertidos no enterócito, em ácido retinoico. Dentre os efeitos do ácido retinoico no sistema imune, destacam-se melhor prognóstico de doenças alérgicas mediadas pela imunoglobulina E (IgE) (SEO *et al.*, 2017), manutenção das concentrações séricas de IgA (SEO *et al.*, 2017), e inibição da secreção de interleucina 13 (IL-13) (YOKOTA-NAKATSUMA, 2017). Assim, tanto carotenoides quanto seus metabólitos exercem papel importante na modulação do sistema imune.

Além da presença de compostos bioativos que incitam pesquisas com o óleo de pequi, investigações prévias já demonstraram algumas de suas propriedades biológicas potencialmente funcionais, tais como atividade antioxidante (MIRANDA-VILELA, RIBEIRO e GRISOLIA, 2016), antiproliferativa, anti-tumoral (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014), anti-inflamatória (MIRANDA-VILELA, RIBEIRO e GRISOLIA, 2016) e de reparação tecidual (BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015; De OLIVEIRA *et al.*, 2010). Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando alguns efeitos advindos da ingestão deste óleo, em modelo animal, sobre o perfil de lipídeos séricos e hepáticos (TEIXEIRA *et al.*, 2013), a adiposidade visceral, a função cardíaca (CÉSAR *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017;) e a morfologia intestinal (MORENO *et al.*, 2016). Contudo, ainda são poucas as pesquisas com o *Caryocar brasiliense* e poucos trabalhos investigaram seus efeitos sobre o sistema imune, especialmente utilizando o óleo de sua polpa.

No contexto do sistema imune, a barreira da mucosa intestinal representa nossa primeira linha de defesa em contato direto com os componentes químicos dos alimentos. Essa

barreira possui um papel importante na resposta imune desencadeada por macromoléculas consumidas, por meio da sua neutralização via produção de IgA (SUZUKI *et al.*, 2004; FRANSEN *et al.*, 2015), e da resposta de tolerância dos leucócitos da mucosa intestinal (HADIS *et al.*, 2011; MAZZINI *et al.*, 2014). Além disso, a homeostase intestinal depende da interação entre microbiota, epitélio intestinal, e sistema imune (MALOY e POWRIE, 2011). O desequilíbrio dessa homeostasia pode gerar uma série de doenças dentre as quais estão as doenças inflamatórias intestinais (DII).

As DII são desordens inflamatórias que afetam o trato gastrointestinal, tendo como maiores representantes a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Elas não são fatais, mas prejudicam a homeostasia da resposta imune intestinal. Entre as consequências estão a ocorrência de fenômenos autoimunes incluindo anormalidades na imunidade humoral (DALWADI *et al.*, 2001) e celular e aumento da reatividade contra antígenos bacterianos intestinais (WEN e FIOCCHI, 2004). Neste contexto, a perda da tolerância as bactérias comensais com redução da diversidade microbiana e disbiose da microbiota intestinal é um dos fenômenos iniciais (MUNYAKA *et al.*, 2016), entretanto outros fatores estão envolvidos tais como defeitos na função das células T regulatórias (PARK, *et al.*, 2010) e estimulação de células dendríticas na mucosa (BECKER *et al.*, 2003).

Para essas doenças como estratégias terapêuticas tem sido adotadas terapias farmacológicas (BAUMGART e SANDBORN, 2007; DE LANGE e BARRETT, 2015; LIU e STAPPENBECK, 2016) e também tem sido utilizado o sequenciamento genético para direcionar o tratamento ou prevenção (PLEVY *et al.*, 2013). Entretanto, a utilização de alimentos com potencialidades imunomoduladoras na manutenção da integridade intestinal tem sido pouco explorada (YEGANEH *et al.*, 2018).

Assim, diante da riqueza em nutrientes e compostos bioativos do óleo de pequi somados às propriedades imunomoduladoras de seus constituintes químicos majoritários, há que se investigar se tais efeitos permanecem e, ou, existem, quando da ingestão do alimento como um todo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos alimentares/alimentos e imunomodulação

De maneira geral, existem evidências do papel de compostos alimentares na modulação do sistema imune de humanos e animais. Algumas situações infecciosas por exemplo, têm sido associados à deficiência de algumas vitaminas e minerais (ESPOSITO e LELII, 2015; HEMILÄ, 2017; WIRTH *et al.*, 2017; WU, HUANG e LIN, 2016). Existem doenças autoimunes, tais como a doença celíaca, a psoríase e a artrite, cujo papel de compostos alimentares tem sido amplamente estudado, visto que são importantes na patogênese e, ou no controle dessas doenças (CALDER, 1998; HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; ISSAZADEH-NAVIKAS, TEIMER e BOCKERMANN, 2012).

Dos compostos alimentares, as proteínas parecem ter papel crucial para modulação imunológica. De fato, Menezes *et al.*, (2003), demonstraram a importância do consumo de proteínas íntegras para o desenvolvimento e formação do tecido linfóide associado ao intestino. Neste trabalho, os autores forneceram dietas com proteínas inteiras ou dietas com quantidades equivalentes de aminoácidos e verificaram que os camundongos que receberam a dieta com aminoácidos, tiveram um desenvolvimento prejudicado do tecido linfóide associado ao intestino. Esse prejuízo se deu pelo baixo número de leucócitos totais e linfócitos $T\alpha\beta$ ($TCR\alpha\beta$) na lâmina própria e baixas concentrações locais de IgA secretória (IgAs). A IgA e a IgG circulantes também foram reduzidas. Além disso o perfil de resposta predominante, *in vitro*, de células de órgãos linfóides desses animais, foi do tipo Th2, com altas concentrações de interleucina 10 e 4 (IL-10 e IL-4) e baixa concentração de *interferon- γ* ($IFN\gamma$).

Os lipídeos são outra classe de compostos alimentares cuja atividade imunomodulatória tem sido extensamente estudada. Os lipídeos ingeridos na dieta, especialmente os triglicerídeos, podem influenciar a resposta imune de diversas maneiras. Eles são hidrolisados em ácidos graxos livres, os quais podem ser incorporados nos fosfolipídeos de membranas determinando seu perfil estrutural e funcional, especialmente sua fluidez (CLAMP *et al.*, 1997; DEBBABI *et al.*, 2017). Assim, modificações na constituição de ácidos graxos nas membranas celulares são determinadas, especialmente, pela quantidade de triglicerídeos dietéticos, comprimento da cadeia dos seus ácidos graxos, grau de saturação (DEBBABI *et al.*, 2017), qualidade dos lipídeos dietéticos (YAQOUB *et al.*, 1994a) em que estão inseridos, bem como o sexo do animal ou ser humano, dentre outros (CALDER, 1998; De PABLO e CIENFUEGOS, 2000). Além disso, o padrão de ácidos graxos presentes nas

membranas pode influenciar na resposta imune por outros meios, tais como a formação de peróxidos lipídicos, a produção de eicosanoides e a regulação da expressão gênica (CALDER, 1998; De PABLO e CIENFUEGOS, 2000; ROBINSON *et al.*, 1996).

Existem três grandes grupos de ácidos graxos dietéticos, de importância nutricional: ácidos graxos poli-insaturados - *Polyunsaturated fatty acids* (PUFA), ácidos graxos monoinsaturados - *Monounsaturated fatty acids* (MUFA) e ácidos graxos saturados - *Saturated fat acids* (SFA). Dentre os PUFA, estão aqueles denominados essenciais (α -linolênico e α -linoleico), por sua aquisição ser exclusivamente via dieta, e que por apresentarem importante função no processo imunomodulatório. Neste grupo, encontram-se os PUFA da série n-3 ou ômega-3 (derivados do ácido linolênico) e n-6 ou ômega-6 (derivados de ácido linoleico) (VELDHOEN e BRUCKLACHER-WALDERT, 2012). Dentre os MUFA, o interesse científico é voltado para o papel imunomodulatório dos ácidos graxos da série n-9 ou ômega-9, e em especial o ácido oleico, por ser o mais abundante na dieta.

De maneira geral, ácidos graxos poliinsaturados podem modular a resposta inflamatória de forma contraditória. De um lado, podem contribuir com respostas anti-inflamatórias, já que estão relacionados com a inibição de macrófagos, a redução de citocinas pró-inflamatórias e a inibição da expressão dos *tool-like receptors* (TLR). Por outro lado, também estão relacionados com respostas pró-inflamatórias ao modular a síntese de eicosanoides, que por sua vez induzem à síntese de metabólitos que exacerbam a inflamação, tais como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e prostaciclina (VELDHOEN e BRUCKLACHER-WALDERT, 2012).

Os ácidos graxos monoinsaturados por sua vez, estão envolvidos na redução da resposta proliferativa de linfócitos estimulados por mitógeno (PASSOS *et al.*, 2016), imunoregulação (YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1995), redução de proteínas plasmáticas (VAN DIJK *et al.*, 2012) e de citocinas pró-inflamatórias (FINUCANE *et al.*, 2015), modulação da microbiota intestinal (PATTERSON *et al.* 2014) e inibição de vias inflamatórias (FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017), como a via do inflamassoma NLRP3 (*pyrin domain-containing protein 3*) (KIRWAN *et al.*, 2017).

Já os SFA em sua maioria, tem prejudicado a resposta imune, uma vez que promovem a apoptose celular via estimulação mitocondrial e atuam em células dendríticas e células T, aumentando a expressão dos *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR), a produção de citocinas pró-inflamatórias e a diferenciação de células em um perfil Th1 ou Th17 (DE PABLO *et al.*, 1999; VELDHOEN e BRUCKLACHER-WALDERT, 2012).

Entretanto, os estudos ainda são controversos em relação aos efeitos dos diferentes ácidos graxos sobre a atuação do sistema imune na eliminação de patógenos e em doenças (CHEN *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2013; MEI *et al.*, 2011).

A apoptose celular, por exemplo, pode ser modulada de diferentes formas por diversos ácidos graxos. Em culturas *in vitro* com células HepG2 e hepatócitos, os MUFA exerceram efeitos mínimos na apoptose ao contrário dos SFA, que significativamente induziram a apoptose (MEI *et al.*, 2011). Já em cultura de células de neuroblastoma humano (IMR-32), os PUFA aumentaram a expressão de genes apoptóticos de forma seletiva para células tumorais (POLAVARAPU, DWARAKANATH e DAS, 2018). Neste caso, a ausência de citotoxicidade sobre outras células denota o papel protetor desses ácidos graxos. Apesar da aparente citoproteção dos PUFA, estudos *in vivo* demonstraram que esses ácidos graxos poderiam alterar a sobrevivência dos animais infectados com bactérias patogênicas, o que poderia estar associado com um aumento da resistência dos microorganismos (FRITSCHÉ, *et al* 1997; PAUL *et al.*, 1997). Em contrapartida esses estudos demonstraram que a citotoxicidade de SFA pode contribuir na eliminação de bactérias patogênicas (FRITSCHÉ, *et al* 1997).

Além desses macronutrientes, existem diversos nutrientes e compostos bioativos dietéticos que têm sido apontados por seu potencial imunomodulador. Dentre esses, podemos citar alguns fitoquímicos como compostos fenólicos, oligossacarídeos dietéticos, α tocoferol, indol – 3 carbinol, entre outros. Os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, lignanas, diarilheptanóides, aril-alcanonas, estilbenos e flavonoides) são capazes de modular vias pró-inflamatórias e pró-oxidantes e por isso vem sendo associados à prevenção e tratamento de artrite reumatoide (ROSILLO, LASTRA e SÁNCHEZ-HIDALGO, 2016). Os oligossacarídeos atuam diretamente sobre células imunes ou como prebióticos alterando a microbiota intestinal (JEURINK *et al.*, 2013). Por isso, podem prevenir doenças relacionadas às disfunções na tolerância imunológica tais como dermatite atópica (GRÜBER *et al.*, 2010), alergia alimentar (SCHOUTEN *et al.*, 2010) e asma alérgica (VOS *et al.*, 2007).

O α -tocoferol (vitamina E), de natureza lipoproteica, também está envolvido na modulação da resposta anti-inflamatória, por meio de sua incorporação em microdomínios da membrana plasmática. Ao interagir com ácidos graxos, polifenóis e os fosfolípidos de membrana os α -tocoferóis, inibem a oligomerização do TLR4 e atenuam a resposta inflamatória aos lipopolissacarídeos - LPS (CAPIRALLA *et al.*, 2012; CIESIELSKA e KWIATKOWSKA, 2015).

Outros compostos bioativos que vem sendo investigados por seus efeitos sobre o sistema imune, em especial pela secreção de citocinas, são a curcumina, o indol 3 carbinol, o

resveratrol e os sulfuranos. A curcumina, o resveratrol e o sulfurano, estão associados de maneira geral, ao aumento da expressão de Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2 – like 2*), e da atividade da sirtuína 1 (SIRT1), os quais podem inibir a ativação do *nuclear factor kappa B* (NFκB) e com isso aumentar a produção de mediadores anti-inflamatórios (IL-10), e reduzir os pró-inflamatórios: TNFα, IL-1 e IL-6 (CORBI *et al.*, 2016). Já o indol 3 carbinol presente em vegetais crucíferos induziu efeito anti-inflamatório e imunoregulatório em células dendríticas de camundongos, suprimindo a produção dos mediadores pró-inflamatórias, TNFα, IL-1, IL-6, IL-12, óxido nítrico, e aumentando a produção de IL-10 (BENSON; SHEPHERD, 2011).

Assim, existem evidências científicas apontando efeitos imunomodulatórios de compostos da dieta, sejam nutrientes ou não, em modelos animais e humanos. Entretanto, a maioria dos trabalhos investiga os efeitos dos componentes alimentares, em sua forma extraída ou isolada, sem considerar efeitos advindos da ingestão de alimento(s) como um todo, ricos em sua constituição química em um ou mais compostos que, isoladamente apresentam atividade imunomodulatória. Neste contexto, ainda existe uma grande lacuna a ser explorada.

Alguns tipos de leite, por exemplo, foram fornecidos a ratos por 4 semanas, e reduziram a inflamação, via aumento da concentração de oleoiletanolamida (OEA) no músculo esquelético. A OEA vem sendo considerada um regulador do metabolismo de ácidos graxos, aumentando a ativação do PPARα o que eleva a oxidação mitocondrial e promove efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (TRINCHESE *et al.*, 2018).

O potencial anti-inflamatório do tomate foi demonstrado no estudo de Riso *et al.*, (2006). Neste trabalho, uma bebida à base de tomate, que continha em sua composição 5,7 mg de licopeno, 3,7 mg de de fitoeno, 2,7 mg de fitoflueno, foi ofertada a voluntários jovens saudáveis, e reduziu em 34,4% a concentração sanguínea do *fator de necrose tumoral-α* (TNFα).

O consumo agudo de 68 gramas de abacate por voluntários jovens, por sua vez, induziu menor secreção de IL-6 e ativação do NFκB em células mononucleares do sangue periférico (LI *et al.*, 2013). Já o consumo de 200 gramas/dia de polpa de açaí durante 4 semanas por 35 mulheres, reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio em células polimorfonucleares do sangue periférico (BARBOSA *et al.*, 2016).

A ingestão de suco de laranja por mulheres saudáveis que consumiram uma refeição rica em ácidos graxos saturados inibiu o aumento pós-prandial de citocinas pró-inflamatórias (ROCHA *et al.*, 2017).

Em relação aos óleos, o de peixe, rico em PUFA da série n3 tem sido o mais estudado, devido aos seus efeitos imunoreguladores. Um estudo epidemiológico com a população de esquimós da Groelândia, indicou uma baixa incidência de doenças inflamatórias e autoimunes nessa população e este resultado foi associado ao alto consumo de óleo de peixe (KROMANN e GREEN, 1980). Animais com inflamação crônica e carcinogênese induzida por azoximetano e dextran sulfato de sódio, foram alimentados com dieta contendo óleo de milho ou óleo de peixe, e foi verificado que o óleo de peixe reduziu a injúria da mucosa, a incidência de câncer, a expressão genética de citocinas inflamatórias, o número de células T CD8+ nos linfonodos, fornecendo uma nova evidência do papel do óleo de peixe na atenuação da inflamação intestinal em células epiteliais (MONK *et al.*, 2011).

Já o óleo de oliva tem sido associado à redução na proliferação de linfócitos (DE PABLO *et al.*, 1998; YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1994a). De fato, o grupo de Pablo *et al.*, (1998) forneceu uma dieta contendo óleo de oliva para camundongos Balb/c, ou óleo de girassol ou óleo de coco hidrogenado e verificaram uma redução na proliferação de linfócitos isolados de baço e estimulados por lipopolissacarídeos, nos camundongos alimentados com óleo de oliva, em comparação com camundongos alimentados com óleo de girassol ou óleo de coco hidrogenado. Esses efeitos têm sido atribuídos principalmente à presença de ácido graxo oleico, mas também de outros compostos bioativos no óleo de oliva (PACHECO *et al.*, 2007).

Esses estudos em conjunto, reforçam o papel de compostos alimentares e alimentos sobre a modulação da resposta imunológica.

2.2 O óleo de *Caryocar brasiliense* e seu potencial protetor

O *Caryocar brasiliense* é uma espécie nativa dos cerrados brasileiros, conhecido popularmente como pequi, piqui ou pequiá. É um fruto oleaginoso de uma árvore de aproximadamente 15 metros de altura, conhecida como pequizeiro, da família *Caryocaraceae* (TRAESEL *et al.* 2017). O pequizeiro está presente nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste brasileiras (ALMEIDA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009). Este fruto é amplamente consumido nos locais onde é encontrado e apresenta além de um alto valor nutricional, potencial econômico e terapêutico para a população. As folhas, flores, frutos e casca são utilizados de diversas formas pela cultura popular, como revigorantes, afrodisíacos e diuréticos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O fruto apresenta em sua polpa um conteúdo de aproximadamente 66% de óleo (MORENO *et al.*, 2016) e por isso esse óleo tem sido utilizado na culinária, comércio e na

medicina popular. Ele também é utilizado para produção de sabão e nas indústrias têxtil e cosmética (PIANOVSKI *et al.*, 2008). Na medicina popular é utilizado para cicatrização de feridas, alívio de dores musculares e dores reumáticas e para tratamento de doenças hepáticas, úlceras gástricas e doenças respiratórias, tais como asma, bronquite, gripes e resfriados (LEITE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; TRAESEL *et al.* 2017).

Nutricionalmente, o óleo de pequi é rico em ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico (57,42%) (OLIVEIRA *et al.*, 2017) (TAB. 1). O ácido oleico é um ácido graxo de 18 carbonos com insaturação no carbono ômega 9. Ele pode ser encontrado em grandes quantidades (80%) no azeite de oliva, que é um alimento muito utilizado na culinária mediterrânea (OWEN *et al.*, 2000), e apresenta uma forte associação com vários efeitos protetores (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013). Como segundo ácido graxo majoritário, o óleo de pequi apresenta o ácido palmítico, que é de natureza saturada e é amplamente encontrado na alimentação e também é produzido por síntese endógena (SANDERS *et al.*, 2011).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do óleo de pequi (g.100g⁻¹)*.

Ácido graxo	Nº de carbonos	Média ± DP
Láurico	C12:0	0,04 ± 0,01
Mirístico	C14:0	0,10 ± 0,01
Palmítico	C16:0	37,05 ± 0,04
Esteárico	C18:0	2,12 ± 0,01
Araquidônico	C20:0	0,20 ± 0,01
Behenico	C22:0	0,07 ± 0,01
Lignocérico	C24:0	0,09 ± 0,01
Palmitoleico	C16:1	0,82 ± 0,01
Oleico	C18:1	57,42 ± 0,03
Linoleico	C18:2	1,38 ± 0,01
α-linolenico	C18:3	0,32 ± 0,01
Eicosanoico	C20:1	0,25 ± 0,01
Total de saturados		39,73 ± 0,03
Total de insaturados		60,27 ± 0,03

* Fonte Oliveira *et al.*, (2017)

Quanto a outros compostos bioativos, são escassas as informações sobre o óleo de pequi. Entretanto, existem alguns dados publicados sobre a presença desses compostos na polpa de pequi. Dentre os compostos lipofílicos da polpa, foram encontrados diversos antioxidantes com destaque para carotenoides. Dentre esses foram encontrados elevado conteúdo de β -criptoxantina ($69,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e β -caroteno ($64,21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (CARDOSO *et al.*, 2013), além de outros tais como a anteraxantina, a zeaxantina, a violaxantina, a luteína, o licopeno, a criptoflavina e a neoxantina (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). Além disso, de acordo com Oliveira *et al.*, (2017), a quantidade total desses compostos no óleo de pequi é de $32,18 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

Assim, diante da riqueza em nutrientes e compostos bioativos deste óleo somada ao relato do seu uso popular terapêutico e na alimentação, nas últimas décadas houve um aumento do interesse científico em investigações de potenciais propriedades funcionais deste alimento.

Roesler *et al.* (2008) demonstraram *in vitro* que extratos etanólicos da polpa de pequi, inibiram a peroxidação de lipídeos de membrana de forma dose dependente, o que foi atribuído ao seu alto conteúdo de antioxidantes. Miranda-Vilela *et al.* (2009) suplementaram diariamente mulheres corredoras por 14 dias, previamente à competição com cápsulas contendo 400mg de óleo de pequi. Após a competição, observou-se redução da peroxidação lipídica e do dano oxidativo ao DNA, além de redução da concentração de marcadores inflamatórios plasmáticos e da pressão arterial. Mais tarde, Miranda-Vilela *et al.* (2011) afirmaram que polimorfismos genéticos influenciaram as respostas das corredoras à ingestão do óleo de pequi. Mais recentemente Colombo *et al.* (2015) demonstraram que a suplementação com $15\mu\text{L}/\text{dia}$ de óleo de pequi, em camundongos BALB/c, por 60 dias reduziu o estresse oxidativo induzido por uretano, com redução do dano ao DNA e redução da peroxidação de lipídeos.

O potencial anti-tumoral do óleo de pequi também teceu algumas investigações. Miranda-Vilela *et al.* (2014) demonstraram que o óleo de pequi foi uma opção melhor do que as vitaminas C e E para reduzir danos induzidos por doxorubicina em células normais de camundongos com tumor de Ehrlich. Doses de $100\text{mg}/\text{kg}$ ou $400 \text{ mg}/\text{kg}$ de óleo de pequi fornecidas a camundongos por 160 dias protegeram os fígados dos animais de lesões pré-neoplásicas e de adenoma induzidos por dietilnitrosamina (PALMEIRA *et al.*, 2015).

No que se refere à saúde cardiovascular, efeitos paradoxais têm sido observados. Aguilar *et al.* (2012) demonstraram em camundongos deficientes do receptor de LDL que a ingestão do óleo de pequi em dieta hipercolesterolêmica, em comparação ao óleo de soja,

induziu um perfil mais aterogênico, com lesões avançadas na aorta, mas também reduziu a peroxidação de lipídeos e a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos.

De forma geral, os estudos prévios do nosso laboratório com o óleo ou polpa de pequi tem demonstrado alguns efeitos positivos. Inicialmente, observamos por meio de um ensaio biológico de 28 dias, que a ingestão da polpa de pequi, de modo a ofertar 600 mg/dia de óleo elevou as concentrações séricas de HDL colesterol e reduziu a deposição hepática de lipídeos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Outros marcadores de risco cardiovascular não foram alterados (TEIXEIRA *et al.*, 2013). A redução na deposição hepática de lipídeos em ratos foi observada em três outros trabalhos do nosso grupo (CÉSAR *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, Moreno *et al.* (2016) demonstraram que a suplementação com polpa de pequi em ratos saudáveis por 15 semanas promoveu melhorias na estrutura da mucosa do intestino delgado, sem afetar outros marcadores de risco cardiovascular. OLIVEIRA *et al.* (2017) também demonstraram em ratos saudáveis que a suplementação dietética com óleo de pequi na proporção 2,25 g.100⁻¹ g de dieta melhorou a função cardíaca *ex vivo* provavelmente porque aumentou a razão *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase/phospholamban* (SERCA2a/PLB), mas não afetou marcadores de risco cardiovascular sistêmicos. Em modelo de obesidade induzida por dieta de padrão ocidental (rica em banha de porco e açúcar), a substituição parcial de 27% da banha de porco por óleo de pequi reduziu a adiposidade visceral e a deposição de triglicérides hepáticos e melhorou a função cardíaca de ratos, sem influenciar em outros marcadores de risco cardiovascular (CÉSAR *et al.*, 2017).

Estes achados demonstram, em conjunto, que o óleo de pequi apresenta potencial protetor em diversos processos subjacentes ao desenvolvimento de doenças, especialmente, as crônicas não transmissíveis. Neste contexto, investigações sobre atividade imunomodulatória deste alimento, são ainda extremamente escassas. Tais investigações, até o momento foram secundárias àquelas de algumas doenças, tais como as hepáticas (TORRES *et al.* 2016), cutâneas (De OLIVEIRA *et al.*, 2010) e gástricas (DA SILVA QUIRINO *et al.*, 2009). Contudo, resultados dessas investigações predizem sobre efeito indireto desse óleo em vias imunológicas, particularmente sobre a produção de citocinas.

No estudo de Torres *et al.* (2016), foi observado o efeito anti-inflamatório do óleo de pequi em nível hepático. Nesse trabalho, ratos tratados com óleo de pequi (3 ou 6 mL/kg), por 21 dias previamente à utilização de uma potente hepatoxina que gera um processo inflamatório no fígado (tetracloreto de carbono), tiveram uma significativa redução na lesão

hepática, nas concentrações de leptina e mediadores inflamatórios, tais como a IL-6, leucotrienos 4 e 5, e receptor de TNF α .

De Oliveira *et al.* (2010) demonstraram que o óleo extraído da semente de *Caryocar coriaceum*, espécie também pertencente a família *Caryocaraceae*, apresentou atividade anti-inflamatória tópica e acelerou o reparo cutâneo *in vivo*. Foram utilizadas concentrações crescentes desse óleo (6%, 12%, 25%, 50% e 100%) sobre um modelo de edema de ouvido em ratos. Esses autores demonstraram redução da inflamação de forma dose-dependente, com inibição do edema em 38.01% em 15 minutos, na concentração de 100% (50 mL) *in natura*, quando comparados com o controle positivo. Cabe destacar que este óleo tem a composição bem parecida com o óleo de pequi da espécie *Caryocar brasiliense*, tendo como maiores constituintes o ácido oleico (57,15%) e o ácido palmítico (35,53%), apresentando como diferença apenas o conteúdo de carotenoides (De OLIVEIRA *et al.*, 2010). Assim, esses dados demonstram que a composição em ácidos graxos do óleo de pequi é fundamental para sua atividade anti-inflamatória.

Bezerra, Barros e Coelho (2015) demonstraram que a aplicação tópica de 1 mL de óleo de pequi em ratos *Wistar* em uma ferida circular produzida cirurgicamente induziu reparo das lesões cutânea. Esses autores demonstraram que o óleo promoveu maior velocidade do reparo tecidual, reduziu o número de células inflamatórias e aumentou o número de fibroblastos.

Em um estudo pioneiro, Da Silva Quirino *et al.* (2009) demonstraram a primeira evidência de que o óleo de pequi reduz o dano gástrico, induzido por etanol. Foi sugerido que tais efeitos estariam relacionados, pelo menos em parte, a mecanismos que envolvem receptores α_2 , prostaglandinas endógenas, óxido nítrico e canais de K⁺ sensíveis ao ATP. Assim, além da indicação do efeito benéfico do óleo de pequi sobre a mucosa gastrointestinal, este estudo indicou possíveis mecanismos de atuação, mas que devem ser melhor investigados.

Em resumo, diversas evidências científicas vêm apontando o potencial citoprotetor do óleo de pequi, com efeitos anti-tumoral, anti-oxidante, na hepatoproteção, na melhoria da função cardiovascular, no reparo de lesões cutâneas e gástricas entre outros. Entretanto, seus efeitos inflamatórios (anti- ou pró-inflamatórios) ainda precisam ser melhor investigados e elucidados. Foram sugeridos até o momento, a modulação de prostaglandinas endógenas e óxido nítrico bem como a redução da produção de TNF α , como vias de atuação do óleo de pequi. Adicionalmente, nada se sabe sobre os efeitos do óleo de pequi sobre o sistema imune de mucosa intestinal. Ainda, sua provável atuação sobre o reparo gástrico

fornece evidência da atividade desse óleo sobre a preservação da mucosa e incita estudos que investiguem a possibilidade de atuação contra o dano induzido à mucosa intestinal.

2.3 Principais compostos bioativos do óleo de pequi e suas propriedades imunomodulatórias

2.3.1. Ácidos graxos monoinsaturados.

Diversos estudos têm demonstrado o papel dos MUFA no metabolismo (MURPHY *et al.*, 2015), na melhoria da função cardiovascular, na redução do risco de aterosclerose (PITUCH-ZDANOWSKA, BANASZKIEWICZ e ALBRECHT, 2015) e modulação do estado redox celular (SORCI e FAIVRE, 2009). Entretanto, pouca atenção tem sido dada para seus efeitos sobre o sistema imune. A baixa prevalência de aterosclerose, por exemplo, a muito tempo vem sendo associada ao consumo de MUFA, e pode estar atrelada à modulação dos eventos inflamatórios presentes na doença. Por exemplo, o consumo de MUFA por homens de meia idade por 2 meses reduziu a expressão de moléculas de adesão intercelulares do sangue periférico, o que pode ter implicações para o desenvolvimento da aterosclerose (YAQOOB, 1998).

Atualmente, a maior parte dos estudos investigou a resposta imune mediada por MUFA em comparação com SFA, o que torna os efeitos do primeiro, ainda mais evidentes. De fato, essas evidências têm demonstrado um perfil anti-inflamatório dos MUFA quando comparados com os efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos dos SFA (FINUCANE *et al.*, 2015; YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1995; VAN DIJK *et al.*, 2012). As vias pelas quais os MUFA podem atenuar a resposta inflamatória induzida por ácidos graxos saturados, envolvem imunoregulação (YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1995; YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1994a, 1994b), redução de proteínas plasmáticas (VAN DIJK *et al.*, 2012) e de citocinas pró-inflamatórias (FINUCANE *et al.*, 2015), modulação da microbiota intestinal (CÂNDIDO *et al.*, 2018; PATTERSON *et al.* 2014) e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e, conseqüente, inativação da via do NLRP3 (inflamassoma pertencente à família do receptor *NLR*) (FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017).

Os efeitos imunoreguladores dos MUFA já foram demonstrados na literatura por meio da supressão da atividade das células *natural killers* e da expressão de receptores de IL-2 e supressão da proliferação de linfócitos T totais estimulados por mitógeno nos linfonodos mesentéricos (YAQOOB, NEWSHOLME e CALDER, 1994a, 1994b; YAQOOB; NEWSHOLME e CALDER, 1995), entretanto esses efeitos ainda são controversos. O grupo

de Yaqoob, Newsholme e Calder (1994a) não encontrou modificações nas proporções de linfócitos B, T (CD4⁺ ou CD8⁺), monócitos ou macrófagos, no baço, timo e linfonodos, estimulados ou não por mitógenos. Por outro lado, Tian *et al.*, (2016) demonstraram que o óleo de semente de damasco que é rico em ácido graxo oleico (MUFA) amenizou a imunossupressão induzida por quimioterapia. Neste estudo, os linfócitos isolados dos animais tiveram maior secreção de IgA, IgM, IgG, IL-12, IL-2 e TNF α .

Em relação aos efeitos dos MUFA sobre citocinas e proteínas pró-inflamatórias, foi verificado em adultos com sobrepeso ou obesidade que consumiram dieta mediterrânea, rica em MUFA, redução nas proteínas plasmáticas pró-inflamatórias e diminuição na expressão de genes da fosforilação oxidativa por células mononucleares do sangue periférico em relação àqueles que consumiram dieta rica em SFA (VAN DIJK *et al.* 2012). Em modelo experimental, camundongos alimentados com dieta alta em gordura, rica em MUFA, tiveram redução na secreção de IL-1 β pelo tecido adiposo, mediada pelo inflamassoma NLRP3, comparados com camundongos alimentados com dieta alta em gordura, rica em SFA (FINUCANE *et al.*, 2015). No mesmo trabalho um experimento *in vitro* demonstrou que esses MUFA inibem a secreção da IL-1 β e sustentam a ativação da AMPK, o que também está associado a redução da inflamação (FINUCANE *et al.*, 2015).

Já em um estudo randomizado com indivíduos eutróficos e obesos acompanhados por 3 semanas que ingeriram dietas ricas em ácido palmítico (SFA) ou dietas com baixa concentração de ácido palmítico e alta de ácido oleico (MUFA), foi verificado baixa secreção de IL-1, IL-18, IL-10, e TNF α por células mononucleares do sangue periférico e baixa expressão de *RNA*m para NLRP3 no músculo (KIEN *et al.*, 2016). O efeito dos MUFA contra o dano inflamatório induzido pelo inflamassoma NLRP3, parece estar associado a manutenção da ativação do sensor de excesso de energia, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017). A AMPK é um regulador metabólico chave do processo inflamatório, sensível ao excesso de energia na forma de ATP (HARDIE, 2011).

Adicionalmente, também tem sido apontado um papel dos MUFA na eubiose intestinal. Patterson *et al.* (2014) demonstraram que a suplementação com óleo de oliva (rico em MUFA) em dieta hiperlipídica foi associada com um aumento na população da família de *Bacteroidaceae* em comparação com dieta hiperlipídica rica em óleo de palma. Em uma revisão sistemática recente, Cândido *et al.* (2018) sugerem que o consumo de ácidos graxos monoinsaturados pode ser regulador da microbiota intestinal (eubiose) e conseqüentemente da inflamação, o que pode ser positivo para o ecossistema microbiano do hospedeiro.

2.3.2. Carotenoides

Pigmentos carotenoides, tipicamente presentes na polpa ou óleo de pequi (32,18 a 42 mg.100g⁻¹) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2016) são responsáveis pela coloração amarela, laranja ou vermelha de diversos alimentos. Os principais alimentos relatados como fontes de carotenoides são as frutas amarelo-laranjadas e hortaliças verde-escuras (AMBRÓSIO *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). Dentre os carotenoides encontrados no óleo de pequi destacam-se a anteraxantina, a zeaxantina, a violaxantina e a luteína, mas também apresentam quantidades importantes de β -caroteno, licopeno, criptoflavina, β -criptoxantina, neoxantina dentre outros (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Quimicamente, os carotenoides apresentam um sistema extenso de duplas ligações conjugadas que podem ser substituídas por grupos terminais o que lhes confere atividade antioxidante, protegendo as células e tecidos contra os danos dos radicais livres e oxigênio singlete (GÜLÇIN, 2012; MAIANI *et al.*, 2009; PRIOR *et al.*, 2005). Eles agem no sequestro aos radicais peroxila reduzindo a oxidação dos lipídeos, e desativam o oxigênio singlete (BARREIROS e DAVID, 2006). E por isso, atualmente são conhecidos por apresentar papel chave em funções fisiológicas diversas (BENDICH, 1989; KAULMANN e BOHN, 2014; SURAI *et al.*, 2001). Eles representam o mais abundante grupo fitoquímico solúvel em gorduras encontrado no plasma e apresentam um *clearance* renal reduzido (KLOTZ, 2009). Essas características aumentam relativamente a meia vida dos carotenoides, principalmente do licopeno, do β -caroteno e da luteína (OLMEDILLA *et al.*, 2001), o que resulta em efeitos biológicos mais prolongados.

Inicialmente, pensava-se que a habilidade de carotenoides dietéticos prevenirem infecções era dependente da sua conversão em vitamina A, ou seja, era um efeito apenas atribuído aos carotenoides pró-vitamina A (BENDICH, 1989). No entanto, pesquisas mais recentes tem verificado ação específica de carotenoides dietéticos que não apresentam atividade pró-vitamina A, tais como a luteína, a cantaxantina, o licopeno e a astaxantina. De fato, esses carotenoides não pró-vitamina A são ativos, e às vezes, mais ativos que o β -caroteno em melhorar a resposta imune humoral e mediada por células, tanto em animais quanto em humanos (CHEW; PARK, 2004). Atualmente, o papel dos carotenoides nas respostas imunes inata e adquirida está bem relatado na literatura, entretanto as vias pelas quais eles exercem seus efeitos ainda estão sendo esclarecidas (RUBIN *et al.*, 2017).

Dentre as características que contribuem para efeitos imunomodulatórios dos carotenoides, estão a natureza hidrofóbica, que facilita a incorporação em diversas membranas

e a atividade antioxidante. Reszczynska *et al.* (2015) demonstraram a sua associação à proteínas e formação de complexos que podem se ligar às membranas, o que pode contribuir com o transporte de diversos pigmentos intramembrana. Além disso, a sua incorporação aumenta a firmeza das membranas por dois mecanismos: interdigitação e compactação. Ainda, há de se considerar que a natureza dos carotenoides pode exercer diferentes respostas em biomembranas (JOHNSON *et al.*, 2018).

Nesse sentido, os carotenoides são classificados em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas. A principal diferença entre os dois é que os carotenos são completamente constituídos por hidrocarbonos e as xantofilas contêm oxigênio (JOHNSON *et al.*, 2018), o que determina a sua solubilidade. Por isso, os carotenos são muito solúveis em solventes de hidrocarbonos e as xantofilas são solúveis em solventes mais polares (CURL, 1953). Assim xantofilas podem, por exemplo, incorporar na membrana e atuar na eliminação de radicais livres tanto na fase lipídica quanto na aquosa (GRUDZINSKI *et al.*, 2017). E os carotenos podem atuar na eliminação na fase apolar da membrana. Assim, os vários tipos de carotenoides podem atuar em diferentes tipos de membrana, incluindo membrana celular, mitocondrial e nuclear (GRUSZECKI e STRZAYKA, 2005). Isso é importante porque demonstra o amplo espectro de atuação dos carotenoides na proteção contra a formação de peróxidos em membranas e lipoproteínas (GRUSZECKI e STRZAYKA, 2005; AGARWAL e RAO, 1998).

Esses efeitos justificam o papel dos carotenoides na prevenção ou tratamento de diversas doenças, tais como doenças inflamatórias intestinais (WENDLAND *et al.*, 2001), câncer (LINNEWIEL-HERMONI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2013a), aterosclerose, encefalopatia diabética, entre outras (COYNE *et al.*, 2005; MONTONEN *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2015).

Wendland *et al.* (2001), em estudo do tipo caso-controle, demonstraram relação entre a incidência de Doença de Crohn e baixos níveis plasmáticos de α e β caroteno, licopeno e β -critoxantina em 22 homens e 15 mulheres. Em uma meta análise com 13 estudos com 3832 casos de adenoma coloretal, Xu *et al.* (2013a), demonstraram que a ingestão de β -caroteno foi inversamente associada com o risco de adenoma coloretal. Outro estudo demonstrou que pacientes com aterosclerose que receberam 20 mg/dia de luteína tiveram uma significativa redução de IL-6 e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (XU *et al.*, 2013b). Esses autores associaram os resultados com os efeitos dos carotenoides em vias metabólicas diretamente relacionadas com a inflamação, tais como a via do NF κ B e do Nrf2.

De acordo com Kaulmann e Bohn (2014), a ativação da via do NF κ B pode agravar a inflamação por estar associada à transcrição e secreção de mediadores pró-

inflamatórias, tais como a IL-8 e a IL-6 e a prostaglandina E2. Linnewiel-Hermoni *et al.* (2014) demonstraram que derivados carotenoides eletrofílicos (licopeno oxidado ou derivados dialdeído sintéticos de carotenoides) inibiram em estágios diferenciados a cascata de sinalização do NFκB, inibindo a sua translocação para o núcleo. Adicionalmente, esses compostos também podem influenciar a via do Nrf2, estimulando sua translocação para o núcleo, o que induz a transcrição de genes relacionados às defesas antioxidantes enzimáticas, como a glutathione S-transferase (KAULMANN e BOHN, 2014).

Os modelos experimentais têm demonstrado que o papel imunomodulatório dos carotenoides pode se estender por diversos compartimentos corporais. Um experimento com camundongos mostrou que a suplementação contendo 300 mg de β-caroteno por kg de dieta resultou em alto número de linfócitos T e B no baço, e de IgG no soro, comparados a uma dieta basal (GARCIA *et al.*, 2003). Já camundongos com encefalopatia diabética, tratados com astaxantina (25 mg/kg/dia), tiveram uma melhoria da cognição e neuroproteção contra a injúria inflamatória. Esses resultados foram atribuídos ao bloqueio da sinalização do NFκB, e redução da expressão do TNFα no hipocampo e córtex frontal (ZHOU *et al.*, 2015). Em tecido ocular, o tratamento com astaxantina e luteína reduziu os níveis de mediadores de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios e aumentou as concentrações de enzimas antioxidantes (YEH *et al.*, 2016). Em tecido hepático já foi demonstrado efeitos da β-criptoxantina e da astaxantina na redução do dano inflamatório, por meio de mecanismos que passaram por: indução da polarização dos macrófagos M1 para M2, inibição da fibrose hepática, da beta oxidação e da peroxidação de lipídeos (NI *et al.*, 2016).

Na mucosa intestinal, os carotenoides parecem exercer funções protetoras, principalmente os pró-vitamina A. O ácido retinoico, principal forma ativa da vitamina A, promove a diferenciação de células T regulatórias antiinflamatórias o que impacta significativamente na manutenção da estrutura da mucosa (MUCIDA *et al.*, 2007). Entretanto, estudos que avaliem efeitos de carotenoides diversos agregados em um único alimento sobre integridade e funcionamento de compartimentos intestinais ainda são escassos.

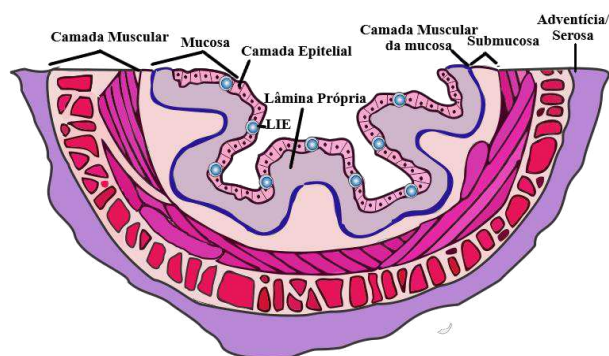
Há ainda que se atentar que, apesar da existência de estudos epidemiológicos que correlacionaram a alta ingestão de carotenoides dietéticos ou sua alta concentração no plasma, com menor risco de doenças crônicas, também existem estudos cujos resultados foram controversos quanto aos efeitos benéficos dos carotenoides (BUIJSSE *et al.*, 2005; RUBIN *et al.*, 2017). Um ensaio antigo demonstrou que a suplementação com α-tocoferol e β-caroteno, não exerceu efeito sobre a incidência de câncer de pulmão e em alguns casos piorou o seu prognóstico (OMENN, 1996). Isso demonstra que ainda há muito o que se estudar para

esclarecer o potencial funcional e imunomodulatório dos carotenoides, em especial inseridos em alimentos, bem como sobre as quantidades a serem ingeridas a fim de modular a resposta imune de forma benéfica.

2.4. Anatomia da mucosa intestinal e fisiologia do seu sistema imune

O intestino delgado e o cólon representam, em conjunto, uma extensa barreira extremamente especializada em selecionar moléculas a serem absorvidas e efetuar a reposta imune contra patógenos. Para isso, a estrutura de ambos é adaptada de forma a manter a tolerância a antígenos alimentares e reconhecer antígenos estranhos. Tal estrutura pode ser dividida em camadas: camada da mucosa, camada submucosa, camada muscular e camada adventícia/serosa (ROSS e PAWLINA, 2016) (FIG. 1).

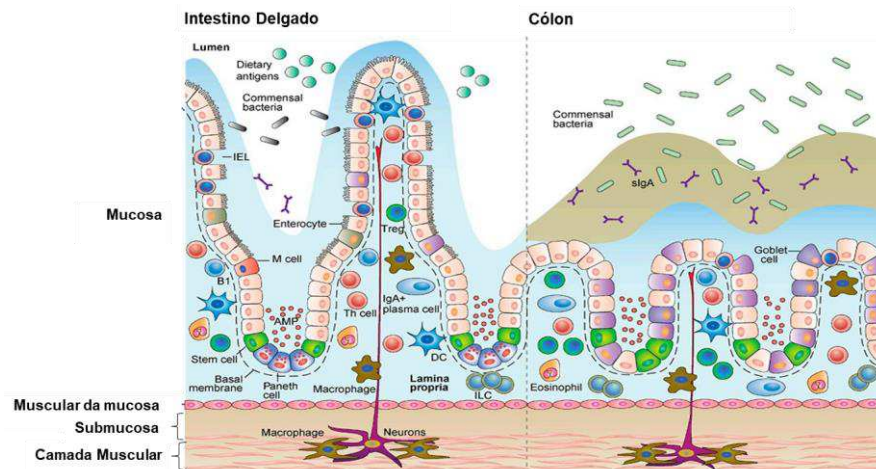
Figura 1. Anatomia do cólon: regiões da mucosa, da submucosa, do músculo, da adventícia/serosa e seus componentes*.



*LIE: linfócitos intraepiteliais de superfície da mucosa.

Ao considerar a disposição das camadas do lúmen do intestino delgado e cólon até a camada mais externa, tem-se primeiramente a mucosa, em contato direto com a superfície. A primeira linha de defesa encontrada na mucosa é formada pela lâmina epitelial, na qual encontram-se enterócitos justapostos, linfócitos intraepiteliais (LIE), células caliciformes, células de Paneth e algumas células tronco (FIG. 2) (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017).

Figura 2. Localização dos componentes imunológicos do intestino delgado e cólon e aspectos diferenciais*.



*Figura adaptada de Faria, Reis e Mucida (2017).

Adjacente à lâmina epitelial está a lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, e células do sistema imune, tais como linfócitos T *auxiliares*, células dendríticas, plasmócitos, macrófagos, células T reguladoras, entre outras (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017; ROSS e PAWLINA, 2016). Ainda na mucosa, abaixo da lâmina própria tem-se uma fina camada de músculo liso, cujas fibras ficam dispostas em sentido transversal, que constitui a camada muscular da mucosa. Abaixo desse músculo, é encontrada a tela submucosa, também formada por células do sistema imune e tecido conjuntivo. E logo depois tem-se uma camada muscular espessa que pode ser dividida em uma parte mais interna composta por fibras longitudinais e outra camada mais externa composta por fibras transversais. Por fim, recobrendo toda a camada muscular existe a camada adventícia ou serosa (ROSS e PAWLINA, 2016). Portanto, a mucosa intestinal mostra um alto grau de complexidade em sua arquitetura. As regiões epiteliais e subepiteliais hospedam a maioria das células imunes e estão mais próximas da estimulação antigênica luminal que as regiões da submucosa e muscular. Ainda na região de mucosa são encontradas criptas e células caliciformes, estruturas também envolvidas com a proteção da mucosa. As regiões de criptas são responsáveis pela renovação celular o que auxilia na manutenção da integridade da mucosa (WALLACE *et al.*, 2014) enquanto que as células caliciformes são responsáveis por secretar o muco que também impede o contato direto de antígenos luminiais com a mucosa (JOHANSSON *et al.*, 2008).

Assim, superfícies corporais estimuladas cronicamente, em particular a mucosa intestinal, são os maiores locais onde as células imunes trafegam e residem. Só na mucosa

intestinal existem mais linfócitos que nos órgãos linfoides em conjunto (CERF-BENSUSSAN, GUY-GRAND e GRISCELLI, 1985; FARIA, REIS e MUCIDA, 2017; ROCHA, VASSALLI e GUY-GRAND, 1991). O desenvolvimento dessas células depende do processo de adaptação tecidual, que influencia a resistência ou tolerância a indutores exógenos da resposta imune. Essa adaptação requer constante discriminação entre estimulação natural proveniente de alimentos e da microbiota inofensiva e patógenos que necessitam ser eliminados. A plasticidade dos linfócitos auxilia na manutenção dessa homeostasia (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017). Alguns leucócitos atuam rapidamente na eliminação do perigo, ao recrutar células maduras que participam da iniciação, fase efetora e resolução do processo inflamatório. Já a ativação crônica pode ocasionar dano inflamatório tecidual, fibrose, crescimento tumoral, ou doenças autoinflamatórias. Células imunes, portanto, devem manter um controle cuidadoso no balanço entre inflamação e tolerância (MEDZHITOV, 2008).

Basicamente, as células T da mucosa são organizadas em estruturas linfoides, dentro do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), incluindo Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos. As células T residentes no GALT são mais encontradas em nodos linfáticos periféricos, e são consideradas células linfoides. Mas existem aquelas células T não linfoides espalhadas na lâmina própria (LLP) e LIE residentes em outros sítios da membrana basal da lâmina própria (CHEROUTRE, 2004).

Dentre as células encontradas nas superfícies da mucosa intestinal, estão os LIE localizados no próprio epitélio, os quais são células únicas, dispersas entre as células epiteliais, com incidência de aproximadamente um linfócito para cada 4 a 9 células epiteliais do intestino delgado. Tem sido estimado, baseado em imunohistologia, que essas células de intestino delgado de camundongos apresentam sozinhas quantidades superiores a 50% do total de células T dos órgãos linfoides (ROCHA, VASSALLI e GUY-GRAND, 1991). Adicionalmente, as células T residentes nos compartimentos intestinais são significativamente diferentes das convencionais células T, em relação a ontogenia, fenótipo e função e, portanto, é evidente que essas células fornecem qualitativamente e quantitativamente maiores contribuições à biologia do sistema imune de mucosa e sistêmico (CHEROUTRE, 2004).

Outras células com funções cruciais para manutenção da resposta imune de mucosa intestinal são as células B. A diferenciação das células B na mucosa também está relacionado com o reconhecimento de diferentes antígenos luminiais. A secreção de IgA polireativa por plasmócitos provenientes de células B é fundamental para manutenção da diversidade da microbiota. De fato, foi verificado que camundongos deficientes em IgA

desenvolviam disbiose e variação fenotípica adicional (FRANSEN *et al.*, 2015; KAWAMOTO *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2004).

As populações de células B sofrem diferenciação em células plasmáticas produtoras de IgA. Essa diferenciação pode ser influenciada por alguns fatores como ingestão de vitamina A (SEO *et al.*, 2017) TGF β e a IL-21 (CAO *et al.*, 2015) e pela resposta Th17 (HIROTA *et al.*, 2013). De fato, após estimulação por antígenos microbianos, nas Placas de Peyer, as células Th17 adquirem um fenótipo de células foliculares *auxiliares* e induzem o desenvolvimento de centros germinativos de células B produtoras de IgA (HIROTA *et al.*, 2013). A IgA é crucial para eliminação de patógenos, de forma que a deficiência de IgA em camundongos é suficiente para elevação de bactérias filamentosas segmentadas, conhecidas pela forte indução da resposta Th17 (FRANSEN *et al.*, 2015; SUZUKI *et al.*, 2004).

Outro fator que interfere na diferenciação das células B intestinais, é o reconhecimento antigênico via *Toll-like receptors* (TLR), semelhante à resposta imune inata (KOCH *et al.*, 2016). Adicionalmente, também tem sido mostrada a atuação das células dendríticas foliculares na secreção de TGF- β e fatores de ativação de células B da família TNF (BAFF), os quais desencadeiam a expressão de células B IgA⁺ (SUZUKI *et al.*, 2010).

A resposta imune na mucosa também depende da localização, tipo de antígenos expostos e diversidade celular. Por exemplo, no cólon e íleo, a existência da microbiota é mais evidente, enquanto que antígenos solúveis são mais presentes no duodeno e jejuno onde são absorvidos (MOWAT e AGACE, 2014). As células caliciformes são predominantes no epitélio colônico (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017). Esses ambientes especializados no eixo proximal-distal dentro do tecido, são críticos para o desenvolvimento da resposta imune intestinal.

Por sua vez, os compostos alimentares estão intrinsicamente envolvidos na resposta imune de mucosa. A ingestão dietética de macronutrientes modifica a estrutura da microbiota, que por sua vez modifica o valor nutricional do alimento consumido. Os componentes dietéticos não modificados são absorvidos no intestino onde eles podem interagir com o sistema imune. Sinais microbianos na forma de padrões moleculares associados a micróbios (*microbe-associated molecular patterns*- MAMP) modificam a resposta imune da mucosa por meio de vias de sinalização inatas tais como inflamassomos ou TLR (KAU *et al.*, 2011). Componentes dietéticos modificados pela fermentação microbiana hospedeira (tais como o acetato) também atuam como sinalizadores melhorando as defesas intestinais mediadas por células epiteliais e protegendo contra infecções (FUKUDA *et al.*, 2011; KAU *et al.*, 2011). O ácido retinoico, por exemplo, pode alterar a diversidade e número

de bactérias filamentosas segmentadas na microbiota intestinal de camundongos (CHA *et al.*, 2010; KAU *et al.*, 2011). Assim, existe uma infinidade de fatores envolvidos de diversas formas na manutenção da homeostasia intestinal, mas os mecanismos associados a estes processos ainda são pouco esclarecidos.

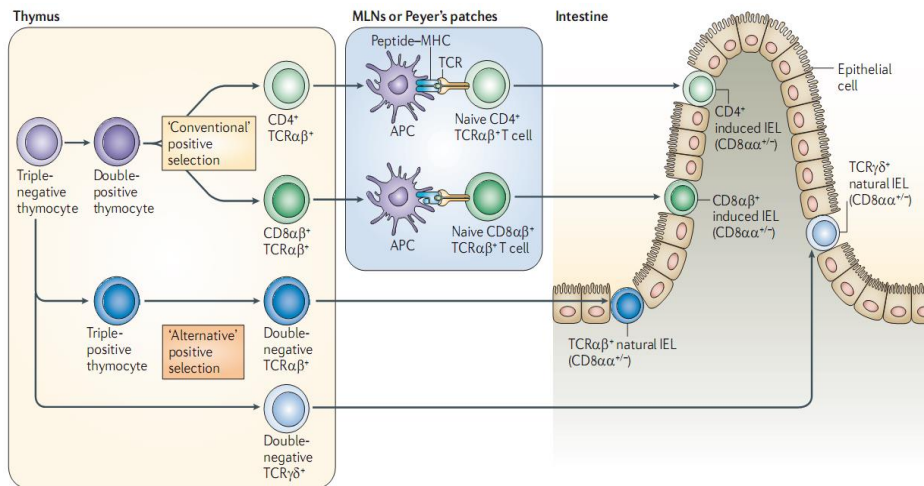
2.4.1. Linfócitos de superfície da mucosa intestinal.

Dentre os componentes do sistema imune de mucosa, especial atenção deve ser destinada aos linfócitos superficiais, entre os quais são encontrados linfócitos intraepiteliais (LIE), uma vez que são os residentes primários das superfícies da mucosa e participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011). Essas células compõem um grupo bem heterogêneo de linfócitos incluindo células de memória, residentes em tecidos (TRM – *Tissue-Resident Memory*), células linfoides inatas, caracterizadas por alta expressão de marcadores de ativação (CD69 e receptores de ativação e inibição de NK), linfócitos T citotóxicos regulados por genes tais como as granzimas B; e receptores anti-inflamatórios ou inibitórios tais como LAG-3 (DENNING *et al.*, 2007).

Entre suas principais funções, os linfócitos de superfície devem manter a homeostasia imunológica, para resguardar a barreira epitelial. Para isso, sua resposta deve ser constantemente controlada a fim de não agredir a camada epitelial. São considerados maduros para o reconhecimento de antígenos e por isso respondem prontamente ao estímulo antigênico, com liberação de citocinas ou mediante apoptose das células infectadas (OUELLETTE, 2004). A maioria dos linfócitos superficiais, são linfócitos T, apresentam grânulos em seu citoplasma e podem secretar citocinas efetoras tais como $IFN\gamma$, IL-2, IL-4, e IL-17 (CERF-BENSUSSAN, GUY-GRAND e GRISCELLI, 1985; ROBERTS *et al.*, 1993; SHIRES *et al.*, 2001). Esses linfócitos podem ser divididos em 2 grandes grupos: $TCR\alpha\beta$ e $TCR\gamma\delta$. E estão distribuídos pela barreira epitelial, em maiores proporções no intestino delgado (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011).

Em relação ao fenótipo desses subgrupos, encontramos cerca de 60 % de $TCR\gamma\delta$ no intestino delgado, que expressam marcadores de ativação tais como CD44 e CD69 (CHEROUTRE, 2004). Esses $TCR\gamma\delta$ são considerados LIE naturais ou tímicos, uma vez que são ativados por antígenos próprios ainda dentro do timo. Além dos $TCR\gamma\delta$ também são encontrados $TCR\alpha\beta$ naturais que podem expressar o homodímero $CD8\alpha\alpha^+$ ou não, mas não expressam CD4 nem $CD8\alpha\beta$ (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017). Outro subgrupo de LIE é composto por LIE induzidos ou periféricos, uma vez que são derivados dos tradicionais linfócitos $TCR\alpha\beta CD8^+$ ou $TCR\alpha\beta CD4^+$ naives e são ativados após apresentação de antígenos externos pelas células apresentadoras de antígenos, nos linfonodos ou placas de peyer, tornando-se células efetoras (HUANG *et al.*, 2011; KLOSE *et al.*, 2014; MUCIDA *et al.*, 2013) (FIG. 3). A aquisição de um fenótipo especializado, pelos LIE periféricos já ocorre no tecido epitelial intestinal (SUJINO *et al.*, 2016), com maiores proporções de $TCR\alpha\beta$, expressando $CD8\alpha\beta$ do que de $TCR\alpha\beta CD4^+\alpha\beta$ (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017).

Figura 3. Vias de diferenciação e ativação dos Linfócitos intraepiteliais (LIE) naturais e induzidos*.



*Figura retirada de Cheroutre, Lambolez e Mucida, (2011).

A migração dos LIE induzidos para o epitélio intestinal é independente da estimulação pela microbiota (BANDEIRA *et al.*, 1990; MOTA-SANTOS *et al.*, 1990). Já a manutenção no epitélio requer vias dependentes de IL-15 e do gene T-bet, mas também pode ser influenciada por compostos dietéticos (KLOSE *et al.*, 2014). Os vegetais crucíferos, por exemplo fornecem metabólitos dietéticos ligantes de receptores de hidrocarbonetos acrílicos, que estão associados com a manutenção de linfócitos de superfície TCR $\gamma\delta$ + no epitélio intestinal (LI *et al.*, 2011).

Os diferentes tipos de superfície de mucosa exercem funções diferentes conforme o compartimento onde se encontram e o estado fisiológico ou patológico (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011; MEDZHITOV, 2008). Os LIE naturais mais encontrados no ID, são os TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\alpha$ + e os TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ + e atuam em respostas anti-inflamatórias, antimicrobianas, na tolerância a antígenos intestinais, regulação imune e integridade do epitélio, entretanto podem promover dano epitelial durante a inflamação intestinal. Os LIE induzidos mais encontrados no ID, são os TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + e atuam na tolerância oral na resposta antimicrobiana. Entretanto, também contribuem para inflamação exacerbada e citotoxicidade em resposta a antígenos luminiais, piorando a doença celíaca por exemplo (CERF-BENSUSSAN, GUY-GRAND e GRISCELLI, 1985; CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011).

No cólon, os LIE naturais mais encontrados são os $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ e os induzidos mais encontrados são $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+$, ambos atuam em respostas antimicrobianas e os $\text{TCR}\gamma\delta\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ ainda exercem respostas anti-inflamatórias e tolerância a antígenos (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Entretanto, em quadros patológicos os LIE naturais colônicos promovem dano epitelial durante a inflamação intestinal e os induzidos, além desse efeito, promovem citotoxicidade em resposta a antígenos derivados da microbiota, piorando o prognóstico da doença (EPPLÉ *et al.*, 2010).

De maneira geral os linfócitos de superfície $\text{TCR}\gamma\delta$ condicionam e reparam a barreira epitelial, controlam o *turnover* celular, e fornecem uma linha de defesa contra os patógenos. Apresentam para isso uma peculiaridade em relação aos demais por não necessitarem de apresentação de antígenos para exercerem suas respostas. Ainda, estão implicados em vários papéis regulatórios incluindo, produção de IgA, limpeza do epitélio necrótico e reparo do epitélio danificado (MENGEL *et al.*, 1995). Essas funções estão relacionadas com sua capacidade de secretar substâncias ligadas à manutenção da integridade do epitélio, tais como $\text{TGF}\beta$ e fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (CHEN *et al.*, 2002; SHIRES *et al.*, 2001).

Já os linfócitos de superfície $\text{TCR}\alpha\beta$ apresentam funções relacionadas à especificidade fenotípica de seus subgrupos. Os $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD8}\alpha\beta$ atuam na eliminação de agentes infecciosos como o rotavírus (DHARAKUL *et al.*, 1991), toxoplasma gondi (LEPAGE *et al.*, 1998), entre outros (KANWAR *et al.*, 1996). Já as células $\text{TCR}\alpha\beta\text{CD4}$ fornecem papel protetor principalmente no cólon, onde são mais encontradas. Essas células durante a estimulação crônica podem exibir plasticidade e se transformarem em T reguladoras ou nos diversos subconjuntos de T *auxiliares* e podem produzir IL-10 (MCGEACHY *et al.*, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2008).

A população de linfócitos naturais ativados exerce a primeira colonização da mucosa intestinal, e assim atua tanto na defesa contra patógenos quanto na tolerância a antígenos dietéticos e a à microbiota inofensiva em fases anteriores da vida. Já a população de linfócitos induzidos, que se torna ativada apenas pela exposição a antígenos externos, ou seja, cresce conforme o envelhecimento. Isso é importante porque já foi demonstrado um papel crucial tanto de componentes dietéticos (proteínas inteiras) quanto da microbiota no estabelecimento normal dos linfócitos de superfície na mucosa intestinal (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011; MENEZES *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 1986). Os componentes dietéticos podem atuar sobre a microbiota colônica que influencia a permanência dos linfócitos de superfície na mucosa, ou ainda podem atuar diretamente sobre

eles. As vitaminas A e D por exemplo podem atuar na expansão desses linfócitos. Já foi demonstrado que camundongos deficientes no receptor de vitamina D tinham reduzido número de linfócitos de superfície $CD8\alpha\alpha^+$ e baixos níveis de IL-10, o que agravou o estado inflamatório (YU *et al.*, 2008). O ácido retinoico é um importante indutor do trânsito de LIE para o intestino, via indução de receptores de migração, tais como a integrina $\alpha4\beta7$ (IWATA *et al.*, 2003).

Dessa forma, investigar efeitos de diferentes compostos alimentares sobre os diferentes tipos de linfócitos de superfície, torna-se relevante considerando que eles fornecem um *link* entre o ambiente externo e interno e uma primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos.

2.5. Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são condições inflamatórias crônicas e multifacetadas do trato gastrointestinal, representadas principalmente pela colite ulcerativa e doença de Chron. Nenhuma delas são fatais, mas causam dor abdominal, vômito, diarreia, anemia e perda de peso (BERNSTEIN *et al.*, 2010; DE LANGE e BARRETT, 2015). Entre seus fatores etiológicos estão condicionantes genéticos, fatores ambientais desfavoráveis, desregulação da microflora intestinal e alteração da resposta imunológica (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016; LIU e STAPPENBECK, 2016; MALIK, 2015). Dentre esses fatores, o determinante presente em todas as manifestações e que pode modular o prognóstico da doença, é a resposta imunológica. Como já discutido, o sistema imune de mucosa intestinal mantém um equilíbrio entre atuação contra antígenos estrangeiros e tolerância a antígenos alimentares e à microbiota inofensiva. Nas DII, ocorre primeiramente perda da tolerância imunológica à própria microbiota, o que gera ativação imune contínua, dano à mucosa e inflamação de longa duração descontrolada (YEGANEH *et al.*, 2018).

Existe uma ligação entre a inflamação subjacente às DII e a disbiose da microbiota intestinal (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016). A disbiose é representada pela presença de bactérias patogênicas que estimulam vias inflamatórias de forma semelhante aos estímulos dos xenobióticos e da injúria. Nessa situação, padrões moleculares associados à microorganismos (MAMPs) estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias por células epiteliais, células dendríticas e macrófagos, que induzem o desenvolvimento de células T $CD4^+$ efectoras, com perfil de resposta Th1 e Th17. Também pode ser induzida a proliferação de células com perfil de resposta Th2, ou células com perfil de resposta Th9 que causam prejuízos a função da barreira epitelial.

Assim, as influências exercidas pela microbiota nas DII ocorrem com envolvimento direto tanto da resposta imune inata quanto da adquirida. Como primeira linha de defesa contra quaisquer invasores ou patógenos, a imunidade inata é a primeira a ser ativada. Assim, um dos primeiros sinais da inflamação intestinal é a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, que persiste no decorrer do curso da doença. Os neutrófilos contribuem para a patogênese da doença, uma vez que prejudicam a função da barreira intestinal e causam destruição tecidual por meio de danos oxidativos e proteolíticos e perpetuação da inflamação, através da liberação de mediadores inflamatórios múltiplos (BRAZIL, LOUIS e PARKOS, 2013).

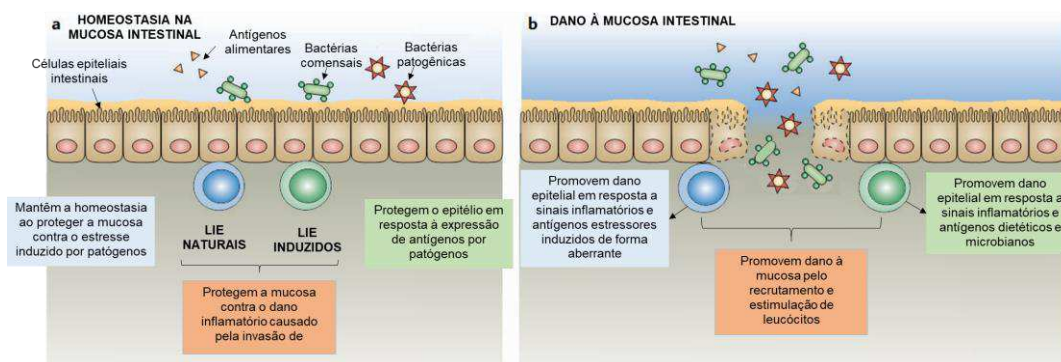
Também estão envolvidos macrófagos e células dendríticas neste processo (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016). A participação dos macrófagos intestinais se dá pela produção de citocinas, tais como IL-6, IL-23 e TNF α , que contribuem com a inflamação na doença de Crohn (KAMADA *et al.*, 2008). Já as células dendríticas fornecem um link entre resposta imune inata e equilíbrio na imunidade adaptativa (ROSSI e JAMES, 2005). Em condições adequadas, o fenótipo não inflamatório das células dendríticas semelhante ao perfil TH2, é desenvolvido, sob estímulo de sinais genéticos das células epiteliais. Contudo, na Doença de Chron, ocorre diminuição desses sinais e com isso, as células dendríticas tendem a desenvolver um fenótipo inflamatório (RIMOLDI *et al.*, 2005). Além disso, em ambas as DII, ocorre um aumento da expressão de receptores relacionados a inflamação, tais como o TLR2 e TLR4 (HART *et al.*, 2005; MIDDEL, *et al.* 2006).

Em relação à resposta imune adaptativa, as DII têm a participação da imunidade humoral, linfócitos intraepiteliais e outras células T efetoras e células T reguladoras. A presença de anticorpos contra antígenos próprios ou antígenos microbianos na doença de Crohn ou colite ulcerativa já foi previamente relatada (GONG *et al.*, 2019; HALSTENSEN, DAS e BRANDTZAEG, 1993). Essa resposta humoral parece não apresentar potencial patogênico para as DII (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016), mas precisa ser melhor investigada.

Como componentes da barreira epitelial, a atuação dos linfócitos de superfície também é fundamental nas DII. Entretanto, os estudos são controversos quanto a sua função benéfica ou prejudicial nessas doenças. De forma geral, os linfócitos de superfície naturais colônicos promovem dano epitelial durante a inflamação intestinal e os induzidos, promovem, além deste efeito, citotoxicidade em resposta a antígenos derivados da microbiota (FIG. 4). Além disso, linfócitos de superfície foram associados à indução da colite ulcerativa por meio da secreção de IL-17 (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011). Adicionalmente, linfócitos de superfície TCR $\gamma\delta$, aumentam a produção de IL-22, IL-17A e IL-17F. Essas

citocinas atuam de formas divergentes na mucosa, a IL-22 atua na proteção da barreira epitelial, já a IL-17A e a IL-17F recrutam neutrófilos que promovem a inflamação (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016). Já os linfócitos de superfície CD8⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ humanos foram associados à supressão da resposta imune na doença celíaca, já que expressam em sua superfície o receptor inibitório de células *natural killer* (NKG2A), estimulando a secreção de TGF β , o qual está envolvido no reparo tecidual (BHAGAT *et al.*, 2008).

Figura 4. Diferenças entre a resposta imune dos linfócitos de superfície de mucosa em condições de integridade da mucosa, e da resposta imune no dano à mucosa subjacente à inflamação da mucosa intestinal*.



* Figura adaptada de Cheroutre, Lambolez e Mucida, (2011).

Entre as células T efetoras, tanto as células T CD4⁺ quanto as células T CD8⁺ estão envolvidas na imunomodulação das DII. Em relação às T CD4⁺ uma mutação na diferenciação ou na função dos subconjuntos de células T *auxiliares* tem sido apontado como os maiores fatores contribuintes para imunopatologia na mucosa. Tem sido citado o importante papel da resposta Th17, estimulada por IL-23, que fornece uma interface entre células Th17 produtoras de IL-17, células Th1, Th2 e T reguladoras (WEAVER e HATTON, 2009). Esse link entre o perfil Th17 e Th1 foi verificado em pacientes com doença de crohn, nos quais linfócitos da mucosa produziram tanto IL-17, quanto IFN γ , citocina produzida por células Th1 (ANNUNZIATO *et al.*, 2007). Também já foi verificado em modelos de indução química de colite estímulo à resposta Th1, com produção de IFN γ , (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016) e da resposta Th2, com produção de IL-5 e IL-13 (TARGAN e KARP, 2005). O papel das células T CD8⁺ por sua vez, foi menos explorado nas DII, mas envolve a implicação de células T CD8 $\alpha\beta$, na iniciação e progressão da inflamação de forma dependente de IL-17 (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016).

As células T reguladoras, por sua vez, tem seu papel extensamente discutido no controle da inflamação subjacente às DII. São células T do tipo CD4⁺, que expressam o FOXP3⁺ - *forkhead box protein P3 transcription factor*, e o receptor de IL-2 – CD25⁺ (HARRISON e POWRIE, 2013). Essas células T CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ regulam a resposta imune e por isso são também recrutadas em condições inflamatórias. Entretanto nas DII, esse recrutamento é dependente do local afetado. Já foi demonstrado que células T reguladoras são suprimidas na periferia e aumentadas na mucosa (MAUL *et al.*, 2005). Este aumento na mucosa, entretanto, parece ser insuficiente para controlar os agravos das DII (HUIBREGTSE, VAN LENT e VAN DEVENTER, 2007).

Adicionalmente, existem outros componentes imunopatogênicos envolvidos em DII. Entre os componentes imunológicos, ainda podemos citar células linfoides inatas, células *natural killer*, mediadores solúveis da inflamação intestinal, principalmente representados por citocinas (BHAGAT *et al.*, 2008) e quimiocinas (JOHNSON *et al.*, 2005). E entre os componentes patogênicos, estão células epiteliais e a desregulação da permeabilidade intestinal (DE SOUZA e FIOCCHI, 2016; TURNER, 2009).

Neste contexto, a busca por alternativas de prevenção ou cura dessas doenças tem aumentado em virtude do crescimento contínuo de sua incidência em todos os continentes (BERNSTEIN *et al.*, 2010; MALIK, 2015). Somente na América do Norte, 1,5 milhões de pessoas apresentam DII (MALIK, 2015). Entretanto, os componentes imunopatológicos dessas doenças ainda não são completamente entendidos, o que dificulta a prevenção ou tratamento. Dentre as abordagens terapêuticas atualmente utilizadas estão o uso de agentes bloqueadores de TNF α (infiximab, adalimumab, etc) e anti-integrina α 4 (natalizumab). Entretanto, essas abordagens têm sido criticadas por não considerar a complexidade de agentes envolvidos na doença. Outras abordagens estão sendo testadas tais como Anti-IL-12, Anti-IL-23, Anti-IL-17 e inibidores de IL-6 (PLEVY; TARGA, 2011).

Como o tratamento para as DII necessitam da dependência por logo tempo de medicamentos, a utilização de produtos naturais e probióticos como alternativa terapêutica tem emergido (SALMINEN, ISOLAURI e SALMINEN, 1996; SHANAHAN, 2001; YEGANEH *et al.*, 2018). Como exemplo podemos citar o estudo de Yeganeh *et al.*, (2018). Nele, o potencial terapêutico dos polifenóis da maçã foi demonstrado em um experimento no qual a colite ulcerativa foi induzida em camundongos pela administração oral de 2,5 % de DSS por 10 dias e simultaneamente os animais receberam doses de 200 ou 400 mg/kg/dia de pó da casca da maçã seca. Ambas as doses reduziram as lesões histológicas e a infiltração de células inflamatórias, melhoraram parâmetros macroscópicos e atenuaram sinais clínicos.

2.5.1 Colite ulcerativa e seus modelos de indução.

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória recidiva não transmural que é restrita ao cólon (BAUMGART e SANDBORN, 2007). A patogênese da doença correlaciona marcadores genéticos e subclínicos, as abordagens terapêuticas incluem terapia oral ou tópica e o prognóstico envolve a necessidade de cirurgia, severidade da doença, risco de câncer retal e mortalidade (SILVERBERG *et al.*, 2005). A classificação clínica da colite ulcerativa nesse sentido pode esclarecer alguns pontos de sua patogênese, terapia e prognóstico. O grupo de trabalho de Silverberg *et al.*, (2005), propôs no Congresso Mundial de Gastrenterologia em Montreal uma classificação clínica da colite ulcerativa, basicamente relacionada a extensão e a severidade.

A classificação por extensão considera a inflamação no sentido coloretal, que pode ser determinada em radiografia, endoscopia, ou histologicamente. Nesse sentido a colite ulcerativa foi classificada como: (1) proctite ulcerativa, quando o envolvimento é limitado ao reto; (2) colite ulcerativa do lado esquerdo, quando a inflamação envolve a porção coloretal distal em direção à flexura esplênica e (3) colite ulcerativa extensiva, ou pancolite, que envolve desde a região proximal até a flexura esplênica. Essa classificação é importante porque a mortalidade da doença também está relacionada com a sua extensão (EKBOM, *et al* 1992; JESS *et al.*, 2007; LANGHOLZ, *et al.*, 1992).

Já a classificação por severidade, foi dividida em: (1) colite ulcerativa em remissão clínica: quando não apresentam sintomas; (2) colite ulcerativa leve, quando o indivíduo é acometido por 4 ou menos defecações ao dia, com ou sem sangramento, sem apresentar sinal sistêmico de toxidade, com taxa de sedimentação dos eritrócitos normal, ausência de febre, pulso de pelo menos 90 bpm e hemoglobina de 105 g/dL, conforme recomendações do Colégio Americano de Gastroenterologia (2004) (KORNBLUTH e SACHAR, 2004) e dos autores Truelove e Witts (1995); (3) colite ulcerativa moderada, quando o indivíduo apresentar mais que 4 defecações diárias, mas com sinais mínimos de toxidade sistêmica; e (4) colite ulcerativa severa, quando ocorrem pelo menos 6 defecações diárias com sangue, febre, taquicardia, anemia ou elevação da taxa de sedimentação de eritrócitos (KORNBLUTH e SACHAR, 2004). Casos ainda piores de colite ulcerativa foram classificados como colite fulminante, quando ocorre defecação por no mínimo 10 vezes ao dia, com sangramento contínuo, toxidade, sensibilidade e distensão abdominal, com requerimento de transfusão sanguínea e dilatação colônica (KORNBLUTH; SACHAR, 2004).

Nesse sentido, diversos autores tem procurado investigar as vias fisiopatológicas envolvidas no prognóstico da doença, bem como formas terapêuticas e preventivas e para isso foram desenvolvidos modelos experimentais para estudo das DII, em específico para estudo da colite ulcerativa. A utilização de químicos para simular a colite ulcerativa é o mais comum entre esses modelos. Assim são utilizados principalmente o ácido trinitro benzeno sulfônico (TNBS) ou oxazolona e o dextran sulfato de sódio (DSS) para os modelos de indução da inflamação intestinal.

No primeiro modelo, ocorre a administração intrarectal do TNBS ou oxazolona, que induz uma resposta mediada por células T contra antígenos luminais ou proteínas autólogas modificadas (WIRTZ *et al.*, 2007). Na colite induzida por TNBS, ele é diluído em álcool utilizado para quebrar a barreira epitelial. O TNBS atua haptenizando antígenos autólogos do cólon ou proteínas da microbiota, ativando assim, o sistema imune do hospedeiro contra esses antígenos próprios. Esse modelo é útil para estudar respostas imunes da mucosa dependentes de células T *auxiliares* (WIRTZ *et al.*, 2007). De fato, previamente foi demonstrado o papel tanto da resposta Th1 quanto da resposta Th2, na indução da colite crônica, em camundongos SJL/J, camundongos nocautes para IFN γ e camundongos Balb/c (NEURATH *et al.*, 1995, 1996). A administração retal do reagente hapteno oxazolona induz a colite severa em camundongos, caracterizada por perda de peso, diarreia, perda de células caliciformes, e altas taxas de morte (BOIRIVANT *et al.*, 1998). Esse modelo tem sido mais utilizado para investigação das respostas Th2 (WIRTZ *et al.*, 2007).

Já no modelo com DSS, os camundongos ingerem por vários dias o DSS diluído em água. Esse químico exerce citotoxicidade sobre as células epiteliais colônicas de criptas basais, o que afeta a integridade da barreira (WIRTZ *et al.*, 2007) e permite a disseminação de conteúdo pró-inflamatório intestinal para o tecido subjacente (CHASSAING *et al.*, 2014). Portanto, o conteúdo intestinal, incluindo microbiota hospedeira e patogênica, são essenciais para a evolução da doença nesse modelo.

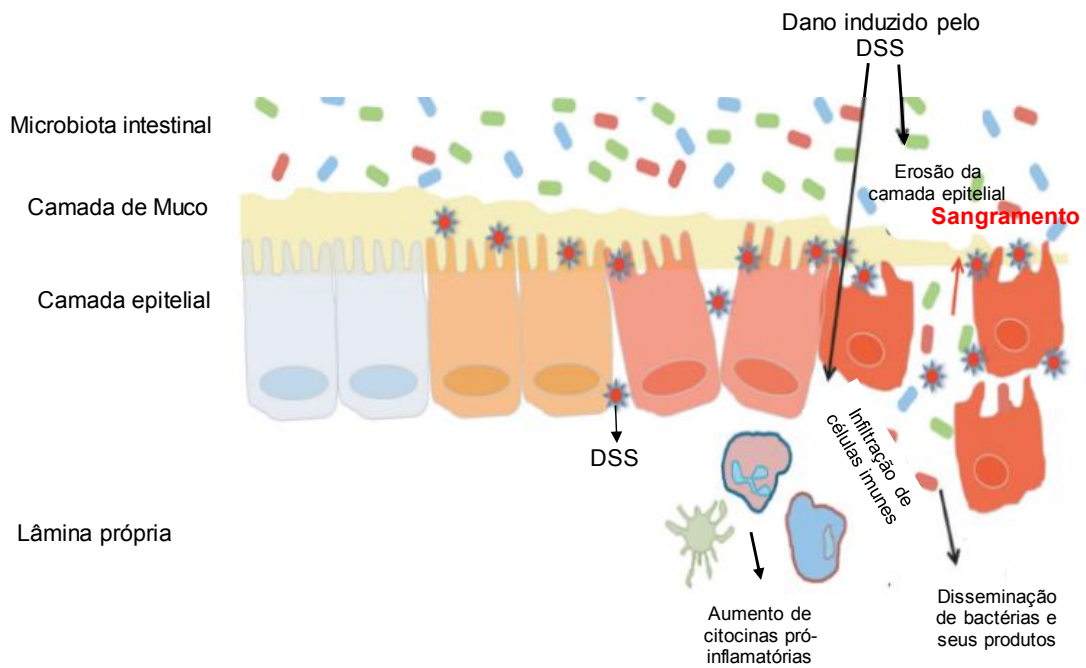
O DSS já foi utilizado para indução de colite ulcerativa em diferentes espécies de animais, como camundongos, ratos, hamsters e porcos (WIRTZ *et al.*, 2007). Ele pode ser utilizado tanto para indução de colite aguda quanto de colite crônica.

Para a colite aguda, os principais sintomas observados são diarreia com sangramento, ulceração e infiltração de granulócitos (OKAYASU *et al.*, 1990). Esse modelo foi mais utilizado para investigar as contribuições da resposta imune inata para colite (DIELEMAN, *et al* 1994), entretanto estudos mais recentes tem utilizado este modelo para

investigar a iniciação da resposta imune adaptativa. De fato, a utilização de DSS por 7 dias, na concentração de 3%, induziu a infiltração de células TCD4⁺ no cólon (GAO *et al.*, 2016).

Para indução da colite crônica tem sido utilizado o DSS em vários ciclos alternados (7 dias com DSS + 14 dias com água). O mecanismo pelo qual o DSS atua no rompimento da barreira ainda não é claro, mas Laroui *et al.* (2012) sugeriram que o DSS forma nanocomplexos lipídicos com ácidos graxos de cadeia média no cólon (FIG. 5). Adicionalmente, para indução de câncer de cólon- retal, o DSS é utilizado em combinação com azoximetano carcinógeno (TANAKA *et al.*, 2003). De forma geral esses modelos de indução de colite com DSS tem sido utilizados devido a sua simplicidade e semelhança com a colite ulcerativa humana (CHASSAING *et al.*, 2014).

Figura 5. Representação da atuação do DSS sobre a barreira epitelial da mucosa intestinal, para indução da colite ulcerativa aguda*.



*Figura adaptada de Chassaing *et al.*, (2014).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando todo o exposto anteriormente, a proposta desse trabalho se justifica diante das seguintes premissas:

- ✓ Existem evidências científicas apontando diversos efeitos imunomodulatórios de compostos da dieta, sejam nutrientes ou não, em modelos animais e humanos.
- ✓ Dentre os inúmeros compostos investigados por suas propriedades imunomodulatórias *in vivo* e *in vitro*, destacam-se MUFA e carotenoides.
- ✓ A maioria dos trabalhos investiga efeitos dos componentes alimentares, aqui destacados os MUFA e os carotenoides, em sua forma extraída ou isolada, sem considerar efeitos advindos da ingestão de um alimento como um todo, rico em sua constituição química em um ou mais compostos que, isoladamente apresentam atividade imunomodulatória.
- ✓ O óleo de pequi apresenta elevado potencial nutricional, por ser rico em lipídeos, principalmente MUFA e diversos carotenoides, o que incita sua utilização em investigações de propriedades imunomodulatórias.
- ✓ Existem algumas evidências científicas sobre efeitos anti-inflamatórios do óleo de pequi em doenças, sobre o reparo tecidual e sobre a melhoria da estrutura intestinal.
- ✓ A mucosa intestinal representa uma primeira linha de defesa contra patógenos, mas deve estar em constante homeostasia, mantendo um controle sobre a resposta de tolerância a antígenos alimentares e microbiota hospedeira.
- ✓ Antígenos alimentares podem alterar a homeostasia da mucosa intestinal, exercendo efeitos diferenciados em condições fisiológicas e patológicas.
- ✓ São ausentes na literatura investigações sobre efeitos do óleo de pequi na resposta imune da mucosa intestinal.

Assim, este estudo investigou os efeitos da ingestão do óleo de pequi na resposta imune de mucosa intestinal em duas condições: (a) na mucosa íntegra e (b) na ruptura dessa integridade, por meio da indução de uma doença inflamatória intestinal.

A hipótese do estudo foi de que a ingestão do óleo de pequi altera parâmetros imunológicos em camundongos com a mucosa intestinal íntegra ou agredida.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em elementos da resposta imune de mucosa intestinal de camundongos.

4.2 Objetivos específicos

Em condições de integridade da mucosa intestinal:

- Determinar o fenótipo de linfócitos das superfícies das mucosas do intestino delgado e do cólon e de órgãos linfoides.
- Determinar o perfil de moléculas sinalizadoras do sistema imune de mucosa intestinal.
- Avaliar biomarcadores imunológicos sanguíneos.

Em condições de ruptura da integridade da mucosa intestinal, representada por um modelo de doença inflamatória intestinal:

- Avaliar o quadro clínico e manifestações histopatológicas da colite na mucosa colônica.
- Determinar o fenótipo de linfócitos de compartimentos intraepiteliais das mucosas do intestino delgado e do cólon e de órgãos linfoides.
- Determinar o perfil de moléculas sinalizadoras do sistema imune de mucosa intestinal.
- Avaliar biomarcadores imunológicos sanguíneos.

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção do óleo de pequi e preparo da amostra

O óleo da polpa de pequi foi adquirido da empresa MM Indústria e Comércio de Alimentos – LTDA em frascos de 150 mL. Os frascos foram envolvidos com papel alumínio e armazenados a 15 °C até o momento do uso. Para sua utilização, o óleo foi aquecido a 40 °C, em banho-maria até a completa liquefação.

5.2. Ensaio biológico

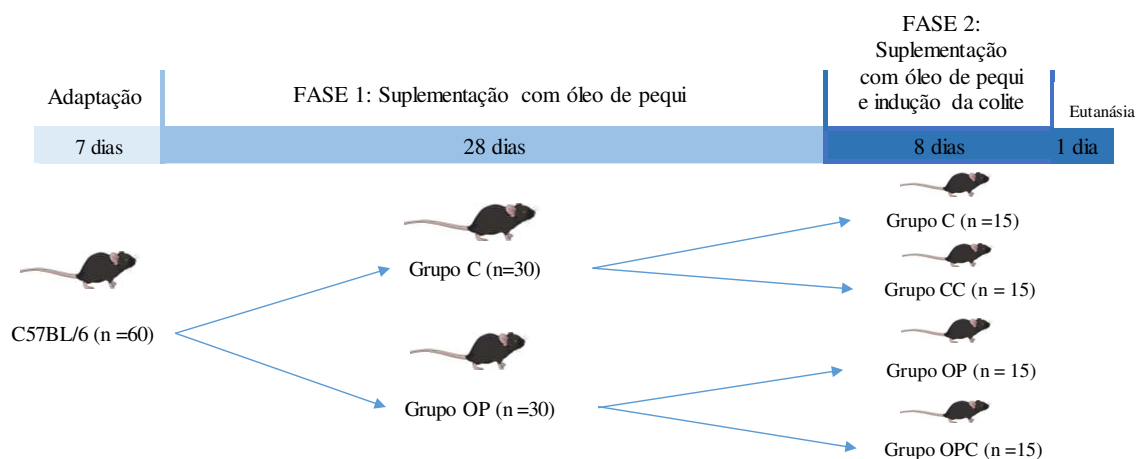
5.2.1. Animais e condições experimentais

Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6 machos, com peso médio inicial de 26,7g±3,5, adquiridos do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O experimento foi conduzido no Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB) do Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em sala climatizada (22-24 °C), em ciclo claro-escuro de 12-12 horas invertido ao ciclo regular. Os animais foram mantidos, manipulados e eutanasiados de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA (www.cobea.org.br). O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais – CEUA, da UFVJM (Protocolo n. 039/2016).

5.2.2 Dietas e protocolo experimental

Utilizou-se ração comercial da marca Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S/A), peletizada, contendo 22% de proteínas, 4,5% de lipídeos, 8% de fibras, e aproximadamente 40% de carboidratos. A densidade calórica foi de aproximadamente 3Kcal/g.

O protocolo experimental teve duração de 6 semanas e foi dividido em duas fases, conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema ilustrativo do protocolo experimental*.

* C: Grupo controle OP: Grupo óleo de pequi CC: Grupo controle com colite OPC: Grupo óleo de pequi com colite.

Inicialmente os animais passaram por sete dias de adaptação às condições ambientais e à alimentação. Em seguida, para a Fase 1 (Fase de suplementação com óleo de pequi (QUADRO 1), foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle (C) que recebeu apenas ração comercial e água filtrada *ad libitum* e grupo Óleo de Pequi (OP) que recebeu diariamente, além da ração e água, 280 mg de óleo de pequi homogeneizados em aproximadamente 1,11g de ração triturada (QUADRO 1), na forma de um *pellet*. Esta Fase teve duração de 28 dias e todos os animais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração comercial (FIG. 6). A dose de óleo de pequi utilizada neste estudo foi escolhida baseada em um estudo piloto, pelo qual foram testadas duas doses de 180 e 280 mg. Através desse estudo foi detectado que a dose de 280 mg de óleo de pequi preservou melhor o peso corporal dos animais doentes em comparação ao grupo controle (SANTOS, 2018).

No primeiro dia da Fase 2, os dois grupos experimentais foram redivididos, conforme descrito no Quadro 1, em grupos C, CC, OP, OPC e deu-se início à indução da colite ulcerativa aguda. Os grupos C e OP permaneceram nos mesmos tratamentos da Fase 1. Os grupos CC e OPC passaram a receber, além dos tratamentos da Fase 1, solução aquosa de dextran sulfato de sódio (DSS), a 1,5%, em regime *ad libitum*. Esta Fase teve duração de 8 dias (FIG. 6). Após esta fase, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras.

QUADRO 1. Descrição dos grupos experimentais, conforme a Fase do protocolo: Fase 1: Fase de suplementação com óleo de pequi e Fase 2: Fase de suplementação com óleo de pequi e indução da colite ulcerativa aguda.

Fase 1	Fase 2
<p><i>Grupo Controle – C</i> (n=30): alimentados com ração comercial</p>	<p><i>Grupo Controle – C</i> (n=15): alimentados com ração comercial + água filtrada e autoclavada <i>ad libitum</i>.</p>
	<p><i>Grupo Controle com Colite – CC</i> (n=15): alimentados com ração comercial + solução aquosa de Dextran Sulfato de Sódio (DSS) a 1,5%, <i>ad libitum</i>.</p>
<p><i>Grupo Óleo de pequi – OP</i> (n=30): alimentados com ração comercial + 280 mg de óleo de pequi/dia</p>	<p><i>Grupo Óleo de Pequi – OP</i> (n=15): alimentados com ração comercial + 280 mg de óleo de pequi/dia + água filtrada e autoclavada <i>ad libitum</i>.</p>
	<p><i>Grupo Óleo de Pequi com Colite– OPC</i> (n=15): alimentados com ração comercial + 280 mg de óleo de pequi/dia + solução aquosa de DSS a 1,5%, <i>ad libitum</i>.</p>

5.2.2.1. Suplementação com óleo de pequi.

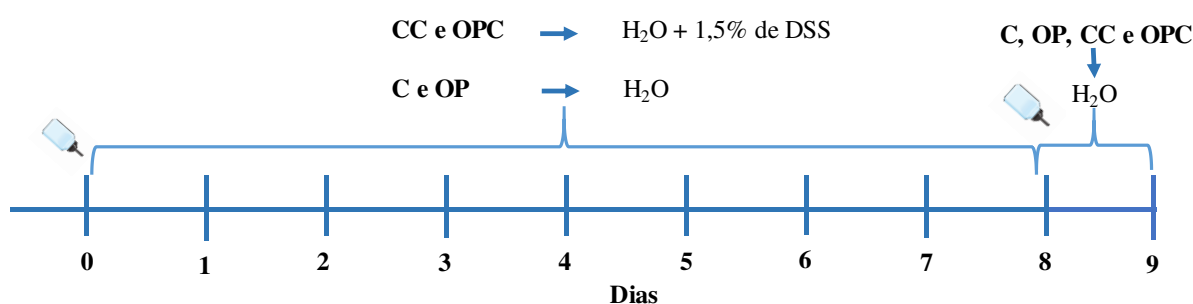
A quantidade de óleo de pequi foi determinada conforme resultados de parâmetros imunológicos do estudo piloto realizado previamente ao experimento. O *pellet* contendo 280 mg de óleo de pequi foi oferecido diariamente para o grupo OP na fase 1, e para os grupos OP e OPC na fase 2. Para isso, todos os animais foram separados diariamente e colocadas em caixas individuais de polietileno, para consumo desse *pellet*, por aproximadamente 2 horas. Após esse ingestão completa do *pellet*, foram novamente reagrupados em caixas coletivas (5 animais/caixa). Os grupos C e CC também passaram pelo mesmo procedimento diário, mas com um *pellet* contendo apenas ração comercial.

5.2.2.2 Indução da colite ulcerativa

Na fase 2, os grupos CC e OPC passaram pela indução da colite ulcerativa aguda, conforme protocolo de Wirtz *et al.* (2007), com adaptações. Os animais receberam água filtrada e autoclavada contendo 1,5% de DSS com peso molecular 40 kDa (Sigma Aldrich) durante 8 dias. Para isso foi calculado um volume total de solução correspondente a uma

ingestão média por camundongo de 6 mL por dia. Essa solução foi trocada no dia 2, e dia 5 de indução de colite, conforme Figura 7. Os animais dos grupos C e OP receberam água filtrada e autoclavada durante toda a fase 2. No dia 8 todos os animais receberam água filtrada e autoclavada. No dia 9 todos os animais foram eutanasiados (FIG. 7).

Figura 7. Esquema ilustrativo da Fase 2 – indução da colite ulcerativa aguda com solução aquosa de DSS a 1,5%.



* C: Grupo controle OP: Grupo óleo de pequi CC: Grupo controle com colite OPC: Grupo óleo de pequi com colite, H₂O: água, DSS: Dextran sulfato de sódio

5.2.2.3 Avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar

Durante a Fase 1, a ingestão alimentar e peso corporal foram avaliados semanalmente. Na fase 2 essas aferições foram feitas diariamente. O peso da ração e o peso corporal dos animais foram aferidos em balança semi-analítica (Shimadzu UX420H). O ganho de peso (GP) e a ingestão alimentar (IA) foram calculados da seguinte forma:

$$GP(g) = \text{peso corporal final (g)} - \text{peso corporal inicial (g)}.$$

$$IA(g) \text{ do período} = \text{Peso da ração ofertada} - \text{peso sobras}.$$

5.2.2.4. Avaliação do índice de atividade de doença.

Para avaliar a agressividade da colite ulcerativa aguda, dois avaliadores treinados verificaram os sinais: perda de peso, sangramento retal e diarreia durante toda a fase 2. Foram atribuídos *scores* conforme a agressividade dos sinais, de acordo com a metodologia adaptada de Murthy *et al.* (1993). Os *scores* de cada sinal estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2. Scores atribuídos as manifestações clínicas do modelo de colite ulcerativa aguda induzida por DSS*.

Score	Perda de peso (%)	Consistência das fezes	Sangramento
0	Nenhuma	Normal	Negativo
1	1 a 5 %	-	----
2	5 a 10%	Fezes Moles	Hemocult positivo
3	10 a 15%	-	Presença de sangue nas fezes
4	>15	Diarreia	Sangramento retal

*Adaptado de Murthy *et al.* (1993).

O índice de atividade de doença (IAD) foi calculado pela fórmula:

$$IAD: (\text{score de perda de peso} + \text{consistência das fezes} + \text{sangramento retal})/3$$

A perda de peso corporal foi avaliada pela diferença entre o peso durante a indução de colite e o peso inicial da fase 2.

Para avaliação das fezes e do sangramento, os animais foram separados por aproximadamente 30 minutos. Após esse período, as fezes e a presença de sangramento foram avaliadas. A consistência das fezes foi considerada normal: quando estavam bem firmes e formadas; moles: quando as fezes estavam amolecidas ou pastosas sem aderir ao ânus; Diarréia: quando as fezes estavam líquidas com aderência ao ânus. O sangramento foi avaliado como grave (*score* 4) quando estava presente no ânus e na caixa dos camundongos e moderado (*score* 3) quando estava presente apenas na caixa. Para verificação da presença de sangue oculto nas fezes (*score* 2) foi utilizado um Teste para “Pesquisa de Sangue oculto nas fezes” de cartelas (Inlab Confiança, SP, Brasil), conforme instruções do fabricante.

5.3. Eutanásia e coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados no dia 9, após o término da Fase 2, e após jejum de 12 horas. No momento da eutanásia os animais foram anestesiados com ketamina (150 mg.Kg⁻¹) e xilazina (10 mg.Kg⁻¹). A seguir tiveram suas cavidades torácicas abertas, o sangue foi coletado por punção cardíaca e, conseqüentemente, os animais foram eutanasiados por exsanguinação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados. Alíquotas foram utilizadas para confecção dos esfregaços sanguíneos e para contagem total de leucócitos. O restante das amostras foi centrifugado a 2200 x g, por 12 minutos, temperatura 4°C e o plasma foi coletado e congelado a -80°C. O baço, linfonodos mesentéricos, intestino delgado e cólon foram retirados para análises posteriores. O peso do baço e o comprimento do cólon foram aferidos.

Foi calculado o peso relativo do baço, pela razão entre o peso do baço e o peso do animal. E o comprimento do cólon foi relativizado pelo comprimento do animal.

5.4. Obtenção dos lavados das fezes, do intestino delgado e do cólon.

No dia da eutanásia, os animais foram pesados e separados até o momento da eutanásia. Para obtenção do lavado das fezes, 100 mg de fezes da caixa foram coletadas e colocadas em tubo de polipropileno de 2 mL. Foi acrescentado 1 mL de tampão fosfato de salina (PBS) (NaCl, 1,5M; NaHPO₄, 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, Ph 7,2-7,4) e misturados vigorosamente em vórtex. Logo depois o tubo contendo a mistura de fezes em PBS foi centrifugado a 850 x g, 20 minutos a 4 °C em centrífuga para *eppendorff* (SIGMA® Laborzentrifugen 2K15).

A coleta dos conteúdos do intestino delgado e cólon foi feita por cuidadosa lavagem do lúmen com 5 mL de PBS, infundido no interior de cada lado do intestino delgado com auxílio de uma seringa de 5 mL, totalizando 10 mL de lavado. Para o cólon foi utilizado o mesmo procedimento com apenas 5 mL de PBS. Da mesma forma, ambos os lavados foram misturados vigorosamente em vórtex misturados vigorosamente e logo depois foram centrifugados por 20 minutos, a 850 x g, a 4 °C em centrífuga (Jouan BR4i multifunction Centrifuge).

Após centrifugação 1 mL dos sobrenadantes dos lavados de fezes, cólon e intestino delgado, foram retirados e congelados imediatamente a -80°C. Esses lavados foram utilizados posteriormente para dosagem de IgAs.

5.5. Análises de imunofenotipagem celular nos tecidos

5.5.1 Coleta de tecidos

O baço e linfonodos mesentéricos foram removidos e colocados em Solução Salina Fosfato contendo 0,1% de albumina de soro bovino (PBS-BSA 0,1%) a 4°C. Em seguida, o intestino delgado e o cólon foram removidos e após obtenção dos lavados e remoção das Placas de *Peyer* do Intestino Delgado, ambos foram abertos longitudinalmente. Os intestinos eram então, transferidos para uma placa de petri contendo Tampão A, composto por Solução de Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS*) livre de Ca²⁺/Mg²⁺, tampão HEPES (25Mm) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) para remover o conteúdo fecal.

5.5.2. Isolamento das células dos tecidos

Baço

Células mononucleares do baço foram obtidas conforme Deitch, Xu e Qi (1990) através do emprensamento com auxílio do êmbolo de uma seringa de 5 mL em PBS-BSA 0,1%. O homogenato então passou por uma peneira de malha de calibre 70 μ M (*cell strainer*). A suspensão de células foi lavada a 400 x g, 6 minutos a 4 °C em PBS-BSA 0,1%. Após a lavagem foi feita a lise das hemácias com 9 mL de água deionizada e 1 mL de PBS concentrado (10x). As células foram lavadas 3 vezes (400xg, 6 min., 4 °C) em PBS e o volume de suspensão celular foi acertado para 1 mL com PBS-Wash (PBS 0,015 M Ph 7,4, 0,5% de BSA, 0,1% de Azida Sódica). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), pelo qual 10 mL da suspensão celular foram incubados por 5 minutos com 190 mL de azul de trypan (0,4% diluído em PBS). Para ajustar a concentração da suspensão de células para 1 x 10⁷ células/mL, foi feita a contagem de células viáveis (coradas) e excluídas as inviáveis (não coradas) utilizando-se Câmara de Neubauer.

Linfonodos mesentéricos (LMN)

As células foram isoladas dos linfonodos mesentéricos, conforme Deitch, Xu e Qi (1990). Os LMN foram removidos e foi retirado todo tecido gorduroso circundante. Foram suavemente macerados com auxílio da parte fosca de lâmina histológica. O concentrado de células foi passado por uma peneira de malha com calibre 70 μ M (*cell strainer*), para obtenção da suspensão de células únicas. A suspensão de células foi lavada duas vezes em PBS-BSA 0,1% e a viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão por azul de Trypan. A concentração final foi ajustada para 1 x 10⁷ células/mL em PBS-Wash.

Isolamento de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado e cólon

No intestino delgado e cólon, os linfócitos foram isolados dos compartimentos intraepiteliais usando o método descrito por Souza *et al.* (2016), com algumas modificações para acessar somente linfócitos intraepiteliais. Brevemente, os intestinos e cólons foram lavados três vezes com 10 mL de tampão A (composto por HBSS livre de Ca²⁺/Mg²⁺, 25mM de tampão HEPES e 5% SFB) em placa de petri, com auxílio de uma pinça. Em seguida, foram cortados em pedaços de 0,5 cm e transferidos para um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL, ou 15 mL de tampão A, a 4°C, para o cólon e intestino delgado, respectivamente. Para

a remoção do muco, os tubos cônicos foram misturados em vórtex vigorosamente por 15 segundos e logo depois, o sobrenadante foi passado por uma peneira de aço inox com malha de 1 mm. Um tampão A novo foi colocado no tecido e o processo se repetiu por 3 vezes.

Após a 3ª lavagem em tampão A, os pedaços de tecido foram imersos em tampão B (Solução de Hanks livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 2Mm de ácido etilenodiamino tetra-acético- EDTA e 25Mm de tampão HEPES). Novamente, os tubos cônicos foram vortexados vigorosamente por aproximadamente 30 segundos e a solução foi passada novamente na mesma peneira. Os pedaços de tecido foram então imersos em tampão C (Solução de Hanks livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 15 Mm de tampão HEPES, 5Mm de EDTA, 10% de Soro Fetal Bovino, 0,015% de α -Ditiotretitol) e vortexados. Depois os pedaços de tecido imersos em tampão C, foram transferidos para garrafas de cultura e mantidos no homogeneizador (Shake SI300, Lab Companion), a 37°C, 67 rpm, por 15 minutos. Após serem novamente vortexados, os pedaços de tecido foram novamente passados na peneira de aço inox. O sobrenadante foi coletado em tubo cônico de 50 mL e o tecido foi descartado. Esse sobrenadante contendo a suspensão de células únicas foi utilizado para continuidade do protocolo.

A suspensão de células em tampão C, foi centrifugada a 400xg, 6 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspendido em 10 ou 15 mL de PBS-BSA 0,1%, para o cólon e intestino delgado, respectivamente. Posteriormente, os sobrenadantes contendo linfócitos, debris e células mortas foram filtrados através de peneira com malha de calibre 70 μM , para obtenção da suspensão de células únicas.

A suspensão de células foi lavada duas vezes em PBS-BSA 0,1% e a viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão por azul de Trypan. A concentração final de células do intestino delgado foi ajustada para 1×10^6 células/ mL em PBS-Wash, e do Cólon foi ajustado para 1×10^5 células/ mL em PBS-Wash.

5.5.3. Análise ex-vivo de leucócitos do baço, linfonodos, intestino delgado e cólon

A análise dos marcadores de superfície dos linfócitos isolados do baço, dos linfonodos mesentéricos e dos compartimentos intraepiteliais do intestino delgado e do cólon foi feita pelo método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickson (BD, San Diego, CA-USA), com algumas modificações. 50 μL de suspensão de células de todos os compartimentos, ou seja 5×10^5 células dos linfonodos e baço, 5×10^4 células do intestino delgado e 1×10^4 células do cólon foram incubados com misturas de anticorpos monoclonais, por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo de luz. Foram utilizados 1 μL de anticorpos específicos para

os receptores celulares CD45, CD3, CD4, CD8, CD19 e TCR $\gamma\delta$, para análise de leucócitos totais, linfócitos T, linfócitos c, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e linfócitos T $\gamma\delta$.

Após incubação as suspensões de células foram lavadas com 1 mL de PBS e novamente com 2 mL de PBS e foram centrifugadas a 300 x g, 18° C, 7 minutos, após cada lavagem. A exceção ocorreu com as marcações para TCR $\gamma\delta$. Como o anticorpo Anti- TCR $\gamma\delta$ era biotinilado, após a primeira lavagem com PBS, foi acrescentado 5 mL de Streptoavidina diluída em PBS (1:250) e a mistura foi incubada por mais 30 minutos, posteriormente foi lavada com 2mL de PBS e centrifugada. Em seguida, as células do baço, linfonodos e cólon foram ressuspensas em 0,1 mL de PBS e 0,1 mL de tampão de fixação PBS-Paraformaldeído 4%. As células do intestino delgado foram ressuspensas em 0,2 mL de PBS e 0,1 mL de tampão de fixação PBS-Paraformaldeído 4%. Prosseguiu-se a análise em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II® - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) em um intervalo de tempo de no máximo 24 horas.

As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros fenotípicos celulares a fim de quantificar o percentual de diferentes marcadores em linfócitos, indicando a frequência de células de interesse nas diversas subpopulações celulares estudadas. Foram adquiridos por tubo aproximadamente 50000 eventos totais para o cólon e 50000 *singlets* (células únicas) para o baço, linfonodos e intestino delgado. Os dados foram analisados usando o software FlowJo, version 10.0.6 (Tree Star Inc., Ashland, OR). Os anticorpos utilizados para identificação das populações leucocitárias eram conjugados com os fluorocromos Aloficocianina (APC^o, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Proteína Clorofila Peridina (PerCP) ou Ficoeritrina (PE), e o Anticorpo Anti-TCR $\gamma\delta$ era conjugado com biotina. Para este, foi utilizado uma Streptoavidina conjugada com PE. Os anticorpos, seus clones e suas especificidades estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos monoclonais *anti-mouse* conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações leucocitárias.

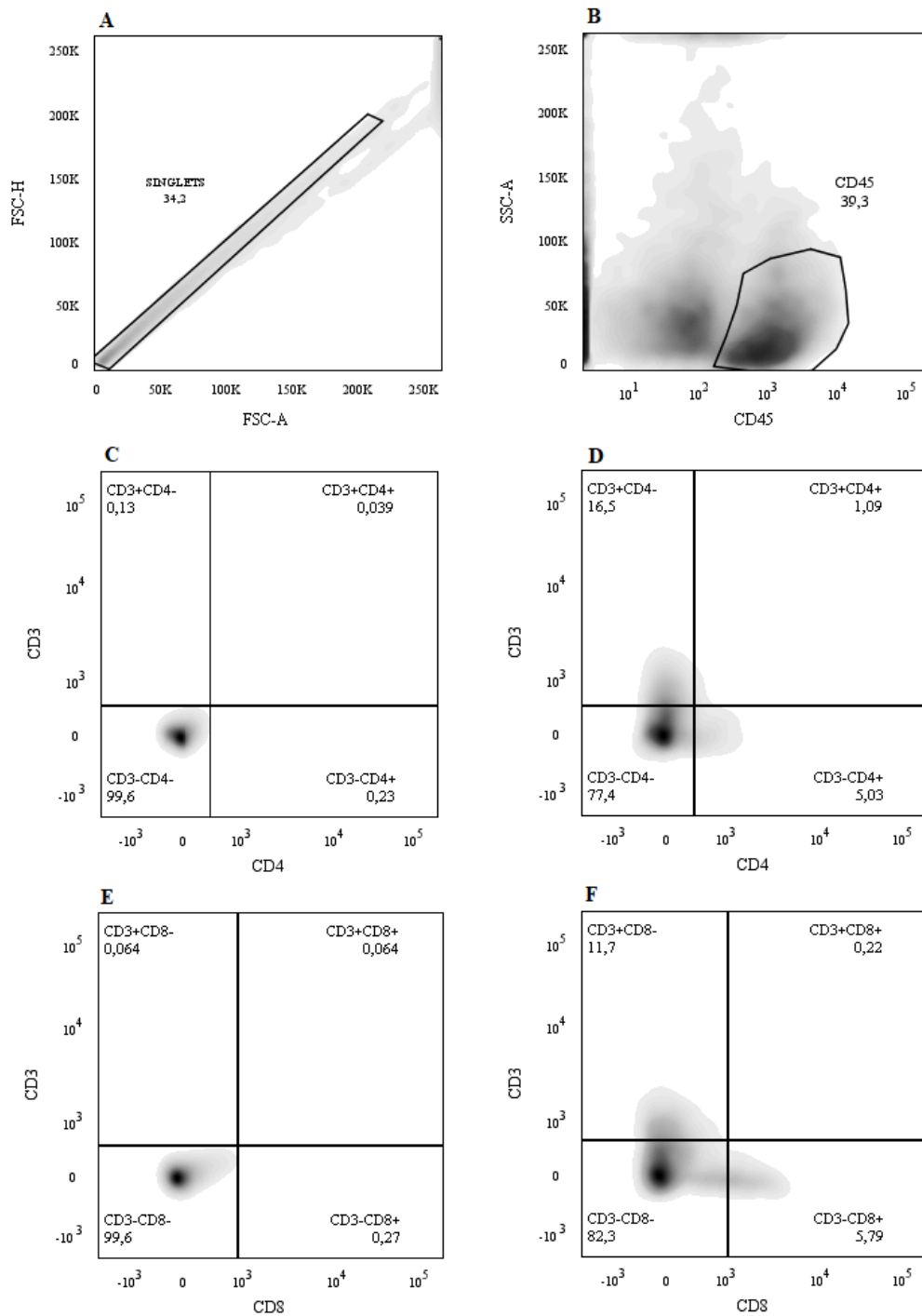
Anticorpos	Clone e marca	Especificidade
Anti-CD45 APC efluor	30-F11 e-Bioscience, USA	Leucócitos
Anti-CD3 PE	17 ^a 2 BD Biosciences USA	Linfócitos T
Anti-CD4 FITC	GK1.5 BD Biosciences USA	Linfócitos Th
Anti-CD8 PERCP	53-6,7 BD Biosciences USA	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19 FITC	1D3 (RUO), Caltag Laboratories, USA	Linfócitos B
Anti-TCR $\gamma\delta$ <i>Biotin</i>	GL3 BD Biosciences USA	Linfócitos T $\gamma\delta$

5.5.4. Estratégia de análise

A estratégia de análise geral compreendeu as seguintes etapas: seleção de células únicas (*singlets*), seleção de leucócitos totais e seleção das populações leucocitárias de interesse. Para isso, primeiramente foi feito um gráfico de distribuição de pontos, com os eixos “tamanho pelo pico de área” e “tamanho pelo pico de altura” (FSC-A x FSC-H). Nesse gráfico foi selecionada a população de células únicas (*singlets*), com um *gate* sobre essa população, conforme Figura 8. Dessa população foi plotado um novo gráfico de granulidade (SSC) pela fluorescência da população de leucócitos totais (CD45). Neste gráfico foi feito um *gate* sobre a população de leucócitos totais e a partir desse *gate* foi plotado os gráficos posteriores.

Para análise do percentual de linfócitos T Totais em relação ao total de leucócitos e percentual de Linfócitos T auxiliares dentro do total de Linfócitos T foi feito um gráfico conforme as marcações com anticorpos Anti-CD3 x Anti-CD4. Para análise do percentual de linfócitos T citotóxicos dentro de linfócitos T as marcações foram Anti-CD3 x Anti-CD8. A partir das populações de células não marcadas com anticorpos foi estabelecido o que seriam as populações marcadas, utilizando *gates* de quadrantes. Os dados obtidos em cada quadrante dos gráficos de dispersão corresponderam aos valores percentuais da população seccionada nos gráficos de dispersão SSC x Anti-CD45. A estratégia de análise está especificada na Figura 8.

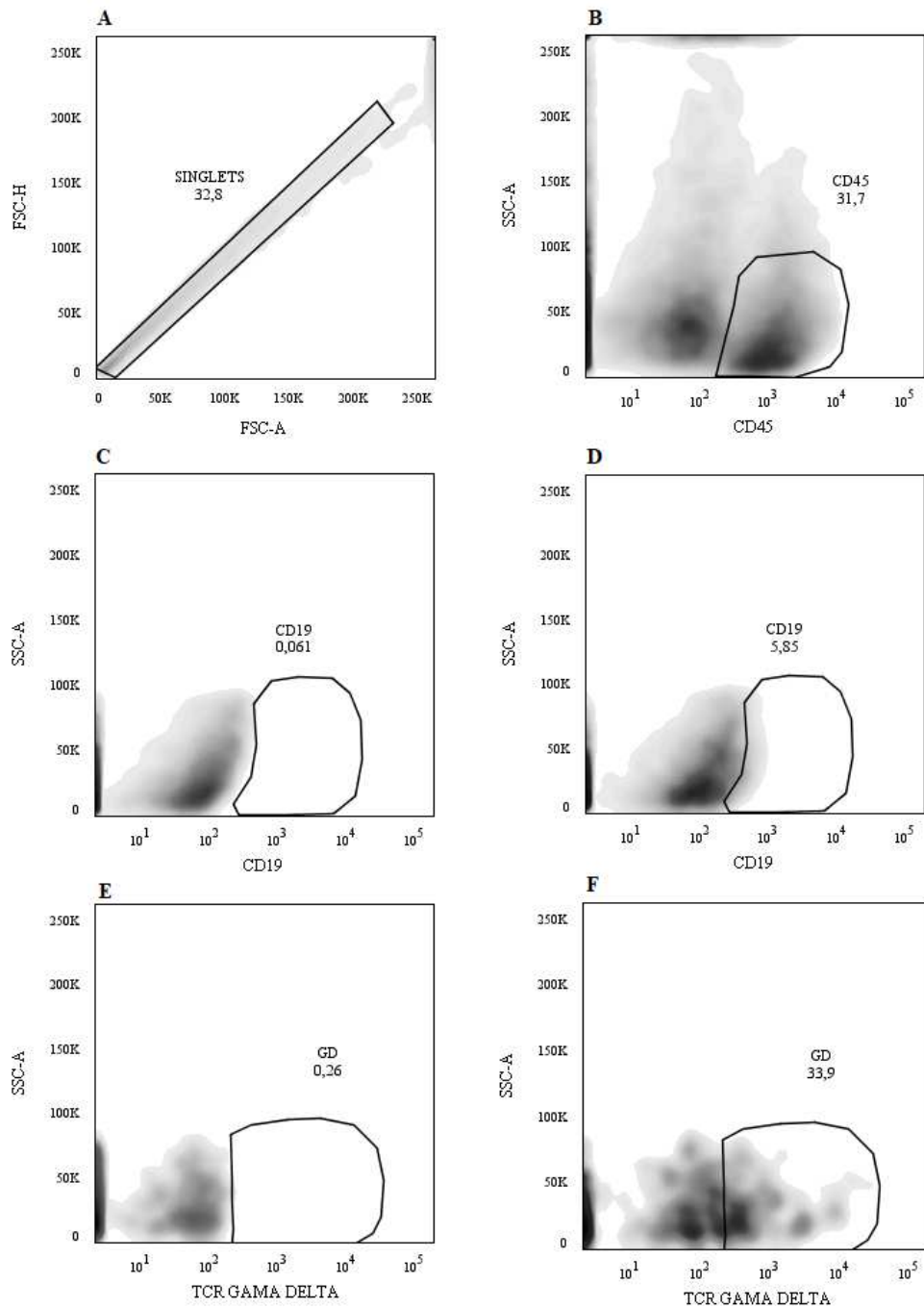
Figura 8. Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo*.



*Gráficos de dispersão pontual são usados para seleção de *singlets* (A). Em seguida são utilizados gráficos SSCxAnti-CD45, para seleção de leucócitos (B). As células não marcadas são delimitadas por um *gate* de quadrantes nos gráficos Anti-CD3xAnti-CD4 (C) para percentual de células T Totais e Células Th e Anti-CD3xAnti-CD8 (E) para percentual de células T citotóxicas. Esses mesmos *gates* são utilizados para delimitar as populações de células marcadas (D e F).

Para obtenção dos percentuais de linfócitos B e de linfócitos T $\gamma\delta$, após seleção dos leucócitos foram plotados gráficos de dispersão de granulosidade x fluorescência dos anticorpos CD19-FITC e TCR $\gamma\delta$ Biotin-Streptoavidina-PE (Stp-PE), para detecção das populações de linfócitos B e T $\gamma\delta$, respectivamente (FIG. 9). Da mesma forma, a partir das populações de células não marcadas com anticorpos foi estabelecido o que seriam as populações marcadas utilizando um *gate* desenhado manualmente.

Figura 9. Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de Linfócitos B e $T\gamma\delta$ por citometria de fluxo.



Gráficos de dispersão pontual são usados para seleção de *singlets* (A). Em seguida são utilizados gráficos SSCxAnti-CD45, para seleção de leucócitos (B). E por fim são utilizados gráficos SSCxAnti-CD19, para seleção percentual de células B (D) e gráficos SSCxAnti-TCR $\gamma\delta$ -Stp-PE, para seleção percentual de células $T\gamma\delta$ (F) após delimitação das células não marcadas (C e E).

As misturas de anticorpos para detecção de cada população celular estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégia de análise.

APC efluor	PE	FITC	PERCP	Stp-PE	Subpopulações analisadas
CD45	CD3				% leucócitos e linfócitos totais
CD45	CD3	CD4	CD8		% linfócitos T auxiliares e citotóxicos
CD45		CD19			% linfócitos B
CD45				TCR $\gamma\delta$	% linfócitos T $\gamma\delta$

5.6. Dosagem de citocinas

As porções distais do intestino delgado e cólon foram pesadas e homogeneizadas em um tampão de extração de citocinas, contendo 23,4 g de NaCl, 500 mL de Tween 20, 5 g de BSA, 34 mg de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1 mL de DMSO, 44,6 mg cloreto de benzetônio, 372 mg Na₂EDTA e 40 mL de aprotinina (10 mg/ mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluídos em 1 L de PBS. As amostras foram maceradas em tubo de polipropileno de 1,5 mL com auxílio de uma ponteira de 1 mL, a 4°C (100 mg tecido/ 0,5 mL tampão). Após homogeneização as suspensões foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de polipropileno de 1,5 mL e congelados a -80°C.

Para dosagem de citocinas, os homogenatos e plasma foram descongelados em gelo. Foram avaliadas as concentrações das citocinas das respostas Th1, Th2 e Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ , IL-17, IL-10), por meio do ensaio de citometria de *beads*, usando kit CBA (BD *Biosciences*) para camundongos, conforme recomendações do fabricante. Prosseguiu-se a análise em citômetro de fluxo (FACSCANTO II, BD *Biosciences*). Os dados foram analisados usando o software FlowJo, versão 10.0.6 (Tree Star Inc., Ashland, OR). A concentração de cada citocina foi calculada baseada na curva padrão obtida com a citocina recombinante de camundongos, posteriormente foi corrigida pelo conteúdo de proteína total, sendo então expressa em pg/mg de proteína total. A dosagem de proteína total foi feita pelo método de Bradford (1976).

5.7. Dosagem de Imunoglobulina A

Os lavados de fezes, cólon e intestino delgado, e o plasma foram descongelados a 4°C e posteriormente foi dosado IgAs, por ELISA- *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, com

kit de reagentes para detecção quantitativa de IgA em camundongos (eBioscience, Viena, Austria), conforme instruções do fabricante. Brevemente, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura por poço, *overnight*, a 4°C. Após 2 lavagens com tampão de lavagem, os poços foram bloqueados com tampão de bloqueio a temperatura ambiente, por 2 horas ao abrigo de luz. Os poços foram novamente lavados por 3 vezes com tampão de lavagem. Prosseguiu-se a diluição seriada da curva padrão e das amostras de plasma (1:10000). As amostras dos lavados não foram diluídas para o ensaio. Tanto a curva padrão quanto as amostras foram pipetadas nos poços e prosseguiu-se a incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi novamente lavada 4 vezes e depois os poços foram incubados com anticorpo de detecção por 1 hora, a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 4 vezes e foi adicionada a solução substrato em cada poço. Após 20 minutos, a reação foi interrompida com uma solução de parada (*Stop solution*). As leituras das absorbâncias foram feitas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Ou Ratastie 2, FI-01620 Vantaa, Finlândia), nos comprimentos de onda 570 nm e 450 nm. Posteriormente, foi calculada a concentração de imunoglobulina A conforme as absorbâncias encontradas para a curva padrão, a qual foi corrigida pelo conteúdo de proteína total, sendo a concentração expressa em ng/mg de proteína total. A dosagem de proteína total foi feita pelo método de Bradford (1976).

5.8. Dosagem de proteína C reativa

O plasma de cada amostra foi descongelado a 4°C e posteriormente foi dosado a proteína C reativa (do inglês *C-reactive protein*- CRP), por ELISA, com kit de reagentes para detecção quantitativa de CRP em camundongos (R&D System, USA & Canadá), conforme instruções do fabricante. Brevemente, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura por poço, *overnight*, a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com tampão de lavagem, os poços foram bloqueados com reagente diluente, à temperatura ambiente, por 1 hora ao abrigo de luz. Os poços foram novamente lavados por 3 vezes com tampão de lavagem. Prosseguiu-se a diluição seriada da curva padrão e das amostras de plasma (1:10000). Tanto a curva padrão quanto as amostras foram pipetadas nos poços e prosseguiu-se a incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi novamente lavada 3 vezes e depois os poços foram incubados com anticorpo de detecção por 2 horas, a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes e foi adicionada a streptoavidina- HRP em cada poço. Após 20 minutos ao abrigo de luz, prosseguiu-se mais uma etapa de lavagem semelhante as demais. A solução substrato foi

adicionada em cada poço e após 20 minutos, a reação foi interrompida com uma solução de parada (*Stop solution*). As leituras das absorvâncias foram feitas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Ou Ratastie 2, FI-01620 Vantaa, Finlândia), nos comprimentos de onda 570 nm e 450 nm. Posteriormente, foi calculada a concentração de CRP conforme as abosorbâncias encontradas para a curva padrão, a qual foi corrigida pelo conteúdo de proteína total, sendo a concentração expressa em pg/mg de proteína total. A dosagem de proteína total foi feita pelo método de Bradford (1976).

5.9. Leucograma global e diferencial

No dia da eutanásia, foi realizado o leucograma global. Para isso o sangue foi diluído na proporção 1:20 em Líquido de Turk. Após 5 minutos, 10 µL da solução foi adicionada na Câmara de Neubauer e os leucócitos foram contadas em contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Baruerí, SP, Brasil). Para leucograma diferencial, os esfregaços sanguíneos foram corados com *Giemsa* e *May-Grunwald*, conforme descrito por Carvalho e Silva (1998), utilizando se o microscópio de luz com objetiva de imersão (Olympus – BX41TF – Japan).

5.10. Análises histopatológicas

5.10.1 Preparação do tecido, confecção das lâminas e coloração

No último dia do experimento, após lavagem do cólon com PBS a 4°C, foi feito um corte transversal na secção distal do cólon. Um pedaço de aproximadamente 1,5 cm de cólon foi imediatamente colocado em formalina tamponada 10%.

Após fixação com formalina tamponada 10% os tecidos foram submetidos à desidratação com gradiente crescente de álcool (70, 80, 90 e 100%). Os cólons foram submetidos ao processo de diafanização, no qual o álcool presente nos tecidos é substituído por xilol, e logo após o processo de impregnação, em que o xilol é substituído por parafina fundida em estufa a 60°C. Posteriormente foram confeccionados os blocos com os tecidos incluídos em parafina.

Foram confeccionadas lâminas com os cortes teciduais de 5 µm, utilizando um micrótomo (Lupetec MRP09). Para isso, a cada 2 lâminas confeccionadas, um intervalo de 15 cortes era dado, para confecção de outras 2 lâminas, com um total de 6 lâminas para cada amostra. Metade das lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). A outra metade foi corada com corante Azul de Alcião com pH de 2,5, e contracorados com hematoxilina,

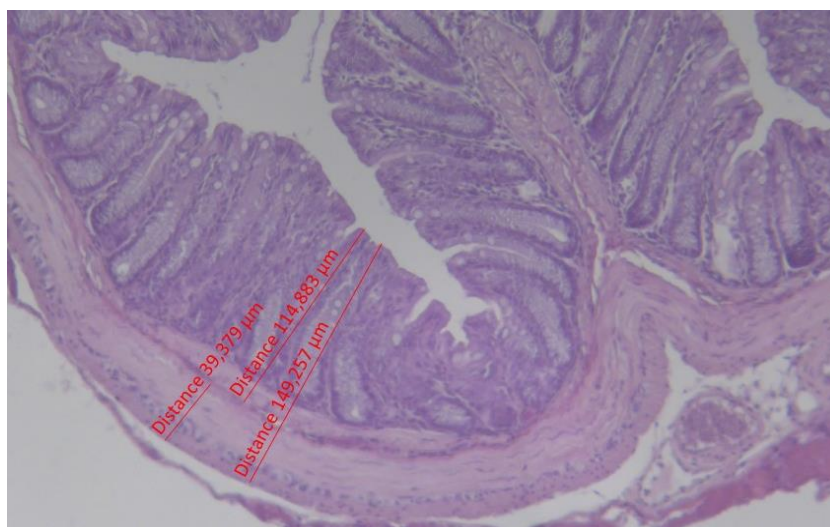
para avaliação de células caliciformes e região de criptas. Os campos foram fotografados utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio (Zeiss), nos aumentos de 40x, 100x e 400x.

5.10.2. Análise Histopatológica do cólon.

A avaliação histopatológica foi realizada por 2 indivíduos em ensaio duplo-cego devidamente treinados. As lâminas coradas em HE foram utilizadas para avaliar os seguintes critérios: erosão, ulceração, integridade do epitélio, presença de folículos linfoides, e infiltração e células imunes (Quadro 2). As lâminas coradas com Azul de Alcian foram utilizadas para avaliar a região das criptas e a presença de células caliciformes (Quadro 2). Foram atribuídos *scores* de 0 a 4 para todas as variáveis conforme Quadro 2, e o resultado do *score* histopatológico total foi dado pela somatória de todos os *scores*, conforme as metodologias adaptadas de Erickson *et al.* (2016) e Kojouharoff *et al.* (1997).

Também foi analisada a espessura total da parede do cólon, bem como das regiões de mucosa + submucosa e camada muscular. Para isso 3 campos de cada lâmina foi analisado, utilizando o software *Axion Vision*, conforme Figura 10.

Figura 10. Fotomicrografia ilustrativa da análise da espessura total do cólon e de suas camadas: mucosa +submucosa e muscular.



Coloração HE. Aumento de 100x.

5.11. Análises Estatísticas

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado. Todos os resultados foram expressos em médias \pm erros padrões. A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. Para avaliar o efeito da ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal, o grupo C foi comparado com o grupo OP e para investigar o efeito da ingestão do óleo de pequi sobre a ruptura dessa integridade, o grupo OPC foi comparado com o grupo CC e C. Para as comparações simples entre os grupos C vs OP e CC vs OPC, foi utilizado, em caso de atestado a normalidade dos dados, o Teste *T de Student* e em caso contrário, o Teste *Mann Whitney*. Para as demais comparações (C vs CC vs OPC), quando os dados foram paramétricos, utilizou-se análise de variância de um fator (*One Way ANOVA*) e o teste de comparações múltiplas de Tukey, *à posteriori*, quando necessário. Quando os dados não foram paramétricos, utilizou-se a análise de Kruskal-Wallis e o teste de Dunns *à posteriori*, quando necessário. Para todas as análises estatísticas, foi adotado como nível de significância $p < 0,05$ e utilizado o software no Prisma, versão 5.0. Os gráficos também foram gerados no Prisma, versão 5.0.

QUADRO 2. Avaliação histopatológica da parte distal dos cólons dos animais experimentais.

Parâmetros gerais	Erosão e Ulceração		Características do epitélio	Infiltração de células imunes		Nº de folículos linfoides
	<i>Scores</i>	Extensão da Erosão Ulceração		Profundidade da Erosão Ulceração	Presença da Infiltração de células imunes	
0	Nenhuma (0)	Nenhuma	Morfologia Normal	Nenhum	Nenhuma	0
1	Pontual (1)	Lâmina Epitelial	Perda de células caliciformes	Mínimo	Mucosa	1
2	Mínimo (2)	Lâmina Própria da Mucosa	Perda de células caliciformes em grandes áreas	Mediano	Mucosa + Submucosa	2
3	Moderado (3)	Lâmina Muscular Própria	Perda de criptas	Moderado	Mucosa + Submucosa + Muscular	3
4	Generalizada (>3)	Tela submucosa	Perda de criptas em grandes áreas	Severo	Mucosa + Submucosa + Muscular + Serosa	> 3

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Características gerais dos animais experimentais

Os animais iniciaram o protocolo experimental com pesos corporais homogêneos entre os grupos (TAB. 5). Não houve variação desse parâmetro, em função da suplementação com óleo de pequi ao final da Fase 1 (TAB. 5), com isso, todos os animais iniciaram a fase 2 com pesos corporais também homogêneos. A ingestão alimentar diária foi aproximadamente 18% menor para o grupo OP, o que não alterou a ingestão calórica diária. No entanto, é importante ressaltar que a suplementação com óleo de pequi provavelmente tornou a ingestão calórica lipídica diária superior para o grupo OP (TAB. 5).

Tabela 5. Características gerais dos animais experimentais ao final da Fase 1.

Variáveis	Grupos experimentais	
	C (n=30)	OP (n = 30)
Peso corporal inicial (g)*	27,43±0,58	27,47±0,49
Peso corporal final (g)*	28,22±0,64	28,25±0,60
Ingestão alimentar diária (g)**	4,03	3,58
Ingestão calórica diária (Kcal)**	12,16	12,56
Ingestão lipídica diária (Kcal)**	1,78	4,06

*Resultados expressos em médias ± erros padrões e diferenças avaliadas por teste T de *Student*. ** Resultados expressos como média de ingestão da caixa.

De maneira geral, inferiu-se que a ingestão diária de 280 mg de óleo de pequi por 28 dias, não alterou indicadores antropométricos nem a ingestão alimentar dos animais. Isso indica que, apesar da adição de óleo de pequi, somada aos lipídeos já presentes na dieta, ter elevado em aproximadamente 17% o seu valor calórico, não promoveu maior ingestão calórica diária e não alterou o peso corporal final. Assim sugerimos que é provável que não tenha havido ruptura do balanço energético para o grupo OP.

6.2. Efeitos da ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal

6.2.1. Imunofenotipagem de células de superfície da mucosa intestinal e de órgãos linfoides

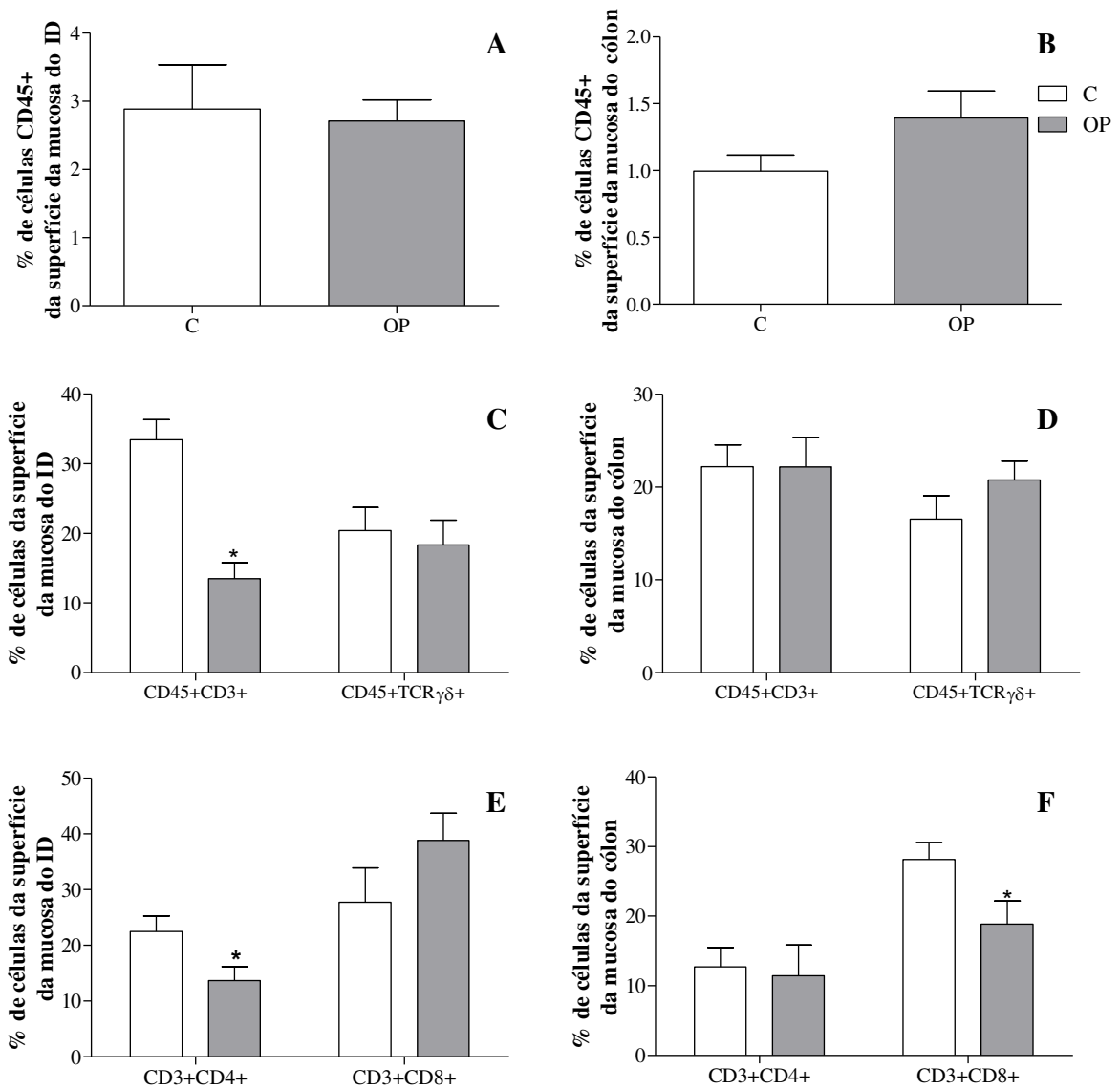
Nas figuras 11 e 12 pode ser observado um panorama geral do perfil fenotípico celular na superfície da mucosa intestinal e de órgãos linfoides.

Nas superfícies da mucosa intestinal, no grupo OP foram verificados menores percentuais de linfócitos T totais (CD45+CD3+) ($p < 0,0001$, FIG. 11C) e de linfócitos T auxiliares (CD45+CD3+CD4+) no ID ($p < 0,05$, FIG. 11E). Já no cólon o grupo OP apresentou redução no percentual de linfócitos T citotóxicos (CD45+CD3+CD8+) ($p < 0,05$, FIG. 11F).

Em relação aos linfonodos mesentéricos, o grupo OP apresentou menores percentuais de linfócitos T citotóxicos (CD45+CD3+CD8+) ($p = 0,002$, FIG. 12E). E no baço, apresentou menores percentuais tanto de células T auxiliares ($p < 0,05$, FIG. 12F), quanto de células T citotóxicas ($p = 0,002$, FIG. 12F).

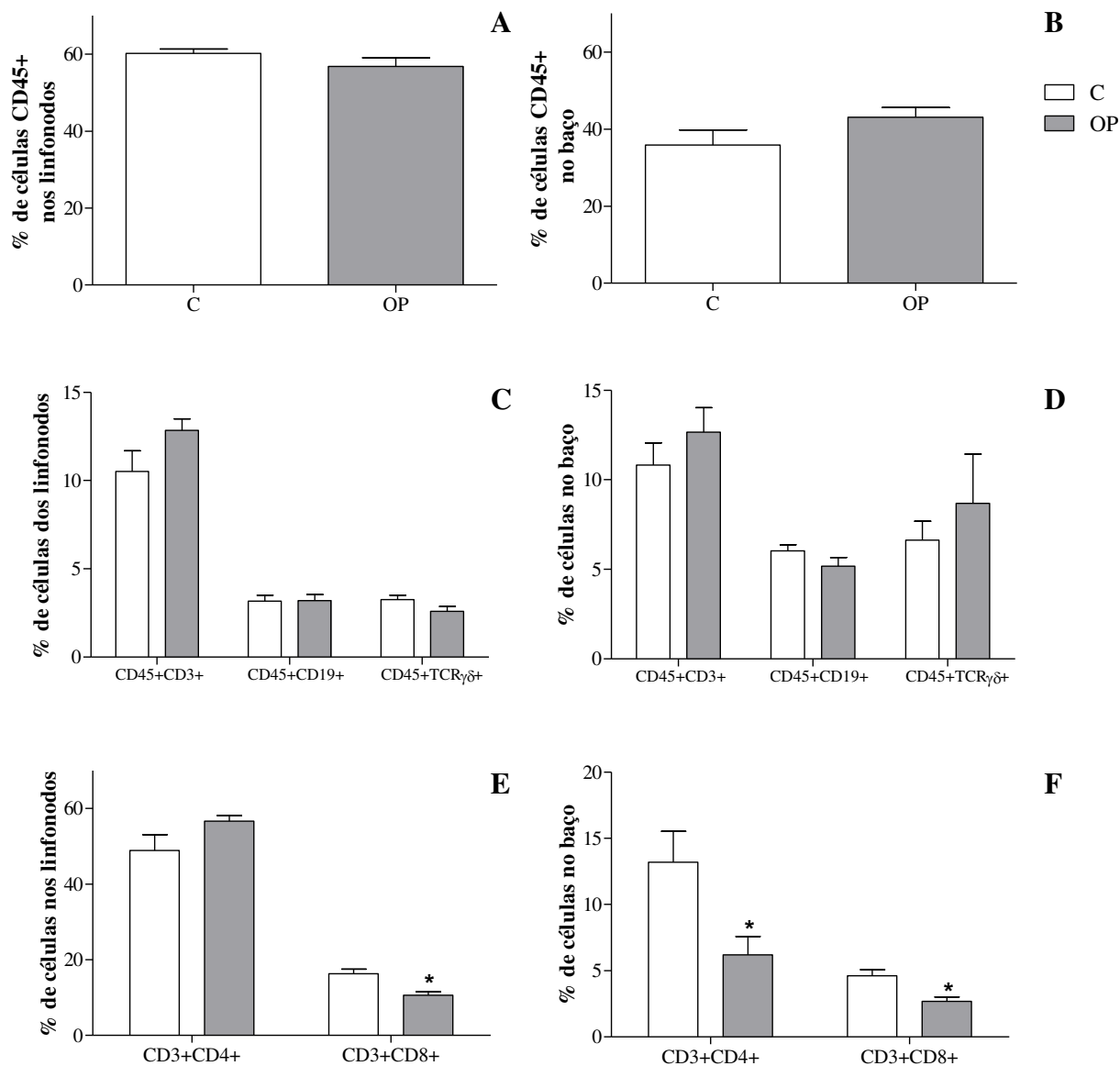
Os leucócitos totais (CD45+) e os linfócitos T $\gamma\delta$ (CD45+TCR $\gamma\delta$ +) não foram alterados pelo tratamento com óleo de pequi em nenhum dos tecidos avaliados (FIG. 11A-D e 12A-D) nas condições de integridade da mucosa intestinal. E os linfócitos B (CD45+CD19+) não foram alterados nos tecidos linfoides avaliados (FIG. 12A-D) nas mesmas condições. Também não foram alterados os linfócitos T totais (CD45+CD3+) dos linfonodos mesentéricos (FIG. 12C), baço (FIG. 12D) e cólon (FIG. 11D). E por último, não foram alterados no grupo OP, os linfócitos T auxiliares (CD45+CD3+CD4+) da superfície de mucosa do cólon (FIG. 11F) e dos linfonodos mesentéricos (FIG. 12E) e os linfócitos T citotóxicos intraepiteliais (CD45+CD3+CD8+) do ID (FIG. 11F).

Figura 11 Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T totais e suas subpopulações e linfócitos $T\gamma\delta$ presentes na superfície da mucosa intestinal.



Percentual de leucócitos totais na superfície da mucosa do ID (A) e do cólon (B). Percentual de linfócitos T, B e $T\gamma\delta$ na superfície da mucosa do ID (C) e do cólon (D). Percentual das subpopulações de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos na superfície da mucosa do ID (E) e do cólon (F). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, n=10 animais/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney, C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi, ID: intestino delgado.

Figura 12. Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações, de linfócitos B e linfócitos T $\gamma\delta$ presentes em órgãos linfoides.

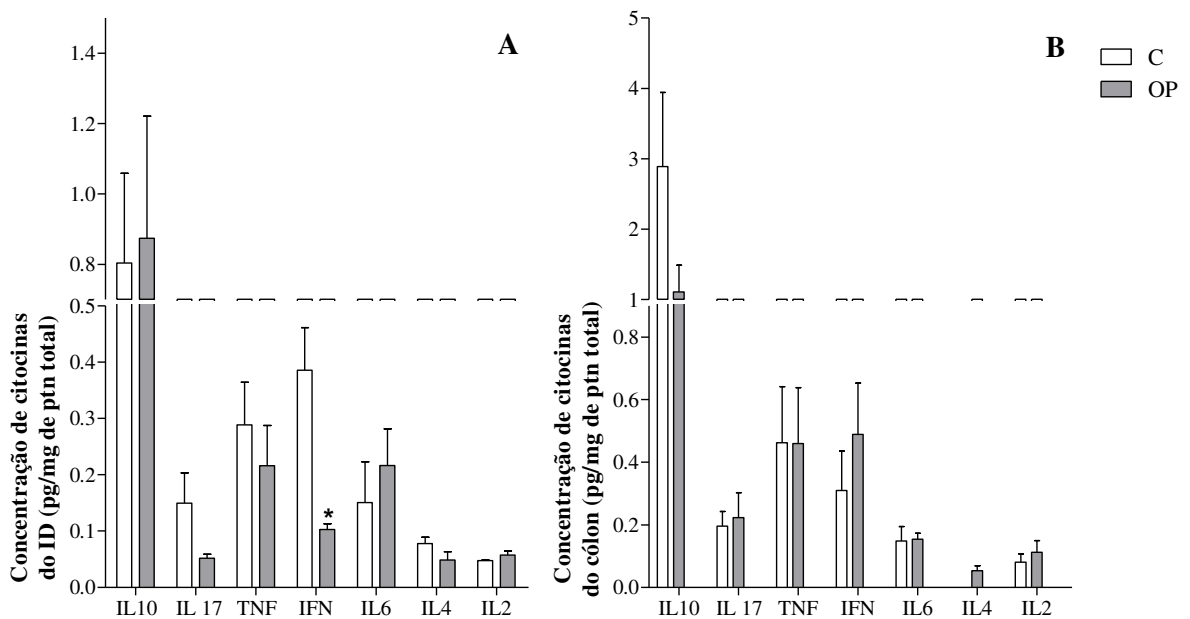


Percentual de leucócitos totais nos linfonodos (A) e no baço (B). Percentual de linfócitos T, B e T $\gamma\delta$ nos linfonodos (C) e no baço (D). Percentual das subpopulações de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos nos linfonodos (E) e no baço (F). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, n=15 animais/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos (p<0,05). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney, C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi.

6.2.2. Perfil de citocinas e concentração de imunoglobulina A secretória (IgAs) da mucosa intestinal

O grupo OP apresentou menores concentrações de $\text{IFN}\gamma$ na mucosa do ID ($p=0,003$, FIG. 13A). E as demais citocinas analisadas não apresentaram alteração no grupo OP na mucosa do ID ou cólon (FIG. 13A e B).

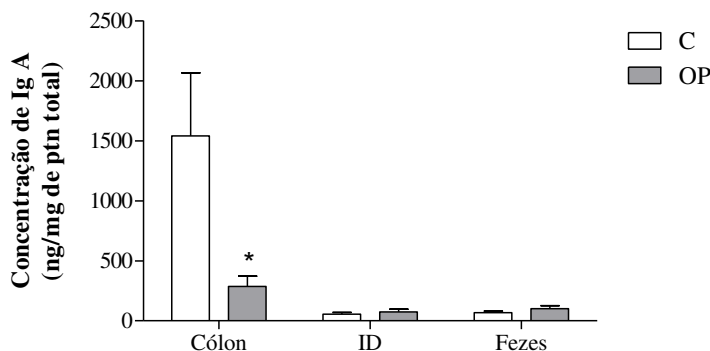
Figura 13. Concentrações de citocinas das mucosas do intestino delgado e cólon.



Concentração de citocinas na mucosa do ID (A). Concentração de citocinas na mucosa do cólon (B). Resultados foram expressos em médias \pm erros padrões, $n=5$ animais/grupo para ID e $n=10$ animais/grupo para cólon. * indica diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi. IL: interleucina, $\text{TNF}\alpha$: *Tumor necrosis factor*- fator de necrose tumoral α , IFN: *interferon gamma*- Interferon γ , ID: intestino delgado.

Já na figura 14, pode ser observado que o grupo OP apresentou menores concentrações de IgAs no lavado do cólon ($p<0,05$), mas não apresentou alterações dessas concentrações nos lavados do ID e das fezes.

Figura 14. Concentrações de IgAs nos lavados de cólon, intestino delgado e fezes.

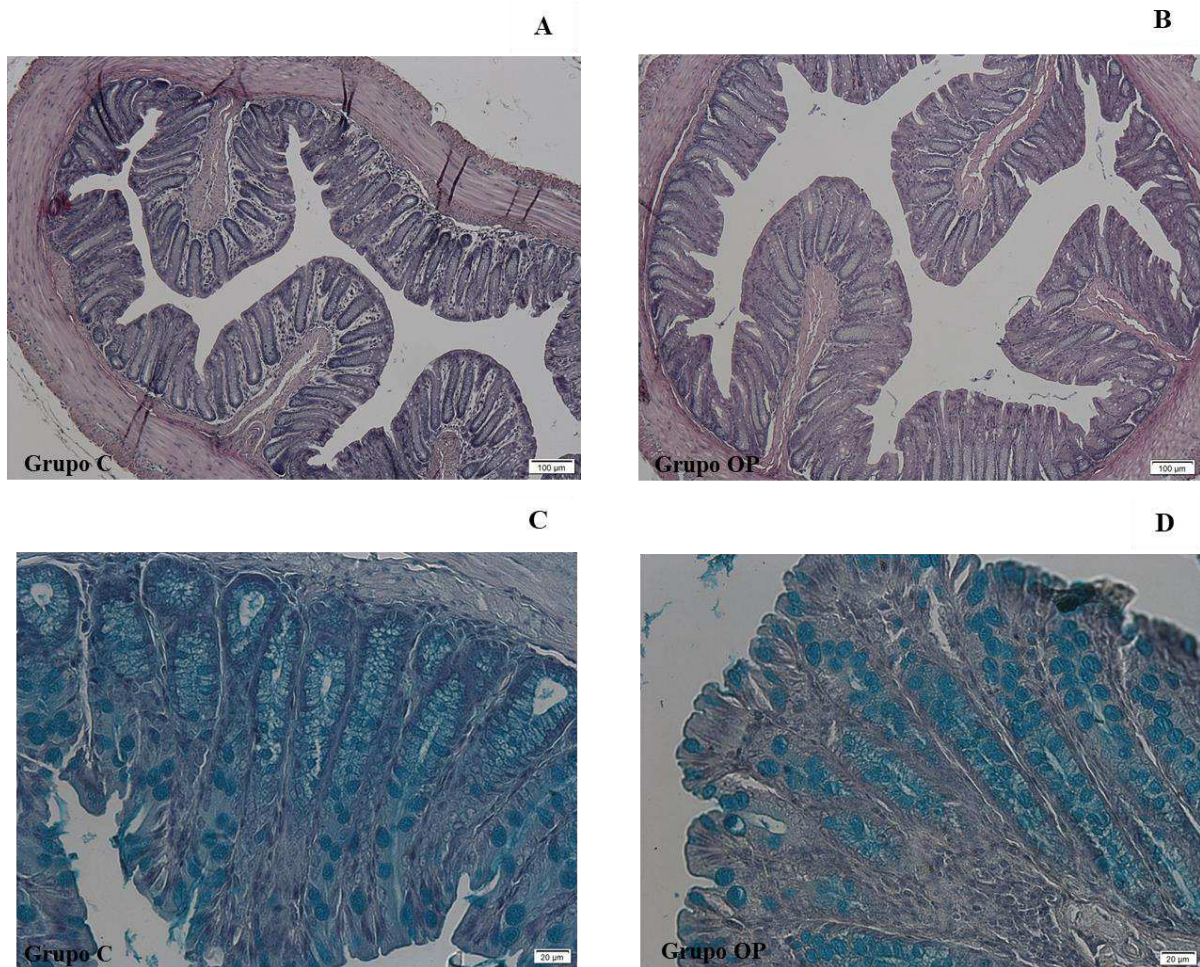


Resultados foram expressos em médias \pm erros padrões, $n=5$ animais/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney, C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi, ID: intestino delgado, IgA: Imunoglobulina A.

6.2.3. Análise histológica do cólon

Na figura 15, pode ser observado que a suplementação com óleo de pequi não induziu nenhuma alteração morfológica, no cólon, ou seja os animais do grupo OP, apresentaram camada epitelial, mucosa, submucosa e camada muscular intactas, e não apresentaram infiltração de células do sistema imune (FIG. 15 A e B). Além disso os animais OP apresentaram criptas e células caliciformes normais e semelhantes às do grupo C (FIG. 15 C e D).

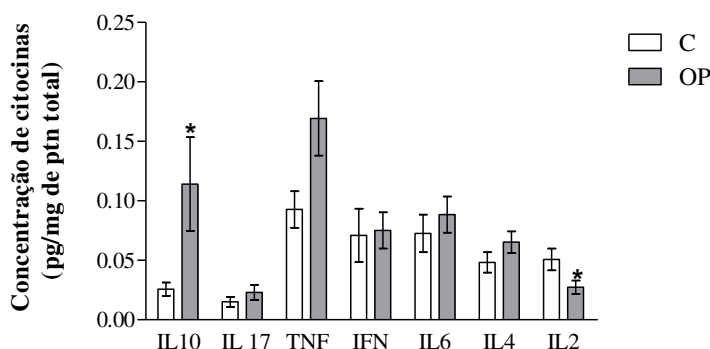
Figura 15. Fotomicrografias representativas da análise histopatológica do cólon dos animais experimentais.



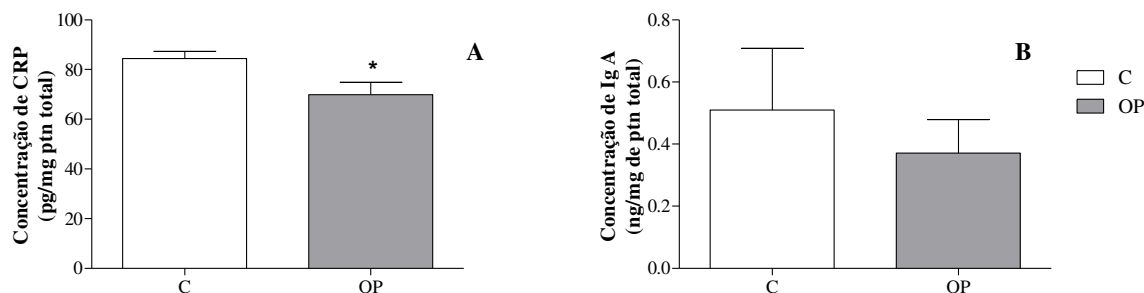
A e B Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon corado com Hematoxilina e eosina, com camada epitelial intacta e ausência de infiltrados celulares, aumento de 100x. C e D: Fotomicrografias representativas das criptas e células caliciformes, coloração com Hematoxilina /Azul de Alciano, aumento de 400x. C: Grupo controle (n=10), OP: Grupo óleo de pequi (n=10).

6.2.4. Biomarcadores imunológicos sistêmicos

O grupo OP apresentou maiores concentrações plasmáticas de IL-10 e menores concentrações de IL-2 e CRP ($p < 0,05$, FIG. 16 e 17A). As demais citocinas analisadas, bem como as concentrações de IgA plasmáticas não foram alteradas pelo tratamento com óleo de pequi (FIG. 16 e 17B).

Figura 16. Concentrações plasmáticas de citocinas dos animais experimentais.

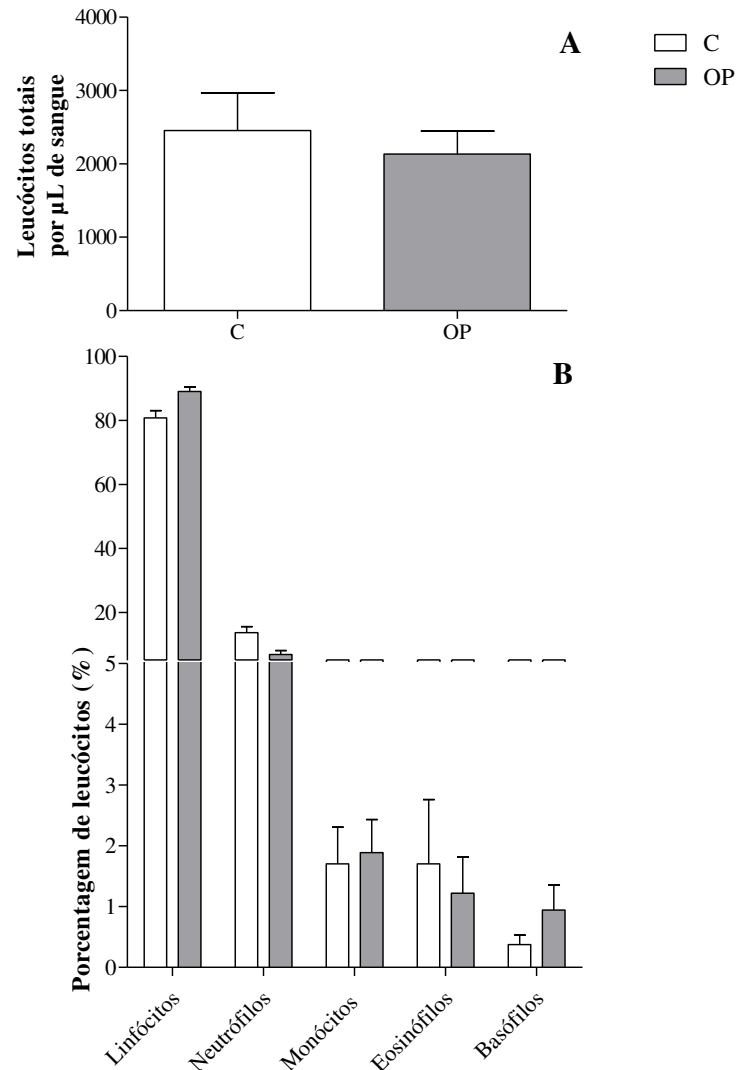
Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n = 10$ animais por grupo. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Para dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi, IL: interleucina, TNF: *Tumor necrosis factor*- fator de necrose tumoral α , IFN: *interferon gamm*- Interferon γ .

Figura 17 Concentrações plasmáticas de proteína C reativa e imunoglobulina A dos animais experimentais.

Concentração de proteína C reativa plasmática (A). Concentração de Imunoglobulina A plasmática (B). Resultados foram expressos em médias \pm erros padrões, $n = 15$ animais/grupo para CRP e $n = 5$ animais/grupo para IgA. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi, CRP: Proteína C Reativa, Ig: Imunoglobulina.

Em relação ao perfil leucocitário sanguíneo, o grupo OP apresentou maior percentual de linfócitos ($p < 0,05$) e menor percentual de neutrófilos ($p = 0,006$), em relação ao grupo C (FIG. 18 B). Entretanto, o tratamento com óleo de pequi não alterou a contagem total de leucócitos e os percentuais de basófilos, monócitos e eosinófilos sanguíneos (FIG. 18A e 18B).

Figura 18. Perfil leucocitário hematológico dos animais experimentais.



Leucócitos Totais por μL de sangue (A). Percentual de diferentes leucócitos sanguíneos (B). Resultados foram expressos em médias \pm erros padrões, $n= 15$ animais/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. C: Grupo Controle, OP: Grupo Óleo de Pequi.

Este estudo investigou os efeitos da ingestão de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) tanto na integridade da mucosa intestinal, quanto na ruptura da integridade dessa mucosa em camundongos. Inicialmente, na mucosa íntegra, para a qual foram utilizados camundongos saudáveis, a ingestão do óleo de pequi modificou parâmetros imunológicos celulares e funcionais de maneiras diferentes e compartimento-dependentes. De acordo com os dados obtidos, podemos inferir que a ingestão do óleo de pequi parece ter contribuído com os

elementos que, de certa forma mantiveram as características reguladoras da resposta imune intestinal.

Assim, na superfície da mucosa intestinal, prevaleceram efeitos reguladores do óleo de pequi em diferentes biomarcadores inflamatórios e conforme a região anatômica (intestino delgado ou cólon). Essas alterações regionais podem estar relacionadas com a distribuição e as diferenças nos fenótipos dos linfócitos de superfície, já que estes linfócitos estão de 10 a 20 vezes mais presentes no epitélio do ID em comparação ao epitélio do cólon (MOWAT e AGACE, 2014).

A relevância de tal variação regional no tamanho e composição da população de linfócitos de superfície para a homeostase intestinal ainda permanece incerta. Entretanto, os estímulos que sobressaem sobre essas células são conhecidos. Por exemplo, tanto linfócitos de superfície totais, quanto linfócitos de superfície CD4⁺ são produtores de IFN γ e TNF α conforme o microambiente em que estão expostos (BILATE *et al.*, 2016; MCDONALD, JABRI e BENDELAC, 2018). De fato, em nosso estudo, observamos no grupo OP, redução dos linfócitos de superfície totais e da subpopulação de linfócitos de superfície CD4⁺ no ID, o que pode ter corroborado também a menor concentração de IFN γ na mucosa do ID desses animais.

De acordo com o estudo de Carol *et al.* (1998), a supressão de Linfócitos da Lâmina Própria (LLP) e de LIE reduziu a concentração de IFN γ , o que ocorreu de forma igualitária em ambos os tipos celulares. Em nosso estudo, os animais de ambos os grupos não foram expostos a nenhum tipo de mitógeno ou desafio imunológico. Assim, as concentrações de citocinas determinadas indicam secreção espontânea basal das células presentes na mucosa intestinal. Logo, nós acreditamos que a redução de linfócitos de superfície totais pode ter sido suficiente para promover redução da produção basal de IFN γ do grupo OP.

Além disso, a redução percentual de linfócitos de superfície CD4⁺ no ID dos animais OP também pode ter contribuído para a menor concentração de IFN γ . Carol *et al.* (1998) demonstraram que, dentre as células imunes estudadas, os linfócitos de superfície e os LLP CD4⁺ foram os maiores secretores de IFN γ . É importante ressaltar que os linfócitos de superfície CD4⁺ são compostos por 50% de células reguladoras e 50% de outros tipos celulares, tais como as células Th1, as quais mediam a imunidade via secreção de IFN γ (KANG *et al.*, 1999; TAKAYANAGI *et al.*, 2012).

Em conjunto, no ID, esses achados apontam para um efeito protetor do óleo de pequi na manutenção do equilíbrio da barreira intestinal, especialmente porque a secreção

elevada de IFN γ por linfócitos de superfície pode resultar na perda da função da barreira epitelial (YANG *et al.*, 2002).

Na mucosa colônica, os efeitos do óleo de pequi parecem ter sido direcionados para a redução do fenótipo citotóxico e da resposta humoral. Houve redução nos percentuais de células citotóxicas CD8+, no cólon e nos órgãos linfoides, o que pode ter sido determinado, pelo menos em parte, pela redução da concentração basal de IL-2 plasmática. Conforme mencionado anteriormente, a redução da IL-2 pode diminuir a ativação e a proliferação de células T CD8+ nos órgãos linfoides (BOYMAN e SPRENT, 2012; RUTISHAUSER *et al.*, 2009), o que pode induzir menor reposta efetora dessas células nos sítios de inflamação. Assim, um menor número de células T CD8+ sendo ativadas nos linfonodos mesentéricos pode resultar em um menor número de linfócitos de superfície CD8+ no cólon.

A relação entre os percentuais celulares dos linfonodos mesentéricos e cólon pode ocorrer porque, anatomicamente, existe circulação linfática direta entre os linfonodos mesentéricos distais e o cólon (CARTER e COLLINS, 1974). Assim, as células ativadas nesses linfonodos seguem diretamente para o cólon, o que, em nosso estudo, pode explicar as menores populações de células CD8+ observadas no grupo OP. Esse efeito pode ter sido específico para o fenótipo citotóxico, possivelmente por representar dentre os linfócitos de superfície, o fenótipo preponderante do cólon (BOLL, *et al.*, 1995).

A redução do percentual de células T citotóxicas no grupo OP, é mais um indício do papel do óleo de pequi na manutenção da homeostasia da resposta imune intestinal. De fato, no estudo de Nancey *et al.* (2006), células T CD8+ apresentaram atividade citolítica sobre células epiteliais intestinais, o que estimulou o processo inflamatório e consequentemente induziu doença inflamatória intestinal em camundongos saudáveis.

Adicionalmente, a menor concentração de IgAs nos homogenatos do cólon do grupo OP podem indicar menor secreção dessa imunoglobulina. A mucosa colônica em seu estado basal, apresenta plasmócitos secretores de IgA, os quais após ativados nas placas de Peyer, transitam para a lâmina própria (MIYAZATO *et al.*, 2016). Em nosso estudo, não investigamos as populações de linfócitos B presentes na região de lâmina própria, entretanto acreditamos que a ingestão do óleo de pequi possa ter modificado essa população, ocasionando uma possível redução da sua proliferação ou da sua ativação, o que pode ter contribuído para redução da secreção de IgAs.

Outro fator condicionante para produção de IgAs é a interação entre a microbiota e os receptores de imunoglobulinas poliméricos presentes no cólon (p-IgR) (NAKAMURA *et*

al., 2004). De acordo Nakamura *et al.* (2004), a interação entre a microbiota e linfócitos B ocorre via os receptores p-IgR. Após esta ligação, o linfócito diferencia-se em plasmócito e secreta IgA. Nós inferimos que, apesar de o número de células B nas superfícies da mucosa do cólon não ter sido alterado, possivelmente o óleo de pequi pode ter reduzido a ativação dessas células para diferenciação em plasmócitos, via supressão dos p-IgR, o que reduziu a secreção de IgA.

Além disso, é importante ressaltar que a concentração de IgAs está diretamente relacionada com o perfil de citocinas do intestino. Enquanto que citocinas Th1 como o IFN γ e o TNF α são conhecidas por inibir a produção de IgA, outras citocinas como IL-10 e TGF β estimulam a secreção de IgA (FAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2017; WU, *et al.*, 1999). Neste estudo, não foram verificadas alterações significativas no perfil de citocinas da mucosa colônica entre os grupos. Entretanto o grupo OP apresentou concentração média de IFN γ 58% superior à do grupo C e concentração de IL-10 38% inferior à do grupo C. Dessa forma, essas pequenas alterações, ainda que não significativas, podem também ter contribuído para reduzir a secreção de IgA. É relevante considerar também, que a redução da concentração plasmática de IL-2 pode ter também influenciado na secreção de IgA, já que essa citocina afeta a diferenciação de células B em células secretoras de IgA (GAFFEN e LIU, 2004; HIPPEL *et al.*, 2017).

Assim, em relação à IgAs, podemos inferir que o óleo de pequi exerceu um efeito redutor. Por outro lado, não exerceu prejuízo à estrutura da mucosa colônica (FIG. 15). Em consonância, no estudo de Ramiro-Puig *et al.* (2008), verificou-se em ratos wistar, que uma dieta contendo 10% de cacau rico em antioxidantes e ofertada por 3 semanas, reduziu a IgAs intestinal, sem prejuízos à arquitetura da mucosa intestinal. No entanto, nós consideramos que o efeito do óleo de pequi sobre a IgA deve ser melhor investigado, uma vez que esta é a principal imunoglobulina das superfícies de mucosa e é importante para a manutenção da diversidade da microbiota (FARIA, REIS E MUCIDA, 2017) e da homeostasia intestinal (KAWAMOTO *et al.*, 2014).

Em relação aos órgãos linfoides mais uma vez prevaleceu o efeito regulador do óleo de pequi. No baço e linfonodos mesentéricos, a redução das subpopulações de células T encontrada pode estar relacionada com o número de células T de memória, as quais se mantêm por migração dessas células ou por proliferação homeostática, via IL-15 (LODOLCE *et al.*, 1998; SIRACUSA, *et al.*, 2017).

No baço, o tráfico de células T CD8+, é direcionado por moléculas de adesão, tais como CLEVER 1, ICAM 1 e VCAM 1 (TADAYON, *et al.*, 2019). Nos linfonodos

mesentéricos, a migração dessas células requer sinalização via receptor acoplado a proteína G, o que ocorre somente quando necessário (KLONOWSKI, *et al.*, 2004). Assim é provável que no grupo OP, o requerimento de linfócitos T CD8+, tanto para o baço quanto para os linfonodos mesentéricos, tenha reduzido, o que conseqüentemente pode ter induzido à supressão dos processos tanto de circulação (moléculas de adesão), quanto de proliferação e manutenção de linfócitos T CD8+ residentes (via IL-15).

Adicionalmente, o menor percentual de células T CD4+ observado no baço, também pode explicar os menores percentuais de células T CD8+. As células T CD4+ estão envolvidas na coativação das células T CD8+ (JANSSEN *et al.*, 2005; LAIDLAW, CRAFT e KAECH, 2016), assim menor número de células T CD4+ em atividade pode repercutir em menor número de células T CD8+, no baço.

É importante ressaltar também, o possível envolvimento da redução da concentração plasmática de IL-2 nos achados já discutidos para o grupo OP. Essa citocina, atua como modulador da inflamação e está envolvida na ativação e proliferação tanto das células T CD4+ (GAFFEN e LIU, 2004; MALEK, 2008), quanto das células T CD8+ (BALKHI *et al.*, 2015; FURTADO, *et al.*, 2002). De fato, a deficiência de IL-2, foi relacionada com a diminuição do número de linfócitos com este fenótipo (BALKHI *et al.*, 2015).

A redução do percentual de células T auxiliares foi específica para o baço. Isto pode ter ocorrido porque a dinâmica de circulação entre sangue e linfonodos mesentéricos das células T CD4+ é diferente da dinâmica das células T CD8+. As células T CD4+ realizam suas funções e recirculam entre sangue e linfonodos duas vezes mais rápido do que as células T CD8+ (MANDL *et al.*, 2012). Desta forma, linfócitos T CD4+ residentes nos linfonodos mesentéricos, são transitórios o que, possivelmente, dificultou a observação de efeitos do OP sobre essas células.

Do ponto de vista sistêmico, as alterações no perfil de citocinas plasmáticas no grupo OP foram também indicativas do provável efeito regulador do óleo de pequi. Tanto o aumento da concentração de IL-10 quanto a redução das concentrações de IL-2 e da CRP no grupo OP, podem ter sido fundamentais para manutenção da homeostasia imunológica.

O aumento da concentração plasmática de IL-10 pode ter estimulado uma resposta anti-inflamatória e, ou regulatória (MANZANILLO, EIDENSCHENK e OUYANG, 2015; RUBTSOV *et al.*, 2008). Isto, porque ela inibe a síntese de sinais imunológicos relacionados, tais como a MIP1 α , a MCP1, o TNF α , a IL-1 β , a IL-6 e a IL-8, bem como a proliferação e

função de células imunológicas, tais como macrófagos, células T e suas subpopulações (De WAAL, *et al.*, 1991; MOCELLIN, *et al.*, 2003; OLSZYNA, *et al.*, 2000;).

No caso da IL-2, acreditamos que em nosso estudo, a sua redução plasmática possa ter exercido efeito regulador, já que esta citocina é capaz de induzir, primordialmente, a proliferação de células T CD4+ e T CD8+ (WANG *et al.*, 2018). Embora não tenha sido possível investigar o fenótipo de células imunes sanguíneas, nas superfícies da mucosa intestinal e nos órgãos linfoides, houve redução de pelo menos um dos dois fenótipos nos referidos compartimentos, o que poderia também estar ocorrendo no sangue.

A CRP é considerada uma proteína de fase aguda que torna-se elevada em resposta a diversos fatores, tais como inflamação (SPROSTON e ASHWORTH, 2018). Assim, em nosso estudo consideramos a sua redução plasmática no grupo OP como um efeito positivo, tanto sob o aspecto clínico quanto preventivo e que poder ter sido advindo da regulação causada pela ingestão do óleo de pequi.

A suplementação com óleo de pequi também alterou o percentual de linfócitos e neutrófilos presentes no sangue. Este efeito parece ser específico para alguns tipos celulares, uma vez que o total de leucócitos sanguíneos e dos compartimentos estudados, não foi alterado.

A diminuição do percentual de neutrófilos do grupo OP indica uma possível redução da resposta imune inata nesses animais. É possível que esta redução esteja associada à maior ingestão de ácidos graxos monoinsaturados advinda do óleo de pequi. Por exemplo, Reyes-Quiroz *et al.* (2014) demonstraram *in vitro* que a adição de 200mM do ácido oleico em cultura de neutrófilos reduziu a migração e ativação dessas células. Esses ácidos graxos podem incorporar nas membranas dos neutrófilos e com isso modular a estrutura e função celular. De fato, Rodrigues *et al.*, (2010) verificaram que uma suplementação por 5 dias com ácido oleico em ratos Wistar foi suficiente para incorporação desses ácidos nas membranas dos neutrófilos e modulação da sua função. Além disso, deve ser considerado que a redução no percentual dos neutrófilos possa ter ocorrido de forma a compensar a elevação do percentual de linfócitos, uma vez que os valores absolutos dos diferentes tipos de leucócitos não foram modificados pelos tratamentos ofertados (dados não mostrados).

Em humanos, investigações sobre efeitos da ingestão de óleo de pequi na resposta imune são escassas. Entretanto, nossos achados corroboram o estudo de Miranda-Vilela *et al.* (2009). Neste estudo, corredores com idade entre 30 e 34 anos de ambos os sexos ingeriram cápsulas contendo 400 mg de óleo de pequi por 14 dias previamente à uma competição. Após a competição, a concentração de CRP e o percentual de neutrófilos sanguíneos foram menores

nesses corredores em comparação a controles. Adicionalmente, mesmo em modelo animal, nosso estudo acrescentou informações relevantes, já que demonstramos efeitos anti-inflamatórios do óleo de pequi em condição de integridade da mucosa, o que reforça o seu caráter preventivo para doenças.

Por outro lado, o aumento do percentual de linfócitos sanguíneos no grupo OP, parece não estar relacionado com uma resposta pró-inflamatória, já que não resultou em elevação de outros sinais pró-inflamatórios e nem alterou outros indicadores clínicos. Especificamente, essa alteração não repercutiu em elevações nos percentuais de linfócitos T totais de nenhum compartimento estudado. Nós acreditamos que esse resultado pode estar mais relacionado a um provável aumento das células reguladoras uma vez que, apesar de não ter sido investigado tal fenótipo, foi observado aumento da secreção de IL-10, que é predominantemente secretada por células T reguladoras (RUBTSOV *et al.*, 2008). Além disso, a alta concentração de ácido oleico no OP, mais uma vez, pode ter contribuído para a estimulação das respostas reguladoras, tendo em vista que este ácido graxo já foi identificado como um potente indutor do fenótipo regulatório (WU *et al.*, 2017).

Também existem evidências do efeito dos MUFA no acúmulo de lipídeos intracelulares em linfócitos (GORJÃO *et al.*, 2007), o que pode afetar sua ativação e proliferação. Entretanto esse papel ainda é controverso, uma vez que os estudos divergem em tipos de modelos, de células e concentrações de MUFA utilizadas (YAQOOB, 2002). Ainda assim, condizente com nossos resultados, o ácido oleico já foi relacionado em dois estudos prévios com o aumento da proliferação dos linfócitos sanguíneos. Nesses estudos foi demonstrado que linfócitos isolados do sangue de humanos saudáveis e estimulados com mitógeno, quando cultivados com concentrações não tóxicas deste ácido graxo, tiveram sua proliferação elevada em comparação com outros ácidos graxos (GORJÃO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2016).

Portanto, diante dos achados em condições de integridade da mucosa intestinal, inferimos que óleo de pequi reforçou o efeito regulador em todos os compartimentos investigados e que este efeito possa estar relacionado, pelo menos em parte, com a maior oferta de MUFA e a ingestão de compostos antioxidantes, especialmente os carotenoides, do óleo de pequi.

No processo de absorção dos MUFA e dos carotenoides do óleo de pequi, há uma interação direta destes compostos com os enterócitos e linfócitos de superfície presentes no intestino delgado. Nós acreditamos que essa interação pode ter reduzido as células do sistema imune e os mediadores imunológicos observados, o que pode ser importante para o retorno à

homeostasia após uma resposta imune contra patógenos. Entendemos que as vias pelas quais essas alterações ocorrerem precisam ser melhor investigadas e elucidadas. No entanto, são várias as hipóteses que podem dar suporte a essa inferência.

Em relação aos MUFA, sua incorporação nos fosfolipídeos de membranas das células imunes pode inibir vias pró-inflamatórias (FINUCANE *et al.*, 2015; KIRWAN *et al.*, 2017), inicialmente por meio da redução da produção de eicosanoides, via substituição do ácido araquidônico (CALDER, 2009; De PABLO e CIENFUEGOS, 2000; ROBINSON *et al.*, 1996). Este processo pode modular a fluidez das membranas celulares e com isso, tornar a célula mais funcional, o que facilitaria o retorno às condições de homeostasia após resposta a antígenos patogênicos.

Outra via de atuação dos MUFA, ocorreria pelo aumento da expressão (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2016) e interação com os *peroxisome proliferator activated receptor* – PPAR γ . Esses receptores nucleares são altamente expressos no cólon, mas também são encontrados em outros compartimentos corporais (DUBUQUOY *et al.*, 2006). Eles atuam na regulação de vias de sinalização da inflamação (DESREUMAUX *et al.*, 2001), na expressão de moléculas de adesão (JACKSON *et al.*, 1999) e na regulação da proliferação e da viabilidade celular (HARRIS e PHIPP, 2001). De acordo com Harris e Phipp (2001), a interação entre ligantes agonistas e esse receptor inibiu a proliferação e a viabilidade de células T naive ou ativadas, mediante apoptose. Assim, a maior ingestão de MUFA pelos animais OP pode também ter estimulado a maior expressão desses receptores, e estar relacionada com menores percentuais de células, especialmente das T citotóxicas nestes animais.

Adicionalmente, deve ser considerada a atuação do óleo de pequi sobre a imunidade inata. Essas células estão envolvidas na ativação e diferenciação das células da imunidade adaptativa. O efeito supressor do ácido oleico sobre células da imunidade inata foi previamente demonstrado em dois estudos. No primeiro, a atividade das células *natural killer* do baço, foi inibida por uma dieta rica em ácido oleico, o que também culminou com redução da proliferação *ex vivo* de linfócitos do baço (JEFFERY *et al.*, 1997). No segundo, foi verificada redução de macrófagos (CD11+), e conseqüentemente redução da proliferação de linfócitos CD4+ e CD8+ da pele de camundongos BALBc, após aplicação tópica de ácido oleico (CARDOSO *et al.*, 2011). No presente estudo, foi observada redução sanguínea do percentual de neutrófilos; entretanto, não foi possível avaliar os fenótipos representativos de células inatas nos compartimentos estudados. Portanto, em uma perspectiva futura a avaliação dos efeitos do óleo de pequi sobre células imunes inatas deve ser considerada.

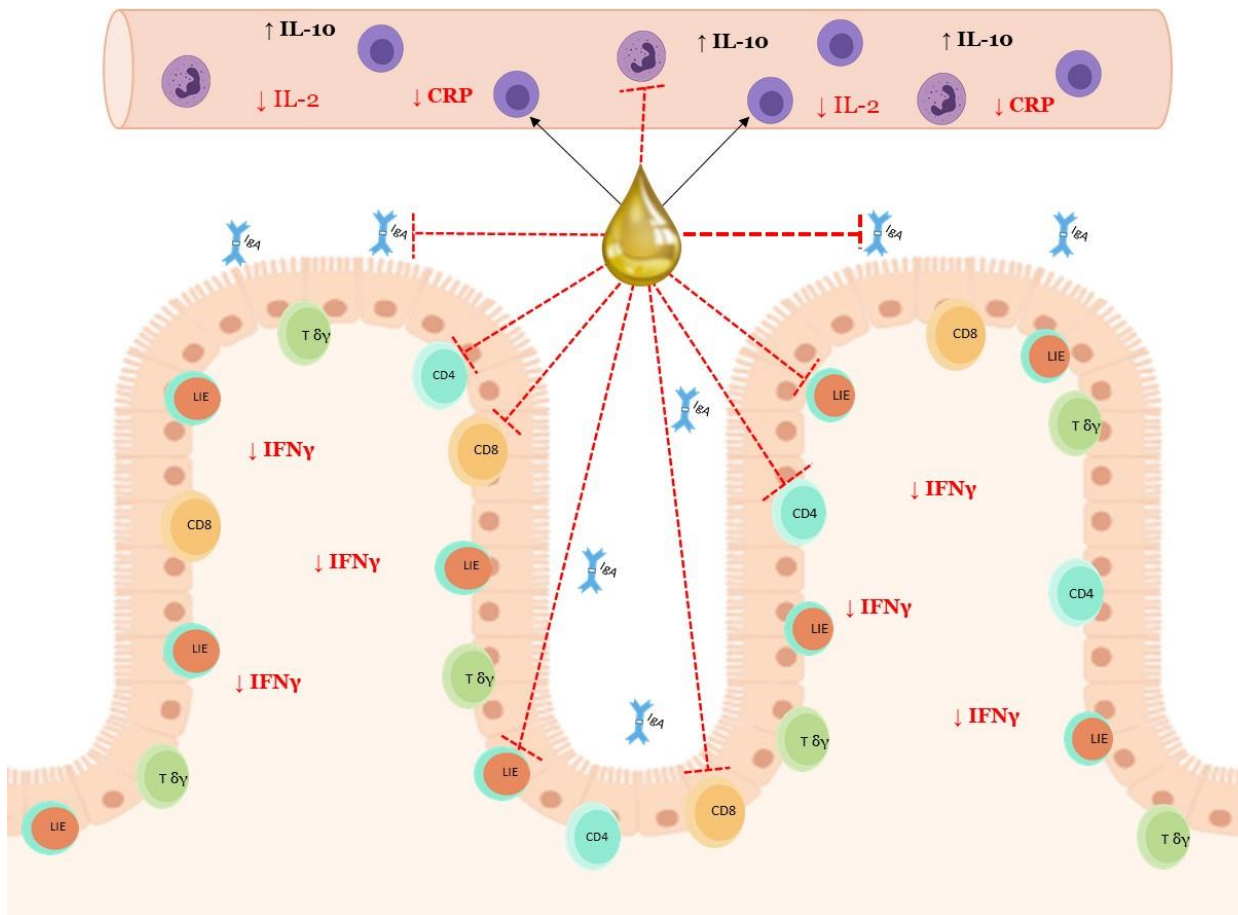
Em relação aos carotenoides, estes possuem natureza hidrofóbica o que facilita a sua incorporação e a sua atividade antioxidante nas membranas. Assim, após incorporados nas membranas celulares, eles podem diminuir a peroxidação de lipídeos, o que contribui para a melhoria da funcionalidade dessas células. De fato, a inibição da peroxidação lipídica já foi demonstrada anteriormente no estudo de Roesler *et al.* (2008) com extratos etanólicos da polpa de pequi (óleo), o que foi atribuído ao seu alto conteúdo de carotenoides.

Além disso, para a mucosa intestinal, os carotenoides pró vitamina A como o β -caroteno, que são amplamente encontrados no óleo de pequi (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; CARDOSO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PALMEIRA *et al.*, 2015), estimulam a formação do ácido retinoico, o qual apresenta função na diferenciação e integridade celular, o que impacta significativamente na manutenção da estrutura da mucosa (MUCIDA *et al.*, 2007). De fato, em nosso estudo, a análise histológica não mostrou nenhum prejuízo à estrutura da mucosa colônica.

Além disso, o ácido retinoico possui papel na indução da tolerância por redução da produção de $\text{IFN}\gamma$ em células T CD4^+ e CD8^+ (VAN *et al.*, 2009), o que também foi parcialmente observado em nosso estudo. Acreditamos que possa ter havido algum grau de supressão da expressão de moléculas de adesão, o que pode ter inibido o trânsito ou permanência de certos tipos celulares nos compartimentos estudados. Ainda, a via que culmina com a expressão de citocinas pró-inflamatórias regulada pelo $\text{NF}\kappa\text{B}$ pode ter sido sub-regulada, o que pode ter induzido à menor expressão de $\text{IFN}\gamma$ e, conseqüentemente menor concentração no ID. De fato, no estudo de Harari *et al.* (2008) foi demonstrado que 0,6% de β -caroteno na dieta de camundongos, por 10 semanas, reduziu a expressão hepática de RNAm para VCAM-1 e $\text{IFN}\gamma$. Além disso, Van Helden *et al.* (2013) verificaram que 150mg/Kg de peso corporal de β -caroteno por 14 semanas diminuiu a expressão de genes envolvidos com a produção e regulação de $\text{IFN}\gamma$ no fígado, pulmão e tecido adiposo branco.

Assim, resumidamente como pode ser observado na figura 19, em condições de integridade da mucosa existe um equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias contra patógenos estrangeiros e respostas reguladoras a antígenos alimentares e bactérias comensais. A ingestão do óleo de pequi reduziu elementos da resposta pró-inflamatória, e elevou a IL-10, que apresenta funções reguladoras, o que em conjunto pode ter reforçado a característica reguladora da resposta imune de mucosa.

Figura 19. Representação das alterações imunológicas após ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal*.



*A gota dourada representa o óleo de pequi, a cor vermelha das setas e de mediadores inflamatórios indicam os efeitos redutores do óleo de pequi, as setas pretas indicam estimulação ou aumento do mediador demonstrado. IL Interleucina, IFN γ : Interferon Gama; CRP: Proteína C Reativa, IgA: Imunoglobulina A, LIE: representa os linfócitos T totais de superfície da mucosa intestinal.

6.3. Efeitos da ingestão do óleo de pequi sobre elementos da resposta imune de mucosa em condições de ruptura da integridade intestinal.

Considerando os resultados advindos da ingestão do óleo de pequi em condições de integridade da mucosa intestinal, nosso próximo passo foi investigar efeitos da ingestão do óleo de pequi após a ruptura dessa integridade na mucosa intestinal, provocada por meio de um agente químico. A intenção foi verificar como se comportariam os elementos celulares e funcionais da resposta imune, frente a um desafio capaz de provocar uma ruptura da barreira da mucosa intestinal e consequentemente uma resposta inflamatória associada. Para isso, escolhemos um modelo de doença inflamatória que envolve diretamente a mucosa intestinal, neste caso, a colite ulcerativa aguda.

6.3.1. Quadro clínico e manifestações histopatológicas da colite na mucosa colônica

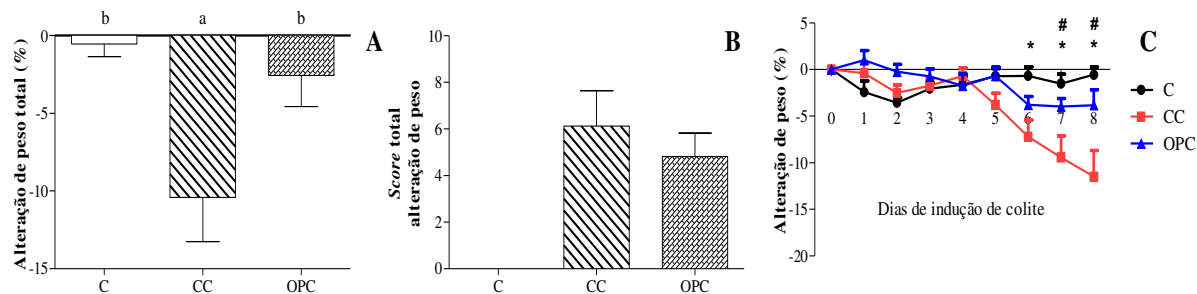
Inicialmente, foi investigado se o óleo de pequi poderia alterar sinais clínicos e histopatológicos da colite ulcerativa aguda. Neste contexto, é provável que a ingestão calórica total do grupo OPC (66,14 kcal) tenha sido inferior à dos demais grupos, já que foi aproximadamente 6% inferior em relação ao grupo CC (70,26 kcal) e 10% em relação ao grupo C (73,47 kcal) ao final da fase 2.

Conforme relatado anteriormente os animais de todos os grupos iniciaram a fase 2 com peso corporal semelhante (C=27,36±0,92, CC=28,05±0,92, OPC=28,15±0,76). Ao final dessa fase, os pesos corporais permaneceram semelhantes entre os grupos (C=27,77±0,93, CC=25,46±0,68, OPC=26,84±0,67). Apesar disso, os animais do grupo OPC apresentaram perda de peso corporal menor do que os animais do grupo CC e se assemelharam ao grupo C (FIG. 20A; p=0,004).

Além disso, a perda de peso corporal ocorreu a partir do dia 5, para o grupo CC e permaneceu em progressão até o final da fase 2, enquanto que o grupo OPC perdeu peso corporal a partir do dia 6, e se manteve estável até o final dessa fase (FIG. 20C). O percentual de alteração do peso corporal do grupo OPC foi semelhante ao do grupo C durante toda a fase 2, enquanto que foi inferior ao do grupo CC nos dias 7 (p=0,002) e 8 dessa fase (FIG. 20C; p=0,0006).

Essas alterações no peso corporal não refletiram em alterações nos *scores* de peso total entre os grupos, uma vez que esses foram semelhantes entre os grupos CC e OPC (FIG. 20B).

Figura 20. Indicadores das alterações no peso corporal dos animais experimentais durante e ao final da indução da colite ulcerativa.

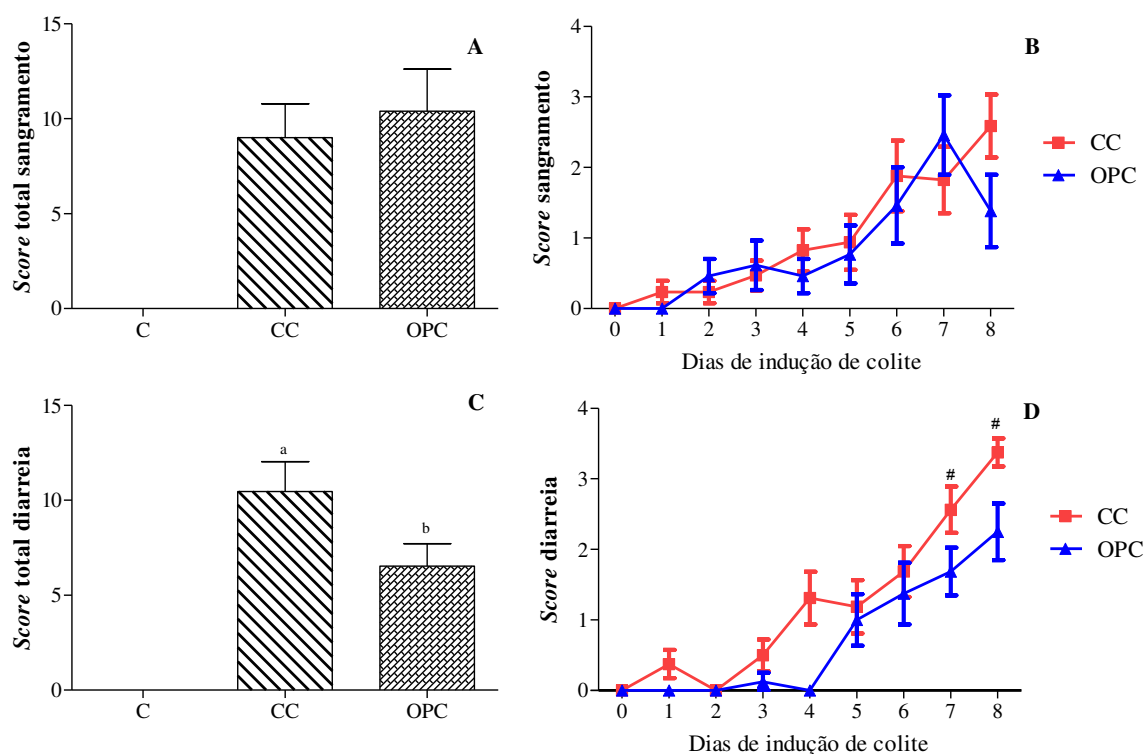


Percentual de alteração de peso final em relação a peso inicial (A). *Score* total de alteração de peso (B). Percentual de alteração de peso durante a Fase de 2 (C). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=15$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) pelo Teste de *Dunns*. * indica diferença significativa C vs CC, # indica diferença significativa CC vs OPC ($p<0,05$). Foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns* para resultados dos gráficos A e C e *Mann-Whitney* para o gráfico B. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Além da alteração no peso corporal, a presença de diarreia e sangue nas fezes são também outros sinais clínicos desse modelo. Nesse contexto, o tratamento com óleo de pequi não modificou o *score* total de sangramento retal, nem a sua progressão ao longo da fase 2 (FIG. 21A e 21B). Houve presença de sangue oculto nas fezes a partir do segundo dia dessa fase, o que foi intensificado pela presença de sangue visível a olho nu, a partir do quarto dia nos grupos CC e OPC (FIG. 21B).

O grupo OPC apresentou menores *scores* totais de diarreia, bem como a progressão do sinal ocorreu de forma mais amena que no grupo CC ($p<0,05$), já que no grupo OPC a presença de fezes amolecidas aconteceu a partir do dia 4 da fase 2, enquanto que se manifestou no grupo CC, a partir do dia 2 dessa fase. Além disso ao final da fase 2, nos dias 7 e 8, o grupo OPC apresentou *score* de diarreia significativamente menor que o do grupo CC ($p<0,05$).

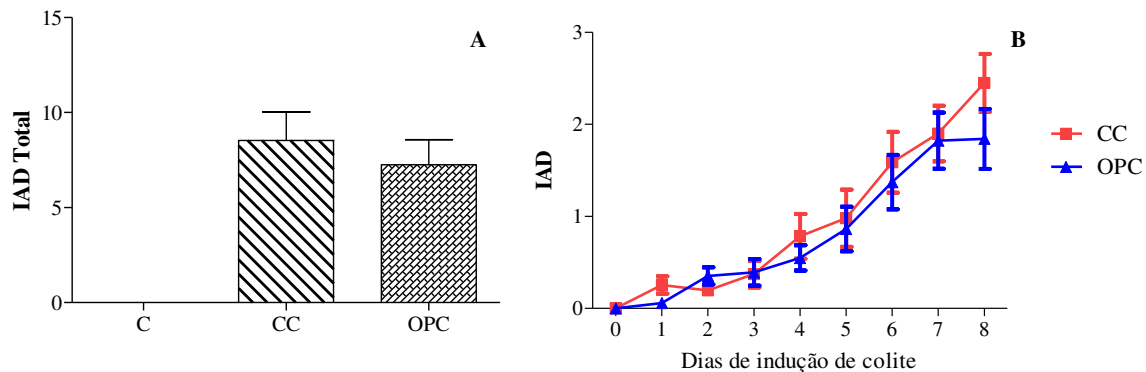
Figura 21. Scores de sangramento e diarreia dos animais acometidos pela colite ulcerativa ao final e durante a fase 2.



Score total de sangramento ao final da fase 2 (A). Score de sangramento durante a fase 2 (B). Score total de diarreia o ao final da fase 2 (C). Score de diarreia durante a fase 2 (D). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n= 15$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$), pelo Teste T. # indica diferença significativa CC vs OPC ($p<0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Apesar das alterações observadas no grupo OPC no peso corporal e diarreia, essas não resultaram em alterações no IAD. Assim, tanto o IAD total ao final da fase 2, quanto o IAD durante essa fase foram semelhantes entre os grupos CC e OPC (FIG. 22A e 22B).

Figura 22. Índice de atividade de doença (IAD) dos animais acometidos pela colite ulcerativa ao final e durante a fase 2.

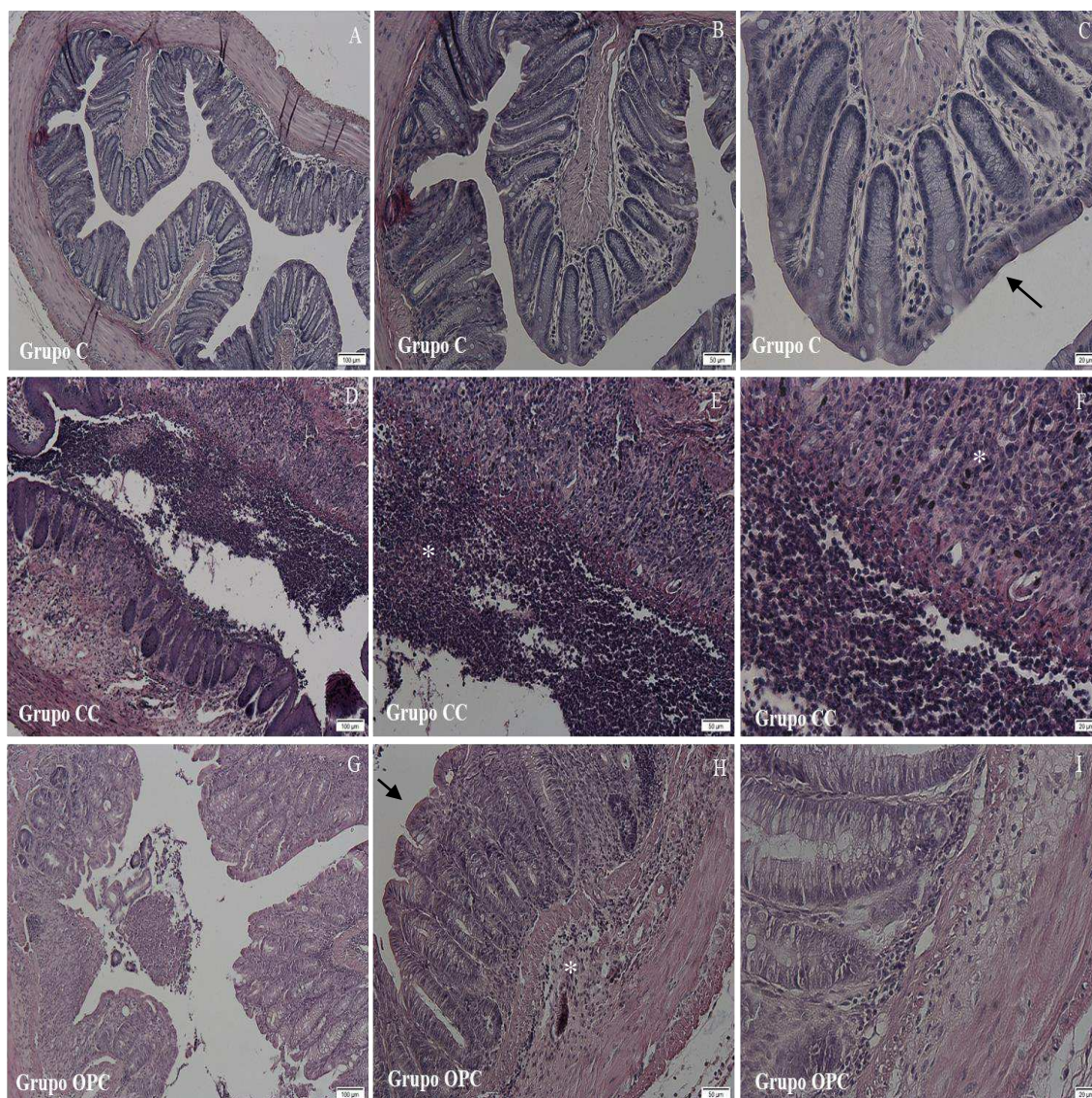


IAD total ao final da fase 2 (A). IAD durante a fase 2 (B). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=15$ animais/grupo. Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney ($p < 0,05$). C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite, IAD: Índice de Atividade de Doença.

Além das manifestações clínicas, a colite ulcerativa aguda, induz alterações histopatológicas, tais como erosão da mucosa, aumento do número de folículos linfoides, redução do número de criptas e células caliciformes, e infiltração de células imunes (ERICKSON *et al.*, 2016; KOJOUHAROFF *et al.*, 1997). No presente estudo, o grupo CC apresentou erosão da camada epitelial em toda a sua extensão, e infiltração de células imunes em todas as camadas do cólon, quando comparado ao grupo C (FIG. 23 A-F). Além disso, este grupo apresentou total perda de criptas e células caliciformes quando comparado ao grupo C, o qual apresentou essas estruturas preservadas (FIG. 24 A-D). O aumento do número de folículos linfoides não foi observado em nenhum grupo (FIG. 23 A-I).

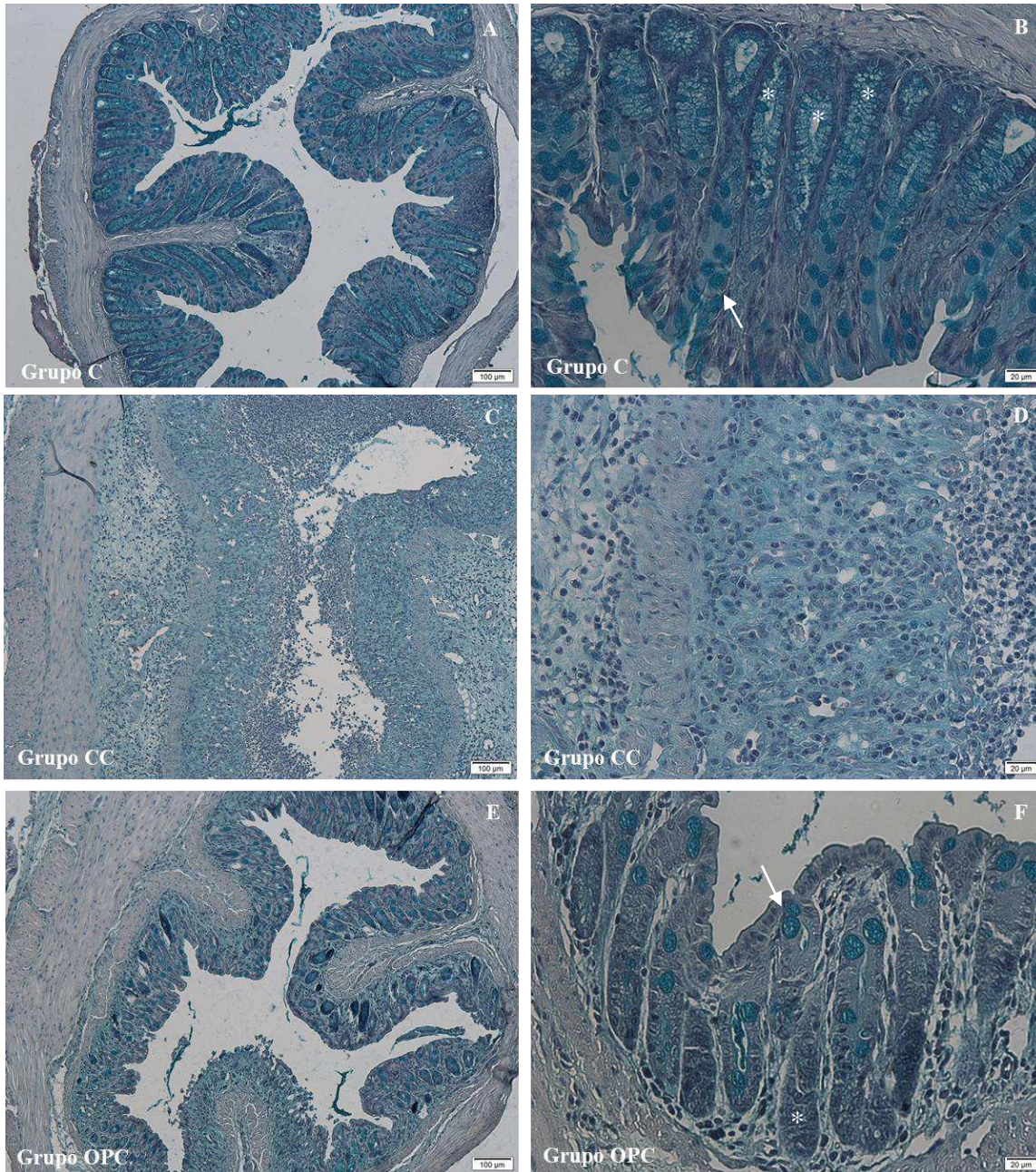
O grupo OPC apresentou preservação parcial da camada epitelial da mucosa, com menor infiltração de células imunes em relação ao grupo CC (FIG. 23 D, E, G e H). Adicionalmente, no grupo OPC houve maior preservação de criptas e células caliciformes como representado na Figura 24 (C-F). Este resultado foi confirmado quantitativamente pela redução significativa ($p < 0,05$) do *score* referente a perda de criptas e células caliciformes do grupo OPC em relação ao grupo CC (TAB. 6).

Figura 23. Fotomicrografias representativas de alterações histopatológicas no cólon, em condições de ruptura da integridade da mucosa.



A, B e C Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon do grupo C, com camada epitelial intacta e ausência de infiltrados celulares. D, E e F: Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon dos animais do grupo CC, com erosão da camada epitelial e região da mucosa e presença de infiltrados celulares em toda a sua extensão. G, H e I: Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon dos animais do grupo OPC, com preservação mínima da camada epitelial e menor presença de infiltrados celulares. A, D, e G: aumento de 100x, B, E e H: aumento de 200x, C, F e I: aumento de 400x. Coloração em hematoxilina e eosina, n=10 animais/grupo. Setas representam a camada epitelial intacta, * representam áreas com infiltrados celulares. C: controle; CC: controle com colite; OPC: óleo de pequi com colite.

Figura 24. Fotomicrografias representativas de alterações histopatológicas em criptas e células caliciformes no cólon em condições de ruptura da integridade da mucosa.



A e B: Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon do grupo C, com presença de criptas e células caliciformes intactas. C e D Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon dos animais do grupo CC, com ausência total de criptas e células caliciformes. E e F: Fotomicrografias representativas da estrutura do cólon dos animais do grupo OPC, preservação parcial de criptas e células caliciformes. A, C e E: aumento de 100x, B, D e F: aumento de 400x. Coloração em hematoxilina e azul de alciano, n = 10 animais/grupo. Setas representam células califormes, * representam regiões de criptas. C: controle; CC: controle com colite; OPC: óleo de pequi com colite.

De maneira geral, não houve diferenças significativas para os *scores* histopatológicos totais e variáveis individuais entre os grupos CC e OPC, exceto para os *scores* de perda de criptas conforme já relatado (TAB. 6).

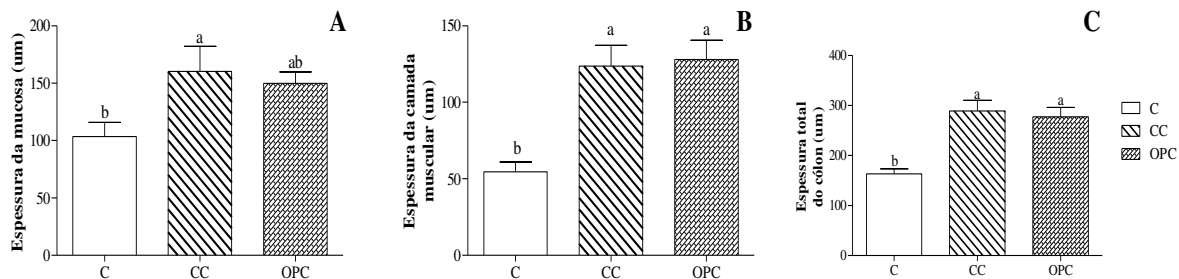
Tabela 6. Análise histopatológica do cólon em condições de ruptura da integridade da mucosa.

Variáveis Histopatológicas	Grupos Experimentais	
	CC	OPC
Extensão da erosão	3,10±0,46	3,00±0,45
Profundidade da erosão	3,25±0,38	3,00±0,26
Perda de criptas e células caliciformes	3,60±0,25	1,80±0,49*
Folículos	0,71±0,47	0,57±0,57
Presença de infiltrado	2,80±0,38	2,83±0,40
Profundidade do infiltrado	3,86±0,14	4,00±0,00
Score histopatológico total	16,29±1,49	15,00±1,51

Resultados expressos em médias \pm erros padrões, n=10 animais/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Para os dados paramétricos foi utilizado Teste T e para não paramétricos foi utilizado Mann-Whitney. CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Outra manifestação histopatológica da colite ulcerativa é o espessamento da parede colônica (GAJENDRAN *et al.*, 2019). Foi observado que a colite ulcerativa induziu ao espessamento das camadas mucosa, submucosa, muscular e, conseqüentemente ao espessamento total da parede colônica ($p < 0,05$), em comparação aos animais controles (FIG. 25A, B e C). A suplementação com óleo de pequi não reverteu esses efeitos.

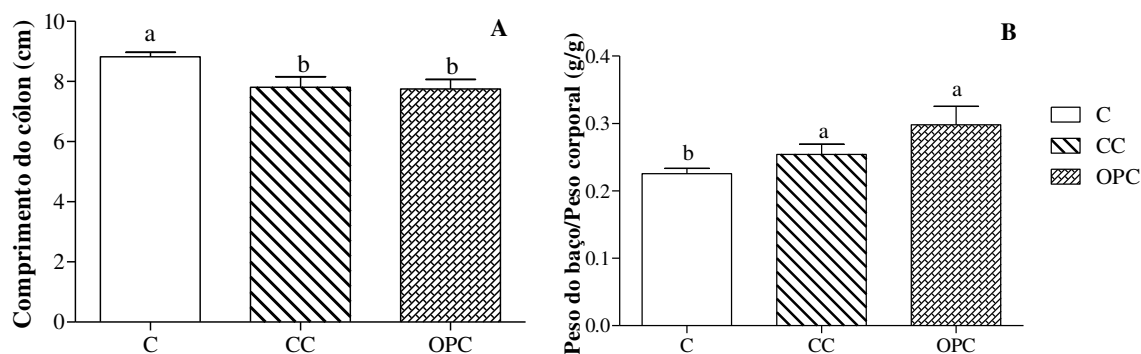
Figura 25. Análise da espessura total do cólon e de suas camadas em condições de ruptura da integridade da mucosa.



Espessura da camada da mucosa colônica (A). Espessura da camada muscular (B). Espessura total do cólon (C). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=10$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.05$), pelos Testes *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Os grupos CC e OPC apresentaram de forma semelhante um encurtamento do cólon ($p < 0,05$, FIG. 26 A) e uma elevação no peso relativo do baço ($p < 0,05$, FIG. 26B) em relação ao grupo C.

Figura 26. Análise do comprimento do cólon e do peso relativo do baço em condições de ruptura da integridade da mucosa.



Comprimento do cólon (cm) (A). Peso relativo do baço (B). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=15$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos Testes *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Como relatado previamente, foi escolhido um modelo de doença inflamatória intestinal para promover o desafio da resposta imune de mucosa intestinal. O protocolo utilizado para a indução dessa doença, foi baseado na metodologia proposta por Wirtz (2007). Entretanto um estudo piloto foi realizado para avaliar a menor concentração de DSS capaz de induzi-la. Assim utilizamos uma solução aquosa de DSS a 1,5% de DSS, a qual foi efetiva em induzir sinais clínicos, alterações macroscópicas e microscópicas, esperados neste modelo. Os sinais clínicos já foram verificados desde o 2º dia de indução, mas se exacerbaram a partir do 4º dia. Como alterações macroscópicas, foram verificados o encurtamento do cólon e um maior peso relativo do baço para os animais doentes. E em relação às alterações microscópicas, o único sinal não evidenciado nesses animais foi o aumento do número de folículos linfoides. Entretanto, apesar disso, como todas as demais alterações foram observadas, consideramos suficientes para a ruptura da integridade intestinal e resposta imune exacerbada.

A ingestão do óleo de pequi (OPC), nesse contexto, parece ter reduzido parcialmente os sinais clínicos da doença, quando comparada aos animais CC. Inicialmente, refletiu em uma menor e mais tardia perda de peso corporal total e essa alteração chegou a ser semelhante à do grupo C. Esses resultados demonstram que o óleo de pequi contribuiu para a preservação do peso corporal nos animais OPC, mesmo não refletindo em alterações dos *scores* atribuídos à variação de peso corporal no grupo OPC. Em princípio, nós inferimos, que maior ingestão calórica lipídica desses animais possa ter sido um dos determinantes. Os animais OPC ingeriram mais lipídeos e, portanto, houve maior sobrecarga de calorias advindas de lipídeos quando comparados aos CC. De acordo com Hu *et al.* (2018) a incorporação de lipídeos da dieta em gordura corporal, demanda menos energia quando comparada a carboidratos ou proteínas, o que favorece manutenção e, ou, ganho de peso corporal.

Em relação à diarreia, nós verificamos atenuação deste sinal nos animais OPC em relação aos CC. Este achado é importante, uma vez que a diarreia está associada ao comprometimento do cólon (BÜRGEL *et al.*, 2002), o que pode afetar suas funções especializadas, tais como absorção de água e minerais e formação de fezes (CRONIN e SHANAHAN, 2005). O sangramento retal, por sua vez, não foi alterado pela ingestão do óleo de pequi. De fato, após o rompimento da barreira epitelial, o DSS induz erosão da mucosa, o que expõe vasos sanguíneos e induz sangramento. Para reversão desse sinal deve haver processo de cicatrização, o que parece não ter ocorrido no grupo OPC.

A atenuação dos sinais de diarreia e perda de peso corporal não repercutiram em

uma melhora do IAD dos animais OPC comparado com os CC. Como o IAD considera em seu cálculo a média dos *scores* dos 3 sinais clínicos, a ausência de efeitos sobre os *scores* de peso e sangramento podem ter influenciado esse resultado. Também não foram afetados no grupo OPC em relação ao CC, os sinais macroscópicos como encurtamento do cólon e aumento do peso relativo do baço.

Na análise histopatológica, o efeito da suplementação com óleo de pequi sobre a preservação de criptas e células caliciformes foi demonstrado, tanto pela avaliação qualitativa, quando pela avaliação de *scores*. A região de criptas contribui para a constante renovação celular, e por isso sua preservação resulta na manutenção da integridade da barreira intestinal (WALLACE *et al.*, 2014). Além disso a preservação das células caliciformes garante a secreção de muco, o qual é importante para impedir a entrada de microorganismos patogênicos e o contato direto entre a mucosa e o conteúdo luminal (SHENG *et al.*, 2012; WALLACE *et al.*, 2014).

Por outro lado, apesar dos *scores* atribuídos à erosão e infiltração de células imunes não terem sido diferentes entre os grupos OPC e CC, a avaliação qualitativa demonstrou uma preservação parcial da camada epitelial, mucosa e submucosa, bem como menor presença de infiltrados celulares. É importante ressaltar que a preservação de parte da camada epitelial pode contribuir para a redução da entrada de microorganismos patogênicos e conseqüentemente para a redução dos infiltrados celulares, reduzindo assim o processo inflamatório (LENZEN *et al.*, 2018; WALLACE *et al.*, 2014).

Ainda assim, a preservação parcial do cólon, não foi suficiente para reverter significativamente o espessamento do cólon. Esse espessamento ocorre por edema local, aumento da irrigação sanguínea e presença de células imunes (HORTON, CORL e FISHMAN, 2000), o que demonstra que o óleo de pequi atenuou variáveis histopatológicas, mas não reverteu a doença. Assim, tanto do ponto de vista clínico quanto do histopatológico, pode-se deduzir que o óleo de pequi apenas atenuou sinais da colite ulcerativa. Entretanto, isto pode ter sido suficiente para determinar alterações na resposta imune.

Mais uma vez, a maior ingestão de ácido oleico pelo grupo OPC, pode explicar, pelo menos em parte, esses efeitos sobre a integridade da mucosa, bem como sobre os sinais clínicos. Em estudo prévio de nosso laboratório (MORENO *et al.*, 2016), já havíamos demonstrado o efeito da polpa de pequi na melhoria da estrutura intestinal de ratos saudáveis, por elevação da altura das vilosidades e da profundidade das criptas. Chen *et al.*, (2008) verificaram que a ingestão de altas doses de ácido oleico (30g/kg de dieta) por camundongos C57BL/6 com colite ulcerativa induzida por DSS (2,5%) por duas semanas, também reduziu a diarreia e reverteu

parcialmente a erosão da camada epitelial e a perda de criptas. Esses autores, por meio de análise metabolômica do soro, verificaram que a colite induziu à inibição da expressão hepática da *stearoyl-CoA desaturase 1* (SCD1), a qual é responsável pela biossíntese hepática de ácido oleico a partir do ácido esteárico. Na colite, esta inibição conduziu à maior concentração de estearoil lisofosfatidil colina (metabólito ativo do ácido esteárico) e menor concentração de oleil lisofosfatidil colina (metabólito ativo do ácido oleico) o que foi correlacionado com maior secreção de citocinas pró-inflamatórias. A ingestão do óleo de pequi, rico em ácido oleico, atenuou este desequilíbrio.

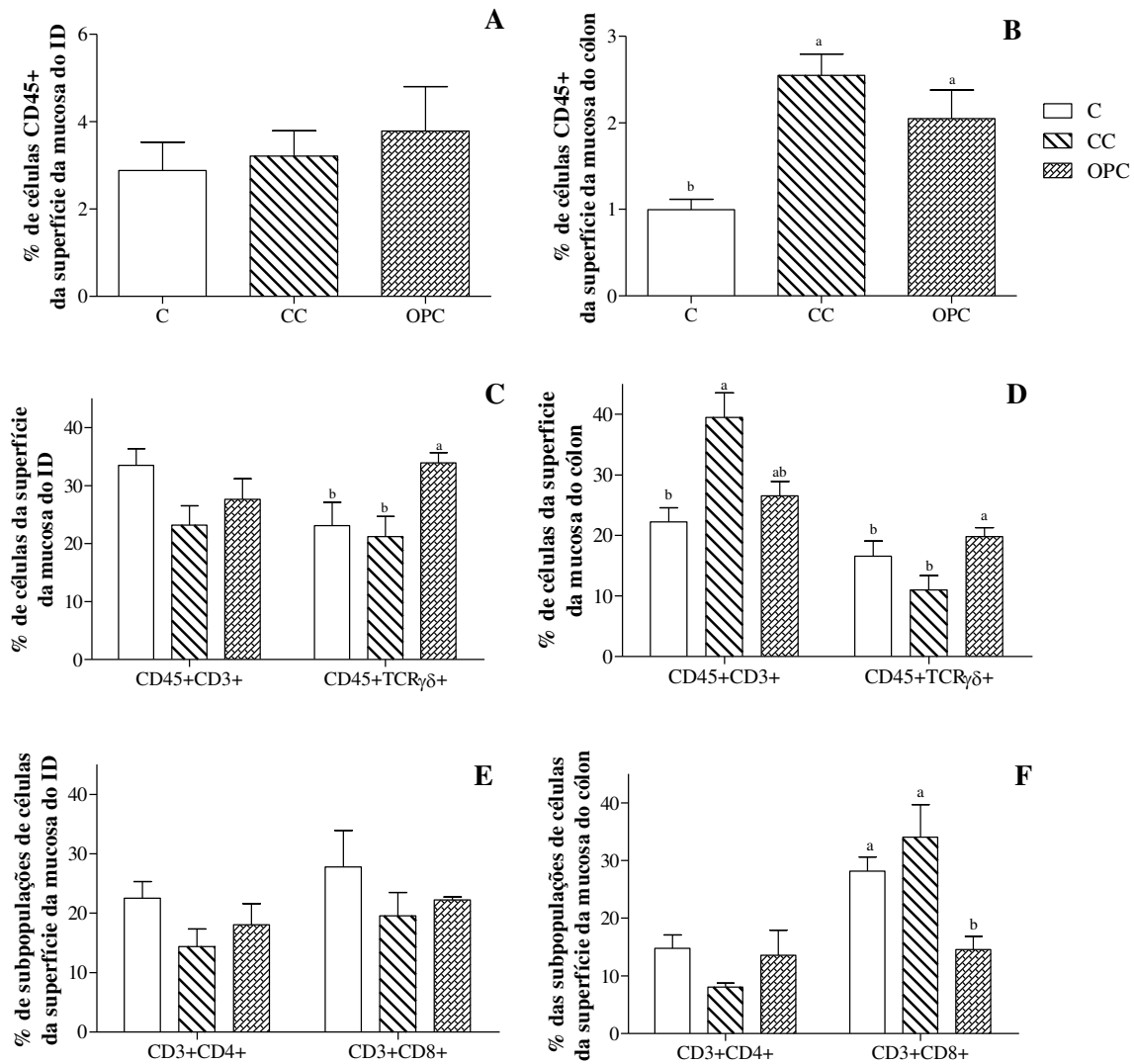
6.3.2. Imunofenotipagem de linfócitos das superfícies das mucosas do intestino delgado e do cólon e dos órgãos linfóides.

Como parte da resposta imune de mucosa, nós investigamos as alterações fenotípicas celulares induzidas pela suplementação com óleo de pequi na doença inflamatória intestinal nas superfícies das mucosas do intestino delgado e do cólon e nos linfonodos mesentéricos, e no baço.

Inicialmente, nas superfícies da mucosa do intestino delgado, o grupo OPC apresentou elevação dos linfócitos $T\gamma\delta$, em relação aos grupos C e CC, que se igualaram ($p=0,007$, FIG. 27C). Os percentuais dos demais tipos celulares, a saber, leucócitos totais, linfócitos T totais e linfócitos T auxiliares e citotóxicos não foram alterados em nenhum grupo experimental (FIG. 27A, C e E).

Em relação ao perfil fenotípico das superfícies da mucosa do cólon, foi observado um aumento do percentual de leucócitos totais em ambos os grupos doentes (CC e OPC), comparados ao grupo C ($p=0,0008$, FIG. 27B). O grupo CC apresentou elevação do percentual de linfócitos T totais ($p<0,05$) em relação ao grupo C e o grupo OPC não apresentou alteração nessa variável. O grupo OPC apresentou elevação do percentual de linfócitos $T\gamma\delta$ ($p=0,008$), e redução dos linfócitos T citotóxicos ($p=0,005$) em relação aos grupos C e CC (FIG. 27D e F). Além disso, não houve alterações nos grupos experimentais para o percentual de linfócitos T auxiliares (FIG. F).

Figura 27. Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T totais e suas subpopulações e linfócitos $T\gamma\delta$ presentes na superfície da mucosa intestinal, em condições de ruptura da integridade da mucosa.

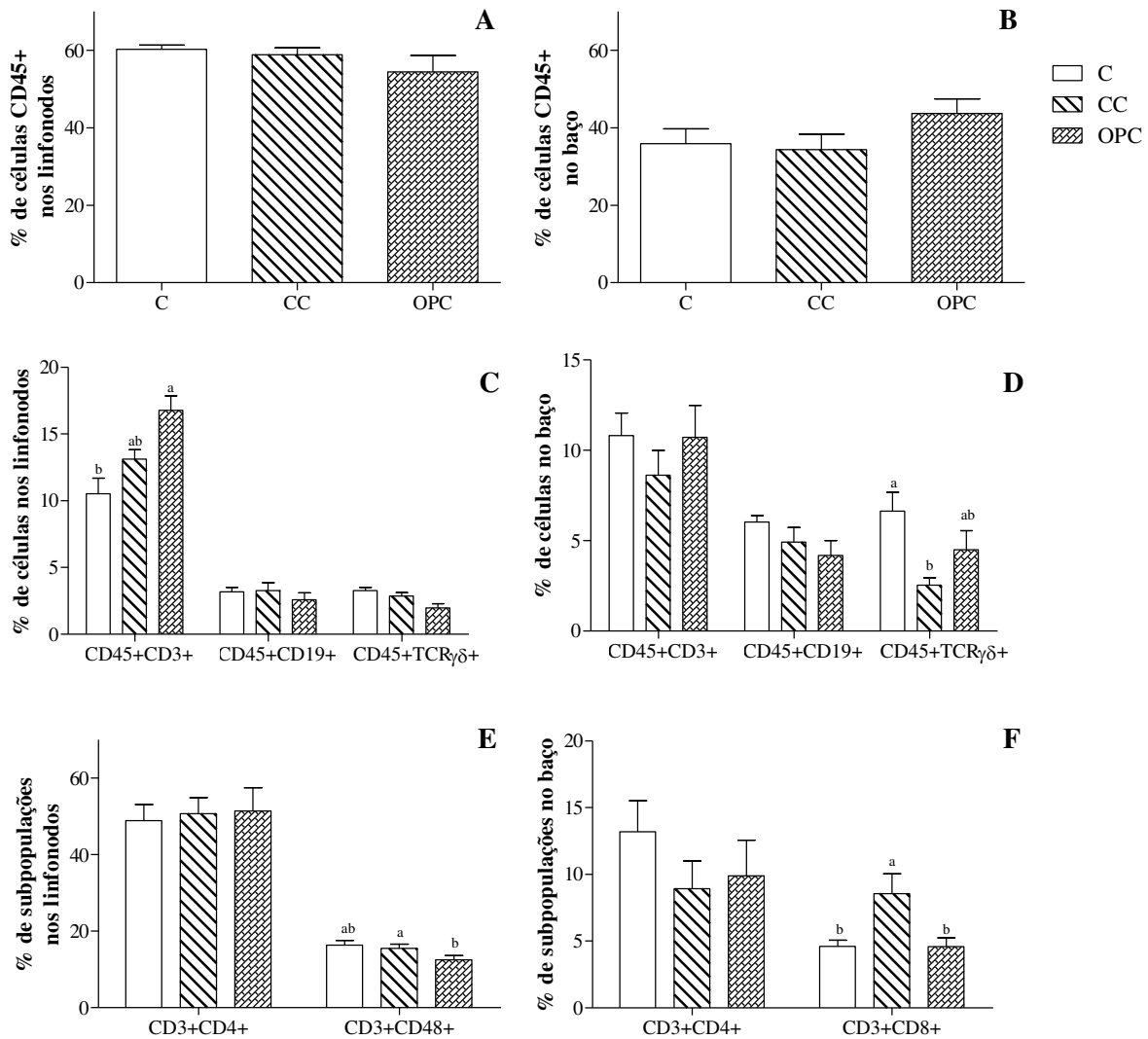


Percentual de leucócitos totais nas superfícies da mucosa do ID (A) e do cólon (B). Percentual de linfócitos T, B e $T\gamma\delta$ nas superfícies da mucosa do ID (C) e do cólon (D). Percentual das subpopulações de linfócitos T citotóxicos e T auxiliares nas superfícies da mucosa do ID (E) e do cólon (F). Resultados expressos em médias \pm erros padrões e $n=10$ animais/grupo para ID e cólon. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos testes de *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

Nos linfonodos mesentéricos nenhuma das células avaliadas foram alteradas no grupo CC, em relação ao grupo C (FIG. 28A, C, e E). O grupo OPC, por sua vez apresentou elevado percentual de linfócitos T totais (CD45+CD3+) em relação ao grupo C e semelhante ao grupo CC ($p < 0,05$, FIG. 28C). Já para os linfócitos citotóxicos (CD45+CD3+CD8+) dos linfonodos mesentéricos, o grupo OPC apresentou menor percentual comparado ao grupo CC e ambos foram semelhantes ao grupo C ($p < 0,05$, FIG. 28E). Os leucócitos totais, linfócitos B, linfócitos $T\gamma\delta$ e linfócitos T auxiliares não foram alterados pelos tratamentos (FIG. 28A, C, e E).

No baço, a suplementação com óleo de pequi (OPC) reduziu o percentual de linfócitos T citotóxicos em relação ao grupo CC, com valores que se igualaram aos do grupo C ($p < 0,05$, FIG. 28F). O grupo CC apresentou redução de linfócitos $T\gamma\delta$ ($p = 0,006$) e aumento dos linfócitos T citotóxicos ($p < 0,05$) em relação a grupo C (FIG. 28D e F). Outras alterações fenotípicas nos grupos experimentais, não foram observadas no baço (FIG. 28B, D e F).

Figura 28. Percentual de leucócitos totais, linfócitos T totais e subpopulações, linfócitos B e $T\gamma\delta$ presentes nos linfonodos mesentéricos e baço em condições de ruptura da integridade da mucosa.



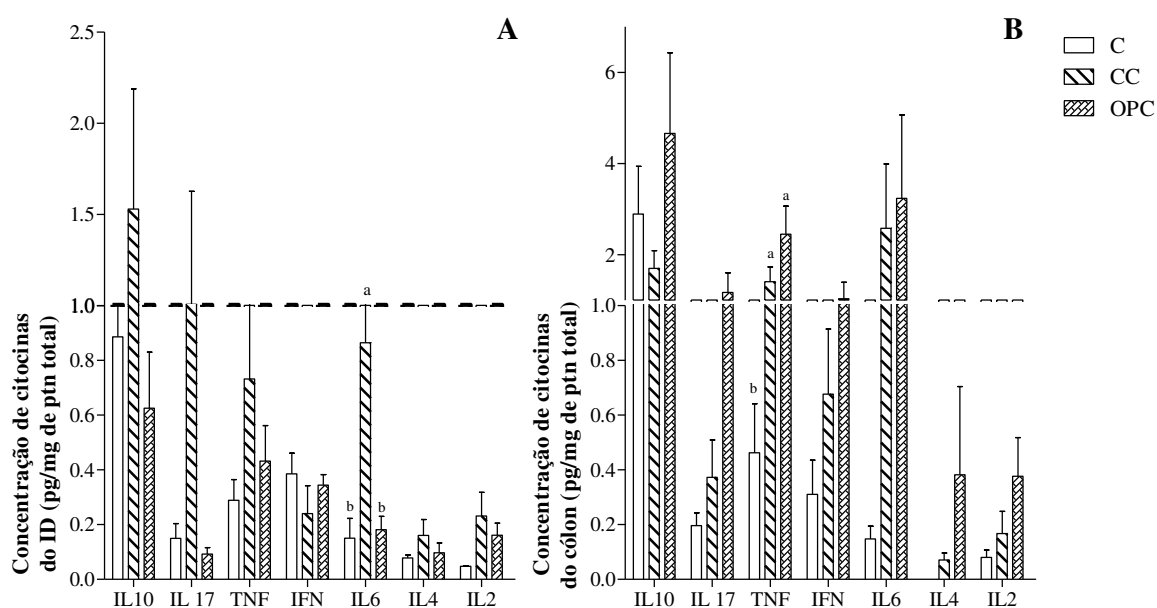
Percentual de leucócitos totais nos linfonodos (A) e baço (B). Percentual de linfócitos T, B e $T\gamma\delta$ nos linfonodos (C) e baço (D). Percentual das subpopulações de linfócitos T citotóxicos e T auxiliares nos linfonodos (E) e baço (F). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, n=15 animais. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos Testes *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

6.3.3. Perfil de citocinas e a concentração de IgAs na mucosa intestinal

A resposta imune da mucosa intestinal também pode ser influenciada por diversas moléculas sinalizadoras, tais como a imunoglobulina A e citocinas.

Em relação ao perfil de citocinas da mucosa do intestino delgado, observou-se menor concentração de IL-6 no grupo OPC em relação ao grupo CC, a qual foi semelhante à do grupo C (FIG. 29A). Na mucosa colônica, o grupo OPC e CC apresentaram elevação da concentração de TNF α , em relação ao grupo C (FIG. 29B). As concentrações das demais citocinas avaliadas não foram alteradas nas mucosas do ID e cólon em todos os grupos experimentais (FIG. 29A e B).

Figura 29. Concentrações de citocinas da mucosa do intestino delgado e cólon em condições de ruptura da integridade da mucosa.

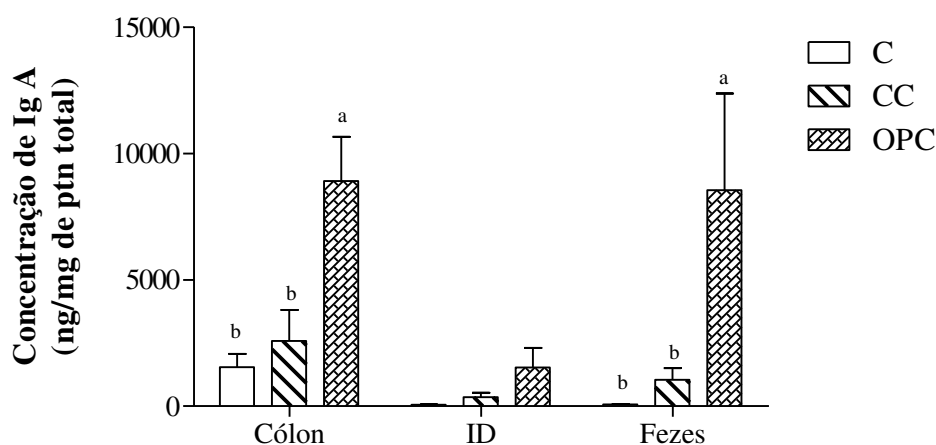


Concentração de citocinas na mucosa do ID (A). Concentração de citocinas na mucosa do cólon (B). Resultados foram expressos em médias \pm erros padrões, n=5 animais/grupo para ID e n=10 animais/grupo para cólon. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos testes de *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite, IL: interleucina, TNF α : *Tumor necrosis factor*- fator de necrose tumoral α , IFN: *interferon gamma*- Interferon γ , ID: intestino delgado.

O conteúdo de IgAs foi determinado nos lavados das fezes, cólon e ID. Foi constatada maior concentração de IgAs no lavado do cólon e das fezes no grupo OPC em

relação aos demais. Além disso, o grupo CC não teve alteração desse parâmetro, em nenhum dos lavados. Não houve alteração para a IgAs em nenhum grupo no ID (FIG. 30).

Figura 30. Concentrações de IgAs dos lavados de ID, cólon e fezes em condições de ruptura da integridade da mucosa

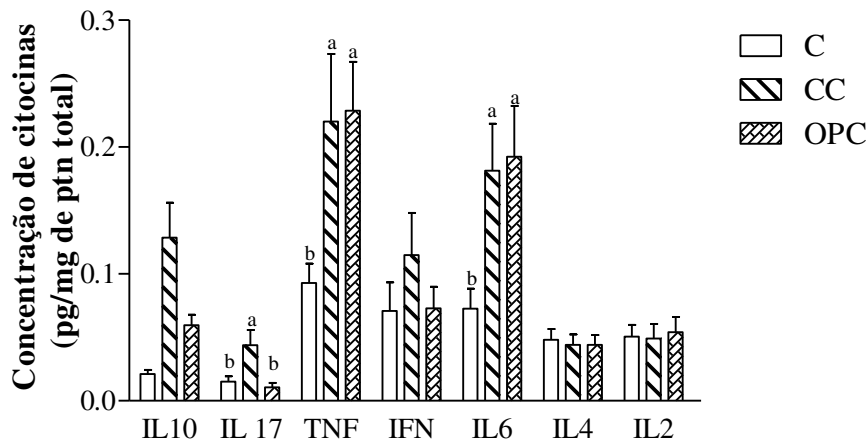


Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=5$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos testes de *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite.

6.3.4. Biomarcadores imunológicos sistêmicos

Alterações imunes na mucosa intestinal podem repercutir em alterações sistêmicas. Neste caso, o grupo OPC teve menor concentração plasmática de IL-17 que o grupo CC e semelhante ao grupo C ($p=0,005$). As concentrações de TNF α e IL-6 foram aumentadas nos grupos CC e OPC em relação ao grupo C ($p<0,05$). Não foram detectadas diferenças nas demais citocinas nos grupos experimentais (FIG. 31).

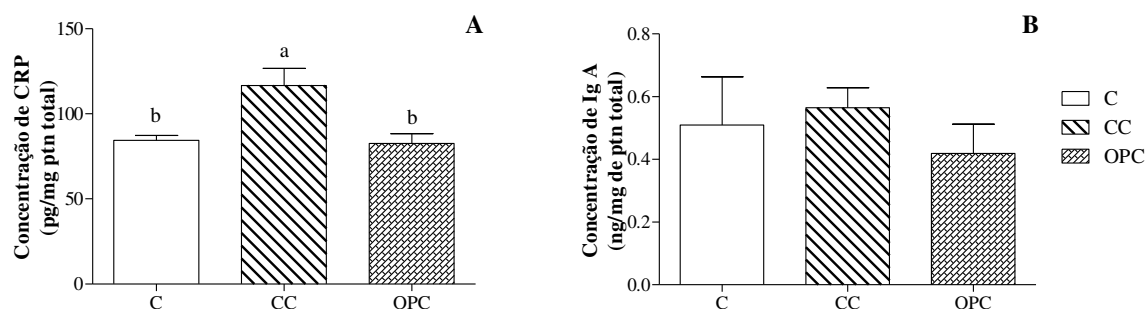
Figura 31. Concentrações plasmáticas de citocinas (pg/mg de proteína) em condições de ruptura da integridade da mucosa



Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=15$ animais/grupo. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelos Testes *Tukey* ou *Dunns*. Para os dados paramétricos foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey* e para não paramétricos foi utilizado o *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunns*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite, IL: interleucina, TNF α : *Tumor necrosis factor*- fator de necrose tumoral α , IFN: *interferon gamma*- Interferon γ .

Para avaliar efeitos potenciais do óleo de pequi sobre a inflamação sistêmica, também foram determinadas as concentrações de CRP e IgA plasmáticas. O grupo CC apresentou concentração de CRP superior à do grupo C, o que não aconteceu com o grupo OPC, no qual essa concentração foi inferior à do grupo CC e semelhante à do grupo C ($p=0,001$, FIG. 32A). A concentração plasmática de IgA não foi alterada nos grupos experimentais (FIG. 32B).

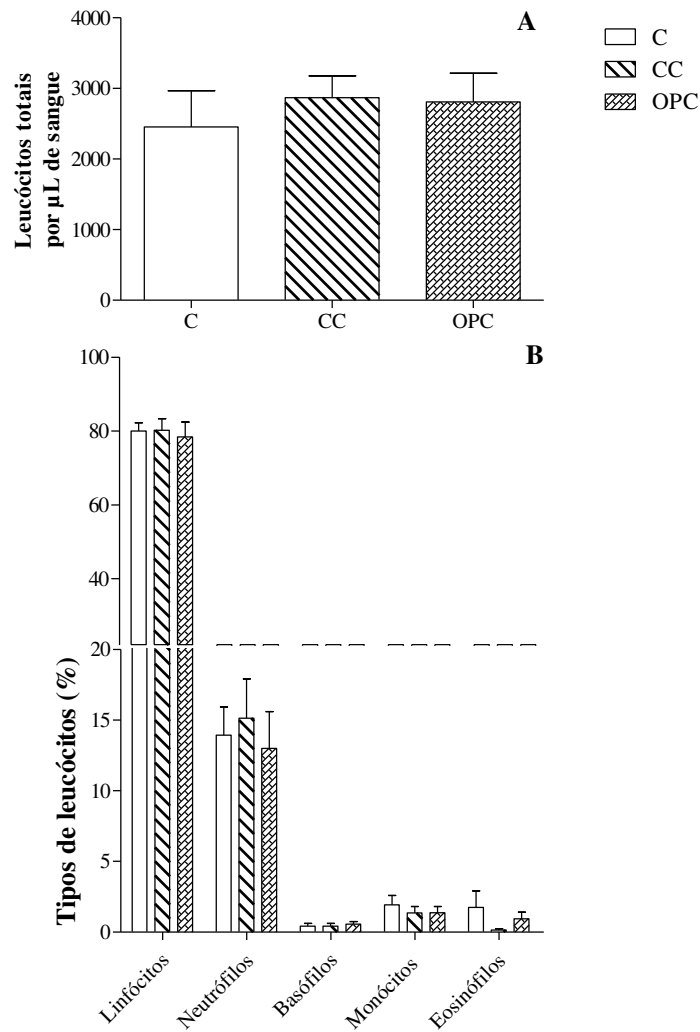
Figura 32. Concentrações plasmáticas de Proteína C reativa (pg/mg de proteína) e de imunoglobulina A (ng/mg de proteína) em condições de ruptura da integridade da mucosa.



Concentração plasmática de CRP (A). Concentração plasmática de IgA (B). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n= 15$ animais/grupo para CRP e $n= 5$ animais/grupo para IgA. Barras acompanhadas de letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelo teste *Tukey*. Foi utilizado *One Way ANOVA* e teste *Tukey*. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite, CRP: proteína C reativa, Ig: Imunoglobulina.

Tanto o número total de leucócitos sanguíneos quanto os percentuais de linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos foram semelhantes entre os grupos (FIG. 33A e B).

Figura 33. Perfil leucocitário hematológico em condições de ruptura da integridade da mucosa intestinal.



Leucócitos totais sanguíneos (A). Percentual de Leucócitos diferenciais (B). Resultados expressos em médias \pm erros padrões, $n=15$ animais/grupo. C: grupo controle, CC: grupo controle com colite, OPC: grupo óleo de pequi com colite. Foi utilizado *One Way* ANOVA.

Os modelos de indução de doenças inflamatórias intestinais são conhecidos por agredir a mucosa intestinal e induzir alterações em respostas imunes intestinais, que podem afetar os órgãos linfoides secundários e conseqüentemente a resposta imune sistêmica (WIRTZ *et al.*, 2007; NANCEY *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, a indução da doença inflamatória intestinal não alterou as populações celulares nos linfonodos mesentéricos e no sangue (C x CC). No entanto, outras alterações causadas por este modelo foram observadas, tais como redução de linfócitos T $\gamma\delta$ (KÜHL *et al.*, 2002) e aumento do percentual de linfócitos T CD8+ no baço (NANCEY *et al.*, 2006). Ainda, na mucosa colônica, observamos aumento de leucócitos totais e de linfócitos de superfície T totais (CHASSAING *et al.*, 2014; KIESLER, FUSS e STROBER, 2015).

Adicionalmente, quando comparamos os grupos CC e OPC com o grupo C na mucosa colônica, observamos aumento do percentual de leucócitos totais em ambos. Nós acreditamos que, no grupo CC este aumento pode estar associado com a elevação de linfócitos de superfície totais, e no grupo OPC, este efeito pode estar associado a elevação dos linfócitos T $\gamma\delta$. Além disso, deve ser considerada a influência das células da imunidade inata neste resultado, as quais também possuem em sua superfície, CD45, e não foram investigadas no presente estudo. Tem sido demonstrado infiltração de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, entre outros tipos celulares, na mucosa colônica de animais com colite ulcerativa (KIESLER, FUSS e STROBER, 2015; MUNYAKA *et al.*, 2016; RABBI *et al.*, 2014).

Esses resultados indicam que o modelo foi efetivo em promover alterações em fenótipos celulares e que essas alterações podem sinalizar para um desequilíbrio na resposta imune.

A ingestão do óleo de pequi pelo grupo OPC promoveu alguns efeitos diferenciais. Houve elevação de células T totais nos linfonodos quando comparada ao grupo C. Isso indica que, provavelmente, um maior número de células estava sendo ativado nesses animais. Entretanto, isso não repercutiu em um maior número de linfócitos no sangue ou baço e de linfócitos de superfície T no ID e no cólon. Além disso, esse efeito não foi prejudicial para os animais do grupo OPC quando comparado ao grupo CC, uma vez que ambos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. Deve ser considerado, entretanto uma investigação de alterações nos percentuais de linfócitos presentes na lâmina própria dos animais OPC, já que alguns tipos celulares após ativados seguem para essa região onde permanecem para secreção de citocinas e contribuem para o prognóstico da doença (NANCEY *et al.*, 2006).

Adicionalmente, no grupo OPC houve redução de células T citotóxicas em vários compartimentos, comparado ao grupo CC. Inicialmente nos órgãos linfoides, o efeito do óleo de pequi sobre a redução das células citotóxicas já havia sido evidenciado neste estudo, em condições de integridade da mucosa intestinal, o que indica o papel regulador do óleo de pequi sobre essas células, em ambas as condições. De fato, o grupo OPC reduziu linfócitos T CD8+ nos órgãos linfoides e no cólon. Essa redução é importante para manter a integridade intestinal, bem como deter a progressão da agressão sobre a mucosa.

Nancey *et al.*, (2006) demonstraram em um modelo de indução da colite ulcerativa com 2,4 dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS), que as células CD8+ efetoras ativadas no baço e linfonodos foram direcionadas para o cólon e apresentaram resposta citolítica, com aumento da produção de IFN γ e de granzimas B, o que está relacionado com a agressão das células epiteliais. Ainda, os mesmos autores demonstraram que a supressão dessas células inibia o processo inflamatório e a iniciação da doença. Dessa forma, a redução dos percentuais de células citotóxicas pode ter favorecido o prognóstico da doença e pode explicar, pelo em menos em parte, a atenuação dos sinais clínicos e histopatológicos observados no grupo OPC. A maior ingestão de ácido oleico por este grupo, pode estar associada com a redução dessas células em todos os compartimentos. Serizawa *et al.*, (1996) demonstraram que a ingestão de doses crescentes (5 e 10%) de ácido oleico na dieta de ratos, diminuiu o percentual de linfócitos CD8+, tanto em órgãos linfoides quanto na mucosa intestinal, sugerindo menor migração dessas células.

Outra subpopulação celular afetada pela ingestão do óleo de pequi, foi a de células T $\gamma\delta$. Essas células não foram alteradas nos órgãos linfoides, mas seus percentuais foram elevados nas superfícies da mucosa do ID e do cólon, no grupo OPC em comparação aos grupos C e CC. A função dessas células na colite ulcerativa, bem como em outras doenças inflamatórias intestinais, é peculiar. Dependendo dos sinais imunológicos aos quais essas células são expostas, ou daqueles que elas produzem, elas passam a assumir um papel protetor ou patogênico.

O papel patogênico das células T $\gamma\delta$ na doença inflamatória intestinal, está associado com a produção de IL-17, a qual atua sobre células dendríticas e incita a produção de IL-6 e IL-23 (DO *et al.*, 2014). Essas citocinas são reponsáveis pela diferenciação de células Th17 em células Th1 secretoras de IFN γ (KIM *et al.*, 2011; PAUL, SHILPI, e LAL, 2014). Este processo está relacionado com a degradação da membrana basal das células epiteliais levando ao desenvolvimento da colite (DO *et al.*, 2014; PAUL, SHILPI, e LAL, 2014). Em nosso estudo, não observamos aumento significativo das citocinas IL-17 e IL-6 na

mucosa dos animais do grupo OPC em relação aos outros dois grupos. De outro modo, foi observado na mucosa do ID, menor concentração de IL-6 no grupo OPC em relação ao CC.

As citocinas plasmáticas neste contexto, parecem também não ter interferido no potencial patogênico das células $T\gamma\delta$. A concentração de IL-17 plasmática foi reduzida no grupo OPC em relação ao CC. Já em relação a IL-6 plasmática, apesar de ter sido detectada concentração elevada dessa citocina no grupo OPC em relação ao grupo C, não diferiu do grupo CC, o que indica que um prejuízo adicional não foi induzido pela suplementação com óleo de pequi. Outro aspecto que pode também refutar o potencial patológico do aumento das células $T\gamma\delta$ neste estudo, é a redução do percentual de células CD8+. Isso porque, já foi demonstrado que as células $T\gamma\delta$ que secretam IL-17 são CD8 α + (PARK *et al.*, 2010) e no presente estudo o percentual total de células T CD8+ foi reduzido na mucosa colônica, o que pode estar associado com uma redução também no fenótipo de células $T\gamma\delta$ CD8 α + produtoras de IL-17.

Por outro lado, o papel protetor do acúmulo de células $T\gamma\delta$ durante a doença inflamatória intestinal está associado a maior produção de *Keratinocyte growth factor* (KGF), o qual promove reparo tecidual, e cicatrização de células epiteliais (CHEN *et al.*, 2002; NIELSEN, WITHERDEN e HAVRAN 2017; PAUL, SHILPI, e LAL, 2014). Em nosso estudo, não foi avaliada a concentração de KGF, entretanto observamos uma atenuação dos sinais clínicos da doença, bem como preservação das criptas e células caliciformes e preservação parcial da camada epitelial do ponto de vista histológico. Assim, inferimos que o aumento do percentual de linfócitos de superfície $T\gamma\delta$ no ID e cólon no grupo OPC, está associado à proteção contra o avanço da doença. De fato, já foi demonstrado que a depleção de células $T\gamma\delta$ elevou a mortalidade de ratos com colite ulcerativa induzida por TNBS (KÜHL *et al.*, 2002). Além disso, o seu papel protetor também ocorre por incitar a diferenciação das células B em plasmócitos secretores de IgA, por meio de uma resposta Th2 (HIROI *et al.*, 1995).

Neste contexto, vários estudos demonstraram efeitos de compostos bioativos de alimentos na elevação das células $T\gamma\delta$ (AKIYAMA *et al.*, 2005; BASSAGANYA-RIERA *et al.*, 2001; PERCIVAL, BUKOWSKI e MILNER, 2008). Entretanto, o nosso estudo demonstrou pela primeira vez que a ingestão de um alimento rico em MUFA e carotenoides também pode elevar essas células na mucosa intestinal, com efeito na regulação da integridade intestinal. Entretanto, os mecanismos pelos quais esses compostos atuam sobre essas células precisam ser melhor investigados.

Nós também verificamos elevação da concentração de IgA nos lavados de cólon e fezes dos animais do grupo OPC em relação aos outros dois grupos, apesar de não ter sido detectado alteração sobre o percentual de células B totais. Este resultado pode estar relacionado como já mencionado, com a elevação de células T $\gamma\delta$ no grupo OPC. Além disso, sugerimos que a maior ingestão de carotenoides pró-vitamina A, pelo grupo OPC, também possa ter interferido nesses resultados. Nessa perspectiva, a maior produção do metabólito da vitamina A, ácido retinoico por células dendríticas, pode induzir entre outros efeitos, a diferenciação das células B em plasmócitos secretores de IgA (AGACE *et al.*, 2012; MORA *et al.*, 2006), e portanto pode estar envolvida nos efeitos encontrados no grupo OPC.

Esse efeito é importante pois na doença inflamatória intestinal a IgA parece estar inversamente relacionada com o grau de displasia e inflamação (ROGNUM, *et al.*, 1982). Além disso, essa imunoglobulina impacta na diversidade da microbiota da mucosa, selecionando bactérias protetoras e incitando a internalização de bactérias não invasivas (FRANSEN *et al.*, 2015). Estes efeitos também auxiliam a reduzir a progressão da doença, uma vez que a associação do desequilíbrio da microbiota intestinal e da resposta imune, está envolvida com a manifestação e progressão da doença inflamatória intestinal (GARRETT *et al.*, 2010).

Em relação ao perfil de citocinas e CRP foram detectadas alterações tanto locais quanto sistêmicas. No ID houve elevação da concentração de IL-6 e no cólon, de TNF α no grupo CC em relação ao C. Existem poucas evidências de alterações da IL-6 ou outra citocina no ID em doenças inflamatórias intestinais. Parece que, na doença de Crohn, podem estar presentes na porção distal do ID (BECKER *et al.*, 2003; BOGAERT *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2012). Em humanos, já se observou aumento da expressão de IL-6 no ileum de indivíduos com doença de Crohn (BOGAERT *et al.*, 2010). Adicionalmente, nós também observamos que a concentração de IL-6 no ID dos animais OPC foi reduzida em relação ao CC. Assim, o óleo de pequi pode ter contribuído, pelo menos em parte, para este efeito.

No cólon, a colite elevou as concentrações de TNF α no grupo CC em relação ao C, o que é característico da doença. Este achado tem sido mostrado frequentemente em modelos de indução de colite e faz parte da resposta inflamatória causada pela doença (KUMAR *et al.*, 2011; NEURATH *et al.*, 1997; TEN HOVE *et al.*, 2001). Neste caso, a ingestão do óleo de pequi pelos animais OPC não reverteu esse efeito.

No sangue, a colite promoveu elevação das concentrações de IL-6, TNF α , IL-17 e CRP dos animais CC em relação aos C. A ingestão do óleo de pequi pelos animais OPC impediu esta elevação para IL-17 e CRP, e não impediu a elevação das demais. Alterações nas

concentrações sanguíneas de TNF α e IL-6 na colite ulcerativa foram relatadas recentemente (GONG *et al.*, 2019). Nós acreditamos que a elevada concentração de IL-6 sanguínea nos grupos CC e OPC pode estar relacionada à elevada concentração de TNF α . De acordo com Aggarwal, Gupta e Sung (2013), o TNF α estimula a secreção de IL-6 que induz a expressão de genes pró-inflamatórios (AGGARWAL, GUPTA e SUNG, 2013). Além disso, essas citocinas estão envolvidas com a progressão da doença, sendo o TNF α determinante para apoptose celular e inflamação.

Assim, considerando os efeitos diferenciais observados no grupo OPC em relação ao CC para os marcadores sistêmicos, podemos inferir que o óleo de pequi atenuou a resposta imune. No caso da IL-6 no ID, nós acreditamos que o óleo de pequi possa estar relacionado tanto com supressão da via do NF κ B em leucócitos da mucosa do ID, quanto com a menor concentração de IL-17 observada no grupo OPC em relação ao CC. Conforme mencionado anteriormente, diversos autores tem relatado associação entre a maior ingestão de carotenoides e a supressão via de sinalização do NF κ B, o que leva à menor expressão e secreção de mediadores pró-inflamatórios, dentre os quais, estão as citocinas IL-17 e IL-6 (IZUMI-NAGAI, *et al.*, 2008; KAULMANN e BOHN, 2014; KWOK *et al.*, 2012). Além disso, é possível que a menor concentração da IL-17 tenha contribuído para a redução da IL-6. No estudo de Hata *et al.* (2002), a IL-17 induziu à secreção de IL-6 por miofibroblastos subepiteliais do cólon, os quais estão presentes também na mucosa do ID (LAHAR *et al.*, 2011). Assim, no grupo OPC possivelmente, tanto a redução sistêmica de IL-17, quanto a redução em 90% da concentração de IL-17 na mucosa do ID, podem ter resultado em menor estimulação de miofibroblastos e com isso menor secreção de IL-6.

Adicionalmente, a IL-17 está associada à patogênese da colite ulcerativa. Em humanos, Fujino *et al.* (2003) observaram aumento da expressão de IL-17 na mucosa intestinal e no soro de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e associaram essa citocina com alterações inflamatórias e aumento das lesões na mucosa. No nosso estudo, observamos elevação significativa dessa citocina no plasma dos animais CC. Assim, a reversão desse resultado no grupo OPC, pode ter contribuído para o melhor prognóstico da doença. Sugerimos que no grupo OPC, ocorreu uma maior incorporação de compostos bioativos do óleo de pequi nas membranas de células T e monócitos, e que essa incorporação possa ter reduzido a secreção de IL-17, uma vez que na doença inflamatória intestinal, essas células são as principais envolvidas com a produção dessa citocina (ALBANESI *et al.*, 2000; FUJINO *et al.*, 2003).

Neste contexto, os animais do grupo OPC apresentam uma ingestão maior de carotenoides pró-vitamina A, o que também pode estar associado a redução das concentrações de IL-17. No estudo de Ahmad *et al.* (2009), foi demonstrada correlação negativa entre os estoques de vitamina A hepáticos e as concentrações de IL-17 sanguíneas após ingestão de 240mg de vitamina A por homens. Os autores sugeriram que este resultado está relacionado com a supressão da resposta Th17 e poderia impactar na diminuição do risco ou da severidade de doenças autoimunes. Em nosso estudo, resultado similar foi observado, sugerindo que o efeito dos carotenoides pró-vitamina A, presentes no óleo de pequi, possa ter sido similar ao efeito da vitamina A, sobre essa citocina, impactando em atenuação da colite ulcerativa.

Por fim, a reversão da elevação da concentração plasmática de proteína C reativa no grupo OPC, é um indicador de proteção sistêmica, o qual já havia sido verificado em condições de integridade e se manteve no desequilíbrio do sistema imune intestinal. A proteína C reativa é um marcador de inflamação sistêmica da colite ulcerativa aguda utilizado tanto em humanos (SOLEM *et al.*, 2006) quanto para o modelo de colite induzido por DSS em animais (DO e WOO, 2018; MUNYAKA *et al.*, 2016;). Sua produção hepática e secreção no sangue está associada a elevação da concentração de IL-6 circulante (DEL GIUDICE e GANGESTAD, 2018). De fato, verificamos elevação de IL-6 circulante em ambos os grupos doentes, entretanto no grupo OPC essa elevação não induziu maior secreção de proteína C reativa. Assim, sugerimos que a redução plasmática da CRP no grupo OPC precedeu à elevação da IL-6, e é mais um sinal do papel atenuador do óleo de pequi na inflamação sistêmica da doença inflamatória intestinal.

Portanto, de forma geral, observamos que a ingestão do óleo de pequi parece reforçar a ação reguladora do sistema imune de mucosa intestinal. Isso foi verificado em condições de integridade da mucosa intestinal e repercutiu na atenuação da resposta imune, por redução das células com resposta citotóxica, da IL-17 e CRP sistêmicas e elevação da IgAs e das células T $\gamma\delta$, que apresentam potencial regulatório, quando ocorreu a ruptura dessa integridade intestinal. Esses efeitos podem ter sido os principais determinantes da melhora dos sinais clínicos e histopatológicos e apontam para o papel protetor do óleo de pequi na doença inflamatória intestinal.

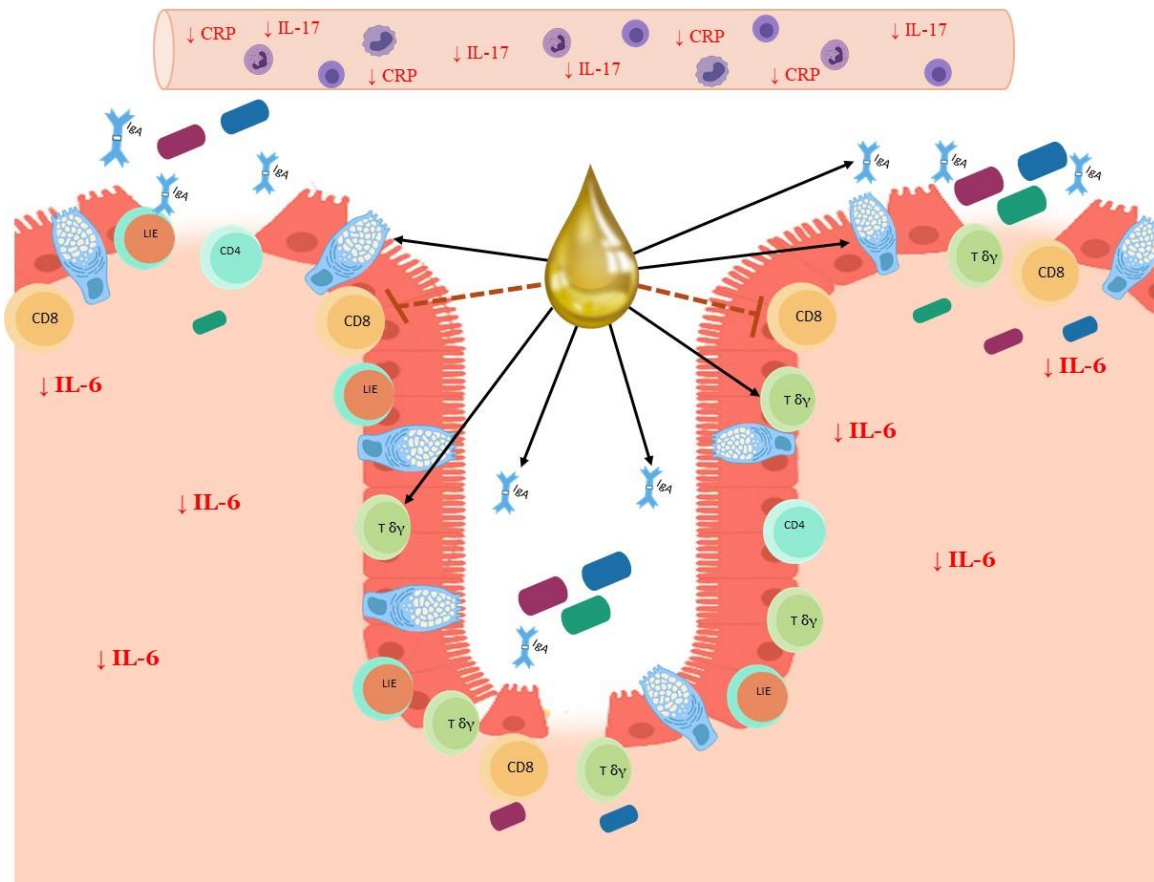
Assim nós relacionamos a maior ingestão de MUFA pelos animais OPC, com melhor prognóstico da doença via modulação do equilíbrio de metabólitos lipídicos na mucosa colônica. Neste contexto, em humanos já foi demonstrado que existem menores concentrações de ácido oleico na mucosa colônica afetada pela colite aguda (NISHIDA *et al.*, 1987). Essa redução está associada com a redução da expressão da enzima ácido graxo sintase

na mucosa colônica, que exerce função chave na síntese endógena de ácidos graxos, incluindo de ácido oleico (HEIMERL *et al.*, 2006). Assim, no grupo OPC, a ingestão mais elevada de ácido oleico pode ter contribuído para restaurar as concentrações desse ácido graxo na mucosa. Além disso, maior oferta dietética de ácido oleico favorece menor incorporação de ácido araquidônico nas membranas celulares e este ácido graxo é precursor de mediadores pró-inflamatórios.

Deve ser considerado ainda que as células avaliadas neste estudo fazem parte do GALT, o qual mantém a integridade da mucosa por combater patógenos e induzir um estado não responsivo a antígenos alimentares e bactérias comensais (RAMIRO-PUIG *et al.*, 2008). Assim, a supressão principalmente de células citotóxicas pela ingestão do óleo de pequi, pode ser importante para melhorar doenças autoimunes. Por outro lado, deve ser considerado que respostas protetoras contra patógenos estrangeiros, tanto em condições de integridade da mucosa intestinal, quanto em sua ruptura, podem estar diminuídas nos animais que ingeriram óleo de pequi, o que pode ser prejudicial.

A figura 34 ilustra a ruptura da integridade da mucosa que favorece a atividade pró-inflamatória na mucosa e o dano epitelial na doença inflamatória intestinal. A ingestão do óleo de pequi atenua a resposta pró inflamatória, pela redução das células T citotóxicas e de mediadores inflamatórios e eleva parâmetros regulatórios tais como células T $\gamma\delta$ e IgAs (FIG. 34). Assim, considerando que a ingestão do óleo de pequi reduziu alguns parâmetros imunológicos em condições de integridade da mucosa intestinal (FIG. 19), sugerimos que essa regulação pode também ter ocorrido no grupo OPC previamente à indução da doença e isso pode ter retardado o processo inflamatório desses animais e contribuído para os resultados observados na ruptura da integridade da mucosa intestinal (FIG. 34). Assim, como perspectiva para estudos futuros deve ser investigado os efeitos da ingestão do óleo de pequi ao longo do tempo, a fim de elucidar a partir de qual momento esses efeitos começam a ser observados e se são perdidos.

Figura 34. Representação das alterações imunológicas após ingestão do óleo de pequi na ruptura da integridade da mucosa intestinal*.



*A gota dourada representa o óleo de pequi, a cor vermelha das setas e de mediadores inflamatórios indicam os efeitos redutores do óleo de pequi, as setas pretas indicam estimulação ou aumento do mediador demonstrado. IL Interleucina, IFN γ : Interferon Gama; CRP: Proteína C Reativa, IgA: Imunoglobulina A, LIE: representa os linfócitos T totais de superfície da mucosa intestinal.

6.4. Resumo dos principais resultados

De maneira geral os principais resultados deste estudo foram:

A) Em condição de integridade da mucosa intestinal, a ingestão do óleo de pequi promoveu:

- No ID: Redução de linfócitos de superfície T totais, T auxiliares e de IFN γ .
- No cólon: Redução de linfócitos de superfície T citotóxicos e IgAs.
- Nos linfonodos: Redução de linfócitos T citotóxicos.
- No baço: Redução de linfócitos T auxiliares e citotóxicos
- No plasma: Aumento de IL-10 e do percentual de linfócitos e redução de IL-2, CRP e do percentual de neutrófilos.

B) Na doença inflamatória intestinal, a ingestão do óleo de pequi promoveu:

- Alterações clínicas: Reduziu a perda de peso e o *score* de diarreia.
- No ID: Elevou os linfócitos de superfície T $\gamma\delta$ e reduziu IL-6.
- No cólon: Elevou os linfócitos de superfície T $\gamma\delta$ e a IgAs e reduziu os linfócitos de superfície T citotóxicos e a perda de criptas e células caliciformes.
- Nos linfonodos: Reduziu os linfócitos T citóxicos.
- No baço: Reduziu os linfócitos T citotóxicos.
- No plasma: Reduziu a IL-17 e CRP.

7. CONCLUSÃO

Na integridade da mucosa intestinal, a ingestão do óleo de pequi parece ter reforçado a resposta reguladora do sistema imune, o que possivelmente contribuiu para que, na ruptura da integridade, houvesse elevação de células com potencial de ação reguladora, redução de mediadores pró-inflamatórios, de células com atividade citotóxica e melhoria do quadro clínico e histopatológico com preservação da mucosa.

REFERÊNCIAS

AGACE, W. W.; PERSSON, E. K. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. **Trends in immunology**, v. 33, n. 1, p. 42-48, 2012.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids**, v. 33, n. 10, p. 981-984, 1998.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; SUNG, B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 8, p. 1672-1692, 2013.

AGUILAR, E. C. *et al.* Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 601-609, 2012.

AHMAD, S. M., *et al.* Markers of innate immune function are associated with vitamin a stores in men. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 2, p. 377-385, 2008.

AKIYAMA, H. *et al.* Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. **FEBS letters**, v. 579, n. 20, p. 4485-4491, 2005.

ALBANESI, C. *et al.* Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- γ and interleukin 4 induced activation of human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 81-87, 2000.

ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa0CPAC**, p. 464, 1998.

AMBRÓSIO, C. L. B. *et al.* Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ANNUNZIATO, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1849-1861, 2007.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 385-396, 2004.

BASSAGANYA-RIERA, J. *et al.* Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8+ lymphocytes. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 9, p. 2370-2377, 2001.

BALKHI, M. Y. *et al.* T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 339-347, 2015.

BANDEIRA, A. *et al.* Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 239-244, 1990.

BARBOSA, P. O. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674-680, 2016.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

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

BECKER, C., *et al.* Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 5, p. 693-706, 2003.

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 112-115, 1989.

BENSON, J. M.; SHEPHERD, D. M. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 327-338, 2011.

BERNSTEIN, C. N. *et al.* World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 112-124, 2010.

BESSLER, H.; DJALDETTI, M. Broccoli and human health: immunomodulatory effect of sulforaphane in a model of colon cancer. **International journal of food sciences and nutrition**, p. 1-8, 2018.

BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. A00101s1, p. 875-880, 2015.

BHAGAT, G. *et al.* Small intestinal CD8⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ NKG2A⁺ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 1, p. 281-293, 2008.

BILATE, A. M., *et al.* Tissue-specific emergence of regulatory and intraepithelial T cells from a clonal T cell precursor. **Science immunology**, v. 1, n. 2, p. 1-27, 2016.

BOGAERT, S., *et al.* Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. **BMC immunology**, v. 11, n. 1, p. 61, 2010.

BOIRIVANT, M. *et al.* Oxazolone Colitis: A Murine Model of T Helper Cell Type 2 Colitis Treatable with Antibodies to Interleukin 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 10, p. 1929-1939, 1998.

BOLL, G. *et al.* Regional specialization of intraepithelial T cells in the murine small and large intestine. **Scandinavian journal of immunology**, v. 41, n. 2, p. 103-113, 1995.

BOYMAN, O., SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAZIL, J. C.; LOUIS, N. A.; PARKOS, C. A. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 19, n. 7, p. 1556-1565, 2013.

BUIJSSE, B. B. *et al.* Plasma carotene and α -tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause-specific mortality in European elderly: the Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action (SENECA)–. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 4, p. 879-886, 2005.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 1, 1998.

CÂNDIDO, F. G. *et al.* Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 69, n. 2, p. 125-143, 2018.

CAO, A. T. *et al.* Interleukin (IL)-21 promotes intestinal IgA response to microbiota. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 5, p. 1072, 2015.

CAPIRALLA, H. *et al.* Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and $A\beta$ -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. **Journal of neurochemistry**, v. 120, n. 3, p. 461-472, 2012.

CARDOSO, C. R. *et al.* Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 409-415, 2011.

CARDOSO, L. M. *et al.* Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3-14, 2013.

CAROL, M. *et al.* Spontaneous secretion of interferon γ and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. **Gut**, v. 42, n. 5, p. 643-649, 1998.

CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 5, p. 1189-1203, 1974.

CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S. **Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação**. 1.ed. Belo Horizonte, p. 139, 1988.

CERF-BENSUSSAN, N.; GUY-GRAND, D.; GRISCELLI, C. Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterisation and study of natural killer activity. **Gut**, v. 26, n. 1, p. 81-88, 1985.

CÉSAR, N. R. *et al.* The Partial Replacement of Lard by Caryocar brasiliense Oil in a Western Diet improves Cardiovascular Risk Factors in Rats. **Food and Nutrition Report**, v. 1, n. 4, p. 1-08, 2017.

CHA, H. R. *et al.* Downregulation of Th17 cells in the small intestine by disruption of gut flora in the absence of retinoic acid. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6799-6806, 2010.

CHASSAING, B. *et al.* Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **Current Protocols in Immunology**, v. 15, n. 25, p. 1-14, 2014.

CHEN, C. *et al.* Metabolomics reveals that hepatic stearyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. **Cell metabolism**, v. 7, n. 2, p. 135-147, 2008.

CHEN, X. *et al.* Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. **Life sciences**, v. 203, p. 291-304, 2018.

CHEN, Y. *et al.* Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14338-14343, 2002.

CHEROUTRE, H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 217-246, 2004.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 7, p. 445, 2011.

CHEW, B. P.; PARK, J. S. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 257S-261S, 2004.

CIESIELSKA, A.; KWIATKOWSKA, K. Modification of pro-inflammatory signaling by dietary components: The plasma membrane as a target. **Bioessays**, v. 37, n. 7, p. 789-801, 2015.

CLAMP, A. G. *et al.* The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. **Lipids**, v. 32, n. 2, p. 179-184, 1997.

COLOMBO, N. B. R. *et al.* Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852-862, 2015.

CORBI, G. *et al.* Dietary phytochemicals in neuroimmunoaging: a new therapeutic possibility for humans?. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 364, 2016.

COYNE, T. *et al.* Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 82, p. 685-93, 2005.

CRONIN, C. C.; SHANAHAN, F. Understanding symptoms and signs in inflammatory bowel disease. In: *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Springer, Boston, 2005. p. 253-267.

CUI, W. *et al.* Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of β -cells by Ca²⁺/calpain-2 pathways. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59921, 2013.

CURL, A. L. Carotenoid Separation and Identification, Application of Countercurrent Distribution to Valencia Orange Juice Carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 456-460, 1953.

CURY-BOAVENTURA, M. F., *et al.* Mechanisms involved in Jurkat cell death induced by oleic and linoleic acids. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 6, p. 1004-1014, 2006.

DALWADI, H. *et al.* The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric T cell superantigen. **Immunity**, v. 15, n. 1, p. 149-158, 2001.

DA SILVA QUIRINO, G. *et al.* Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.

DE LANGE, K. M.; BARRETT, J. C. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. **Journal of autoimmunity**, v. 64, p. 91-100, 2015.

DE OLIVEIRA, M. L. M. *et al.* In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 214-219, 2010.

DE PABLO, M. A. *et al.* Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 25, n. 1, p. 11-23, 1998.

DE PABLO, M. A. *et al.* Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. **Apoptosis**, v. 4, n. 2, p. 81-87, 1999.

DE PABLO, M. A.; De CIENFUEGOS, G. A. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology & Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 31-39, 2000.

DE SOUZA, H. S. P; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13, 2016.

DE WAAL M, R., *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

DE WIT, N. *et al.* Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 5, p. G589-G599, 2012.

DEBBABI, M. *et al.* Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, p. 151-170, 2017.

DEITCH, E. A.; XU, D. Z.; QI, L. Different lymphocyte compartments respond differently to mitogenic stimulation after thermal injury. **Annals of surgery**, v. 211, n. 1, p. 72, 1990.

DEL GIUDICE, M.; GANGESTAD, S. W. Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. **Brain, behavior, and immunity**, v. 70, p. 61-75, 2018.

DENNING, T. L. *et al.* Mouse TCR CD8 intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 4230-4239, 2007.

DESREUMAUX, P., *et al.* Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimer: a basis for new therapeutic strategies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 7, p. 827-838, 2001.

DHARAKUL, T. *et al.* Immunization with baculovirus-expressed recombinant rotavirus proteins VP1, VP4, VP6, and VP7 induces CD8⁺ T lymphocytes that mediate clearance of chronic rotavirus infection in SCID mice. **Journal of virology**, v. 65, n. 11, p. 5928-5932, 1991.

DHINAUT, J. *et al.* A dietary carotenoid reduces immunopathology and enhances longevity through an immune depressive effect in an insect model. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12429, 2017.

DIELEMAN, L. A. Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Occurs in Severe Combined Immunodeficient Mice. **Gastroenterology**, v. 107, p. 1649-1662, 1994.

DO, J. S., *et al.* Colitogenic effector T cells: roles of gut-homing integrin, gut antigen specificity and $\gamma\delta$ T cells. **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 1, p. 90-98, 2014.

DO, J.; WOO, J. From gut to brain: alteration in inflammation markers in the brain of dextran sodium sulfate-induced colitis model mice. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 422, 2018.

DUBUQUOY, L., *et al.* PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 55, n. 9, p. 1341-1349, 2006.

DUVICK, J. P. *et al.* Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 26, p. 18814-18820, 1992.

EKBOM, A. *et al.* Survival and Causes of Death in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Population- Based Study. **Gastroenterology**, v. 103, p. 954-960, 1992.

EPPLE, H. J. *et al.* Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1289-1300. e2, 2010.

ERICKSON, N. A. *et al.* Role of goblet cell protein CLCA1 in murine DSS colitis. **Journal of Inflammation**, v. 13, n. 1, p. 5, 2016.

ESPOSITO, S.; LELII, M. Vitamin D and respiratory tract infections in childhood. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 487, 2015.

FAN, J., *et al.* Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. **Clinical nutrition**, v. 29, n. 1, p. 124-130, 2010.

FARIA, A. M. C.; REIS, B. S.; MUCIDA, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20162014, 2017.

FAURE, M. *et al.* Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1558-1564, 2006.

FINUCANE, O. M. *et al.* Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2116-2128, 2015.

FRANSEN, F. *et al.* BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 527-540, 2015.

FRITSCHKE, K. L. *et al.* Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Science**, v. 92, n. 1, p. 95-101, 1997.

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

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

FURTADO, G. C. *et al.* Interleukin 2 signaling is required for CD4+ regulatory T cell function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 6, p. 851-857, 2002.

GAFFEN, S. L., LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109-123, 2004.

GAJENDRAN, M. *et al.* A comprehensive review and update on ulcerative colitis. **Disease-a-Month**, 2019.

GAO, *et al.* Indirubin ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice through the inhibition of inflammation and the induction of Foxp3-expressing regulatory T cells. **Acta Histochemica**, 2016.

GARCIA, A. L. *et al.* Retinoid-and carotenoid-enriched diets influence the ontogenesis of the immune system in mice. **Immunology**, v. 110, n. 2, p. 180-187, 2003.

GARRETT, W. S., *et al.* Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 3, p. 292-300, 2010.

GHODRATIZADEH, S. *et al.* Effect of carotenoid β -cryptoxanthin on cellular and humoral immune response in rabbit. **Veterinary research communications**, v. 38, n. 1, p. 59-62, 2014.

GONG, Y., *et al.* Aggravated mucosal and immune damage in a mouse model of ulcerative colitis with stress. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 17, n. 3, p. 2341-2348, 2019.

GORJÃO, Renata, *et al.* Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. Cell Biochemistry and Function: **Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 25, n. 3, p. 305-315, 2007.

GORZYNIK-DEBICKA, M. *et al.* Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 686, 2018.

GRÜBER, C. *et al.* Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 4, p. 791-797, 2010.

GRUDZINSKI, Wojciech *et al.* Localization and Orientation of Xanthophylls in a Lipid Bilayer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9619, 2017.

GRUSZECKI, W. I.; STRZAŁKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 108-115, 2005.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives Toxicological**, v. 86, p. 345–391, 2012.

HADIS, U. *et al.* Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 237-246, 2011.

HALSTENSEN, T. S.; DAS, K. M.; BRANDTZAEG, P. Epithelial deposits of immunoglobulin G1 and activated complement colocalise with the Mr 40 kD putative autoantigen in ulcerative colitis. **Gut**, v. 34, p. 650-657, 1993.

HARARI, A. *et al.* A 9-cis β -carotene-enriched diet inhibits atherogenesis and fatty liver formation in LDL receptor knockout mice. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 1923-1930, 2008.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes & Development**, v. 25, p. 1895–1908, 2011.

HARRIS, S. G.; PHIPPS, R. P. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. **European journal of immunology**, v. 31, n. 4, p. 1098-1105, 2001.

HARRISON, O. J.; POWRIE, F. M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance in the Intestine. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, p. 1-17, 2013.

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

HATA, K., *et al.* IL-17 stimulates inflammatory responses via NF- κ B and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 282, n. 6, p. G1035-G1044, 2002.

HEIMERL, S., *et al.* Alterations in intestinal fatty acid metabolism in inflammatory bowel disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1762, n. 3, p. 341-350, 2006.

HEMILÄ, H. Vitamin C and infections. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 339, 2017.

HEMSHEKHAR, M. *et al.* A dietary colorant crocin mitigates arthritis and associated secondary complications by modulating cartilage deteriorating enzymes, inflammatory mediators and antioxidant status. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2723-2733, 2012.

HIPP, N., *et al.* IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1443, 2017.

HIROI, T., *et al.* Polarized Th2 cytokine expression by both mucosal $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells. **European journal of immunology**, v. 25, n. 10, p. 2743-2751, 1995.

HIROTA, K. *et al.* Plasticity of T H 17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. **Nature immunology**, v. 14, n. 4, p. 372, 2013.

HORTON, K. M.; CORL, F. M.; FISHMAN, E. K. CT evaluation of the colon: inflammatory disease. **Radiographics**, v. 20, n. 2, p. 399-418, 2000.

HOU, Y.C., *et al.* Glutamine supplementation attenuates expressions of adhesion molecules and chemokine receptors on T cells in a murine model of acute colitis. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

HU, S., *et al.* Dietary fat, but not protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice. **Cell metabolism**, v. 28, n. 3, p. 415-431, 2018.

HUANG, Y. *et al.* Mucosal memory CD8+ T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. **Nature immunology**, v. 12, n. 11, p. 1086, 2011.

HUIBREGTSE, I. L.; VAN LENT, A. U.; VAN DEVENTER, S. J. H. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? **Gut**, v. 56, p.584–592, 2007.

INOUE, T. *et al.* Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of cardiology**, v. 52, n. 2, p. 127-132, 2008.

ISSAZADEH-NAVIKAS, S.; TEIMER, R.; BOCKERMANN, R. Influence of dietary components on regulatory T cells. **Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 95, 2012.

IWATA, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527-538, 2004.

IZUMI-NAGAI, K., *et al.* Inhibition of choroidal neovascularization with an anti-inflammatory carotenoid astaxanthin. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 49, n. 4, p. 1679-1685, 2008.

JACKSON, S. M., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 19, n. 9, p. 2094-2104, 1999.

JANSSEN, E. M., *et al.* CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 88, 2005.

JEFFERY, N. M., *et al.* Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 805-823, 1997.

JESS, T. *et al.* Overall and Cause-Specific Mortality in Ulcerative Colitis: Meta-analysis of Population-Based Inception Cohort Studies. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, p. 609-617, 2007.

JEURINK, P. V. *et al.* Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 98, n. 2, p. 572S-577S, 2013.

JOHANSSON, M. E. V. *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.

JOHNSON, Q. R. *et al.* Effects of carotenoids on lipid bilayers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 3795-3804, 2018.

JOHNSON, Z. *et al.* Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. **TRENDS in Immunology**, v. 26, n.5, 2005.

KAMADA, N. *et al.* Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 6, p. 2269-2280, 2008.

KANG *et al.* Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. **British Journal of Pharmacology** v. 128, 380 \pm 384, 1999.

KANWAR, S. S. *et al.* Direct and antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Giardia lamblia* by splenic and intestinal lymphoid cells in mice. **Gut**, v. 27, n. 1, p. 73-77, 1986.

KAU, A. L. *et al.* Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327, 2011.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition research**, v. 34, p. 907 – 929, 2014.

KAWAMOTO, S. *et al.* Foxp3+ T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 152-165, 2014.

KAWAMOTO, S. *et al.* The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 485-489, 2012.

KHAN, S. U. *et al.* Honey: Single foodstuff comprises many drugs. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.

KIEN, C. L. *et al.* Lipidomic evidence that lowering the typical dietary palmitate to oleate ratio in humans decreases the leukocyte production of pro-inflammatory cytokines and muscle expression of redox-sensitive genes. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1599–1606, 2015.

KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 1, n. 2, p. 154-170, 2015.

KIM, D. H. *et al.* Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 488, n. 3, p. 477-482, 2017.

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. 416-419, 2011.

KIRWAN, A. M. *et al.* Nutritional modulation of metabolic inflammation. **Biochemical Society Transactions**, p. BST20160465, 2017.

KLONOWSKI, K. D. *et al.* Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 551-562, 2004.

KLOSE, C. S. N. *et al.* The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection and controls CD8 $\alpha\alpha$ + intraepithelial lymphocyte development. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 230-243, 2014.

KLOTZ, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 2, p. 67–76, 2009.

KOCH, M. A. *et al.* Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 827-841, 2016.

KOJOUHAROFF, G. *et al.* Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 107, n. 2, p. 353-358, 1997.

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D. B. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, practice parameters committee. **American Journal of Gastroenterology**, 2004.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. **Journal of Internal Medicine**, v. 208, n. 1-6, p. 401-406, 1980.

KÜHL, A. A., *et al.* Role of gamma delta T cells in inflammatory bowel disease. **Pathobiology**, v. 70, n. 3, p. 150-155, 2002.

KUMAR, K., *et al.* Embelin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 724-731, 2011.

KWOK, S. K., *et al.* Retinoic acid attenuates rheumatoid inflammation in mice. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 1062-1071, 2012.

LAHAR, N., *et al.* Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26898, 2011.

LAIDLAW, B. J.; CRAFT, J. E.; KAECH, S. M. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 102, 2016.

LANGHOLZ, E. *et al.* Colorectal Cancer Risk and Mortality in Patients With Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, v.103, p.1444-1451, 1992.

LAROUI, H. *et al.* Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012.

LEITE, G. *et al.* Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v. 1, n. 1, p. 54, 2009.

LEITE-LEGATTI, A. V. *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LENZEN, H., *et al.* Restoration of mucosal integrity and epithelial transport function by concomitant anti-TNF α treatment in chronic DSS-induced colitis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 8, p. 831-843, 2018.

LEPAGE, A. C. *et al.* Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 9, p. 4902-4908, 1998.

LI, Y. *et al.* Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 629-640, 2011.

LI, Z. *et al.* Hass avocado modulates postprandial vascular reactivity and postprandial inflammatory responses to a hamburger meal in healthy volunteers. **Food & function**, v. 4, n. 3, p. 384-391, 2013.

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LINNEWIEL-HERMONI, K. *et al.* Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. 105-120, 2014.

LIU, T. C.; STAPPENBECK, T. S. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 127-148, 2016.

LODOLCE, J. P. *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. **Immunity**, v. 9, n. 5, p. 669-676, 1998.

MAIANI, G. *et al.* Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 194–218, 2009.

MALEK, Thomas R. The biology of interleukin-2. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 453-479, 2008.

MALIK, T. A. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology, and risk factors. **Surgical Clinics**, v. 95, n. 6, p. 1105-1122, 2015.

MALOY, K. J.; POWRIE, F.. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298, 2011.

MANDL, J. N. *et al.* Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4+ and CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p. 18036-18041, 2012.

MANZANILLO, P; EIDENSCHENK, C; OUYANG, W. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. **Trends in immunology**, v. 36, n. 8, p. 471-478, 2015.

MAZZINI, E. *et al.* Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1+ macrophages to CD103+ dendritic cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 248-261, 2014.

MARTINO, H. S. D., *et al.* Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (Euterpe oleracea Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. **Journal of functional foods**, v. 23, p. 432-443, 2016.

MASSOT-CLADERA, M. *et al.* Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 12, p. 1944-1954, 2014.

MAUL *et al.* Peripheral and Intestinal Regulatory CD4-CD25 high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 128, p.1868–1878, 2005.

MCDONALD, B. D.; JABRI, B.; BENDELAC, A. Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 514-525, 2018, 1.

MCGEACHY, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T H-17 cell-mediated pathology. **Nature immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428, 2008.

MEI, S. *et al.* Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 2, p. 487-498, 2011.

MENEZES, J. S. *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.

MENGEL, J. *et al.* Anti- $\gamma\delta$ T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. **Immunology letters**, v. 48, n. 2, p. 97-102, 1995.

MIDDEL, P. *et al.* Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 220-227, 2006.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Genetic polymorphisms influence runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. **Genes & nutrition**, v. 6, n. 4, p. 369, 2011.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1161-1176, 2014.

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition research**, v. 29, n. 12, p. 850-858, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RIBEIRO, I. F.; GRISOLIA, C. K. Association between interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil: a before-after study. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 554-566, 2016.

MIYAZATO, S., *et al.* Continuous intake of resistant maltodextrin enhanced intestinal immune response through changes in the intestinal environment in mice. **Bioscience of microbiota, food and health**, v. 35, n. 1, p. 1-7, 2016.

MOCELLIN, S., *et al.* The dual role of IL-10. **Trends in immunology**, v. 24, n. 1, p. 36-43, 2003.

MONK, J. M. *et al.* Immunomodulatory action of dietary fish oil and targeted deletion of intestinal epithelial cell PPAR δ in inflammation-induced colon carcinogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 1, p. G153-G167, 2011.

MONTONEN, J. *et al.* Dietary Antioxidant Intake and Risk of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 362–366, 2004.

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

MORENO, L. G. *et al.* Caryocar brasiliense fruit intake ameliorates hepatic fat deposition and improves intestinal structure of rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 37, p. 640-648, 2016.

MOTA-SANTOS, T. *et al.* Divergency in the specificity of the induction and maintenance of neonatal suppression. **European journal of immunology**, v. 20, n. 8, p. 1717-1721, 1990.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667, 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.

MUCIDA, D. *et al.* Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II–restricted cytotoxic T lymphocytes. **Nature immunology**, v. 14, n. 3, p. 281, 2013.

MUNYAKA, P. M., *et al.* Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 9, p. 986-998, 2016.

MURPHY, A. M. *et al.* Interactions between differential fatty acids and inflammatory stressors—impact on metabolic health. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 92, p. 49-55, 2015.

MURTHY, S. N. S. *et al.* Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. **Digestive diseases and sciences**, v. 38, n. 9, p. 1722-1734, 1993.

NAKAMURA, Y., *et al.* Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 137, n. 1, p. 52-58, 2004.

NANCEY, S. *et al.* CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. **Gastroenterology**, v. 131, n. 2, p. 485-496, 2006.

NEURATH, M. F. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1281- 1290, 1995.

NEURATH, M. F. *et al.* Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. **European journal of immunology**, v. 27, n. 7, p.1743-1750, 1997.

NEURATH, M. F. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. **Nature Medicine**, v. 2, n. 9, p.998-1004, 1996.

NI, Y. *et al.* Novel action of carotenoids on non-alcoholic fatty liver disease: macrophage polarization and liver homeostasis. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 391, 2016.

NISHIDA, T., *et al.* Increased arachidonic acid composition of phospholipids in colonic mucosa from patients with active ulcerative colitis. **Gut**, v. 28, n. 8, p. 1002-1007, 1987.

OKAYASU, *et al.* A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. **Gastroenterology**, v. 98, p. 694-702, 1990.

OLIVEIRA, L. G. *et al.* Caryocar brasiliense oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 37, 2017.

OLIVEIRA, L. M. D. *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effect of butanolic fraction from Caryocar brasiliense Camb. leaves in rat thoracic aorta. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

OLIVEIRA, M. N. S. *et al.* Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28p. 380-6, 2006.

OLMEDILLA, B. A. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 227-238, 2001.

OLSZYNA, D. P., *et al.* Interleukin 10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 2, p. 613-620, 2000.

OMENN, G. S. *et al.* Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. JNCI: **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 21, p. 1550-1559, 1996.

OUELLETTE, A. J. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 405-419, 2004.

OWEN, R. W. *et al.* Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. **Food Chemical Toxicology**, v. 38, p. 647-659, 2000.

PACHECO, Y. M. *et al.* Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. **British journal of nutrition**, v. 98, n. 2, p. 260-263, 2007.

PALMEIRA, S. M. *et al.* Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299-305, 2015.

PARK, S. G., *et al.* T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing $\gamma\delta$ T cells. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 791-803, 2010.

PASSOS, M. E. P. *et al.* Differential effects of palmitoleic acid on human lymphocyte proliferation and function. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 217, 2016.

PATTERSON, E. *et al.* Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1905-1917, 2014.

PAUL, K. P. *et al.* Influence of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the resistance to experimental tuberculosis. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 46, n. 6, p. 619-624, 1997.

PAUL, S.; SHILPI LAL, G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 97, n. 2, p. 259-271, 2015.

PERCIVAL, S. S.; BUKOWSKI, J. F.; MILNER, J. Bioactive food components that enhance $\gamma\delta$ T cell function may play a role in cancer prevention. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 1, p. 1-4, 2008.

PEREIRA, M. A. *et al.* Poly (anhydride) nanoparticles containing cashew nut proteins can induce a strong Th1 and Treg immune response after oral administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, p. 51-60, 2018.

PEREIRA, P. *et al.* Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. **European journal of immunology**, v. 16, n. 6, p. 685-688, 1986.

PIANOVSKI, A. R. *et al.* Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

PITUCH-ZDANOWSKA, A; BANASZKIEWICZ, A; ALBRECHT, P. The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. **Przegląd gastroenterologiczny**, v. 10, n. 3, p. 135, 2015.

PLEVY, S. *et al.* Combined serological, genetic, and inflammatory markers differentiate non-IBD, Crohn's disease, and ulcerative colitis patients. **Inflammatory bowel diseases**, v. 19, n. 6, p. 1139-1148, 2013.

- PLEVY, S. E.; TARGAN, S. R. Future Therapeutic Approaches for Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1838–1846, 2011.
- POLAVARAPU, S.; DWARAKANATH, B. S.; DAS, U. N. Arachidonic acid activates extrinsic apoptotic pathway to enhance tumoricidal action of bleomycin against IMR-32 cells. Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 132, p. 16-22, 2018.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- RABBI, M. F., *et al.* Catestatin decreases macrophage function in two mouse models of experimental colitis. **Biochemical pharmacology**, v. 89, n. 3, p. 386-398, 2014.
- RAMIRO-PUIG, E. *et al.* Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 555-565, 2008.
- RESZCZYNSKA, E. *et al.* Carotenoid binding to proteins: Modeling pigment transport to lipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 584, p. 125e133, 2015.
- REYES-QUIROZ, M. E., *et al.* Oleic acid modulates mRNA expression of liver X receptor (LXR) and its target genes ABCA1 and SREBP1c in human neutrophils. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 8, p. 1707-1717, 2014.
- RIMOLDI, M. *et al.* Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. **Nature immunology**, v. 6, n. 5, p. 507, 2005.
- RISO, P. *et al.* Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2563-2566, 2006.
- ROBERTS, A. I. *et al.* Spontaneous cytotoxicity of intestinal intraepithelial lymphocytes: clues to the mechanism. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, n. 3, p. 527-532, 1993.
- ROBINSON, D. R. *et al.* Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 β gene transcription. **Lipids**, v. 31, n. 1, p. S23-S31, 1996.
- ROCHA, B.; VASSALLI, P.; GUY-GRAND, D. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta+ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 2, p. 483-486, 1991.
- ROCHA, D. M. U. P. *et al.* Orange juice modulates proinflammatory cytokines after high-fat saturated meal consumption. **Food & function**, v. 8, n. 12, p. 4396-4403, 2017.
- RODRIGUES, H. G., *et al.* Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. **Lipids**, v. 45, n. 9, p. 809-819, 2010.

RODRIGUES, H. G., *et al.* Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 50-58, 2016.

RODRIGUES, L. J. *et al.* Caracterização do desenvolvimento de pequi (*Caryocar brasiliense*) temporão do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 3, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: **Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2008.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 711-717, 2008.

ROGNUM, T. O., *et al.* Immunohistochemical evaluation of carcinoembryonic antigen, secretory component, and epithelial IgA in ulcerative colitis with dysplasia. **Gut**, v. 23, n. 2, p. 123-133, 1982.

ROSILLO, M. A.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M. An update of dietary phenolic compounds in prevention and management of rheumatoid arthritis. **Food e Function**, p. 1-53, 2016.

ROSS M. H.; PAWLINA, W. *Histología Texto y Atlas: Correlación con biología celular y molecular*. **Wolters Kluwer**, 7ª ed., 2016.

ROSSI, M; YOUNG, J. W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 3, p. 1373-1381, 2005.

RUBIN, L. P. A. *et al.* Metabolic Effects of Inflammation on Vitamin A and Carotenoids in Humans and Animal Models. **American Society for Nutrition. Advances in Nutrition**, v. 8, p. 197–212, 2017.

RUBTSOV, Y. P., *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. **Immunity**, v. 28., n. 4, p. 546-558, 2008.

RUTISHAUSER, R. L., *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8+ T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 296-308, 2009.

SALES-CAMPOS, H. *et al.* An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, L, E.; SALMINEN, Z. E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Kluwer Academic Publisher**, v. 70, p. 347-358, 1996.

SANDERS, T. A. B. *et al.* Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1433-1441, 2011.

SANTOS, E. C. Efeitos da ingestão do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) na colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos. Trabalho de conclusão de Curso. Acervo UFVJM, 2018.

SCHOUTEN, B. *et al.* Oligosaccharide induced whey-specific CD25+ regulatory T-cells are crucial in the suppression of cow's milk allergy in mice. **Cow's milk allergy**, p. 119, 2009.

SEO, G. Y. *et al.* Mechanism underlying the suppressor activity of retinoic acid on IL4-induced IgE synthesis and its physiological implication. **Cellular immunology**, v. 322, p. 49-55, 2017.

SERIZAWA, H., *et al.* Reversal of altered intestinal mucosal immunity in rats fed elemental diet by supplementation of oleic acid. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 11, n. 9, p. 811-818, 1996.

SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.48, p. 609, 2001.

SHENG, Y. H., *et al.* Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, n. 1, p. 28-38, 2012.

SHIRES, J.; THEODORIDIS, E.; HAYDAY, A. C. Biological insights into TCR $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). **Immunity**, v. 15, n. 3, p. 419-434, 2001.

SILVERBERG, M. S. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 29, s. A, p.5A-36A, 2005.

SIMÕES, C. D. *et al.* Habitual Dietary Intake Is Associated with Stool Microbiota Composition in Monozygotic Twins1–3. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 4, p. 417-423, 2013.

SIRACUSA, F. *et al.* Maintenance of CD8+ memory T lymphocytes in the spleen but not in the bone marrow is dependent on proliferation. **European journal of immunology**, v. 47, n. 11, p. 1900-1905, 2017.

SOLEM, C. A., *et al.* Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 11, n. 8, p. 707-712, 2005.

SORCI, G.; FAIVRE, B. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 71-83, 2009.

SOUZA, B. M. *et al.* Lactococcus lactis carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 150, 2016.

SPROSTON, N. R., ASHWORTH, J. J. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

SUGIMOTO, K. *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 2, p. 534-544, 2008.

SUJINO, T. *et al.* Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4+ T cells controls gut inflammation. **Science**, v. 352, n. 6293, p. 1581-1586, 2016.

SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; SPARKS, N. H. C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. **The Journal of Poultry Science**, v. 38, n. 1, p. 1-27, 2001.

SUZUKI, K. *et al.* Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 1981-1986, 2004.

SUZUKI, K. *et al.* The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. **Immunity**, v. 33, n. 1, p. 71-83, 2010.

TADAYON, S. *et al.* Clever-1 contributes to lymphocyte entry into the spleen via the red pulp. **Science Immunology**, v. 4, n. 33, p. 0297, 2019.

TAKAYANAGI *et al.* Norepinephrine suppresses IFN- γ and TNF- α production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes via the β 1 adrenoceptor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 245, p. 66-74, 2012.

TANAKA, T. *et al.* A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer science**, v. 94, n. 11, p. 965-973, 2003.

TARGAN, S. R.; KARP, L. C. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. **Immunological reviews**, v. 206, n. 1, p. 296-305, 2005.

TEIXEIRA, T. N, *et al.* Caryocar brasiliense pulp increases serum HDL and reduces hepatic lipid accumulation in rats fed a high fat diet. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n. 15, p. 963-969, 2013.

TEN HOVE, T., *et al.* Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF- α production in mice. **Gastroenterology**, v. 121, n. 6, p. 1372-1379, 2001.

TIAN, H. *et al.* Apricot Kernel Oil Ameliorates Cyclophosphamide-Associated Immunosuppression in Rats. **Lipids AOCs** 2016.

TORRES, L. R. *et al.* Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 205-216, 2016.

TRAESEL, G. K. *et al.* Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from Caryocar brasiliense Cambess pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 74-82, 2017.

TRINCHESE, G. *et al.* Human milk and donkey milk, compared to cow milk, reduce inflammatory mediators and modulate glucose and lipid metabolism, acting on mitochondrial function and oleyl ethanolamide levels in rat skeletal muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 32, 2018.

TRUELOVE, S. C.; WITTS, L. J. Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. **British Medical Journal**, v. 29, p. 1041-1048, 1955.

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

VAN DIJK, S. J. *et al.* Consumption of a High Monounsaturated Fat Diet Reduces Oxidative Phosphorylation Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Abdominally Overweight Men and Women—4. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 7, p. 1219-1225, 2012.

VAN HELDEN, Y. G. J. *et al.* Organ specificity of beta-carotene induced lung gene-expression changes in *Bcm1*^{-/-} mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 2, p. 307-319, 2013.

VAN, Y. H. *et al.* All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon- γ -producing T-cells without affecting Th17 cells. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 146-155, 2009.

VELDHOEN, M.; BRUCKLACHER-WALDERT, V. Dietary influences on intestinal immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 10, p. 696, 2012.

VOS, A. P. *et al.* Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 12, p. 1582-1587, 2007.

WALLACE, K. L., *et al.* Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 1, p. 6, 2014.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 2009.

WANG, T. *et al.* Interleukin (IL)-2 is a key regulator of T Helper 1 and T Helper 2 cytokine expression in fish: functional characterization of two divergent IL2 paralogs in Salmonids. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D. Interplay between the T H 17 and T Reg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 12, p. 883, 2009.

WENDLAND, B. E. *et al.* Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 2, p. 259-264, 2001.

WEN, Z.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis?. **Journal of Immunology Research**, v. 11, n. 3-4, p. 195-204, 2004.

WIRTH, J. P. *et al.* Predictors of anemia in women of reproductive age: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American journal of clinical nutrition**, v. 106, n. suppl_1, p. 416S-427S, 2017.

WIRTZ, S. *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, 2007.

WU, C. H.; HUANG, T. C.; LIN, B. F. Folate deficiency affects dendritic cell function and subsequent T helper cell differentiation. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 41, p. 65-72, 2017.

WU, H. *et al.* Oleate but not stearate induces the regulatory phenotype of myeloid suppressor cells. **Scientific reports**, v. 7., n. 1, p. 7498, 2017.

WU, Y. *et al.* Route and type of nutrition influence IgA-mediating intestinal cytokines. **Annals of surgery**, v. 229, n. 5, p. 662, 1999.

XU, X. *et al.* Dietary intake of vitamins A, C, and E and the risk of colorectal adenoma: a meta-analysis of observational studies. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 6, p. 529-539, 2013a.

XU, X. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells promote B-cell production of IgA in a TNFR2-dependent manner. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 7, p. 597, 2017.

XU, X. R. *et al.* Effects of lutein supplement on serum inflammatory cytokines ApoE and lipids profiles in early atherosclerosis population. **Journal of Atherosclerosis and thrombosis**, v. 20, n. 2, p. 170-177, 2013b.

YANG, H. *et al.* Interferon-gamma expression by intraepithelial lymphocytes results in a loss of epithelial barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. **Annals of surgery**, v. 236, n. 2, p. 226, 2002.

YANG, Z. H., *et al.* Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-A y mice. **Nutrition & metabolism**, v 10, n. 1, p. 16, 2013.

YAQOOB, P. Monounsaturated fats and immune function. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 4, p. 453-465, 1998.

YAQOOB, P. Monounsaturated fatty acids and immune function. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 3, p. 9, 2002.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A CALDER, P. C. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. **Immunology Letters**, v. 41 241-247, 1994b.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1255, n. 3, p. 333-340, 1995.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. **Immunology**, v. 82, n. 4, p. 603, 1994a.

YEGANEH, P. R. *et al.* Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 57, p. 56-66, 2018.

YEH, P. T. *et al.* Astaxanthin inhibits expression of retinal oxidative stress and inflammatory mediators in streptozotocin-induced diabetic rats. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146438, 2016.

YOKOTA-NAKATSUMA, A. Retinoic Acid Prevents Dendritic Cells from Inducing Novel Inflammatory T Cells That Produce Abundant Interleukin-13. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 137, n. 12, p. 1491-1496, 2017.

YOUNG, D., *et al.* Soy-derived di-and tripeptides alleviate colon and ileum inflammation in pigs with dextran sodium sulfate-induced colitis. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 2, p. 363-368, 2012.

YU, S. *et al.* Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20834-20839, 2008.

ZHOU, X. *et al.* Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice. **Physiology & behavior**, v. 151, p. 412-420, 2015.