



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MODULAÇÃO DO RETINOL NA LESÃO DA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium*
difficile EM CULTURAS DE CÉLULAS INTESTINAIS**

ANDRÊSSA ABY FARAJ LINHARES MACIEL

**Fortaleza-Ceará
2007**

ANDRÊSSA ABY FARAJ LINHARES MACIEL

**MODULAÇÃO DO RETINOL NA LESÃO DA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium*
difficile em CULTURAS DE CÉLULAS INTESTINAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

**Fortaleza-Ceará
2007**

M138m Maciel, Andrêssa Aby Faraj Linhares
Modulação do retinol na lesão da barreira morfofuncional induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em culturas de células intestinais/ Andrêssa Aby Faraj Linhares Maciel. 2007.
238 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2007.

1. Vitamina A. 2. *Clostridium difficile*. 3. Toxina A. 4. Impedância Elétrica. 5. Proliferação de Células. 6. Migração. 7. Apoptose. 8. Necrose. I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (Orient.). II. Título.

CDD 615.73

ANDRÊSSA ABY FARAJ LINHARES MACIEL

**MODULAÇÃO DO RETINOL NA LESÃO DA BARREIRA
MORFOFUNCIONAL INDUZIDA PELA TOXINA A DO *Clostridium*
difficile EM CULTURAS DE CÉLULAS INTESTINAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Data da Aprovação: 27/07/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará-UFC

*Ao meu esposo
Leonardo
Dedico esta dissertação
Com todo meu Amor e gratidão*

Relógio do coração

Há tempos em nossa vida que contam de forma diferente.

Há semanas que duraram anos, como há anos que não contaram um dia.

Há paixões que foram eternas, como há amigos que passaram céleres, apesar do calendário nos mostrar que ficaram por anos em nossas agendas.

Há amores não realizados que deixaram olhares de meses, e beijos não dados que até hoje esperam o desfecho.

Há trabalhos que nos tomaram décadas de nosso tempo na Terra, mas que nossa memória insiste em contá-los como semanas.

E há casamentos que, ao olhar para trás, mal preenchem os feriados da folhinha.

Há tristezas que nos paralisaram por meses, mas que hoje, passados os dias difíceis, mal guardamos lembrança de horas.

Há eventos que marcaram, e que duram para sempre – o dia do nosso casamento, o nascimento do filho, a morte da avó, a viagem inesquecível, o êxtase do sonho realizado. Estes têm a duração que nos ensina o significado da palavra "eternidade".

Já viajei para a mesma cidade uma centena de vezes, e na maioria das vezes o tempo transcorrido foi o mesmo. Mas conforme meu espírito, houve viagem que não teve fim até hoje, como há percurso que nem me lembro de ter feito, tão feliz estava eu na ocasião.

O relógio do coração - hoje descubro - bate noutra frequência daquele que carrego no pulso. Marca um tempo diferente, de emoções que perduram e que mostram o verdadeiro tempo da gente.

Por este relógio, velhice é coisa de quem não conseguiu esticar o tempo que temos no mundo. É olhar as rugas e não perceber a maturidade. É pensar antes naquilo que não foi feito, ao invés de se alegrar e sorrir com as lembranças da vida.

Pense nisso. E consulte sempre o relógio do coração: ele lhe mostrará o verdadeiro tempo do mundo.

Adaptado de Gino_AFRF2006

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelos caminhos da vida, atenuar meus medos, me fazer perseverar diante das dificuldades e confiar que em Seu amor tudo se torna possível.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, gostaria de expressar meu profundo reconhecimento pela sua contribuição decisiva para a minha formação acadêmica e científica, pelo estímulo intelectual, pela pessoa de extrema fé no coração, por toda confiança em mim depositada, pela orientação dia-a-dia que recebi ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho, por todas as oportunidades oferecidas durante os anos de orientação, as quais jamais serão esquecidas no decorrer da minha caminhada, pelo apoio e incentivo que sempre garantiu, e finalmente pelas valiosas sugestões e críticas que permitiram a realização desta dissertação. Como sempre diz: "... o tempo não pára...", seguirei sempre suas orientações mesmo que não esteja por mais perto.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, por ser exemplo profissional e pessoal, pela amizade, co-orientação, colaboração, participação, pelas inúmeras sugestões, e aconselhamentos, pela ajuda em todos os momentos da execução e elaboração deste trabalho. E a sua esposa, Mônica, sempre sua eterna companheira e profissional impecável, gostaria de deixar meu agradecimento.

À Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, sempre ajudando e colaborando com a Pós-graduação em Farmacologia, por prontamente aceitar o convite para compor a banca.

Ao Manuel Braga Neto, meu fiel amigo de todas as horas, lembrarei sempre da sua alegria e amizade, pela ajuda incondicional, meu agradecimento especial.

À Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pela pessoa amável e disponível sempre, pela colaboração e auxílio durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Richard L. Guerrant, pela pessoa simples e amiga, pela colaboração internacional e sugestões na execução desta dissertação.

A todos que compõe a Unidade de Pesquisas Clínicas, por me acolher nesta família e por toda ajuda dada a mim nesta jornada.

À Leah J Barrett, pela pessoa sempre alegre e simpática, e Maria do Carmo Pinto, excelente profissional, por toda ajuda técnica e com todos os materiais necessários para a realização deste trabalho.

A todos os colegas, professores e funcionários, em especial à Aura Rhanes Farias Nogueira Yida, da Pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, minha perene gratidão.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, UMA ETAPA ESPECIAL DA MINHA VIDA, especialmente aos integrantes do grupo "Pietà", Neto, Andréa, Manuel, Sandra, Carol, Jamilyli, João, Ibraim, Bruna BB, Bruninha, Bruna Oliveira, Rodrigo, Ila, Eunice, Herene, com quem compartilhei momentos de extrema alegria, inesquecíveis.

À minha grande amiga Carol, pela sua amizade nestes anos todos, por sua ajuda extremamente importante no desfecho deste trabalho, por saber que LUTAREMOS SEMPRE pelos nossos objetivos em nossas vidas, meu eterno agradecimento.

Às minhas amigas distantes dos olhos, mas perto do coração, Sandra e Fernanda, por saber que mesmo longe sempre torceram por minhas conquistas e lembraram de mim em suas preces.

Aos meus pais, Sérgio e Ikram, por todo amor e por fazerem de mim o que sou hoje.

Às minhas queridas irmãs, Sâmya e Monick, elo inseparável, todo o meu amor, carinho, amizade, consideração e reconhecimento, por serem pessoas imprescindíveis, insubstituíveis em minha vida e por estarem sempre ao meu lado, incentivando e transmitindo palavras de carinho.

Aos meus avós, Hiran e Erondina, pessoas especiais em minha vida, pelas lições de vida, apoio e profunda admiração.

Aos meus sogros, Arilo e Eliane, palavras faltam para retribuir todo o apoio.

Ao meu ESPOSO, Leonnardo Cirilo Sampaio Maciel, símbolo de luta e perseverança na vida, dedico essa dissertação. Ao seu lado aprendi a não ter medo de ser feliz e sempre ir à busca dos SONHOS, e hoje sofro por não está perto de você, mas Deus tranqüiliza meu coração me fazendo aceitar e amar, pois sei que logo estarei ao seu lado. Agradeço pelo carinho e apoio incondicional, pela paciência, pela compreensão nas horas de ausência, pelo incentivo em todos os momentos, e principalmente por me fazer acreditar que no final tudo dá certo.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e aos órgãos financiadores que disponibilizaram realização desta pesquisa.

À colaboração internacional do Forgarty Internacional Center and Ellison Medical Foundation e aos recursos do HHMI International Infectious Disease Scholarship que deram suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Aspectos gerais da Desnutrição.....	23
1.2	Epitélio gastrointestinal e barreira funcional epitelial.....	25
1.3	Vitamina A.....	30
1.3.1	Nomenclatura, propriedades químicas e fontes dietéticas.....	30
1.3.2	Absorção e Metabolismo da vitamina A.....	35
1.3.3	Aspectos gerais do transporte e distribuição da vitamina A.....	42
1.3.4	Funções da Vitamina A.....	44
1.3.5	Deficiência de vitamina A.....	49
1.4.	Vitamina A e ciclo visual.....	55
1.5	Regulação do ciclo celular pela vitamina A.....	58
1.6	Vitamina A e a morte celular.....	63
1.7	Vitamina A e barreira funcional intestinal.....	67
1.8	Toxicidade e teratogenia da vitamina A.....	72
1.9	<i>Clostridium difficile</i>	76
1.9.1	Abordagem Histórica.....	76
1.9.2	Microbiologia do <i>Clostridium difficile</i>	78
1.9.3	Toxina A e B do <i>Clostridium difficile</i>	81
1.9.4	Mecanismo de Ação das toxinas A e B do <i>C. difficile</i>	87
1.9.5	Receptor de ligação e internalização.....	90
1.9.6	Glicosilação das proteínas Rho.....	90
1.9.7	Estudos in vivo e <i>in vitro</i> das atividades biológicas das Toxinas A e B do <i>C. difficile</i>	92
2	JUSTIFICATIVA	95
3	OBJETIVOS	97
3.1	Objetivo geral.....	97
3.2	Objetivos específicos.....	97
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS	99
4.1	Reagentes.....	100

4.1.1	Toxina A do <i>C. difficile</i>	100
4.1.2	Soluções e drogas.....	100
4.2	Meios de cultura.....	101
4.3	Culturas de células Intestinais.....	103
4.3.1	Câmara de fluxo laminar.....	103
4.3.2	Células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6).....	104
4.3.4	Células do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2).....	107
4.4	Protocolos experimentais.....	110
4.4.1	Preparação das células aderidas.....	110
4.4.2	Contagem das células intestinais em lâmina pela câmara de Neubauer	111
4.4.3	Resistência Elétrica Transepitelial (TER).....	113
4.4.4	Medida funcional da barreira epitelial intestinal utilizando como marcadores de lactulose e manitol <i>in vitro</i>	116
4.4.5	Migração celular em cultura de células intestinais.....	119
4.4.6	Proliferação celular de células intestinais em cultura.....	120
4.4.7	Medição da apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	122
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	127
5.	RESULTADOS.....	128
5.1	Efeito da Toxina A (TxA) do <i>Clostridium difficile</i> em cultura de células intestinais	129
5.1.1	Efeito da TxA na resistência elétrica transepitelial (TER): análise de dose, tempo e efeito	129
5.1.2	Efeito da TxA do <i>C. difficile</i> na proliferação celular	131
5.1.3	Efeito da TxA do <i>C. difficile</i> na migração celular	132
5.1.4.	Efeito da TxA do <i>C. difficile</i> na viabilidade celular pela quantificação da apoptose e necrose analisada por citometria de fluxo	132
5.1.5.	Efeito da TxA do <i>C. difficile</i> na barreira funcional epitelial intestinal das células Caco-2 e a medida de permeabilidade utilizando os marcadores moleculares lactulose (L) e manitol (M)	136
5.2	Função do retinol nas células epiteliais intestinais.....	140

5.2.1	Efeito do retinol na barreira funcional epitelial das células Caco-2 medida pela Resistência Elétrica Transepitelial (TER)	140
5.2.1.1	Em meio de cultura sem glutamina.....	140
5.2.1.2	Em meio de cultura com glutamina.....	143
5.2.2	Efeito do retinol na migração celular em células epiteliais IEC-6	145
5.2.2.1	Em meio de cultura sem glutamina	145
5.2.2.2	Em meio de cultura com glutamina	146
5.2.3	Efeito do Retinol na proliferação celular em células epiteliais IEC-6	147
5.2.3.1	Em meio de cultura sem glutamina	147
5.2.3.2	Em meio de cultura com glutamina.....	148
5.2.4	Efeito do Retinol na apoptose e necrose em células epiteliais IEC-6.....	149
5.3	Modulação do retinol nas alterações da resistência elétrica transepitelial (TER) provocadas pela exposição à TxA do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL) em culturas de células intestinais Caco-2.....	152
5.4	Modulação do retinol nas alterações da proliferação celular induzida pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6	156
5.5	Modulação do retinol nas alterações da migração celular induzida pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,01µg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6	158
5.6	Modulação do retinol na apoptose e necrose induzida pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6	163
6.0	DISCUSSÃO	168
7.0	CONCLUSÕES	181
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184
9.0	ANEXOS	231
9.1	Composição dos Meios de Cultura.....	232
9.2	Fichas experimentais.....	235
9.2.1	Resistência elétrica transepitelial.....	235
9.2.2	Migração celular.....	236
9.2.3	Proliferação celular.....	237
9.2.4	Citometria de Fluxo.....	238

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática das junções firmes e da zona de adesão...	28
Figura 02	Fórmulas estruturais da vitamina A e alguns dos seus metabólitos, e do beta caroteno.....	34
Figura 03	Desenho esquemático das vias metabólicas da Vitamina A.....	38
Figura04	Esquema representativo das principais vias dos transportes dos retinóides no organismo.....	41
Figura 05	Deficiência da vitamina A no mundo.....	51
Figura 06	Papel dos retinóides no ciclo visual.....	57
Figura 07	Regulação das proteínas do ciclo celular pela vitamina A.....	62
Figura 08	Vias de sinalização na apoptose.....	66
Figura 09	Micrografia eletrônica dos bacilos do <i>C. difficile</i>	77
Figura 10	Estrutura molecular das Toxinas A e B do <i>Clostridium difficile</i>	83
Figura 11	Figura esquemática mostrando o <i>locus</i> de patogenicidade (Paloc) do <i>Clostridium difficile</i> e a sua relação com os genes da toxina binária.....	86
Figura 12	Alterações celulares causadas pelas toxinas A e B do <i>C. difficile</i>	88
Figura 13	Esquema representativo da troca de meio de cultura pelo sistema de Opticell.....	105
Figura 14	Morfologia das células da linhagem celular IEC-6 em cultura confluenta.	106
Figura 15	Morfologia das células Caco-2 em cultura confluenta.....	109
Figura 16	Câmara de Neubauer.....	111

Figura 17	Figura esquemática mostrando a monocamada de células Caco-2 semeadas em filtros cobertos por colágeno (<i>transwell</i>).....	114
Figura 18	Ensaio para a medição da resistência elétrica transepitelial.....	115
Figura 19	Figura mostrando o cromatograma dos padrões de referência para os três açúcares, sorbitol, manitol e lactulose.....	118
Figura 20	Figura esquemática demonstrando o modelo de migração em células IEC-6).....	120
Figura 21	Redução do Composto Tetrazólico (WST-1), pelas enzimas mitocondriais a Formazan nas células metabolicamente ativas.....	122
Figura 22	Ensaio da quantificação da apoptose e necrose das células IEC-6 por citometria de fluxo.....	124
Figura 23	Desenho esquemático da ligação da Anexina V marcada com FITC a fosfatidilserina.....	126
Figura 24	Efeito da toxina A do <i>C. difficile</i> (0,1-3µg/mL) na resistência elétrica transepitelial (TER) após a confluência das células Caco2.....	130
Figura 25	Ação da toxina A (TxA) do <i>C. difficile</i> (0,001-3µg/mL) na proliferação das células IEC-6 após 24 e 48 horas de exposição.....	131
Figura 26	Apoptose e necrose induzidas pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,001- 3µg/mL) em 24 horas.....	133
Figura 27	Gráfico em barras representativo da porcentagem de células apoptóticas e necróticas induzidas pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,001- 3µg/mL).....	135

Figura 28	Detecção do fluxo de lactulose e manitol nas células IEC-6 expostas à TxA do <i>C. difficile</i>	137
Figura 29	Percentuais de permeação ao teste lactulose/manitol em monocamadas de células Caco-2 após 24 horas de exposição à TxA do <i>C. difficile</i>	138
Figura 30	Efeito do retinol na barreira funcional epitelial nas células Caco-2 em meio sem glutamina.....	141
Figura 31	Efeito do retinol na barreira funcional epitelial nas células Caco-2 em meio com a presença de glutamina.....	143
Figura 32:	Ação do retinol na migração das células IEC-6 em meio sem glutamina (SG) após 24 horas de incubação.....	145
Figura 33	Ação do retinol na migração das células IEC-6 em meio padrão (MP) após 24 horas de incubação	146
Figura 34	Efeito do retinol na proliferação das células IEC-6 em 24 e 48 horas, em meio sem glutamina (MP).....	147
Figura 35	Efeito do retinol na proliferação das células IEC-6 em 24 e 48 horas, em meio padrão (MP).....	148
Figura 36	Redução na apoptose e necrose das células IEC-6 pela suplementação de diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) em 24 horas.....	150
Figura 37	Efeito do retinol (0,1-100nM) na resistência elétrica transepitelial (TER) após o dano celular causado pela toxina A do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL).....	153
Figura 38	Efeito do retinol na proliferação das células Caco-2 após 3 a 4 horas da lesão induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL).....	155

Figura 39 Efeito do retinol na proliferação celular das células IEC-6 após a lesão induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL).....	157
Figura 40 Modulação do retinol na migração das células IEC-6 após a exposição à toxina A do <i>C. difficile</i> (0,01µg/mL) durante 12 e 24 horas.....	158
Figura 41 Modulação do retinol na migração das células IEC-6 após a exposição à toxina A do <i>C. difficile</i> (0,01µg/mL) durante 12 e 24 horas, com a adição da mitomicina C.....	160
Figura 42 Fotos da migração das células IEC-6 suplementadas com diferentes concentrações de retinol (0,1-100nM) após 24 horas de exposição à toxina A do <i>C. difficile</i> (0,01µg/mL), com (M+) e sem mitomicina (M-).....	164
Figura 43 A indução da apoptose e da necrose pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL) foi inibida pelo retinol em 24 horas de exposição às células IEC-6.....	165
Figura 44 Gráfico em barras representam a porcentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) induzidas pela TxA do <i>C. difficile</i> (0,1µg/mL) com a suplementação do retinol ou não, em 24 horas, quantificados pela citometria de fluxo.....	166

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 Valores de equivalência de compostos de vitamina A.....	33
TABELA 02 Composição do Meio de Cultura para IEC-6.....	102
TABELA 03 Composição do Meio de Cultura para Caco-2.....	102
TABELA 04 Parâmetros de permeabilidade em monocamadas de células Intestinais Caco-2.....	139
TABELA 05 Componentes de DMEM com glutamina.....	232
TABELA 06 Componentes de DMEM com glutamina.....	233

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

%	Percentual
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma/ mililitro
mg/mL	Miligrama/mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
µmol/L	Micromol/L
nM	Nanomolar
Ω	Ohms
ANOVA	Análise de Variância
ARAT	Retinol acetiltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Lactulose
C ₆ H ₁₁ O ₆	Manitol
Ca ²⁺	Cálcio
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CCE	Enzima clivadora de carotenóides
CDK	Ciclina
cdtA	Gene da toxina A
cdtB	Gene da toxina B
CMR	Quilomícrons remanescentes
CM-RE	Quilomícrons de ésteres de retinila
CO ₂	Monóxido de carbono
CRBP	Proteína ligadora ou carreadora do retinol celular
CRBP II	Proteína ligadora ou carreadora de retinol celular II
DALY	Índice de Anos Perdidos por Incapacitação
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DVA	Deficiência de vitamina A

EDTA	Etileno Diamino tetraacetato de sódio diidratado
ELISA	Ensaio imunoenzimático
epm	Erro padrão da média
ERs	Equivalentes de retinol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramma
GMPc	Guanina monofosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HPLC-PAD	Cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsátil
IBGE	Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBIMED	Instituto de Biomedicina
IEC-6	Células intestinais da cripta de ratos normais
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IL-8	Interleucina 8
IOM	Instituto de Medicina
IP	Iodeto de propídio
IUPAC-IUB	União Internacional de Química Pura e Aplicada – União Internacional de Bioquímica
IUs	Unidades internacionais
kDa	Kilodalton
KLF5	Fator de transcrição Krüppel
L/M	Lactulose/ Manitol
LRAT	enzima lecitina:retinol acetiltransferase
Ltda	Companhia limitada
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzido
NIH	Institutos Nacionais de Saúde Americano
OMS	Organização Mundial de Saúde

p	Significância estatística
PBS estéril	Salina fosfatada tamponada estéril
Ph	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PLT	lipases pancreáticas triglicéridicas
PM	Peso molecular
PRLP2	Lipase pancreática ligada à proteína tipo 2
PS	Fosfatidilserina
RALDH	Retinal dehidrogenase
RAR	Receptor do Ácido Retinóico
RBP	Proteína ligadora de retinol
RDH	Retinol desiidrogenase
RE	Ésteres de retinila ou ésteres de retinil
REH	Hidrolases dos ésteres de retinila
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
ROH	Retinol
RoIDH	Retinol desidrogenase
RBP	Proteína ligadora de retinol
RXR	Receptores X dos retinóides
TER	Resistência Elétrica transepitelial
TGI	Trato gastrointestinal
TJ <i>Tight Junctions</i>	Junções firmes
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRO	Terapia de reidratação oral
TTR	transtiretina
TxA	Toxina A do Clostridium difficile
TxB	Toxina B do Clostridium difficile
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
UV	Luz ultravioleta

RESUMO

Modulação do retinol na lesão da barreira morfofuncional induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em culturas de células intestinais. Andrêssa Aby Faraj Linhares Maciel. Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Data da defesa: 27 de Julho de 2007 – Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, MD, PhD.

A vitamina A (retinol) é um nutriente essencial necessário em pequenas quantidades para o funcionamento normal do sistema visual, função imune e reprodução. Nosso grupo de pesquisa investigou o efeito de altas doses por via oral em crianças com diarreia em estudos prospectivos em comunidade em áreas endêmicas no Nordeste do Brasil e encontrou benefícios terapêuticos com a utilização do retinol na redução da média de duração da diarreia, porém não houve diminuição da incidência de episódios diarreicos. Esse estudo explorou o papel da suplementação do retinol em linhas de células intestinais frente ao dano citotóxico da Toxina A do *C. difficile* (TxA). O *C. difficile* é principal patógeno causador da diarreia associada ao uso de antibióticos e da colite pseudomembranosa. Investigou-se alterações da resistência elétrica transepitelial (TER) em células Caco-2, e nos modelos de proliferação, migração e morte celular em IEC-6, após a injúria induzida pela TxA. Os resultados mostraram que a suplementação do retinol, principalmente no meio sem glutamina, aumentou a TER, migração celular, como também promoveu uma redução significativa da apoptose e necrose, porém este efeito não foi visto no modelo de proliferação celular. Para estudar a modulação do retinol na diminuição da TER induzida pela TxA, as células foram expostas a TxA (0,1µg/mL) durante 24h. O retinol aumentou a TER (% do valor inicial) nas concentrações de 0,1 e 0,3nM às 3h (59,3±1,3; 69,8±0,6 vs 59,3±1,3Ωcm², respectivamente), e às 4h (36,1±0,02; 33,5±1,8 vs 27,3±0,2Ωcm², respectivamente) em relação ao controle sem retinol e com TxA. Nesses intervalos de tempo não houve influência da proliferação celular nas células Caco-2. O retinol aumentou a proliferação celular na lesão induzida pela TxA (0,1µg/mL) em 14,2; 23,8; 59,8; 8,4; 30,2; 44,1% (0,01; 0,03; 0,1; 1,0; 10; 100nM de retinol, respectivamente), após 24h comparado com controle com TxA. Depois de 12 e 24h de exposição a TxA (0,01µg/mL), seguido do arranhão na monocamada da células IEC-6, a suplementação do retinol aumentou significativamente a migração nas concentrações de 0,1-100nM em uma taxa de 30-80% e 60-100%, nas 12h e 24h, respectivamente. O retinol reduziu a apoptose e a necrose induzida pela TxA nas concentrações de 0,03-100nM, em comparação com controle com a TxA. Os resultados sugerem que o retinol exerce um importante papel na redução da apoptose, em aumentar a migração e proliferação e em prevenir a redução da TER, na lesão pela TxA, sugerindo que a vitamina A é um nutriente essencial na proteção na barreira funcional epitelial.

Palavras-chaves: Vitamina A, *Clostridium difficile*, impedância elétrica, proliferação de células, migração, apoptose e necrose.

ABSTRACT

Retinol modulation protecting the morfofunctional barrier challenged the *Clostridium difficile* Toxin A in intestinal cell lines. Andrêssa Aby Faraj Linhares Maciel. Dissertation submitted as a partial fulfillment of the requirement to the Master degree in Pharmacology from the School of medicine, Federal University of Ceará. Defense date: 2007, July 27. Professor: Aldo Ângelo Moreira Lima, MD, PhD.

Vitamin A (retinol) is an essential nutrient that is necessary in small amounts for normal functioning of the visual system, immune function and reproduction. Our group has investigated the effect of oral dosis of vitamin A on the early childhood diarrhea in our prospective community-based studies in high endemic areas in the Northeast of Brazil and has found a benefit of retinol therapy in reducing the mean duration but not the incidence of diarrheal episodes. In this study, we have explored the role of retinol supplementation in intestinal cell lines, following *Clostridium difficile* toxin A (TxA) cytotoxic challenge. *C. difficile* is the most common anaerobic pathogen that causes antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. We have focused on changes in transepithelial electrical resistance (TER) in Caco-2, a more differentiated intestinal cell line, and on models of proliferation, migration and cell death in IEC-6 cells, an undifferentiated crypt cell line, following or not by TxA-induced cell injury. The results showed retinol alone increased the TER, cell migration and proliferation, and also promoted significant reduction of apoptosis and necrosis, however this effect was not observed at the cell proliferation. To study the retinol effect on the TxA-induced loss of TER, cells were exposed during 24h to 0,1µg/mL TxA. Retinol improved TER (% of initial value) at the concentrations of 0,1nM and 0,3nM at 3h (59,3±1,3; 69,8±0,6 vs 59,3±1,3Ωcm², respectively), and at 4h (36,1± 0,02; 33,5± 1,8 vs 27,3±0,2Ωcm², respectively) in relation to the untreated control challenged with TxA. During this time there was no influence of the cell proliferation in the Caco-2 cells. Retinol increased cell proliferation after TxA-induced cell damage (0,1µg/mL) at a rate of 14,2%, 23,8%, 59,8%; 8,4%; 30,2%; 44,1% after 24h (doses of 0,01; 0,03; 0,1; 1,0; 10; 100nM of retinol, respectively), compared to controls only with TxA. After 24h of TxA exposure (0,01µg/ml), following plate scraping, the retinol supplementation improved significantly IEC-6 migration at the concentrations of 0,1-100nM in rate of 30-80% and 60-100%, in 12h and 24h, respectively. Retinol reduced TxA-induced apoptosis and necrosis at the concentration of 0,03; 0,1; 1; 10 and 100nM, p<0.05, in comparison to the control with TxA. These results suggest that retinol has a critical role in reducing apoptosis, improving cell migration and proliferation and preventing the reduction in TER, following TxA challenge, suggesting that vitamin A is an essential nutrient to protect the intestinal epithelial barrier function.

Key words: Vitamin A, *Clostridium difficile*, Electric Impedance, proliferation of cells, migration, apoptosis and necrosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Desnutrição

A desnutrição no Brasil é considerada um grave problema de saúde pública e decorre da ingestão inadequada ou do incorreto aproveitamento biológico dos alimentos geralmente associados às infecções. Estudos enfatizam a relação entre a desnutrição e a elevada taxa de mortalidade, principalmente no que diz respeito à susceptibilidade as infecções (Ahmad et al., 2000; WHO, 2002; Kosek et al., 2003; Pelletier et al., 1993; Yoon et al., 1997). Além disso, estudos mostram que a desnutrição afeta também o desenvolvimento cognitivo, reprodução, capacidade física para trabalhar e é um fator de risco para pacientes portadores de doença crônica (Guerrant et al., 1999; Niehaus et al., 2002; Guerrant et al., 2002). De acordo com relatórios emitidos pelo Fundo das Nações Unidas para a infância (UNICEF), a desnutrição atinge 146 milhões de crianças no mundo (UNICEF, 2005). No Brasil, déficits de crescimento são comuns em crianças que vivem em áreas rurais, onde 8,3% de crianças menores que dois anos estão abaixo do peso e a taxa mortalidade infantil permanece elevada, em torno de 26,6 para cada 1000 nascimentos, com taxas ainda maiores no Nordeste do Brasil (UNICEF, 2005; IBGE, 2003). No Ceará, essa taxa aumenta para 35 em cada 1000 crianças nascidas (IBGE, 2003).

Um dos maiores problemas enfrentados por sociedades em desenvolvimento é a desnutrição na infância, com comprometimento severo do crescimento linear e/ou emagrecimento extremo da criança, seja por sua elevada frequência, seja pelo amplo espectro de danos que se associam àquelas condições. Estima-se que 38,1% das crianças menores de cinco anos que vivem em países em desenvolvimento padeçam de comprometimento severo do crescimento e que 9,0% apresentem emagrecimento extremo. A essas condições associam-se, entre outros danos, o aumento na incidência e no aproveitamento escolar e diminuição da altura e da capacidade produtiva na

idade adulta (Murray et al., 1997; Pelletier e Frongillo, 2003; Guerrant et al., 2002; Guerrant et al., 1990; Bryce et al., 2005; Guerrant et al., 2005).

As causas da desnutrição são inúmeras. Dentre elas, a pobreza, a falta de educação e a desigualdade, como também as práticas alimentares pouco higiênicas e o freqüente surgimento de doenças, como a diarréia, malária e as doenças parasitárias como importantes fatores que privam, especialmente na infância, dos nutrientes necessários gerando quadro de deficiências nutricionais (Monteiro, 2003).

O estado nutricional interfere nas doenças diarréicas, particularmente na diarréia persistente e recorrente, interferindo na predisposição ao aumento da freqüência diarréica e na sua duração, demonstrando assim o ciclo vicioso da diarréia e desnutrição. Desta forma, a diarréia causa aumento da desnutrição e a desnutrição, por sua vez, aumenta sua freqüência, duração e severidade, com conseqüente risco de morte (Guerrant et al., 1992; Lima et al., 2000; Guerrant et al., 2002; Lima e Guerrant, 1992; Black et al., 1984; Schorling et al., 1990). As doenças diarréicas constituem uma das ameaças à saúde em países em desenvolvimento em torno do mundo. Embora o advento da terapia de reidratação oral (TRO) tenha promovido um declínio na mortalidade por diarréia com desidratação nas últimas décadas, as taxas globais de morbidade por diarréia não têm diminuído (Kosek et al., 2003). Considerando que estas taxas de morbidade são maiores nas populações crescentes de famintos, a diarréia pode representar uma incidência global crescente da doença (Kosek et al., 2003; Murray e Lopez, 1997). A Organização Mundial da Saúde relatou que em 1999 o índice de Anos Perdidos por Incapacitação (*DALY*: a incidência da doença que reflete a quantidade total de anos de vida perdidos por incapacidade ou morte) por doenças diarréicas foi o segundo maior índice, perdendo somente para doenças respiratórias (OMS, 2001).

A maioria das crianças com desnutrições severas, atendidas em hospitais, apresenta histórico de diarréia aguda ou crônica. Tanto a desnutrição como a diarréia persistente é associada com o rompimento da barreira

funcional epitelial, podendo contribuir para a deficiência nutricional destas crianças (Lima et al., 2005; Sullivan et al., 1992; Sullivan et al., 2002; Campbell et al., 2003). Estudos mostram que crianças severamente desnutridas apresentam graus variados de atrofia dos vilos, hiperplasia de criptas e infiltração linfocitária epitelial (Sullivan et al., 1991). Lesões nos vilos podem causar perdas de enzimas da mucosa fundamentais para a digestão e absorção de nutrientes, resultando em um comprometimento da barreira funcional epitelial do intestino delgado com conseqüente efeito na absorção, iniciando um processo inflamatório e uma resposta inune local (Lunn, 2000).

1.2 Epitélio gastrointestinal e barreira funcional epitelial intestinal

As células epiteliais intestinais são fisicamente ligadas por complexos juncionais intercelulares que regulam múltiplas funções, incluindo a polaridade, integridade mecânica e a sinalização (Trojanovsky, 1999). A principal função das células epiteliais que revestem o trato gastrointestinal (TGI) é produzir uma barreira física entre o lumen intestinal potencialmente hostil e o tecido subepitelial fortemente imunoreativo (Li et al., 2003). A barreira epitelial intestinal está localizada na interface entre corpo e o lado externo do ambiente, onde coordena a absorção de eletrólitos e o transporte de nutrientes estando relacionada com a proteção contra vários microrganismos potencialmente patogênicos, tóxicos ou substâncias nocivas presentes no lumen intestinal (Nusrat et al., 2000).

A barreira funcional epitelial consiste em uma monocamada contínua de células especializadas, polarizadas em constante e rápida renovação celular (Cereijido et al., 2000). O *turnover* das células epiteliais intestinais e da barreira funcional intestinal, que envolve a proliferação, migração, diferenciação, apoptose e necrose celular, é um processo dinâmico, marcadamente afetado pelo estado nutricional e pelo adequamento de nutrientes específicos na dieta (Ziegler et al., 2003). A apoptose, morte celular programada, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a proliferação, que ocorre nas criptas, e a

eliminação celular, que ocorre tanto nos vilos quanto nas criptas (Potten, 1997 e Brito et al., 2002).

No intestino delgado, as *stem cells* (células progenitoras), localizadas na região da cripta, podem se diferenciar em outros tipos celulares que não apenas em enterócitos. Essas células especializadas migram em direção ao topo das vilosidades intestinais e eventualmente sofrem apoptose ou são expulsas para dentro do lumen intestinal. A análise da dinâmica dos clones progenitores (C₁, M₁ e Mix) de vida curta (dias) conduz ao aparecimento de um ou dois tipos celulares mucosos (M₀) progenitores de vida longa (meses), e células progenitoras pluripotentes que podem originar todos os tipos celulares (Bjerknes & Cheng, 1999). A constante renovação celular (*turnover*) no intestino delgado e nas células do cólon decorre em função das taxas de proliferação das células progenitoras da mucosa do intestino, da migração celular, ao longo do eixo cripta - vilos no intestino delgado e ao longo do eixo da cripta no cólon, como também da morte celular por apoptose (Bjerknes et al., 1999). Durante a migração, as células se diferenciam obedecendo ao sentido: base da cripta em direção ao topo do vilos. Esta jornada dura em torno de 2 a 4 dias (Bjerknes e Cheng, 1999). Esta constante renovação do epitélio intestinal é um processo que requer um suprimento sempre contínuo de energia, provenientes de macro e micronutrientes (Bjerknes et al., 1999).

A função da barreira da mucosa intestinal é parcialmente mantida pelas junções firmes ou zônulas de oclusão (*Tight Junctions*, TJ) que une as células epiteliais intestinais adjacentes, formando uma estrutura fortemente regulada conferindo uma seletiva permeabilidade e polaridade celular ao intestino delgado (Cereijido et al., 2000 e Denker, 1998, Nustrat *et al.*, 2000). As junções firmes não existem apenas para separar os distintos compartimentos fisiológicos, mas elas também conferem seletividade ao fluxo transepitelial de moléculas e íons pela via paracelular (Mandara et al., 1985; Schneeberger e Lynch, 1992; Gumbiner, 1993; Mitic e Anderson, 1998). Anteriormente, as TJ eram consideradas como estruturas estáticas, embora atualmente haja

evidências que são estruturas altamente dinâmicas, capazes de receber e integrar sinais provenientes de outras células e do ambiente extracelular, podendo adaptar-se a uma variedade de circunstâncias (Fasano et al., 2004).

Um complexo de proteínas composto de diferentes tipos de junções intercelulares, das quais incluem as proteínas das junções firmes (TJ), as zônulas de adesão (cinto, junções ou zona de adesão) e os desmossomas, conferem a estabilidade da barreira epitelial (Collares-Buzato et al., 1994; Yap et al., 1997; Anderson e Itallie, 1995). As junções firmes e de adesão dispõem de uma organização estrutural semelhante, e seus complexos de ligações são constituídos de componentes transmembrânicos com função adesiva e de proteínas adaptadoras citosólicas que geram uma ligação direta ou indireta ao citoesqueleto (Madara et al., 1998, Nusrat et al., 2000).

As TJs são especializados domínios de membranas que estão inseridos nos espaços intercelulares no epitélio e endotélio, contribuindo para a permeabilidade entre os compartimentos luminais e intestinais (Madara et al., 1998). A estrutura da TJ tem sido estudada intensivamente (**Figura 01**) (Fasano e Nataro, 2003). Do grupo das proteínas de membrana associadas às TJ, a primeira proteína pertencente a essas junções foi as ocludinas, identificadas em 1993. A ocludina é composta de quatro domínios, dois domínios extracelulares e um longo domínio carboxi-terminal (Furuse et al., 1993). Uma outra família das proteínas das TJ que foi recentemente identificada é a das claudinas, e sua importância funcional está relacionada com a barreira paracelular dessas junções juntamente com proteínas periféricas (ZO-1 e ZO-2) (Furuse et al., 1998). Vários tipos de claudinas têm sido descritas, as claudinas 2 a 5 são expressas preferencialmente no intestino (Rahner et al., 2001). Além disso, uma outra proteína chamada de JAM (molécula de adesão juncional), uma proteína de membrana tipo I dos genes da superfamília das imunoglobulinas, tem sido descrita como capaz de participar na adesão célula-a-célula e parece estar implicada na infiltração de monócitos através da monocamada endotelial (Martins-Padura et al., 1998).

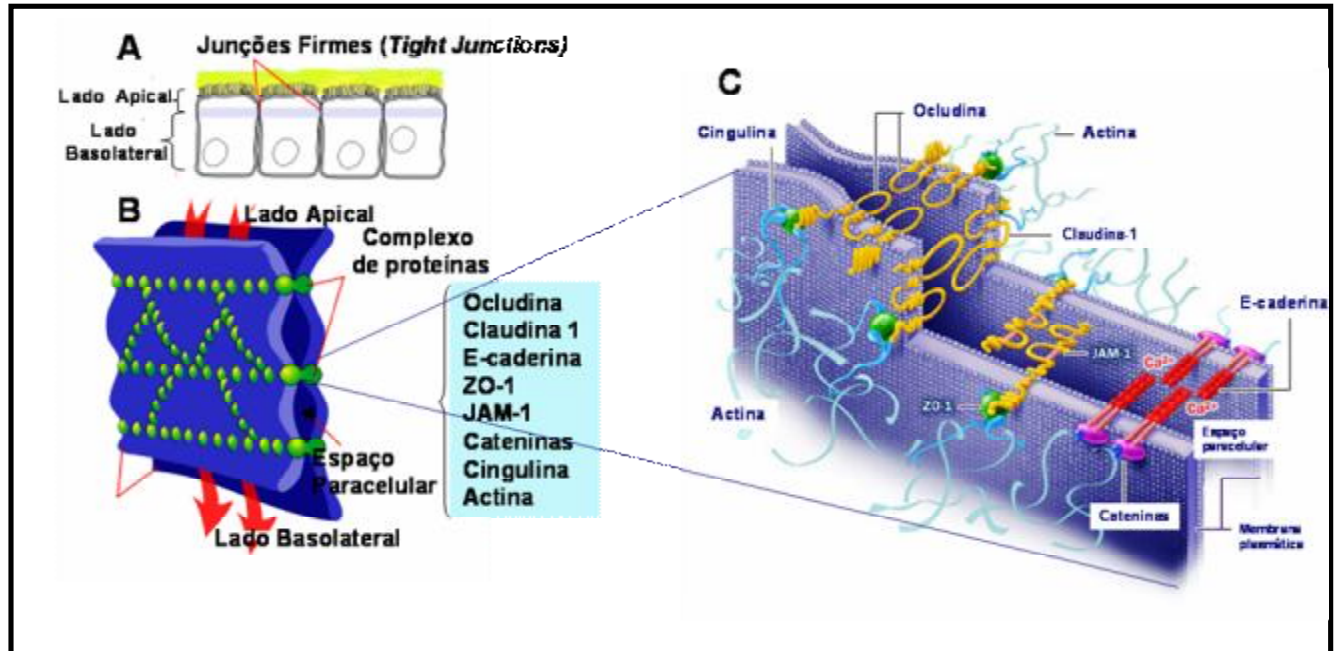


Figura 01: Representação esquemática das junções firmes e da zona de adesão. (A e B) As junções firmes (*Tight junctions*) unem as células epiteliais adjacentes e regulam a passagem de íons e outras substâncias, através dos espaços paracelulares. (C) Um complexo protéico faz parte das junções firmes, incluindo as proteínas transmembrânicas ocludinas e claudinas ligadas às células do citoesqueleto via complexos juncionais, que se conectam aos filamentos de actina. Esses complexos incluem também várias proteínas, como as da família ZO, além de outras, como JAM-1, cingulina, E-caderina e catenina. Fonte: Disponível em <http://www.nastech.com/nastech/junctions_biology>. Acesso em 10 julho de 2007.

Em relação ao grupo das proteínas periféricas de membrana associadas as TJ, as ZO-1 (ligada diretamente cadeia carboxi-terminal citoplasmática da ocludina), ZO-2 e ZO-3 (220, 160 e 100 kDa, respectivamente) são proteínas que formam um complexo no lado citoplasmático das TJ (Stevenson et al., 1986; Gumbiner et al., 1991; Haskins et al., 1998). Outras proteínas de membranas periféricas também têm sido localizadas na TJ, dentre elas destacam-se a cingulina (140 kDa), 7H6, rab 13, $G\alpha_{i-2}$ e proteína quinase C.

Elas interagem com o citoesqueleto de actina, conferindo a função na regulação da permeabilidade paracelular, além de também estarem envolvidas na regulação da expressão de genes, crescimento e diferenciação celular (Balda e Matter, 1998).

O cinto de adesão ou zona de adesão está associado aos filamentos de actina aos quais estão aderidos aos pares as moléculas de miosina tipo II. Os filamentos de actina integram-se às proteínas de adesão transmembranas chamadas de caderinas. As caderinas são moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} para a indução e manutenção dos contatos intercelulares (Angst et al., 2001; Gumbiner, 1996; Takeichi, 1990). A E-caderina, principal caderina expressa nas células epiteliais, está localizada na zona de adesão. A forte adesão célula-a-célula mediada pela E-caderina, parece ser importante para estabilidade da barreira funcional epitelial, assim como os sinais transmitidos pelas junções de adesão, podendo também regular as TJ (Angst et al, 2001; Man et al, 2000; Takeichi, 1990, Varlamov et al, 1997). A família da catenina (α -catenina, β -catenina, γ -catenina), proteínas acessórias intracelulares, liga-se às caderinas aos citoesqueleto de actina. As interações das cateninas com domínios citosólicos específicos das caderinas são necessárias para a adesão. Portanto, em síntese, esta regulação se dá pela fosforilação da miosina II, promovendo a contração dos filamentos de actina, funcionando como esfíncter, abrindo o espaço paracelular, facilitando a passagem de íons do espaço basolateral para lumen, ou vice-versa, promovendo a redução da resistência paracelular (Mitic et al., 2000; Mitic e Anderson, 1998; Heiskala et al., 2001).

A barreira homeostática, a qual resulta em parte de interações coordenadas de linhagens de células dentro da mucosa, pode ser influenciada por vários estímulos fisiológicos e patológicos, como os nutrientes, mediadores imunes, bactérias entéricas e vírus (Pappenheimer JR., 1998; Dickman KG *et al.*, 2000; Nustrat A *et al.*, 2000; Sears, 2000). Diversos estudos têm mostrado o potencial terapêutico de nutrientes específicos e componentes derivados da dieta (incluindo arginina, glutamina, vitamina A, zinco) na renovação celular das

células do intestino, no mecanismo de reparo e na adaptação barreira funcional epitelial (Ziegler *et al.*, 2003, Chauhman *et al.*, 1989). Alguns estudos em modelos animais têm mostrado a relação entre permeabilidade da mucosa intestinal e vitamina A (Holland RE *et al.*, 1993; Warden RA *et al.*, 1997). Em países em desenvolvimento, investigadores sugerem que a suplementação com vitamina A em indivíduos com deficiência de vitamina A diminui o risco de diarreia e disfunção da barreira intestinal, dando suporte ao importante papel desse nutriente no reparo e na função da mucosa intestinal (Duggan e cols, 1997).

1.3 Vitamina A

1.3.1 Nomenclatura, propriedades químicas e fontes dietéticas

“Vitaminas são substâncias orgânicas cuja presença na dieta, em quantidades mínimas, é indispensável para garantir o perfeito desenvolvimento e funcionamento do organismo animal”. (Chaves, 1978). As vitaminas variam amplamente quanto à estrutura química e atividade biológica, podendo funcionar tanto como co-fatores de enzimas em diferentes reações bioquímicas, atuando também como antioxidantes/oxidantes, modulando o balanço oxidativo, e até mesmo como hormônios, regulando a expressão gênica (Olson,1994). De acordo com a solubilidade, as vitaminas são classificadas em dois grupos: vitaminas lipossolúveis (solúveis em gordura) incluem a vitamina A, D, E, K e vitaminas hidrossolúveis (solúveis em água) que incluem as vitaminas do complexo B e a vitamina C. E devido a essa solubilidade, as vitaminas lipossolúveis requerem, para a sua absorção, ácidos biliares, lipases e uma mucosa intestinal íntegra, e esta absorção pode ser aumentada com uma dieta rica em lipídeos (Rolig, 1986). Inicialmente, as vitaminas foram identificadas por letras do alfabeto e posteriormente, receberam um nome químico, entretanto também se utiliza as letras do alfabeto pra denominá-las (Passmore, 1975).

A vitamina A (Vit A) recebeu esta denominação por ter sido a primeira substância a integrar a categoria de fator essencial do organismo. Foi descoberta como fator lipossolúvel em 1913 por Elmer McCollum, um bioquímico da Universidade de Wisconsin-Madison e por seu colega Marquerite Davis onde identificaram um nutriente solúvel na gordura do leite (nata) e no óleo extraído de fígado. Esta descoberta foi seguida por uma série de experimentos que levaram a sua síntese em 1947 por Thomas Osborne e Lafayette Mendel (Osborne e Lafayette, 1947).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada – União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB, 1982), a vitamina A é designada genericamente de retinol. O termo vitamina A é reservado para designar os compostos com atividade biológica de retinol. O termo “retinóides” introduzido em 1976 por Sporn e colaboradores foi designado pela IUPAC-IUB em 1982 para incluir os " compostos que consistem de quatro unidades de isoprenóide; Todos os retinóides podem formalmente ser derivados de um composto monocíclico contendo cinco duplas ligações do carbono e um grupo terminal funcional no término da porção acíclica. De acordo com esta definição o termo retinóides, inclui tanto as formas de vitamina A que ocorrem na natureza como também os análogos sintéticos do retinol, com e sem atividade biológica (Blomhoff e Blomhoff, 2006). Entretanto, vários componentes sintéticos, como TTNN e Ch-55, não cabem nessa difinição de retinóides, pois tem se mostrado muito mais ativo do que o retinol ou ácido retinóide em várias análises da atividade de vitamina A ou do retinol. Por conseqüência, Sporn e Robert (1985) propuseram que o termo retinóide seria definido como uma substância com atividade biológica específica devido à ligação e ativação de um receptor específico ou vários receptores. Contudo, na prática, a maioria dos pesquisadores usa uma combinação dessas duas definições, considerando pertencentes à classe de retinóides os análogos do retinol (com e sem atividade biológica), mas também vários componentes que não são totalmente relatados como retinol, porém possuem atividade biológica de vitamina A ou de retinóides (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

A capacidade de síntese de Vit A e seus derivados são limitados às plantas e microrganismos, desta maneira a maioria dos animais obtém a vitamina A da alimentação através de duas principais fontes: pró-vitamina A (produtos de origem vegetal como β -carotenos, α -carotenos e β -criptoxantina) ou como vitamina A pré-formada (produtos de origem animal) (Goodwin, 1963; Goodwin, 1971). A pró-vitamina A é encontrada principalmente em hortaliças verdes escuras (espinafre, couve, brócolis), e em alguns vegetais de cor alaranjada como a cenoura, abóbora, manga, mamão, buriti ou em alguns óleos vegetais (dendê africano). Como fonte de vitamina A pré-formada podemos incluir o fígado, leite, gema de ovo, óleo de fígado de peixe, peixes de água salgada, leite de vaca integral, queijo e manteiga (During e Harrison, 2004).

Os carotenóides constituem uma família de mais de 600 membros já identificados na natureza, sendo que cerca de 60 apresentam atividade pró-vitamínica A, ou seja, podem funcionar como precursores de vitamina A em mamíferos (Olson, 1989). Os carotenóides representam um grande grupo de pigmentos que são espalhados na natureza e responsáveis pelas cores amarela, laranja, roxa e vermelha em várias espécies de vegetais, frutas e flores (Fraser e Bramley, 2004). As plantas e microrganismos, como algumas bactérias, algas e os fungos podem sintetizar carotenóides, entretanto apenas alguns carotenóides podem ser convertidos em vitamina A pelos animais. O β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína e β -criptoxantina são exemplos de carotenóides importantes presentes no corpo humano. O β -caroteno é o mais abundante na natureza e é encontrado em vegetais e frutas de cor verde-escuro e amarelo-alaranjado (Mangels et al., 1993; Godoy et al., 1994). A conversão estequiométrica de um mol de β -caroteno dá origem a 2 moles de retinol (via retinal), enquanto uma molécula de α -caroteno ou β -criptoxantina dá origem a apenas uma simples molécula de retinol. Originalmente, unidades internacionais (IUs) (1IU = 0,3 μ g de retinol) foram usadas como recomendações nutricionais para a vitamina A. Então, os equivalentes de retinol (ERs) foram utilizados para converter todas as fontes de retinol pré-

formado e de pró-vitamina A (carotenóides) na dieta dentro de uma simples unidade. Desta maneira, a equivalente de atividade de retinol (ER) é igual 1µg de vitamina A pré-formada dietética ou suplementar (retinol) sendo igual a 2µg de β-caroteno suplementado, 12µg de β-caroteno dietético e equivalente a 24µg de outros carotenóides (α-caroteno e β-criptoxantina) (US inst Med Food Nutr., 2000; Trumbo et al., 2001), mostrado na **tabela 01** modificado pelo Instituto de Medicina (IOM, 2000 e 2001).

Tabela 01. Valores de equivalência de compostos de vitamina A

1µg ER (equivalente de atividade de retinol)	1µg de retinol totalmente trans (3,33UI)
	12µg de betacaroteno
	24µg de alfacaroteno
	24µg outros carotenóides (criptoxantina)
1 µg betacaroteno	0,167 µg RE
1 µg outros carotenóides	0,084 µg RE

Fonte: Instituto de Medicina – referência de ingestão dietética (IOM, 2000 e 2001)

O retinol possui peso molecular igual a 286,46 sendo um álcool altamente insaturado, insolúvel na água, facilmente solúvel no éter, clorofórmio, acetona, gorduras e óleo. A Vit A e seus ésteres são rapidamente degradados pela luz, oxigênio e ácidos. Desta forma, as soluções preparadas com retinóides, devem ser estocadas no escuro e em baixas temperaturas (Gundersen and Blomhoff, 2001; Barua e Furr, 1998).

Quimicamente, o retinol é um isoprenóide, sintetizado a partir de unidades de isoprenos, e sua estrutura em anel é que confere sua atividade. Como mostrado na figura 1, o retinol contém um anel carboxílico de seis membros e uma cadeia lateral com onze carbonos e um grupo hidroxila em uma extremidade. Este grupo hidroxila pode ser oxidado para a forma de aldeído (retinal) ou a ácido carboxílico (ácido retinóico) (**Figura 02**). Sua estrutura permite a formação de dezesseis isômeros geométricos, dos quais seis são bem conhecidos, entretanto dois deles tem se destacado em suas atividades, o retinol *trans* que é a forma biologicamente mais ativa, e o isômero de configuração *cis* nos carbonos 11 e 13 (retinol *cis*), que possui atividade biológica no ciclo visual (síntese da rodopsina). A estrutura do retinol totalmente *trans* (all-*trans*-retinol) possui esta denominação devido a todas as duplas ligações serem na configuração *trans*. Dos isômeros *cis*, pode-se destacar o da configuração 11-*cis*-retinal, o qual é requerido para a visão e o ácido 13-*cis* retinóico (ou isotretinóina), usado principalmente na dermatologia (Hoffman et al., 1971).

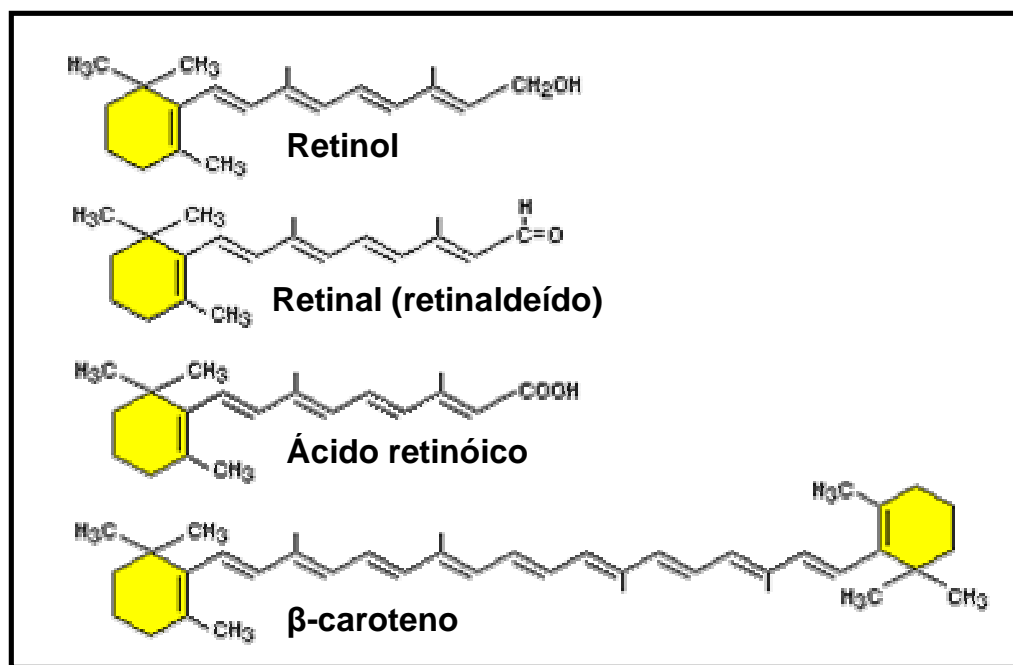


Figura 02: Fórmulas estruturais da vitamina A e alguns dos seus metabólitos, e do beta-caroteno. Fonte: Adaptado de Baltes, 1995.

1.3.2 Absorção e Metabolismo da vitamina A

Os ésteres retinólicos, ácidos graxos de cadeia longa, são a principal forma da vitamina A (vitamina A pré-formada) na dieta alimentar, muito embora existam quantidades significantes proveniente do retinol e menores quantidades ainda provenientes de ácido retinóico (Plack, 1965). A hidrólise destes ésteres a retinol pode ser catalisada por enzimas secretadas pelo pâncreas no lumen intestinal ou por associação direta dentro das células intestinais. Entretanto, os carotenóides procedentes da dieta são absorvidos por mecanismo de difusão passiva pelas células da mucosa intestinal, isto é, dentro do enterócito. Nesta etapa, devido à insolubilidade em água, os ésteres são emulsionados pelos sais biliares e ácidos graxos livres dentro do lumen intestinal, convertendo-se por fim em micelas, para que possam ser absorvidos e transferidos para dentro da mucosa. Em condições normais, mais de 90% da vitamina A ingerida é absorvida (Harrison, 2005).

A digestão dos ésteres retinólicos, devido a sua composição lipofílica, requer a catálise por lipases, enzimas que hidrolisam substratos lipossolúveis, isto é, insolúveis em água (Borgström e Erlanson, 1973; Brockman, 1984). Alguns pontos são particularmente relevantes no estudo da hidrólise de lipídeos altamente apolares, como os ésteres retinólicos. Um dos fatores a serem analisados é a disponibilidade de substratos que pode ser relevante devido a aparente especificidade de algumas enzimas lipofílicas que, na maioria das vezes, repercutem na disponibilidade do substrato na superfície. Isto deve ser levado em consideração, pois existem composições específicas dos lipídeos luminiais que podem gerar um impacto importante na digestão e absorção das vitaminas A exógenas dietéticas (Harrison, 2005).

A maioria dos estudos sobre a hidrólise enzimática dos ésteres retinólicos é conduzido sobre condições no qual a concentração do substrato é indefinida, principalmente quando se considera que mesmo sendo razoavelmente bem caracterizadas as formas de substratos (micelas,

lisossomos ou monocamadas de composição definida) provavelmente não são muito semelhantes comparando com as formas usadas pelos ésteres retinólicos *in vivo* (Harrison, 2005). A inexistência de informações detalhadas sobre as formas ou fases que os ésteres retinólicos adotam no lumen intestinal não deixa claro esta questão. Outros lipídeos vindo da dieta, como triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol, já são bem esclarecidos na literatura (Hernell *et al.*, 1990; Staggers *et al.*, 1990). Estudos tanto em animais experimentais como em humanos, mostraram que a ingestão concomitante na dieta de lipídios aumentaria significativamente a digestão de vitamina A proveniente da dieta (Blomhoff *et al.*, 1984; Noh e Koo, 2001; Tso P *et al.*, 2001). A presença de gordura pode estimular digestão no intestino por três mecanismos: 1. Estimulando a secreção de enzimas do pâncreas; 2. Estimulando a bile a secretar os sais biliares; 3. Aumentando os produtos que digerem os lipídeos (lisofosfolipídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres) (Harrison, 2005).

Muitas enzimas são responsáveis pela completa hidrólise dos ésteres retinólicos no lumen intestinal. As enzimas pancreáticas (lipases pancreáticas triglicéridicas - PLT) e as enzimas presentes nas bordas em escova das células epiteliais intestinais (fosfolipase B – PLB). Somando-se a essas, tem-se ainda observado a presença de possíveis enzimas que também participam deste processo, a lipase pancreática ligada a proteína tipo 2 (PRLP2) e a lipase pancreática ligada a proteína tipo 1 (PRLP1), entretanto mais investigações são necessárias sobre suas possíveis funções (Jennens e lowe, 1995; giller *et al.*, 1992).

Dentro dos enterócitos, o retinol se liga a CRBP II, proteína ligadora de retinol celular II, uma proteína citosólica que se liga especificamente ao retinol com alta afinidade (Harisson e Hussain, 2001). Dentre essas proteínas celulares de ligação do retinol ou proteínas carreadoras de retinol (CRBP), duas delas estão sendo purificadas e caracterizadas extensivamente, a CRBP I e CRBP II, que compartilham propriedades estruturais, genéticas e bioquímicas. A CRBP I, 14,6 kDa, é expressa em vários tecidos enquanto a

CRBP II, 16 kDa, que ocorre principalmente em células absorptivas do intestino delgado constituindo cerca de 1% da proteína solúvel total (Ong et al., 1994; Newcomer et al., 1998; Li e Norris, 1996). A CRBP II parece funcionar como facilitador intestinal no deslocamento e metabolismo da vitamina A, pois solubiliza o retinol protegendo contra a degradação e o direcionando para enzima lecitina:retinol acetiltransferase - LRAT (Levin, 1997; Ong et al., 1994; Batten et al., 2004). Estudos *in vitro* utilizando as células Caco-2, linha de célula intestinal humana, demonstraram que captação do retinol, a esterificação a ácidos graxos de cadeia longa e a secreção são modulados pela CRBP II. Detectou-se nível de RNAm da CRBP II elevado após o tratamento das células diferenciadas Caco-2 com ácido retinóico (Levin, 1993; Lissos et al 1995). Além disso, a CRBP II ligada ao retinol parece ser o principal substrato para enzima retinol lecitina acetiltransferase intestinal, a qual catalisa a transferência dos ácidos graxos de cadeia longa da lecitina para retinol. Desta maneira, o ácido retinóico pode está envolvido na regulação da expressão CRBP II diretamente ou por alguma mudança ao nível de receptores nucleares (Ong, 1987).

Nos enterócitos o β -caroteno, precursor direto da vitamina A da dieta, é convertido em duas moléculas de retinaldeído (retinal) no intestino delgado pela clivagem (clivagem central), especificamente na dupla ligação central, catalisada pela enzima β -caroteno-15, 15'-monooxigenase (Moore, 1930) (**Figura 03**). Olson relata que esta enzima citosólica requer um detergente e oxigênio molecular, necessita de grupos sulfidrilas livres, contém, provavelmente, ferro ou cobre e apresenta $K_M = 1-10\mu\text{mol}$ e pH ótimo = 7,5-8,5 (Olson,1999). E pode ainda ser convertido a retinal por clivagem excêntrica (assimétrica), que produz β -apocarotenais com diferentes quantidades de carbono nas cadeias formadas (Ong, 1994; During e Harisson, 2004). Então, a partir do β -caroteno pode-se obter o retinol, forma predominante da vitamina A na circulação. Este é gerado intracelularmente por duas reações enzimáticas oxidativas pelo qual o retinol é convertido primeiramente a retinaldeído e depois para ácido retinóico. Desta forma, o retinaldeído formado pode também ser

metabolizado a outro retinol, pelo retinaldeído redutase, ou em ácido retinóico pela enzima retinaldeído desidrogenase, como mostrado na figura 03 (Napoli, 1988; Thomas et al., 2005). Assim, o retinol é o precursor imediato de dois importantes metabólitos ativos: retinaldeído (retinal), o qual desempenha um papel crítico na visão e ácido retinóico, metabólito que atua como mensageiro atuando na transcrição de inúmeros genes (Wald, 1968; Giguere 1987).

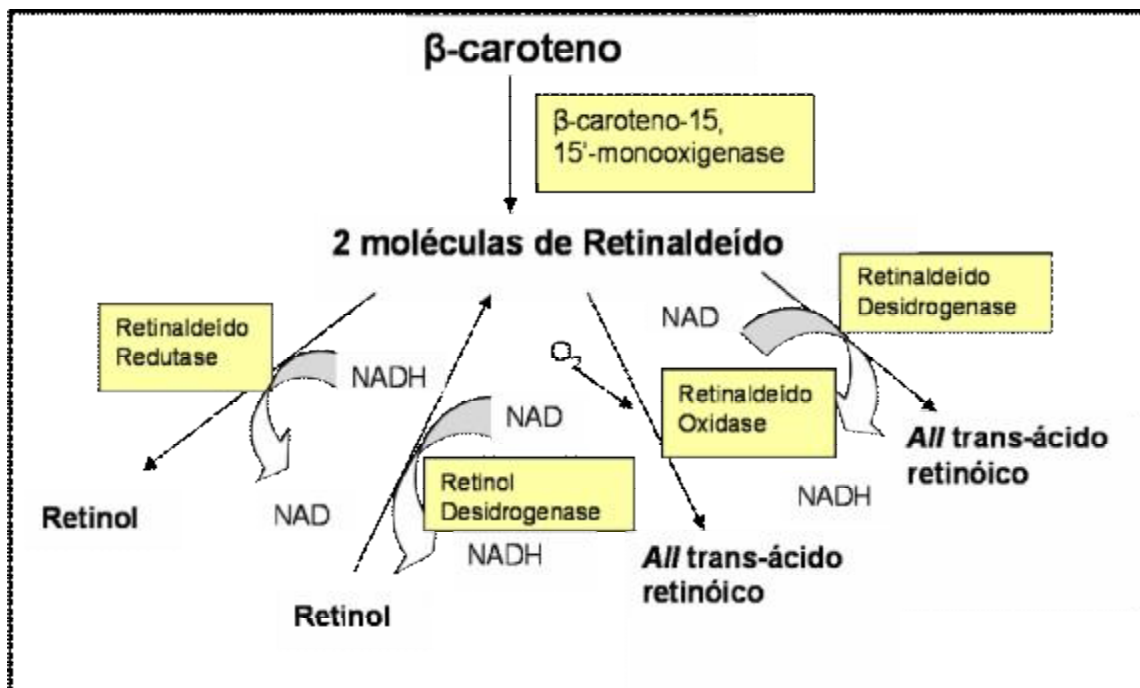


Figura 03: **Desenho esquemático das vias metabólicas da Vitamina A.** O β-caroteno proveniente da dieta pode ser clivado pela enzima β-caroteno-15, 15'-monooxigenase originando duas moléculas de retinaldeído (retinal) que por sua vez origina o retinol e o ácido retinóico (forma ativa da vitamina A). Em síntese, o β-caroteno é gerado intracelularmente por duas reações enzimáticas oxidativas pelo qual o retinol é convertido primeiramente a retinaldeído e depois para ácido retinóico. O retinaldeído formado pode ser metabolizado a outro retinol, pela retinaldeído redutase, ou em ácido retinóico pela enzima retinaldeído desidrogenase (via irreverssível). NAD: Nicotinamida adenosina dinucleotídeo; NADH: Nicotinamida adenosina dinucleotídeo, O₂: oxigênio. Fonte: Adaptado de Thomas et al., 2005.

O passo seguinte da hidrólise dos ésteres provenientes da dieta é a captação do retinol livre (retinol proveniente da dieta somando ao produzido no intestino e o formado a partir dos carotenóides) pela mucosa celular (Dew e Ong, 1994), onde ocorre a reesterificação das longas cadeias de ácidos graxos, por duas enzimas lecitina:retinol acetiltransferase (LRAT) e acil-CoA:retinol acetiltransferase (ARAT) (MacDonald e Ong, 1988; Ong et al., 1987). A enzima LRAT esterifica o retinol ligada a CRBP II, e ARAT esterifica a retinol livre presente na célula, caso haja uma grande ingestão de vitamina A e uma saturação da CRBP II (Blomhoff et al., 1991; Blomhoff, 1984; Ong, 1994). E junto com os fosfolipídeos, colesterol e triglicerídeos, os ésteres de retinílicos são introduzidos para dentro dos quilomícrons, sendo transportado como componente dos quilomícrons, via linfática para rins, músculos e principalmente para o fígado (Blomhoff, 1982; Huang e Goodman, 1965; Harrison e Hussain, 2001). Em torno de 75% de vitamina A é captada pelo fígado.

Os quilomícrons consistem em milhares de agregados de triacilglicerol e fosfolipídeos juntamente com carotenóides, ésteres retinílico, pequenas quantidades de retinol, ésteres de colesterol, e poucas apolipoproteínas específicas. Embora a maioria da vitamina A absorvida seja secretada no sistema linfático como ésteres retinílicos, uma quantidade significativa é também secretada na circulação portal na forma de retinol não esterificado. A absorção portal parece ser importante em condições patológicas que afetam a secreção de quilomícrons como as betalipoproteínas (Harrison, 2005; Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Após a secreção de quilomícrons dentro do sistema linfático, as partículas lipoprotéicas movem-se para dentro da circulação geral, onde uma série de processos como hidrólise de triacilglicerol e troca de apolipoproteínas resultam na formação de quilomícrons remanescentes (Blomhoff et al., 1990; Hazzard e Bierman, 1976; Hussain et al., 1996). A captação extra-hepática do quilomícrons remanescentes pode ser importante para a distribuição dos ésteres retinílicos e dos carotenóides para atender as necessidades dos

tecidos, como a medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético e fígado (Paik et al., 2004).

Nos hepatócitos, os ésteres retinílicos são novamente hidrolisados e convertidos dentro das células estelares (células Ito) do fígado a retinol por meio da ação de uma hidrolase dos ésteres retinílicos (retinil-éster-hidrolase), com a transferência para as células parenquimais. Posteriormente, o retinol pode ser secretado pelos hepatócitos na circulação sanguínea estando ligado a chamada proteína transportada do retinol (proteína de ligação do retinol) (RBP) na circulação plasmática. Este complexo está associado com outra proteína plasmática, transtiretina (TTR). Ou pode ser captado pela RBP citoplasmática e levado aos sítios de estocagem, que são os adipócitos e os hepatócitos. O armazenamento na forma de éster de retinol é feito através da ação da retinol-acetil-transferase sobre o retinol. Ao chegar no plasma, o complexo retinol-RBP se liga à pré-albumina que o protegerá da ação da degradação no rim. Após se ligar aos receptores de membrana, o retinol entra nos sítios celulares e a RBP volta à circulação para ser degradada e reciclada. Ao entrar na célula, o retinol se fixa a uma molécula de transporte citoplasmática, a proteína de ligação ao retinol (específica do órgão) que o transporta ao sítio de ação. Além disso, o retinol pode ser oxidado e se transformar em ácido retinóico, que se liga a receptores nucleares específicos. O ácido retinóico, metabólito ativo da vitamina A, é responsável pela maioria dos efeitos pleotróficos da vitamina A atuando através da regulação de genes específicos a nível transcricional via receptores nucleares específicos, como os receptores do ácido retinóico (RARs) e os receptores do ácido retinóide X (RXRs), os quais possuem três isoformas (alfa, beta e gama) (Blomhoff e Blomhoff, 2005) (**Figura 04**).

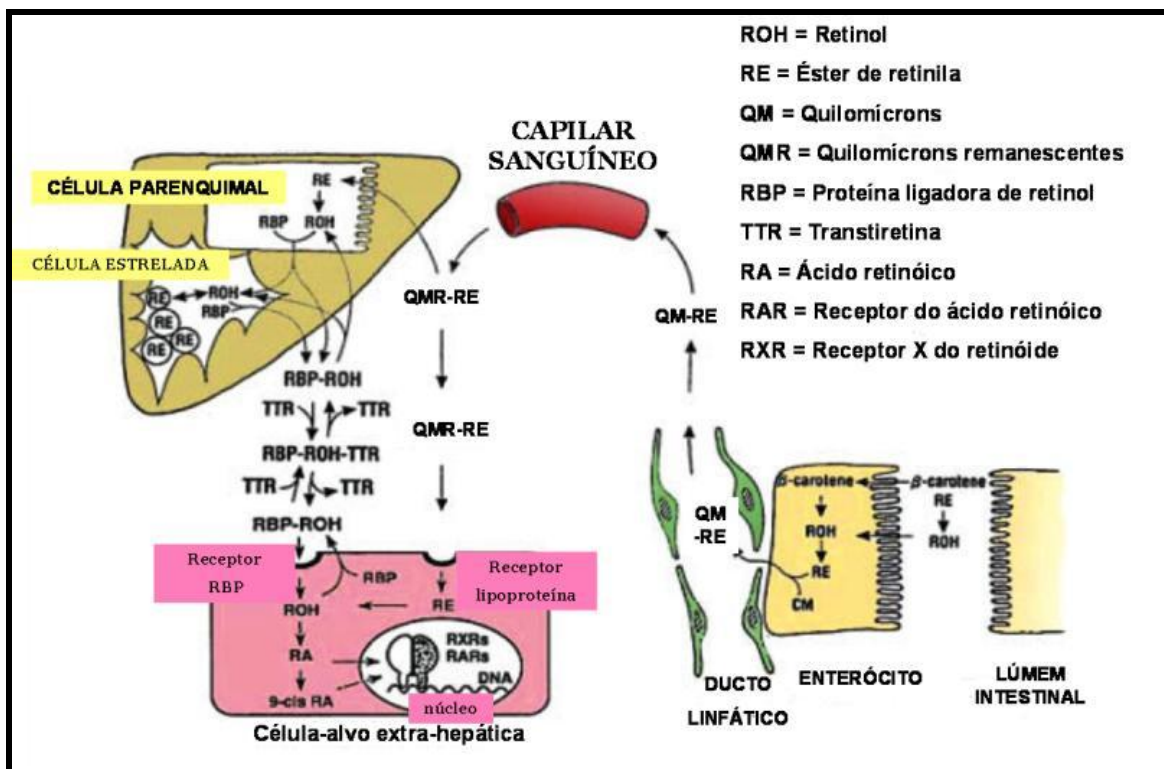


Figura 04: Esquema representativo das principais via de transportes dos retinóides no organismo. As principais fontes de vitamina A na dieta humana são proveniente dos carotenóides, presentes nas frutas e vegetais principalmente na forma de β -carotenóide, e na forma de ésteres de retinila (RE) encontrados nos alimentos de origem animal. Nos humanos os carotenóides são clivados gerando retinol (ROH) ou absorvidos intactos, já os RE são completamente hidrolisados no lumen intestinal e o retinol livre é captado pelos enterócitos onde é reesterificado a RE (principalmente na forma de palmitato) resultando na incorporação destes dentro dos quilomícrons para então serem absorvidos pela via linfática. Após a secreção dos QM-RE (quilomícrons de ésteres de retinila), nos vasos linfáticos ele se movem para dentro da circulação geral, onde ocorrem vários processos como hidrólise de triacilglicerol e troca de apoproteína resultando na formação dos quilomícrons remanescentes (QMR). Ocorre também a captação extra-hepática dos QMR, sendo uma via importante no processo de obtenção do retinol a partir do RE e dos carotenóides para suprimento de vitamina A nos tecidos como medula

óssea, tecido adiposo, fígado, músculos esqueléticos, entre outros. No hepatócito, os RE são hidrolisados e o retinol não esterificado pode ser associado à proteína ligadora de retinol (RBP). Além disso, uma grande porção deste retinol pode ser transferida a um outro tipo de célula do fígado, células estreladas, sendo local de estoque de retinol no organismo (50-80% do total de retinol no corpo). O retinol pode ser secretado pelos hepatócitos na circulação sanguínea estando ligado RBP (ROH-RBP) na circulação plasmática. Fonte: Adaptado de Blomhoff e Blomhoff, 2005.

1.3.3 Aspectos gerais do transporte e distribuição da vitamina A

No plasma e dentro da célula a molécula de retinol liga-se a proteínas transportadoras distintas, a proteína plasmática ligadora do retinol (RBP) e as proteínas celulares ligadoras de retinol (CRBPs). Em torno de 90 a 95% da vitamina A da circulação plasmática encontra-se ligada a proteína ligadora de retinol (RBP) (Newcomer et al., 1998). A RBP é uma proteína formada por simples cadeias polipeptídicas de 21 KDa e liga-se ao retinol, gerando um complexo binário associado a outra proteína plasmática denominada de transtiretina (TTR). A TTR apresenta dois sítios de ligação independentes, um para tiroxina (T4) e outro para a ligação a RBP (Kanda et al., 1974; Ferguson et al., 1975; Raz et al., 1970; Van Jaarsveld et al., 1973), onde na circulação a maior parte da RBP está ligada à TTR (Goodman, 1984). Estudos com células hepáticas mostraram que a síntese e a liberação da RBP pode ocorrer na ausência da TTR sugerindo que a TTR pode não ser essencial para a liberação da RBP aos tecidos e células (Zovich et al., 1992; Melhus et al., 1991; Davis e Ong, 1992)

Os primeiros pesquisadores a demonstrar que o retinol no plasma era ligado a uma proteína específica de ligação do retinol foram Kanai e colaboradores, onde a isolaram do soro humano em 1968, desde então a RBP tem sido isolada do soro de vários outros vertebrados, incluindo pássaros e peixes (Goodman, 1984). Aproximadamente 95% da RBP está associada a

TTR (na razão 1:1 de molaridade), e este complexo reduz a filtração glomerular do retinol e o catabolismo da RBP. O complexo retinol-RBP na circulação tem uma meia vida de 12 horas. O retinol liberado pelo fígado junto ao RBP e sabendo que a proteína RBP tem apenas um sítio de ligação para retinol, o retinol e RBP existem na circulação em concentrações equimolares (Smith et al., 1973; Ingenbleek et al., 1975). A maioria dos retinóides, além do retinol e ésteres de retinil, estão presentes no plasma em concentrações nanomolares (5-10nM). Grande parte do nível de retinol e ésteres de retinil dependem da captação da vitamina A e que normalmente aumenta 2 a 4 horas depois de uma grande ingestão de vitamina A (Hartmann et al., 2005). Grande parte dos tecidos adquire a vitamina A através do retinol ligado a RBP (Goodman e Blaner, 1984). Sugere-se que o retinol entre na célula por difusão passiva ou através de um receptor para a RBP (Blomhoff et al., 1991, Blomhoff et al., 1994), porém o exato mecanismo de transferência do retinol ainda precisar se confirmado.

Os carotenóides são solúveis em gorduras e são transportados no plasma ligados a lipoproteínas. São absorvidos da dieta e entra na via linfática associado com quilomícrons, e eles seguem principalmente juntos aos quilomícrons para o fígado. Os carotenóides não se acumulam nas células do fígado, mas são mobilizados como componentes do VLDL sendo convertidos a VLDL remanescentes e LDL na circulação por processo semelhante ao da formação dos quilomícrons remanescentes (Ambrósio et al., 2006)

Estudos sugerem que o caminho pelo qual o tecido adquire os retinóides seja predominantemente através do retinol transportado pela RBP, embora outros retinóides na circulação sirvam como fonte para os tecidos. Existem, entretanto, mecanismos independentes da RBP, através dos quais as células adquirem os retinóides, através do ácido retinóico livre, pelos ésteres retinólicos em quilomícrons e quilomícrons remanescentes, pelos glucoronídeos do retinol e ácido retinóico solúveis em água e pelos carotenóides, como provitamina A,

que podem ser convertidos dentro dos tecidos a retinol e ácido retinóico (Paik et al., 2004).

Os retinóides podem chegar ao sangue por diferentes formas de vitamina A. Em síntese, o retinol captado pela célula pode ser tanto oxidado para retinal pela ação de uma retinol dehidrogenase (RoLDH) ou esterificado a ésteres de retinila pela ação da lecitina:retinol acetiltransferase (LRAT). Os ésteres de retinila presentes nas células podem ser hidrolisados a retinol pela ação das hidrolases dos ésteres retilínicos (REH). Além do complexo retinol-RBP-TTR, depois da ingestão de uma refeição rica em vitamina A, pode conter grandes quantidades de ésteres de retinila nos quilomícrons e nos seus remanescentes na circulação sangüínea. Embora o fígado tenha a capacidade de captar a maioria da vitamina A da dieta, alguns tecidos captam a vitamina A da dieta presentes nos quilomícrons. Níveis baixos de retinil- β -glucoronídeos, de retinoil- β -glucoronídeos e ésteres de retinila nas lipoproteínas também são encontrados na circulação. A pró-vitamina A proveniente dos carotenóides pode ser absorvida intacta da dieta ou são encontras na circulação presentes nos quilomícrons e nas lipoproteínas. O retinal é formado tanto através da oxidação do retinol como também da clivagem dos carotenóides pela enzima clivadora de carotenóides (CCE) sendo posteriormente oxidado por uma retinal dehidrogenase (RALDH) a ácido retinóico, que pode agir dentro do núcleo da célula regulando a transcrição dos genes responsivos a vitamina A. Dentro das células, o retinol pode está ligado a proteínas ligadora de retinol tipo I (CRBP-1) e o ácido retinóico celular a proteína tipo I e II (Paik et al., 2004).

1.3.4 Funções da Vitamina A

A vitamina A (Vit A) e seus análogos são nutrientes essenciais em pequenas quantidades para o funcionamento normal do sistema visual, controle do crescimento e diferenciação, desenvolvimento normal embrionário, manutenção da integridade das células epiteliais, função imune, reprodução e morte durante toda a vida. De acordo com o tipo do tecido, órgão ou sistema orgânico, as várias formas da vitamina A podem apresentar funções

específicas (Warden et al., 1997; Quadro L et al., 2000; Ziegler TR, 2003, Blomhoff e Blomhoff, 2005).

Na função visual, a vitamina A depende do seu metabólito 11-*cis*-retinal, mas para a maioria das outras funções da vitamina A, depende do ácido retinóico, principalmente do todo-*trans*-ácido retinóico (ácido retinóico totalmente *trans*) e do 9-*cis*-ácido retinóico (Kastner et al., 1995). O ácido retinóico é formado principalmente através do metabolismo oxidativo intracelular do retinol via retinal. (Duester, 2000). O ácido retinóico desempenha papéis nas vias metabólicas celulares e em promover a diferenciação celular epitelial (Baltes et al., 2004; De Luca et al., 1972). Os efeitos celulares do ácido retinóico são mediados através da ligação a receptores nucleares específicos que servem para ativar ou inibir genes específicos requeridos pelas células, incluindo genes que codificam os hormônios, fatores de crescimento, receptores de membranas, matriz protéica extracelular, proteínas estruturais e enzimas envolvidas em diversos processos metabólicos (Chen et al., 1996, Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1994; Gudas et al., 1994).

O ácido retinóico se liga a duas famílias de receptores nucleares, os receptores do ácido retinóico (RAR) e receptores X para retinóides (RXR) (Kastner et al., 1995; Mangelsdorf e Evans, 1995). Estes dois receptores atuam sempre como heterodímeros, ou seja, um RXR com um RAR, nos elementos responsivos para o ácido retinóico e apresentam subtipos que são denominados de α , β , γ que são sintetizados por diferentes genes. Os mais encontrados na pele são o RAR-g e o RXR-a, enquanto que o principal receptor relacionado à teratogenicidade é o RAR-a. Estes receptores estão acoplados a determinadas regiões dos genes que são responsivas à ativação pelo retinol e/ou ácido retinóico. O 9-*cis*-ácido retinóico liga-se a ambos os tipos de receptores, enquanto o todo-*trans*-ácido retinóico, o mais importante ácido retinóico fisiológico, liga-se ao RAR e, apenas em altas concentrações, pode-se ligar ao RXR (Chambon, 1996). Uma vez ativados pelos seus ligantes o RAR

se liga, como heterodímeros RAR-RXR, à seqüências alvo específicas do DNA, chamadas de elementos responsivos para o ácido retinóico, acarretando mudanças na expressão de genes por interferir em efeitos biológicos (Bonet et al., 2003). Embora os mecanismos específicos de ação extracelulares dos retinóides ainda estão sendo identificados (Chen et al., 1996).

Segundo SAARI (1994), o retinal desempenha função específica no sistema visual, sendo necessário no processo de transdução da luz em sinais neurais. A absorção da luz catalisa a fotoisomerização do 11-*cis*-retinal, presente no pigmento rodopsina dos receptores *rod*, ao retinal totalmente *trans*. Tais receptores liberam sinais que ativam as células neurais associadas à porção do córtex cerebral responsável pela visão (IOM, 2001)

A capacidade de diferenciação do ácido retinóico tem despertado grande interesse pelo potencial terapêutico do mesmo para o tratamento de uma variedade de tipos de câncer (Shelton et al, 2006). Muitas das funções das moléculas de adesão são moduladas pelos retinóides, principalmente pelo ácido retinóico. Estudos têm demonstrado que o ácido retinóico é capaz de induzir uma maior diferenciação fenotípica em vários tipos de células, sendo também efetivo em reduzir, atrasar ou prevenir as transformações neoplásicas e promover a regressão em alguns tumores *in vivo* (Niles, 2000). Por conseqüência, os retinóides são utilizados como agentes quimioterápicos ou quimiopreventivos no tratamento de doenças (Freemantle et al., 2003; Lippman et al., 1995). O todo-*trans*-ácido retinóico é uma droga quimioterápica eficaz para o tratamento da leucemia promielocítica (Degos e Wang, 2001). Além disso, esta droga exibe efeito inibitório em inúmeras linhas de células de câncer de cólon (Nicke et al., 1999; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000).

Uma outra função da vitamina A ou retinol, derivada de seus precursores ou na forma encontrada no sangue, está na regulação da diferenciação celular programada durante a embriogênese e também nos tecidos adultos. Evidências sugerem que o ácido retinóico desempenha um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, estando presente nas regiões da medula

espinhal dorsal e das vértebras (Morriss-Kay e Sokolova, 1996). Está também envolvido no desenvolvimento dos membros, do coração e os aparelhos visuais e auditivos (Ross et al., 2000). O ácido retinóico inibe a proliferação celular e induz a diferenciação celular em alguns tipos de células embrionárias incluindo os hepatócitos, células endoteliais e células do músculo liso vascular (Dickman e Smith, 1996; Hofmann e Eichele, 1994; Macffery e Drager, 1995).

Experimentos realizados com animais e com várias linhas celulares sugerem que a vitamina A e seus análogos modulam vários elementos responsivos do sistema imune, dentre eles, a expressão de queratina e mucinas, linfopoiese, apoptose, produção de citocinas, função dos neutrófilos, células natural *killer*, monócitos ou macrófagos, linfócitos T e B e a produção de imunoglobulinas (Semba, 1998). A suplementação terapêutica com a vitamina A em diferentes tipos de infecção, destacando-se as doenças diarreicas, o sarampo, a malária, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV e a tuberculose, tem-se mostrado com um elevado valor terapêutico (Markowitz et al., 1989). Estudos de triagem clínica mostraram que a suplementação com altas doses de vitamina A reduz a mortalidade e morbidade em crianças com infecção aguda pelo sarampo e diminui as complicações (na pneumonia e em doenças diarreicas) associadas com a supressão imune do sarampo (Barclay et al., 1987; Hussey e Klein, 1990; Coutoudis et al., 1991; Ogaro et al., 1993; Sempa, 1999).

A vitamina A é importante para a imunidade intestinal, pois desempenha um papel específico nas células T do intestino. O ácido retinóico regula de forma direta ou indireta a atividades das células T incluindo a apoptose induzida pela ativação e desenvolvimento da resposta Th1 e Th2 (T-Helper) (Iwata et al., 1992; 2003; Yang et al., 1993; Racke et al., 1995; Hoag et al., 2002; Stephensen et al., 2002). Iwata e colaboradores mostraram em um estudo *in vitro* que a deficiência de vitamina A causa redução da integrina $\alpha 4\beta 7$ e uma depleção das células T da lâmina própria do intestino (Iwata et al., 2004). A vitamina A também desempenha um papel na produção de

glicoproteína celular e na regulação da divisão celular no intestino, influenciando na duração da renovação epitelial intestinal, depois das infecções entéricas agudas e, deste modo, na absorção de água, eletrólitos e outros nutrientes (DeLuca et al., 1972; Zile et al., 1977; Henning et al., 1992). Estudos *in vivo* demonstraram que animais com deficiência de vitamina A apresentaram mudanças no epitélio do jejuno. Neste estudo a atrofia do jejuno, induzida pelo rotavírus, foi maior nos animais com deficiência de vitamina A (Ahmed et al., 1990).

Vários estudos evidenciaram a importância dos retinóides na integridade do tecido epitelial (Kubota et al., 2001; Swartz-Basile et al., 2000; Swartz-Basile et al., 2003). Estudos em ratos submetidos à maciça ressecção do intestino delgado demonstraram que a vitamina A é necessária para a adaptação intestinal. A deficiência de vitamina A inibiu a adaptação às 48 horas e 10 dias depois da ressecção, causando aumento de apoptose e diminuição taxa de proliferação de células da cripta e redução da migração dos enterócitos (Swartz-Basile et al., 2000; Swartz-Basile et al., 2003). Estudos *in vitro* em células Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano, evidenciaram que o ácido retinóico inibiu o crescimento e estimulou a diferenciação nestas células (McCormack et al., 1996). Em células epiteliais da traquéia, estudos demonstraram que o ácido retinóico promoveu a diferenciação destas células em monocamadas de células epiteliais secretoras de muco (Jetten, et al., 1987; Rearick e Jetten, 1989).

Além disso, a vitamina A e seus ligantes, os retinóides, são importantes reguladores do trato reprodutivo epitelial de fêmeas (Gorodeski et al., 1997). Estudos *in vivo* indicaram que a deficiência de vitamina A leva a um ressecamento de mucosas, em particular da endocérvice (DeLuca, 1978). O epitélio colunar simples da endocérvice pode sofrer metaplasia escamosa em reposta à deficiência de vitamina A, seguido de uma posterior queratinização do epitélio (Elias e Williams, 1981). Nos homens, o retinol e ácido retinóico estão envolvidos na regulação da função testicular, cuja deficiência induz a

cessação da espermatogênese e afeta a produção da testosterona (Howell et al., 1963; Livera et al., 2002). Em hepatócitos, foi evidenciado que o ácido retinóico promoveu *in vitro* um efeito antiproliferativo e de diferenciação em hepatócitos normais e nos hepatócitos diferenciados (Falasca et al., 1998a, 1998b, 1999).

1.3.5 Deficiência de vitamina A

A deficiência de vitamina A (DVA) existe em mais de 120 países, tanto na sua forma clínica quanto subclínica sendo que, nas últimas três décadas, vem sendo reconhecida como um grave problema de saúde pública em vários lugares do mundo e que acomete, principalmente, recém-nascidos, crianças em idade pré-escolar, puérperas, mulheres grávidas e lactantes (Stoltzfus et al., 1993, Underwood, 1998; WHO, 1995). Estima-se que em torno de 140 a 250 milhões de crianças em idade pré-escolar apresentam risco de deficiência subclínica de vitamina A; três milhões possuem deficiência clínica de vitamina A e, anualmente, mais de um milhão de mortes na infância estão associadas à deficiência de vitamina A (WHO, 1995).

Nas crianças, a DVA é freqüentemente associada às infecções como o sarampo, gerando quadros de xeroftalmia e conseqüências mais graves, devido a elevação dos riscos de infecção e mortalidade (Sommer et al., 1986; Sommer e West, 1996; Rahmathullah et al., 1990; Reddy, 1991). Além disso, estudos mostram que a carência de vitamina A no início da vida, como nos recém-nascidos e nos lactentes, está associada com condições desfavoráveis para o desenvolvimento infantil (Taucher, 1992). Estima-se que as manifestações clínicas afetem de 5 a 10 milhões de crianças por ano, em sua maior parte nos países em desenvolvimento (Underwood, 1990) e que a deficiência subclínica, definida como o estágio em que ainda não há sinais clínicos de carência, mas que gera alterações metabólicas com conseqüências graves para a saúde e sobrevivência infantil, possa afetar cerca de 230 milhões de crianças, resultando em 250.000 a 500.000 novos casos de cegueira irreversível a cada ano (WHO, 1995).

A avaliação clínica da deficiência de vitamina A só se torna evidente quando ela progride para um estágio severo, ficando limitada à detecção inicial da deficiência de vitamina A. Valores de retinol sanguíneo $\leq 0,35 \mu\text{M}$ indicam severa deficiência de vitamina A, entre $0,36- 0,70 \mu\text{M}$ indicam uma moderada deficiência, entre $0,71- 1,05 \mu\text{M}$ uma leve deficiência e maior do que $1,05 \mu\text{M}$ indicam níveis suficientes de vitamina A (Underwood, 1994)

Em nível epidemiológico, a WHO (1995) estabelece critérios para caracterizar a hipovitaminose A como um problema de saúde pública. A prevalência de 20% ou mais da população com valores de retinol sérico inferiores a $0,70\mu\text{mol/L}$ constitui deficiência grave; entre 10-19% é classificada como deficiência moderada e abaixo de 10% em deficiência leve. Entretanto, a literatura aponta que o ponto de corte $0,70\mu\text{mol/L}$ não é suficientemente sensível para a detecção da deficiência marginal. As evidências com relação ao impacto da deficiência subclínica sobre os índices de morbi-mortalidade, sobretudo em crianças, têm conduzido a uma reflexão sobre os pontos de corte e a interpretação da curva de distribuição de valores de retinol sérico (Ramalho et al., 2002). Os achados até então acumulados apontam o nível de retinol sérico de $1,05 \mu\text{mol/L}$ como o limite entre o estado de adequação e a condição marginal da deficiência de vitamina A, com base em observações do comportamento do retinol sérico por meio de testes terapêuticos e da resposta relativa à dose (RDR) (Flores et al., 1991; Flores, 1992; Flores, 1993). Outros métodos de diagnóstico também são realizados, como teste modificado de resposta relativa à dose (MRDR), concentração de vitamina A no leite humano, avaliação histológica através da citologia de impressão conjuntival e avaliação fisiológica através do diagnóstico da cegueira noturna, embora esse indicadores não sejam totalmente corretos para avaliar a DVA em certos locais devido a escassez de dados e inquéritos na região (McLaren e Frigg, 1999; WHO, 1996).

Em vários países, pesquisas foram realizadas com base nos níveis de retinol sérico e na prevalência de sinais oculares e nos sintomas da deficiência

de vitamina A, objetivando-se categorizar as regiões dos países em: regiões de DVA clínica, subclínica grave e subclínica moderada (WHO, 1995). No ano de 2000, os países passaram também a ser categorizados, considerando a disponibilidade da informação. No continente Africano, encontram-se países como Zimbábue, Angola e Moçambique, que foram classificados como regiões de DVA clínica e subclínica. No continente Americano, nenhum país foi classificado como áreas de DVA clínica. Todos os países do sudoeste da Ásia foram considerados áreas de DVA ou com possibilidade. Países como Blangladesh, Nepal, Índia, Sri Lanka, foram considerados como regiões DVA clínica, enquanto na Indonésia e Tailândia, regiões de DVA subclínica. No continente Europeu, França, Portugal, Itália e Reino Unido foram classificados como regiões com insuficiência de dados mais com presença provável de DVA. No oeste do pacífico, Comboja, Mongólia e Micronésia foram considerados áreas de DVA clínica. Países como Brasil, Guatemala e Peru, foram clasificados como regiões de DVA subclínica (**Figura 05**) (MacLaren e Frigg, 1999, WHO, 1995).

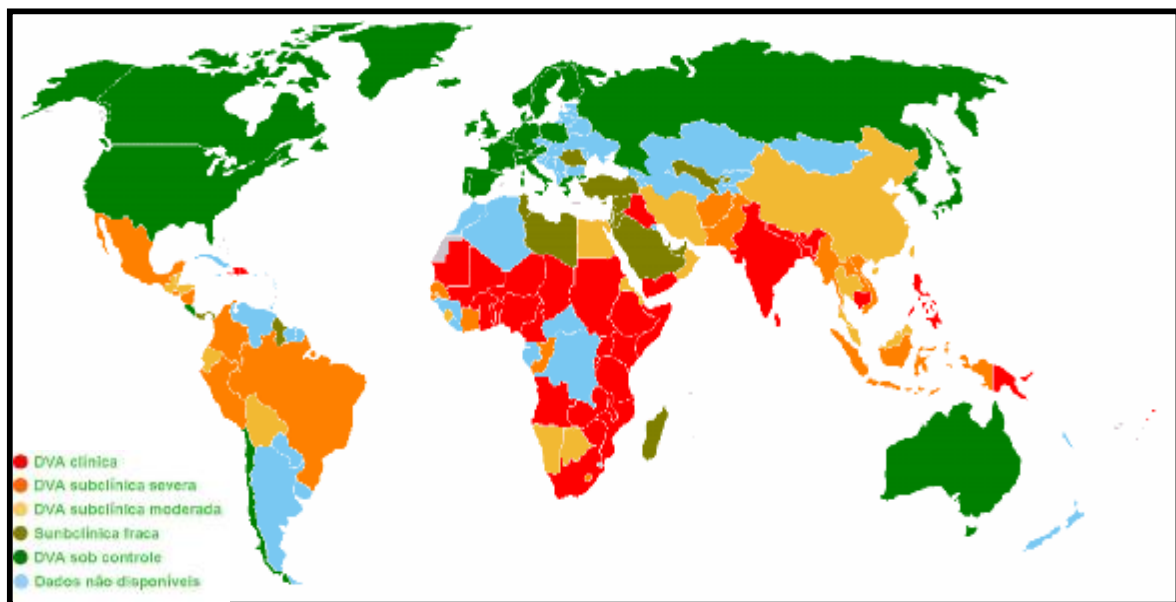


Figura 05: Deficiência da vitamina A no mundo. Mapa mostrando à classificação dos países quanto à deficiência de vitamina A - DVA (clínica

subclínica severa subclínica moderada, subclínica fraca, DVA sob controle e dados não disponíveis). Fonte: WHO, 2001

No Brasil, estudos sobre a prevalência de hipovitaminose A, avaliada através de indicadores bioquímicos e sinais clínicos da deficiência, confirmam que este é um problema com magnitude de saúde pública em todo país, principalmente na região do Nordeste, como em Pernambuco (Flores et al., 1991), Ceará (Mcauliffe et al., 1991), Paraíba (Santos et al., 1983) e Bahia (Assis et al., 1997). Em outras regiões do país também foram encontradas prevalências indicativas de um preocupante problema de saúde, como em São Paulo (Carvalho et al., 1995), Ribeirão Preto (Carvalho et al., 1979), Vale do Jequitinhonha (Araújo et al., 1986), Marabá (Trigo, 1985), e em outras localidades de São Paulo (Roncada, Mazzilli, 1989) e na região Amazônica (Ramalho et al., 2002). Porém, no Nordeste há elevada prevalência da carência clínica (presença de sinais e sintomas oculares) em lactentes, escolares e pré-escolares (WHO, 1995a).

A deficiência de vitamina A pode ser causada por dois fatores principais. O primeiro por uma persistente ingestão inadequada de vitamina A para satisfazer às necessidades orgânicas, tanto em crianças como em indivíduos adultos, prejudicando as funções fisiológicas, ainda que os sinais clínicos de carência não sejam evidentes (OMS, 1982; Flores, 1984; Araújo, 1984; Blomhoff, 1991; OMS, 1992; Underwood, 1993; Brünken e Flores, 1993; Coelho et al., 1995; WHO, 1995). Isto é freqüentemente exacerbado por circunstâncias secundárias, como um insuficiente consumo de gordura na dieta, levando a uma ineficiente absorção deste micronutriente (Dimitrov et al., 1988; Blomhoff, 1991). Para Sommer (1995), uma variedade de razões justifica o consumo insuficiente desta vitamina, sobretudo a falta de conhecimento e a não preferência pelos alimentos ricos em vitamina A, seja pelo seu custo ou hábito alimentar. Com exceção das situações de extrema pobreza, a renda e escolaridade parecem não ser fatores determinantes do estado nutricional de vitamina A, reforçando a tese de que a ingestão inadequada de alimentos fonte

de vitamina A seja o principal fator etiológico da carência desta vitamina, e que sua exclusão ou baixo consumo estejam mais relacionados a hábitos alimentares inadequados do que a fatores econômicos (Brünken e Flores, 1993; Brünken e Flores, 1994; Coelho et al, 1995; Ramalho e Saunders, 2000).

O segundo fator causador da deficiência de vitamina A é a frequência de episódios infecciosos. Para Scrimshaw e colaboradores (1968), nenhuma outra deficiência nutricional apresenta maior sinergismo com doença infecciosa que a carência de vitamina A, pois tal condição nutricional confere uma susceptibilidade maior às infecções, principalmente àquelas que dizem respeito ao epitélio mucoso secretor (Reddy, 1986; Sivakumar 1972; Arroyave e Calcaño, 1979; Darlow e Graham, 2000) e, por outro lado, certas infecções parecem favorecer o desenvolvimento da deficiência clínica de vitamina A, através de uma diminuição dos níveis de retinol circulantes, por uma espécie de “seqüestro de vitamina A” (Ramalho e Dolinsky, 2003).

Sabendo-se que o retinol é um indicador útil da concentração de vitamina A, sua dosagem pode ser usada para identificar indivíduos com estoques no fígado diminuídos ou esgotados de vitamina A (Gibson, 1990; Underwood, 1994) Entretanto, as concentrações de retinol sanguíneo diminuem transitoriamente durante uma resposta de fase aguda a infecção, assim esta diminuição não reflete as reais mudanças nos estoques de vitamina A no fígado, podendo interferir no uso do retinol sanguíneo como indicador da concentração de vitamina A (Filteau et al., 1993; Ross e Stephensen, 1996; Thurnham, 1997; Mitra et al., 1998). Quanto mais grave for a infecção, maior será a diminuição do retinol sanguíneo. E por ser transitória, esta diminuição retorna para os níveis da pré-infecção dentro alguns dias (Mitra et al., 1998). Acredita-se que a principal razão para a diminuição do retinol durante a infecção relativamente leve, é que a síntese do RNAm da proteína ligado do retinol (RBP) pelo fígado esteja diminuída durante uma reação de fase aguda, resultando na diminuição da liberação do retinol-RBP pelo fígado (Rosales et al., 1996). Desta forma, a interpretação de dados das concentrações de

nutrientes na circulação como a vitamina A fica então dificultada com a presença de infecções (Brown et al., 1993; Beisel, 1976), e por isso tem-se sugerido que as proteínas de fase aguda possam ser utilizadas para interpretar os dados de retinol sérico em populações com alta prevalência de infecções (Filteau et al., 1993; Paracha et al., 2000; Quadro et al., 2000).

As alterações epiteliais e no sistema imune podem causar aumento da gravidade de algumas infecções e risco de morte, especialmente entre as crianças (Ross, Hammerling, 1994; Fiteau et al., 1999). Várias patologias são citadas na literatura como sendo fatores que podem influenciar o metabolismo da vitamina A, merecendo destaque as diarreias agudas, as infecções respiratórias, a tuberculose e o sarampo (Reddy, 1986; Sivakumar 1972; Arroyave, Calcaño, 1979; Underwood, 1984; Reddy, et al., 1986). Dados do Ministério da Saúde (2000) mostraram que a carência de vitamina A está associada a 23% das mortes por diarreia em crianças brasileiras. Na deficiência de vitamina A, a integridade das barreiras epiteliais e o sistema imune são comprometidos antes das alterações da função do sistema visual, o que caracterizaria a deficiência subclínica ou marginal de vitamina A (Vijayaraghavan et al., 1990; Sommer, 1995). Quando a depleção de vitamina A é suficiente para afetar a função visual, primeiro ocorre cegueira noturna devido à diminuição da capacidade orgânica em regenerar a rodopsina, que é essencial para a visão em baixa luminosidade. Isto é acompanhado por alterações do epitélio ocular e resulta em xerofthalmia (olho seco) que pode afetar a conjuntiva (xerose da conjuntiva e mancha de *Bitot*) e a córnea (xerose de córnea) podendo conduzir a úlcera de córnea, por invasão microbiana e, finalmente, cegueira parcial ou total (queratomalácia) (Sommer, 1995). Desta forma, o impacto da carência de vitamina A em outras funções metabólicas, além da visão, foi, durante muito tempo, ignorado, apesar dos conhecimentos obtidos em experimentação animal.

As conseqüências fisiológicas da deficiência de vitamina A, como cegueira noturna e anormalidades na diferenciação do epitélio conjuntival,

geralmente começam a ocorrer em níveis de retinol sérico abaixo de 1,0 µmol/L e, especialmente, abaixo de 0,70 µmol/L. A xeroftalmia pode ocorrer em níveis abaixo de 0,70 µmol/L, porém torna-se mais freqüente em níveis abaixo de 0,35 µmol/L (Sommer, 1995). Desta maneira, a carência de vitamina A pode levar a várias conseqüências como cegueira noturna, xeroftalmia, xerodermia e hiperqueratose folicular. Além das alterações oculares, o retardo no crescimento (Sommer, 1989), o aumento da susceptibilidade às infecções e o aumento do risco de doenças respiratórias e diarréicas, são outras graves conseqüências da deficiência de vitamina A (Sommer et al., 1987). Na maioria das vezes, a deficiência de vitamina A aparece associada à desnutrição protéico-energética (Carlier et al., 1991), sendo que as formas avançadas da hipovitaminose A podem evoluir para o óbito. Todos esses dados têm suscitado um elevado interesse na comunidade científica pela grande importância dos resultados e suas conseqüências para a saúde pública (Ramalho et al., 2002; West et al., 1989)

1.4 Vitamina A e ciclo visual

Na história da vitamina A observa-se que a cegueira noturna foi pela primeira vez descrita no Egito cerca de 1500 a.C., não sendo, entretanto associada à deficiência dietética. Hipócrates aconselhava para seu tratamento o emprego tópico com fígado tostado ou frito, assim como a ingestão desse órgão. Desta maneira, há muito tempo, sabe-se que a deficiência de vitamina A interfere na visão em ambientes pouco iluminados, sendo conhecida como cegueira noturna (nictalopia) (Wald, 1968).

As células especializadas da retina, denominadas de bastonetes (sensíveis à luz de baixa intensidade) e cones (receptores à luz de alta intensidade), são responsáveis pela fotorrecepção. Dois tipos de fotoreceptores estão presentes na retina: rodopsinas e iodopsinas. A primeira etapa consiste na absorção de luz por um cromóforo (11-*cis*-retinal) ligado à proteína receptora. O holorreceptor nos bastonetes é a rodopsina, uma combinação da

proteína opsina e do 11-*cis*-retinal ligados a um grupo prostético (Olson, 1984; Lamb e Pugh Jr, 2004).

Durante a síntese de rodopsina, o 11-*cis*-retinol é convertido em 11-*cis*-retinal, uma reação reversível que requer a presença de nucleotídeos de piridina. O seguinte passo é a combinação do 11-*cis*-retinal com o grupo ϵ -amino de um resíduo específico de lisina na opsina, formando rodopsina (Blomhoff e Blomhoff, 2005).

O ciclo visual (**Figura 06**) inicia-se com a absorção de um fóton de luz, seguida de fotodecomposição ou descoramento da rodopsina que desencadeia uma cascata de estados conformacionais instáveis resultando na isomerização do 11-*cis*-retinal em retinal totalmente *trans* e uma hidrólise da ligação covalente entre o retinal totalmente *trans* e a opsina, provocando a dissociação (Olson, 1984; Lamb e Pugh Jr, 2004). A rodopsina ativada interage rapidamente com outra proteína do seguimento externo do bastonete retiniano, denominada transducina. A transducina estimula uma fosfodiesterase do GMP cíclico, e isto resulta em declínio na concentração de GMP cíclico provocando a diminuição na condutância dos canais de Na⁺ e aumento do potencial de membrana. Após processamento no interior do circuito retiniano, este potencial do receptor primário provoca a geração de potenciais de ação que se dirigem até o cérebro através do nervo óptico (Stryer, 1991, Saari, 1994). Deste modo, o retinal totalmente *trans* pode sofrer isomerização direta para 11-*cis*-retinal que ainda pode recombinar-se com a opsina, formando rodopsina. Com também, o retinal totalmente *trans* pode ser reduzido a retinol totalmente *trans*, que é inicialmente convertido em 11-*cis*-retinol e, em seguida, em rodopsina (via anteriormente descrita) (Zile e Cullum, 1983; Olson, 1984; Lamb e Pugh Jr, 2004). Desta forma, a vitamina A é essencial na formação dos pigmentos visuais e, portanto, na prevenção da cegueira noturna (Olson, 1984).

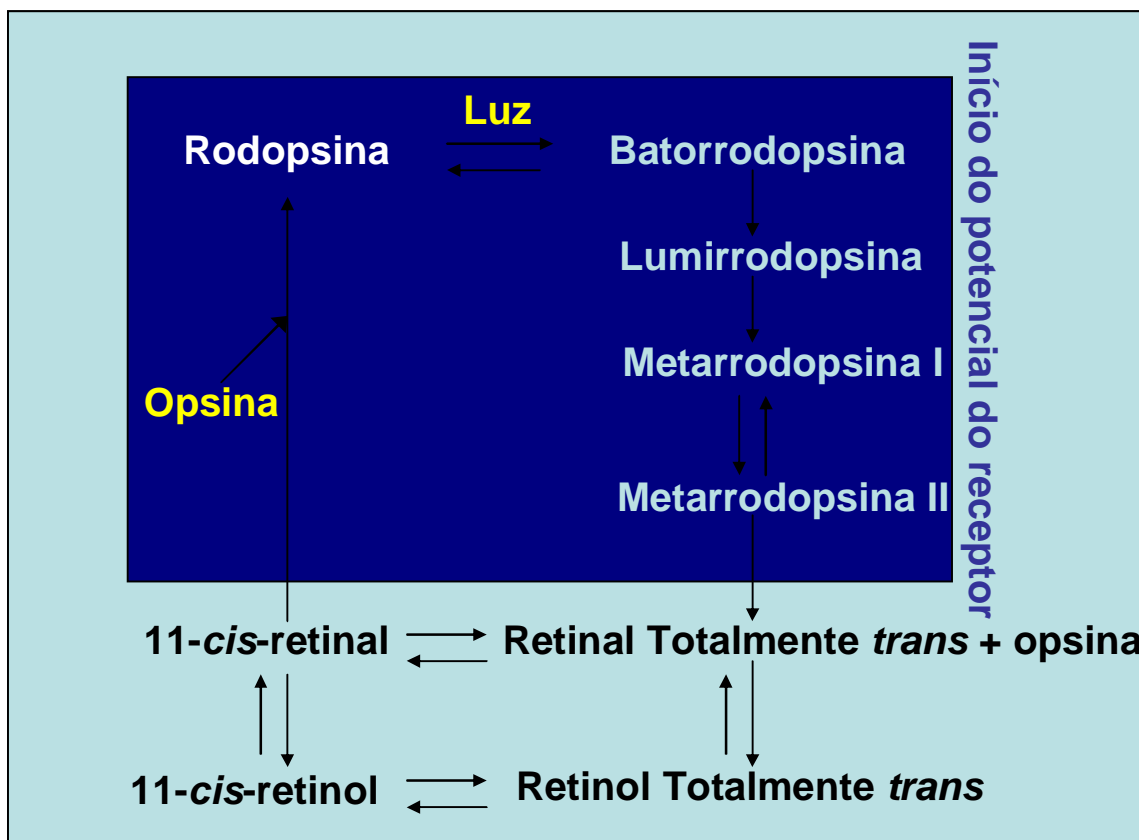


Figura 06: Papel dos retinóides no ciclo visual. O passo inicial do ciclo visual ocorre imediatamente após a absorção de um fóton de luz pelo cromóforo 11-*cis*-retinal, presente dentro da molécula de pigmento visual (rodopsina), que é isomerizado para configuração totalmente *trans*, ativando a cascata de fotontransdução que resulta, em última análise, na formação do retinal totalmente *trans* e dissociação do componente opsina. Deste modo, o retinal totalmente *trans* pode sofrer isomerização direta para 11-*cis*-retinal que pode recombinar-se com a opsina, formando rodopsina. Assim como também, o retinal totalmente *trans* pode ser reduzido a retinol totalmente *trans*, que é inicialmente convertido em 11-*cis*-retinol e, em seguida, em rodopsina. Fonte: Adaptado de Goodman & Gilman, 2007.

1.5 Regulação do ciclo celular pela vitamina A

A regulação das proteínas do ciclo celular por sinais extracelulares como fatores de crescimento e disponibilidade de nutrientes é de fundamental importância para os processos patológicos e normais do organismo. O papel dos micronutrientes, como a vit A, no controle da progressão do ciclo celular ainda não é bem compreendido em relação à importância que os macronutrientes como os carboidratos, proteínas e os ácidos graxos exercem como combustíveis essenciais às células e no organismo como todo (Bohnsack e Hirschi, 2004).

O ciclo celular é uma série ordenada de eventos que está dividido em quatro fases: gap 1 (intervalo) (G_1), síntese (S), gap 2 (intervalo) (G_2) e mitose (M) (**Figura 07**). Cada fase é caracterizada por distintos processos celulares que são requeridos para o processo de divisão celular e formação de ciclinas, como também para a formação do complexo ciclina-quinases dependentes ou proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK) que regula as fases de transição, onde sua ativação enzimática é promovida pela ligação às ciclinas. O complexo ciclina-CDK regula a atividade de múltiplas proteínas envolvida na replicação do DNA e na mitose, fosforilando-as em sítios específicos, ativando algumas e inibindo outras para coordenar os eventos do ciclo celular. A passagem de cada uma destas fases é regulada pelos “pontos de controle”, um no início da fase S e o segundo no início da fase M. Então, para que as fases ocorram em uma seqüência determinada, o controle do ciclo celular por meio de “freios moleculares” pode parar o ciclo em vários pontos de checagem, pontos específicos do ciclo que permitem o desencadeamento do próximo passo somente após o término do estágio precedente (Bohnsack e Hirschi, 2004).

Os complexos ciclinas-CDKs podem ainda ter sua montagem ou atividade bloqueada por proteínas inibidoras de CDK. Como por exemplo, na parada que ocorre no ponto de chagem G_1 , quando o DNA está danificado; a proteína inibidora de CDK denominada p21 se liga ao complexo ciclina-CDK de fase S, responsável pelo avanço para a fase S, bloqueando a sua ação, então a célula não avançará enquanto o DNA não for reparado (Bohnsack e Hirschi, 2004).

Estímulos externos, como nutrientes, e sinais internos, como por exemplo, o dano celular, regula a formação de complexos inibidores de CDK, o qual inclui a família cip/waf (proteínas inibidoras da ciclina-quinases dependente) (p21, p27, p57). A família cip/waf interage com múltiplos complexos ciclinas-CDK e a família INK4 (inibidores de quinases) (p15, p16, p18, p19), os quais especificamente inibem o complexo ciclina D-CDK (Hartwell e Kastan, 1994; Sherr e Roberts, 1999). Deste modo, a atividade das CDKs é regulada por inibidores das CDKs. No primeiro ponto de controle (ponto de controle 1) da proteína Rb (retinoblastoma) atua como freio, e já a ciclina D libera da esta parada. A proteína Rb desempenha esta função através de sua ligação aos fatores de transcrição E2F, que controlam a expressão dos genes que codificam a ciclinas E e A e a DNA polimerase, entre outros elementos essenciais para a replicação do DNA durante a fase S. Assim, a E2F ativa a transcrição de específicos genes, incluindo a ciclinas, necessárias para a próxima fase de transcrição, como também as enzimas requeridas para a síntese de DNA, como a timidina quinase e dihidrofolato redutase. Se houver alguma lesão do DNA, os produtos dos genes de supressão tumoral p53 interrompem o ciclo no ponto de controle 1, permitindo que haja o reparo, ativando a transcrição p21 para inibir a progressão celular. Caso este processo falhe, inicia-se o processo de apoptose (morte celular programada) (Bohnsack e Hirschi, 2004).

A vitamina A ou retinol, derivada de seus precursores ou na forma encontrada no sangue, regula a diferenciação celular programada durante a embriogênese e também nos tecidos adultos. O retinol através de uma série de passos enzimáticos converte-se em vitamina A ativa, sendo formado o *todo-trans*-ácido retinóico como também seus diferentes isômeros *9-cis* e *13-cis* (RA) (Clagett-Dame e DeLuca, 2002; Ross et al., 2000). Os efeitos do *todo-trans*-ácido retinóico são mediados por receptores nucleares do tipo RARs e RXRs, membros da família dos receptores nucleares hormonais. O *todo-trans*-ácido retinóico é um ligante direto para três classes dos receptores RARs (α , β , γ). Da mesma forma existem também três classes para os receptores RXRs (α , β , γ), o qual o isômero *9-cis* RA liga-se diretamente a eles. A ativação dos genes transcricionais pelo *todo-trans*-ácido retinóico requer uma heterodimerização dos receptores RAR e RXR e a ligação destes complexos aos elementos responsivos do *todo-trans*-ácido retinóico (RAREs). As isoformas dos receptores (RARs e RXRs) têm padrões de expressão diferentes gerando várias combinações de heterodímeros RARs e RXRs que podem regular e modular a transcrição de diferentes genes-alvos contendo os elementos responsivos ao receptor do ácido retinóico (Clagett-Dame e DeLuca, 2002; Ross et al., 2000).

Estudos mostraram que durante a embriogênese do rato, o ácido retinóico induz a expressão p21 e p27 nas células endoteliais primordiais, gerando conseqüentemente interrupção G₁ (**Figura 07**) (Bohnsack e Hirschi, 2004). Outros estudos com realizados com células progenitoras (*stem cells*) de embrião demonstraram que o ácido retinóico eleva os níveis de p53 e acelera a diferenciação neural (Alisi et al., 2003; Lai et al., 2003). Já em outras linhagens celulares, o ácido retinóico atua na manutenção da proliferação celular, como no coração onde o ácido retinóico induz fatores tróficos que estimulam a ciclina D1 e a proliferação do cardiomiócito. Desta forma, o ácido retinóico desempenha, durante o desenvolvimento embrionário, ações diferentes na regulação da proliferação dependendo do tipo de célula (Dimberg et al., 2003; Stuckmann et al., 2003). A importância do ácido retinóico como indutor da

diferenciação celular em tecidos adultos, foi melhor identificada na prevenção e tratamento de condições patológicas, como durante a tumorigênese. Estudos relatam que o ácido retinóico apresenta efeitos antiproliferativo em inúmeros tipos de tumores, dentre eles, câncer de próstata, de tireóide, de mama, leucemias mielóides, entre outros (Bohnsack e Hirschi, 2004). O ácido retinóico inibe a vascularização da monocamada de células musculares e promove a diferenciação através da regulação das ciclinas D3 e E, CDK2, CDK4 E CDK6, resultando na hipofosforilação do Rb e a inibição da progressão celular da fase G1 para a fase S (Pakala e Benedict, 2000; Kosaka et al., 2001; Axel et al., 2001). O ácido retinóico induz específicas mudanças ao nível das ciclinas, CDK e CK1 agindo diferentemente em cada tumor e tipo celular (Yuza et al., 2003). Em síntese, o ácido retinóico induz a diferenciação celular programada e regula os inibidores da proliferação em vários tipos de células durante o desenvolvimento, em tecidos adultos e regulando também a progressão de tumores (Bohnsack e Hirschi, 2004).

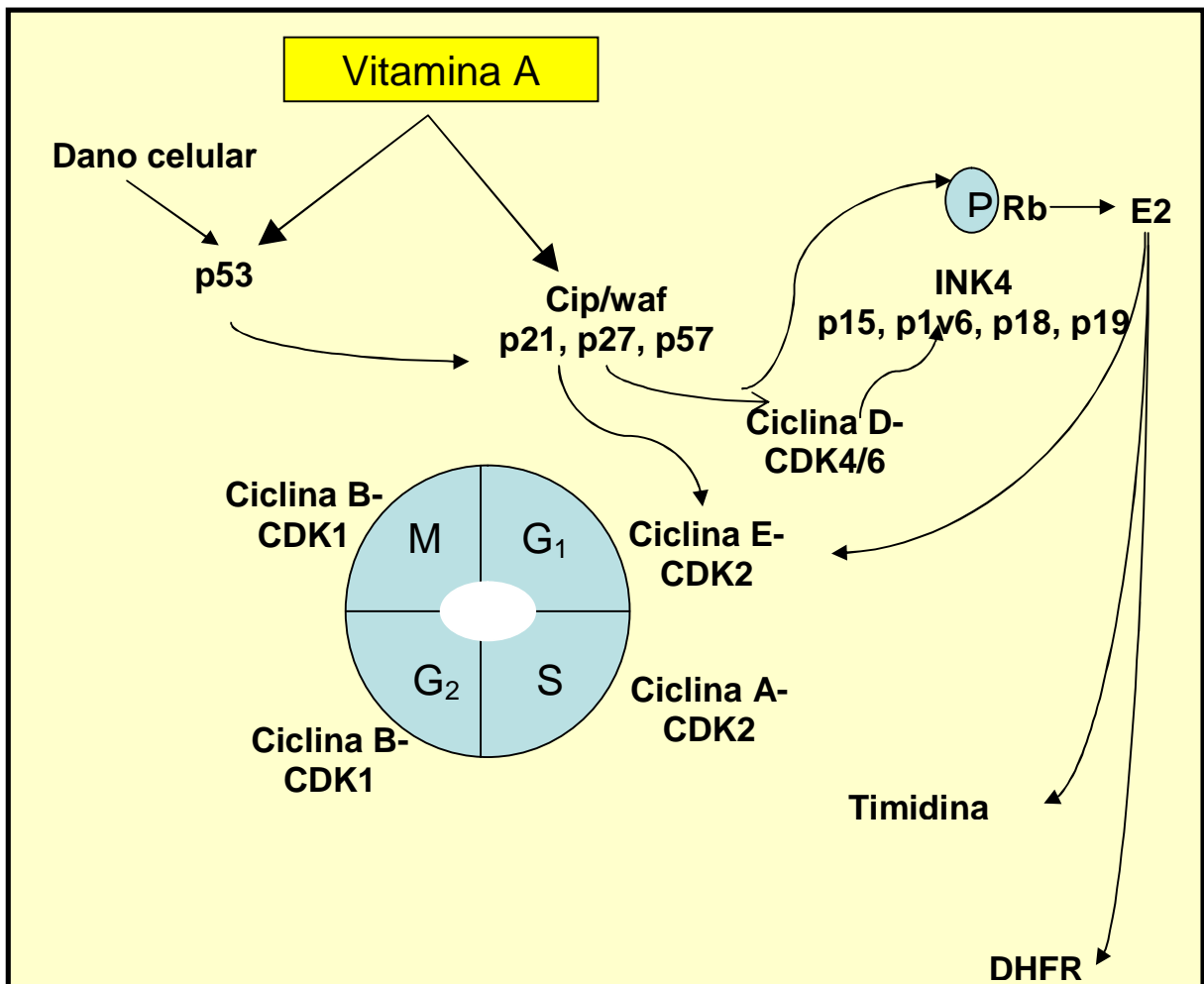


Figura 07: Regulação das proteínas do ciclo celular pela Vitamina A. Os nutrientes, como a vitamina A, regulam o crescimento celular através de uma regulação direta das proteínas do ciclo celular. A vitamina A, derivada do ácido retinóico, regula a proteína inibidora de CDK denominados p21 e p27, como também a de proteína supressão tumoral, p53, resultando na diminuição da formação dos complexos ciclina-CDK, com conseqüente impedimento da fosforilação da proteína Rb, provocando a interrupção do ciclo no ponto de controle G₁. Deste modo, o ácido retinóico regula as ciclinas e os inibidores de ciclinas, inibindo a progressão do ciclo celular na fase G₁, mediando à diferenciação das células tumorais, e, portanto, induzindo a diferenciação celular programada e está envolvida na inibição da proliferação celular em múltiplos tipos de células durante o desenvolvimento. S = síntese; M: mitose;

G₂ = gap (intervalo) 2; G₁ = gap (intervalo) 1; Rb= retinoblastoma; R2; CDK= proteínas quinases dependentes de ciclina; ciclina-CDK = complexo ciclina-quinases dependentes; cip/waf = família de proteínas inibidoras do complexo ciclina-quinases dependente (p21, p27, p57); INK4 = família de proteínas inibidores de quinases (p15, p16, p18, p19); DHFR = dihidrofolato redutase; E2F: fator de transcrição E2F. Fonte: Adaptado de Bohnsack & Hirschi, 2004.

1.6 Vitamina A e a morte celular

A apoptose, uma série programada de eventos que leva a morte celular, desempenha um importante papel no desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos em organismos multicelulares, como também na resposta ao dano celular. Intensas pesquisas têm sido realizadas para explorar os mecanismos moleculares das vias de sinalização incluindo a iniciação, mediação, execução e regulação da apoptose. A necrose difere da apoptose pois consiste em uma desintegração desorganizada de células lesadas, resultando em produtos que desencadeiam a resposta inflamatória. As caspases, uma família de cisteína proteases, são os principais fatores atuantes para morte celular. Uma cascata com cerca de 9 caspases diferentes atuam na produção da apoptose, algumas atuam como papel de iniciadores e outras são responsáveis pela fase efetora final da morte celular. Existem duas vias principais para a apoptose, chamadas de via extrínseca (via receptores de morte) e a outra é a via intrínseca (a via mitocondrial). Ambas as vias ativam as caspases iniciadoras e convergem para uma via final comum de caspases efectoras (Jin e El-Deiry, 2005).

A apoptose é desencadeada por vários estímulos, os quais, então, ativam todo o conjunto de elementos para execução da apoptose (Hetts, 1998). Nos enterócitos, os sinais que induzem a apoptose incluem, drogas quimioterápicas, a privação de micronutrientes como a glutamina (Papaconstantinou et al., 1998), radiação ionizante (Potten e Booth, 1997), microrganismos (McCole et al., 1999), reações imunes (Iwamoto et al., 1996). Todos podem aumentar a taxa de apoptose das células intestinais epiteliais.

Esses estímulos ativam a família de cisteína aspartato proteases (caspases) que são responsáveis pela execução da fase de apoptose (Van Damme et al., 2005). Nos mamíferos, treze caspases tem foram identificadas e podem ser classificadas dentro de três subfamílias, com base na homologia de suas sequências: a subfamília ICE (caspase 1, caspase 4 e caspase 5), a subfamília CPP32 (caspase 3, caspase 6, caspase 7, caspase 8 e caspase 10) e subfamília ICH-1 (caspase 2 e caspase 9), ainda existem, porém não são muitos conhecidas e foram recém-descobertas, as caspase 11, 12 e 13 (Siendones et al., 2005). Cada caspase é sintetizada e seqüestrada intracelularmente como pró-enzimas, e essas são ativadas por clivagem proteolítica, que desta maneira, inicia o sinal apoptótico pela ativação de outras caspases em forma de cascata. Como exemplo de caspases iniciadoras destacam-se a caspase 8 (ativada pela via mediada pelo ligante Fas) e a caspase 9 (ativada pelo citocromo c) e das caspases efetoras, as caspases 3 e 6 (Mates et al., 2006).

A via extrínseca ou via receptores de morte é mediada por um subgrupo da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF) chamada de receptores de morte (TNFR1, Fas e TRAIL). A morte celular mediada por receptores é iniciada pelo recrutamento de proteínas adaptadoras como FADD, as quais se ligam às pró-caspases para gerar o complexo de sinalizações que induz a morte resultando na ativação da caspase 8. A caspase 8 cliva, e por sua vez, ativa as caspases efetoras (caspase 3), enzima que executa a apoptose. Além disso, a proteína Bid, proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2, amplifica a cascata de caspases pela conexão da via dos receptores da morte com a via apoptótica mitocondrial, relacionando-se via caspase 8 e caspase 9 (Nunez et al., 1998; Zamzami et al., 2000; Mates et al., 2006).

A via intrínseca ou mitocondrial de morte celular pode ser ativada através de duas vias principais: lesão do DNA e deprivação dos fatores de sobrevivência celular. Na presença do dano ao nível do DNA, cujo reparo não é possível, a proteína p53 (fator de transcrição proteico que desencadeia a apoptose) e ativa uma subvia envolvendo a via p21 (proteínas inibidoras de quinases) e membros pró-apoptóticos da família da proteína Bcl-2 (Bax e Bak), como também outros membros anti-apoptóticos, que são translocados para a mitocôndria. A proteína Bid, ativa Bax (pró-apoptótica) e Bak, e resulta na liberação do citocromo c no citosol. O citocromo c liberado forma um complexo com a proteína Apaf-1 (fator de ativação de proteases apoptótico-1), e os dois combinam-se então com a pró-caspase 9, ativando-a. A liberação do apoptossoma (conjunto de três componentes composto do citocromo c, Apaf-1 e procaspase 9) gera subsequentemente a ativação da caspase 3 com consequente morte da célula, podendo-se observar características morfológicas e bioquímicas da morte celular, incluindo arredondamento celular, contração do citoplasma, condensação da cromatina do núcleo, fragmentação do DNA, levando a um estágio final de remoção das células por fagocitose pelos macrófagos **(Figura 08)** (Denicourt e Dowdy, 2004; Mates et al., 2006).

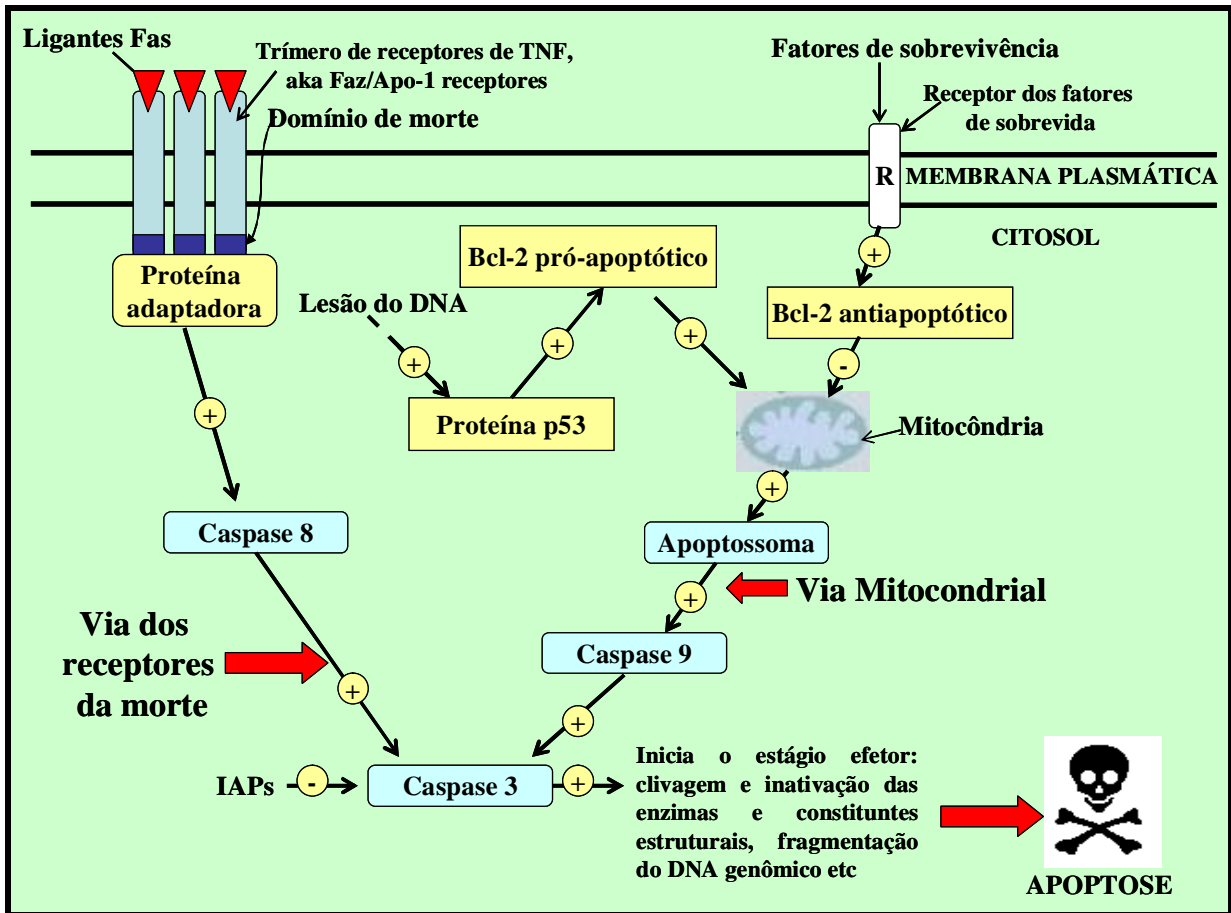


Figura 08: Vias de sinalização na apoptose. A via dos receptores de morte é ativada quando receptores de morte são estimulados por ligantes de morte específicos. Esse processo requer proteínas adaptadoras que atuam as caspases iniciadoras que por sua vez ativam as caspases efetoras, como as caspase 3. A via mitocondrial é ativada por diversos sinais, destando a lesão de DNA. Na presença de lesão do DNA cujo reparo não é possível, a proteína p53 ativa uma subvia que resulta na liberação do citocromo c da mitocôndria, com subsequente atuação do apoptossoma (complexo pró-caspase 9, citocromo c e fator de protease de ativação apoptótico 1, Apaf-1) e ativação de uma caspase iniciadora, a caspase 9. Ambas as vias convergem para a caspase efetora, que leva a morte celular. A subvia dos fatores de sobrevivência ativa um membro antiapoptótico da família Bcl-2. O receptor “R” representa os receptores tróficos, sendo necessário a estimulação contínua desses (IAP:

inibidor das proteínas da apoptose) e caso esta via não for funcional o impulso antiapoptótico é retirado. Fonte: Adaptado de RANG HP et al., 2004.

Wang e colaboradores mostraram que, em modelos *in vivo* utilizando ratos pós-ressecção do intestino delgado, o ácido retinóico induziu a inibição da apoptose sendo associada com redução significativa da expressão da proteína Bax no íleo e dos níveis de RNAm da caspase efetora, caspase 3 (Wang et al., 2007). Estudo utilizando o β -caroteno, pró-vitamina A encontrada nos carotenóides, em cultura de células HT29, células de carcinoma de cólon humano, sugeriu que a toxicidade induzida por altas concentrações de β -caroteno, ocorreu por morte celular via apoptose, e esse mecanismo parece não está relacionado com a modulação da atividade de proteínas como p21, p53 e ERKS (quinases extracelulares reguladas por sinais), indicando que outras vias de sinalização são responsáveis pela indução da apoptose. (Briviba et al., 2001). Um outro estudo conduzido por Maziere e colaboradores, mostrou que a vitamina A *in vitro* induziu a apoptose pela fragmentação de DNA em células de tumor colônico, sugerindo que a suplementação dietética de vitamina A poderia prevenir o desenvolvimento do câncer de colón (Maziere et al., 1997).

1.7 Vitamina A e barreira funcional intestinal

A vitamina A e seus metabólitos são reguladores nutricionais essenciais para inúmeras funções fisiológicas, sendo particularmente importante no crescimento, diferenciação e integridade das células epiteliais intestinais (Nau e Blaner, 1999). A importância da vitamina A na manutenção do epitélio do intestino delgado tem sido demonstrada em vários estudos em animais (Holland et al., 1993; Warden et al., 1997; Zile et al., 1977).

Estudos *in vivo* em ratos, galinhas e cordeiros mostraram, a níveis morfológicos e bioquímicos, os efeitos da deficiência de vitamina A no intestino delgado destes animais e destacaram o papel nutricional da vitamina

A na função da integridade intestinal (Holland et al., 1993; Reifen et al., 1998; Uni et al., 1998). A deficiência de vitamina A em ratos reduziu significativamente a altura do vilos e as atividades da maltase e sucrase (Warden et al., 1996; Zaiger et al., 2004). A deficiência de vitamina A também está associada com o impedimento da migração celular da cripta e impedimento da síntese protéica na mucosa no nível traducional (Zile et al., 1977). Além disso, vitamina A previne a injúria do intestino delgado em modelos animais de enteropatia (Warden et al., 1997). Outros pesquisadores encontraram mudanças variáveis na estrutura e funcionabilidade intestinal em roedores com deficiência de vitamina A (Majumdar e Ghosh, 1987; Singh et al., 1997; Rojanapo et al., 1980; Chauhan e Kansal, 1989; Ahmed et al., 1990). Somando a esses fatos, a vitamina A também desempenha um papel na produção de glicoproteínas celulares e na regulação da divisão celular nas células intestinais (Zile et al., 1972, Zile et al., 1977). A suplementação com vitamina A preveniu alguns dos efeitos colaterais iniciais pela radiação no intestino delgado (Beyzadeoglu et al., 1997). Este efeito foi resultado da capacidade da vitamina A de induzir a diferenciação de células da cripta, tornando essas células menos susceptíveis a danos em seu genoma (Ruifrok et al., 1996).

A vitamina A regula os estágios iniciais adaptativos intestinais depois da ressecção no intestino delgado de ratos, pelo aumento da proliferação das células da cripta do intestino em adaptação (Wang et al., 1997, Wang et al., 2007). Swartz-Basile e colaboradores demonstraram que a depleção preexistente de vitamina A inibiu significativamente a reposta adaptativa do intestino delgado, enquanto que a suplementação com a vitamina A melhorou rapidamente a resposta adaptativa quando comparados com os ratos com a deficiência de vitamina A, dando suporte ao papel da vitamina A nos processos adaptativos do intestino (Swartz-Basile et al., 2000). Muitos estudos em países em desenvolvimento sugerem que a suplementação com a vitamina A diminui a risco de diarréia e de ruptura da barreira funcional intestinal, demonstrando o

importante papel desse nutriente no reparo e na função da mucosa intestinal (Duggan et al., 2002).

O benefício da suplementação com a vitamina A foi comprovada por Sommer e colaboradores em 1986, e a partir desse achado, vários estudos clínicos foram realizados (Sommer et al., 1986; Muhila et al., 1988; Rahmathullah et al., 1990; Hussey et al., 1990; West et al., 1991; Daulaire et al., 1992; Ghana VAST Team, 1993; Beaton et al., 1993; Glasziou et al., 1993; Glasziou e Mackerras, 1993; Fawzi et al., 1993; Vilamor e Fawzi, 2000, Mehta e Fawzi, 2007). Em média, a suplementação com vitamina A reduz a mortalidade, principalmente em crianças com idade pré-escolar, em cerca de 20 a 30%. Além disso, essa suplementação apresenta vantagens em relação ao custo-benefício e tem proporcionado melhorias na saúde pública, em várias áreas do mundo (Sommer et al., 1986; West et al., 1991, Ross et al., 1995; Filteau e Tomkins, 1995; Long et al., 2006).

A suplementação ao nascer diminuiu a mortalidade em dois estudos realizados na Indonésia e na Índia (Hampfrey et al., 1996; Rahmakrishnam et al., 2003), mas não foi documentado em Zimbábue (Malaba et al., 2005). No Norte de Ghana, em um estudo onde crianças foram acompanhadas semanalmente para verificar a ocorrência de mortalidade, não foram observadas diferenças significativas com a suplementação de vitamina no que diz respeito à prevalência de condições diarréicas ou respiratórias. Entretanto, observou-se que crianças suplementadas com vitamina A foram em menor número de vezes às clínicas e tiveram números menores de internações e hospitalares. Somando-se a esse fato, esse estudo mostrou também que a suplementação com vitamina A resultou em uma diminuição significativa na mortalidade infantil associada à diarreia, como também por outras causas, sugerindo que o efeito protetor da vitamina A na diminuição da taxa de mortalidade foi mediada pela redução na severidade do que pela incidência das infecções (Ghana VAST Team, 1993).

Na Turquia, crianças em idade pré-escolar com diarreia recorrente têm menores níveis séricos de vitamina A e beta-caroteno comparado às crianças sem diarreia (Kucukbay et al., 1997). A vitamina A também reduziu a severidade, mas não a ocorrência de doenças em Ghana (Arthur et al., 1992). Na Indonésia, a administração em crianças, de duas doses diárias de 200 000UI de vitamina A, a cada seis meses, reduziu a taxa de mortalidade em 34%. Em um estudo realizado no Nepal, utilizado à mesma dose de vitamina A, a cada quatro meses, observou-se uma diminuição de 30% na mortalidade (Sommer et al., 1986; West et al., 1991). Estudos demonstraram que a carência de vitamina A estimula as respostas de fase aguda, evidenciada pelos níveis elevados de proteína C reativa e proteína amiloide A dosadas no soro de pacientes com diarreia (Filteau et al., 2000; Tomkins et al., 2000).

No Brasil, Barreto e colaboradores encontraram que a vitamina A reduziu significativamente a incidência de doenças diarreicas em 23% (episódios de diarreia), mas não a incidência de doenças respiratórias agudas (Barreto et al., 1994). Outros trabalhos investigaram o efeito de altas doses de vitamina A por via oral nas doenças diarreicas em crianças (um estudo prospectivo realizado em uma comunidade do Nordeste do Brasil) e encontraram uma diminuição significativa na duração média dos episódios de diarreia, mas não na incidência dos episódios diarreicos (Walser et al., 1996). Além disso, outros autores desta mesma linha de pesquisa mostraram uma melhora significativa da função da barreira intestinal medida pela razão da permeabilidade de L/M e crescimento (pelo HAZ) nas crianças suplementadas com vitamina A e zinco (Chen et al., 2003). Quadro e colaboradores evidenciaram a correlação entre a diminuição da concentração sérica de retinol com a integridade da função da barreira epitelial, mostrando haver uma correlação inversa. Esses autores apontaram haver um impedimento significativo da absorção do manitol e redução da razão L/M, sugerindo a importante função da vitamina A na manutenção da integridade epitelial intestinal (Quadro et al., 2000).

Thurnham e colaboradores demonstraram que uma única dose de vitamina A, administrada em crianças indianas hospitalizadas com diarreia, resultou em uma recuperação mais rápida da integridade epitelial após 30 dias em relação às crianças que não receberam vitamina A as quais não foi visto nenhuma melhora após dois meses (Thurnham et al., 2000). A suplementação de vitamina A e β -caroteno em mulheres grávidas da África do Sul infectadas com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) foi associada com baixas taxas de excreção de L/M (lactulose e manitol) na urina, como indicador da permeabilidade intestinal, e em seus filhos com 14 semanas de idade, entretanto isto foi visto apenas naqueles que eram infectados pelo HIV (Filteau et al., 2001).

Hossain e colaboradores relataram que uma única dose de vitamina A (200.000UI) reduziu significativamente a severidade da shigelose aguda, uma das doenças que mais eleva a mortalidade e morbidade em Bangladesh, quando administrado juntamente com antibióticoterapia, em crianças menores de um ano de idade. A vitamina A reduziu a severidade da shigelose aguda promovendo o reparo na mucosa colônica e em estimulando o sistema imune (Hossain et al., 1998). Uma associação entre a deficiência de vitamina A e um aumento na morbidade por diarreia também é relatada (Sommer et al., 1984; Grotto et al., 2002, Villamor e Fawzi, 2000). Salazar-Lindo e colaboradores encontraram que o nível sérico do retinol foi significativamente menor em crianças peruanas com diarreia do que aquelas sem diarreia (Salazar-Lindo et al., 1993). Outros pesquisadores sugerem que a diarreia predispõe a xeroftalmia, talvez devido à depleção do fornecimento de vitamina A ou pelo aumento das perdas urinárias de retinol (Sommer et al., 1987; Sommer, 1998).

O papel da vitamina A na melhoria das seqüelas da diarreia e das infecções entéricas permanece ainda obscura embora pesquisas realizadas no Brasil e em Ghana mostram uma redução na prevalência da diarreia severa com a suplementação com a vitamina A (Barreto et al., 1994; Ghana VAST Team, 1993). Isto sugere um efeito benéfico da vitamina A na prevenção da

diarréia, pois sabe-se que a vitamina A é um substrato necessário para a preservação da integridade das células epiteliais (Olson et al, 1984). Estudos em pacientes com disenteria devido *Shigella* ssp., a vitamina A reduziu a severidade da diarréia (possibilitando a ocorrência também em pacientes portadores de outros patógenos) e dano intestinal (Hossain et al., 1998). Porém, estudos em crianças com diarréia desidratante aguda por *Escherichia coli* enteroagregativa ou rotavírus, não mostraram benefícios com o tratamento da vitamina A (Henning et al., 1992). Provavelmente devido à existência de diferenças na patogênese e duração dos episódios diarreicos entre a diarréia induzida pela *Shigella* ssp com a provocada pela *Escherichia coli* enteroagregativa ou pelo rotavírus, explique as variações na resposta ao tratamento com a vitamina A (Hossain et al., 1998).

1.8 Toxicidade e teratogenia da vitamina A

Vitamina A dietética é obtida a partir da vitamina A pré-formada (ésteres retinílicos dos alimentos de origem animal, alimentos enriquecidos e suplementos farmacêuticos) como também pró-vitamina A encontrada nos carotenóides a partir de fontes provenientes dos vegetais (Penniston e Tanumihardjo, 2006). Vitamina A pré-formada é absorvida e utilizada pelos humanos em uma taxa absorptiva de 70-90% (Olson et al., 1981, Mehta, 2001). Nos Estados Unidos, Europa e outras nações industrializadas em torno de 75% da vitamina A é adquirida por fontes de vitamina A pré-formada, já nos países em desenvolvimento, 70-90% da vitamina A é obtida como pró-vitamina a partir dos carotenóides em fontes vegetais (Gerster, 1997, Tanumihardjo, 2002).

No soro, os ésteres de retinílicos estão normalmente em uma concentração abaixo de 0,2 μ mol/L no jejum, porém isto é aumentado significativamente após uma refeição rica em vitamina A (Krasinski et al., 1989). Os ésteres de retinil podem ser diferenciados do retinol no soro ou em outros tecidos, e posteriormente quantificados, com o uso de método como HPLC (cromatografia de alta eficiência) (Furr, 2004). Em condições normais, a

concentração no soro do retinol é de 1-3 μ mol/L, porém esses limites podem variar (Olson, 2001; Underwood et al., 1979). Reportam-se casos de toxicidade de vitamina A com concentrações de retinol no soro dentro do limite normal, sugerindo que a dosificação do retinol no soro não é uma boa medida para avaliar a toxicidade de vitamina A (Frame et al., 1974; Ellis et al., 1986; Croquete et al., 2000). A presença de diarreia ou febre, estados em que se tem uma elevação das proteínas de fase aguda, causa redução nas concentrações de retinol sangüíneo, levando a um resultado falso negativo (Stephensen e Gildengorin, 2000; Thrunham et al., 2005). Alguns estudos anteriores propuseram que a concentração dos ésteres retinólicos em jejum (>10% do total de vitamina A circulante) poderia ser um biomarcador para toxicidade. Entretanto a determinação da proteína ligadora de retinol (RBP) parece ser uma boa medida alternativa, além de apresentar algumas vantagens, para o retinol sangüíneo, apesar de estes não refletirem o estoques da vitamina A no fígado. Testes funcionais como o de dose-resposta relativa (RDR) e o teste de RDR modificado foram desenvolvidos para atingir e detectar as reservas de retinol no fígado (Loerch et al., 1979; Duitsman et al., 1995). Existe ainda, a técnica de diluição do isótopo que é capaz de estimar quantitativamente os estoques totais de retinol do corpo, porém essa técnica é bastante dispendiosa (Furr et al., 1989).

A toxicidade aguda pela vitamina A, que acomete principalmente as crianças e adultos, e ocorre quando há um aumento maior do que 20 e menor do que 100 vezes a quantidade recomendada por dia, em um período de horas ou em poucos dias, embora ocorra menos do que toxicidade crônica pela vitamina A pré-formada (Olson, 2001; Mehta, 2001) A toxicidade crônica resulta de uma ingestão de altas quantidades de vitamina A pré-formada ao longo de meses ou anos. A ingestão diária de mais de 25.000 IU por mais de 6 anos e 100.000 UI por mais de 6 meses são consideradas doses tóxicas, entretanto esses valores podem variar de indivíduo para indivíduo (Bendich e Langseth, 1989; Hathcock et al., 1990; Coghlan e Cranswick, 2001). As crianças são particularmente mais sensíveis a vitamina A e uma dieta diária com apenas

1500 IU/Kg por peso de vitamina A tem reportado toxicidade neste faixa etária. Em idosos, o risco de toxicidade parece ser maior do que em adultos jovens, em relação à toxicidade crônica de altas doses de vitamina A pré-formada. Fatores nutricionais como a deficiência de zinco, a tolerância individual e fatores genéticos parecem também estar envolvidos nesta variabilidade individual da toxicidade da vitamina A (Olson, 2001; Hathcock et al., 1990; Carpenter et al., 1987; Russell, 1997).

Há evidências de que a vitamina A em excesso durante as primeiras semanas de gestação é teratogênica em humanos (Humphrey et al., 1992; Maden, 1998; Humphrey et al., 1998; Czeizel e Rockenbauer, 1998; Jick, 1998). A ação teratogênica da vitamina A foi demonstrada em várias espécies de animais (Hayes et al., 1981). No entanto, o tipo de conseqüência depende da quantidade de vitamina A, bem como, do estágio gestacional em que a vitamina A é administrada. As anormalidades encontradas em crianças foram devidas a níveis significativamente altos de retinol no soro de mães após o consumo excessivo de vitamina A (Basu, 1983).

Altas doses de vitamina A têm potente efeito teratogênico em animais, sendo contra-indicadas durante a gravidez. Este alto potencial teratogênico justifica a precaução na indicação da vitamina A para mulheres em idade fértil (Guillonneau e Jacqz-Aigrain, 1997). Há evidências de má-formação em crianças, quando as mães consomem altas doses de vitamina A durante a gestação (>25.000UI/dia). Algumas conseqüências da alta ingestão de vitamina A e seus metabólitos podem ser também evidenciadas por um quadro característico de abortos espontâneos, de partos prematuros e de má-formações, afetando o sistema nervoso central, o desenvolvimento cranio-facial ou do sistema cardíaco, como também anomalias do aparelho urinário (OMS, 2001).

Estudos mostraram que o retinol e seus metabólitos não têm efeitos teratogênicos em concentrações séricas fisiológicas. Sabendo-se que o ácido

retinóico desempenha um papel essencial na regulação de numerosos aspectos da embriogênese normal, estudos experimentais indicam que a concentração de ácido retinóico no embrião determina, ao menos parcialmente, a especificidade no poder de regulação genética que se atribui ao ácido retinóico (Azais-Braesco e Pascal, 2000, OMS, 2001).

Estudos de coorte sobre a utilização de vitamina A durante a gestação têm sido apresentados de forma sucinta, sugerindo não haver aumento do número de malformações entre as crianças nascidas de mães que receberam complexo vitamínico contendo 6.000UI de vitamina A pré-formada. Outro estudo foi dirigido a um grande coorte de mulheres acompanhadas durante vários anos, e que freqüentavam um centro médico para diagnóstico pré-natal. Em numerosas análises sobre suplementação, o consumo de mais de 10.000UI de retinol foi considerado como uma forte exposição à vitamina (Rothman et al., 1995). Dez casos de má-formações foram registrados no grupo que recebeu dose mais elevada. Os autores demonstraram que a prevalência de malformações cranianas em crianças está mais associada às crianças nascidas de mães que receberam quantidades superiores a 10.000UI/dia, e ultrapassava 1,7 % do total dos nascimentos (OMS, 2001).

O mecanismo pelo qual a vitamina A exerce efeitos teratogênicos é atribuído à influência das elevadas concentrações de certos metabólitos do ácido retinóico tais como o ácido *trans* e o 13-*cis*-retinóico, sobre o funcionamento dos genes em períodos críticos da organogênese e da embriogênese (Tzimas et al., 2001). Não existem dados para assegurar que a administração de dose única de 100.000 a 200.000UI (30.000 a 60.000µg de éster de retinil), eleve as concentrações de metabólitos do ácido retinóico suscetíveis aos efeitos teratogênicos, e nem o tempo em que estas concentrações permanecem elevadas, ou mais exatamente, o momento em que ocorre a exposição a picos de agentes potencialmente teratogênicos. Por isso, é importante esclarecer a farmacocinética dos metabólitos de vitamina A, em relação à administração de doses elevadas de ésteres de retinil no início da

gravidez, tanto em mulheres que têm reservas elevadas, quanto nas que apresentam estoques limitados de vitamina A (Chagas et al., 2003).

1.9 *Clostridium difficile*

1.9.1 Abordagem Histórica

O trato gastrointestinal apresenta uma microbiota extremamente complexa que atua como uma barreira natural contra muitos patógenos intestinais. E se por algum motivo essa barreira for alterada ou destruída causa um desequilíbrio da microbiota intestinal, tornando o indivíduo mais susceptível à infecção por patógenos entéricos. Muitas bactérias patogênicas, com intuito de atravessar a barreira epitelial intestinal, têm desenvolvido elementos críticos específicos que auxiliam a ruptura da barreira funcional (Liu *et al.*, 2003). Dentre os patógenos bacterianos anaeróbios, o *Clostridium difficile*, bacilo Gram-positivo anaeróbio esporulado, tem se destacado, com uma frequência cada vez maior, como um importante enteropatógeno causador de doenças intestinais associadas ao uso de antimicrobianos, que variam desde uma diarreia autolimitante, relativamente benigna, a uma colite pseudomembranosa grave, que por muitas vezes pode ser fatal (Lyerly et al., 1988; Kelly et al., 1994; Sears e Kaper, 1996; Settle e Wilcox, 1996; Ho et al., 1996; Starr et al., 1997).

Um dos primeiros relatos da colite pseudomembranosa (caracterizada clinicamente por placas inflamatórias e pseudomembranas na mucosa do cólon, com a presença de diarreia aquosa, raramente sangüinolenta, dor abdominal, febre de 37,8- 40⁰C e leucocitose) foi feito por Finney em 1893 a partir da observação de uma pseudomembrana difitérica presente no colón de uma paciente que apresentava uma colite fatal pós-cirúrgica. Porém, nesta época, o agente etiológico desta enfermidade não fora elucidado (Lyerly et al., 1988).

Apenas em 1935, Hall e Toole, pesquisando a microbiota intestinal de neonatos saudáveis, descreveram um patógeno, até então desconhecido, que originalmente recebeu a denominação de *Bacillus difficilis* e logo em seguida de *C. difficile*, refletindo a enorme dificuldade encontrada para isolar e conservar este microrganismo em cultura pura (Hall e Toole, 1935). Estes mesmos autores demonstraram ainda que o *C. difficile* era extremamente toxicogênico, devido a achados de lesões, parada respiratória e morte em animais de laboratórios quando submetidos à injeção da cultura líquida ou filtrado do meio que continha esse microrganismo (Lyerly et al., 1988; Hall e Toole, 1935).

Os quarenta anos que se seguiram após a descoberta do *C. difficile* havendo apenas infreqüentes relatos do isolamento do *C. difficile*, haja visto que esta enfermidade era uma condição rara na era pré-antibiótica. Entretanto, por volta de 1975, no início da década de 1980, esta enfermidade tomou proporções epidêmicas, sendo associada como uma complicação comum ao uso de antibióticos (Bartlett et al., 1978; George et al., 1978).

Em 1978, o *C. difficile* foi identificado como causa primária de colite pseudomembranosa e mostrou-se ser predominantemente isolado de pacientes com tratamento com licomicina e seus congêneres (George et al., 1978). Vários casos foram reportados onde se evidenciou mais ainda a correlação entre colite pseudomembranosa, antibioticoterapia, colonização por *C. difficile* e produção de citotoxinas (Tedesco et al., 1974; Swartzberg et al., 1977; Lyvery et al., 1988). Estes estudos e achados relevaram *C. difficile* como patógeno emergente capaz de causar severa doença gastrointestinal em pacientes sob terapia de antibióticos (Voth e Ballard, 2005).

Nos Estados Unidos, o *C. difficile* é a principal causa de diarreia hospitalar, conhecida como doença associada ao *C. difficile* (Voth e Ballard, 2005). Estima-se que o número de casos com doença associada ao *C. difficile* ultrapasse 250.000 casos por ano (Wilkins e Lyerly, 2003), e com total adicional nos custos à saúde de aproximadamente de um bilhão de dólares anualmente

(Kyne et al., 2002). McDonald e colaboradores (2006) identificaram que o número de pacientes diagnosticados com doença associada ao *C. difficile* duplicou do ano de 1996 para o ano de 2003 (McDonald et al., 2006).

Um estudo realizado por Lima e colaboradores, no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, Brasil, demonstrou que o *C. difficile* é o principal agente causador de diarreia hospitalar neste estabelecimento. (Lima et al., 1993). Desta forma, as doenças relacionadas ao *C. difficile* têm se tornado cada vez mais freqüentes, principalmente com o uso indiscriminado de antimicrobianos, que, além do mais, tem contribuído para o aumento dos índices de mortalidade por doenças diarreicas causadas por esse microrganismo (Pothoulakis e Lamont, 2001).

1.9.2 Microbiologia do *Clostridium difficile*

Os bacilos Gram-positivos anaeróbios esporulados encontrados em infecções humanas são membros do gênero *Clostridium* (Koneman et al, 2001). Em 1994, Collins e colaboradores demonstraram, por sequenciamento direto por PCR, que o gênero *Clostridium* era extremamente heterogêneo (Collins et al., 1994). O *Clostridium difficile* é reconhecido como um bacilo anaeróbio obrigatório, Gram-positivo que forma esporos subterminais, que compõe a microbiota intestinal humana e de outros animais (**Figura 09**) (Lyvery et al., 1988; Pothoulakis e LaMont, 1993; Kelly et al., 1994). Esse microrganismo, encontrado no solo, em ambientes hospitalares e em fezes, é responsável por várias síndromes diarreicas, incluindo a diarreia inflamatória, colite associada a antibióticos e a colite pseudomembranosa (Settle e Wilcox, 1996; Starr et al., 1997; Castagliuolo e LaMont, 1999).

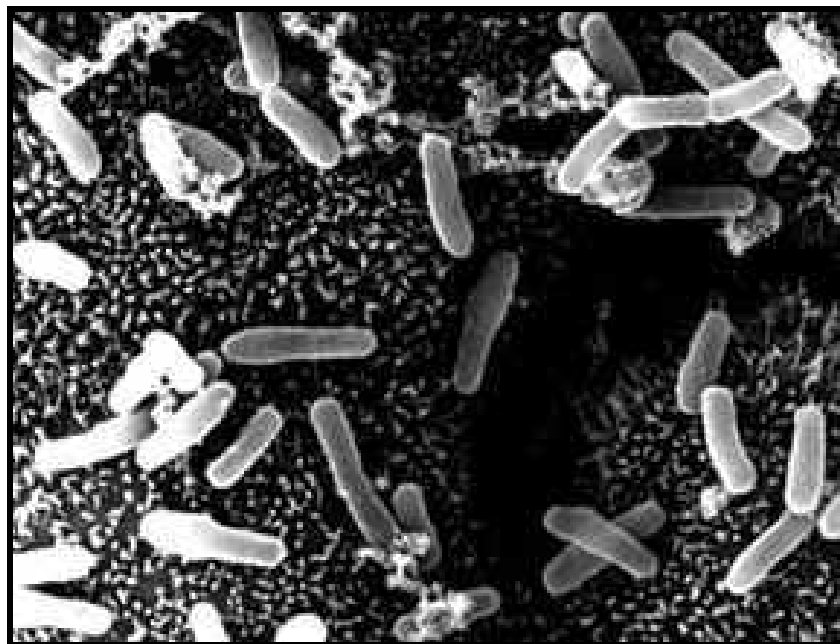


Figura 09: Micrografia eletrônica dos bacilos do *C. difficile*. O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo anaeróbico obrigatório, forma esporos subterminais e compõe a microbiota intestinal humana e de outros animais. Fonte: Universidade de Hobot Hobot University of Wales College of Medicine UK. Disponível em <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/Module13d.htm>. Acesso em 10 de julho de 2007.

A capacidade de formação de esporos torna o *Clostridium difficile* mais resistente ao ambiente hospitalar seletivo (Lyerly et al, 1988). Algumas cepas possuem cápsulas, influenciadas provavelmente devido ao nível de glicose no meio de cultura, entretanto não parece existir uma associação da cápsula com a virulência, bem como com a produção de toxina (Davies e Borriello, 1990). Outros fatores de virulência como fímbrias, glicocálice e enzimas hidrolíticas são descritas na literatura, mas seu papel na doença não está estabelecido. É possível que estes fatores estejam mais relacionados à capacidade do microrganismo colonizar o intestino, através da maior aderência, evasão dos

mecanismos de defesa e lesão tecidual permitindo a colonização e, talvez, exposição de menor número de receptores para as toxinas (Bongaerts & Lyerly, 1997). Entretanto, apesar de serem relatados vários fatores de virulência, além dos citados acima, outros como a produção de flagelos (desempenha um importante papel na colonização intestinal pelo *C. difficile*) e enzimas hidrolíticas também são descritos, porém, o fator de virulência que mais se destacam pela importância clínica e pela melhor caracterização é a produção das exotoxinas A e B, potentes toxinas proteolíticas de cadeia simples. (Barroso et al., 1990; Sauerborn e Von Eichel-Streiber, 1990; Seddon et al., 1990; Bongaerts & Lyerly, 1994; .Borrielo et al., 1990; Tasteyre et al., 2000; Poxton et al., 2001).

A parede celular do *C. difficile* é composta de várias proteínas que têm sido parcialmente caracterizadas, como as proteínas M_r de 38 e 42 kDa. Antígenos como glicose, glicosamina, fosfatos e ácidos graxos constituem 40% do peso da parede celular. Se esses antígenos são ou não diferentes das proteínas de 38 e 42 kDa identificadas ainda não se sabe (Cerquetti *et al.*, 1992; Masuda *et al.*, 1989; Poxton e Byrne, 1981; Poxton e Cartmill, 1982). Outro antígeno, proteína de 36kDa, tem sido relatado, porém sua função ainda é desconhecida, porém não apresenta toxicidade, nem é proteolítico e também não se liga à imunoglobulina como fazem alguns componentes de outros clostrídios (Pantosti et al., 1989; Cerquetti et al., 1992).

A identificação do *C. difficile* até o ano de 1977 era difícil, conseqüentemente as doenças associadas ao *C. difficile* não eram adequadamente diagnosticadas, como citado anteriormente. Em 1979, George e colaboradores desenvolveram um meio de cultura seletivo contendo ágar frutose, cicloserina e cefoxitima (CCFA), o qual facilitou o isolamento deste microrganismo (George et al., 1979). “Neste meio, em 48 horas de incubação, *C. difficile* forma colônias amareladas, rizóides, de 4mm ou mais, com estruturas internas cristalinas, birrefringentes (manchas opalescentes). As colônias de *C. difficile* mostram fluorescência amarelo-esverdeada sob a luz

UV. O odor é similar ao esterco de cavalo. O *C. difficile* é negativo para lípase e lectinase” (Koneman et al., 2001). Este meio (CCFA) é indicado para isolamento seletivo de *C. difficile* de amostras de fezes ou amostras intestinais, porém o crescimento não é específico para *C. difficile* sendo necessário a identificação do isolado em cultura pura (Lyerly et al., 1988). O *C. difficile* hidrolisa esculina e gelatina e não produz indol, nitrato e nem urease. A grande maioria das cepas fermenta glicose, manitol e manose, mas podem variar em relação a presença de salicina e à xilose (Dowell et al., 1977; Allen et al., 1991).

As provas para o diagnóstico em casos onde há suspeitas de doenças por *C. difficile* podem ser realizadas em laboratório mediante demonstração da toxina citotóxica, isolamento e identificação, a partir de fezes produtoras de toxina, por teste de aglutinação com látex ou por diversos sistemas de ensaios imunoenzimáticos (EIA), ELISA, para determinação de glutamato desidrogenase de *C. difficile*, como também por uma prova de EIA para enterotoxina ou citocina produzida pelo microrganismo em fezes ou ainda por uma combinação desses métodos. O *C. difficile* pode ser isolado por meio de uma técnica de seleção de esporos ou do uso de meio seletivos em placas, como o ágar sangue-álcool feniletílico (PEA), ágar frutose-gema de ovocicloserina-cefoxitina (CCFA), já citado acima, mais o ágar sangue para anaerobiose dos CDC seletivo (Koransky et al., 1978; Allen et al., 1991; Marler et al., 1992). Além disso, há outros métodos laboratoriais como contraímunoeletroforese, entretanto o ensaio utilizando a cultura de células é considerado um método padrão servindo de parâmetro para os outros testes na identificação das toxinas A e B do *C. difficile* (Lyerly et al., 1988).

1.9.3 Toxina A e B do *Clostridium difficile*

O *Clostridium difficile* produz duas potentes exotoxinas, a toxina A (TxA), a qual possui atividade tanto citotóxica fraca como enterotóxica e toxina B (TxB) que possui apenas atividade citotóxica. A família das grandes toxinas clostridiais é composta também pela α -toxina do *C. novyi* e pela toxina do *C.*

sordellii ambas são toxinas letais e hemorrágicas (Von Eichel-Streiber et al., 1996). Ainda há cepas negativas para toxina A e positivas para toxina B (TxA⁻, TxB⁺ respectivamente) que também podem causar os sintomas da colite pseudomembranosa (Savidge et al., 2003). Quanto mais toxigênica a cepa, maior a produção das toxinas, indicando que existe uma variação na produção destas (Lyerly e Wilkins, 1994).

Corroborando com essa evidência, tem sido relatado um amplo espectro de resposta do hospedeiro ao *C. difficile*, passando do estado de portador assintomático até a colite pseudomembranosa. Essa variação, até este momento, ainda não é bem compreendida, sugerindo que possa estar associada com diferenças entre as cepas do microrganismo, não toxigênicas, ou com variações na resposta do hospedeiro, relacionadas com modificações nos receptores das toxinas ou nas defesas imunológicas (Pothoulakis e LaMont, 1993; Settle, 1996; Settle e Wilcox, 1996; Pothoulakis, 1996).

As TxA e TxB do *C. difficile* estão codificados na região de patogenicidade dentro do cromossomo de cepas toxigênicas do *C. difficile* e são expressas durante a fase estacionária e de crescimento em resposta aos vários estímulos ambientais (Voth e Ballard, 2005). Estudos mostram que existe uma relação direta entre os níveis de toxina e o desenvolvimento da colite pseudomembranosa como também com a duração da diarreia (Burdon et al., 1981).

Em relação às propriedades físicas, a toxina A é mais estável e mais resistente a pH extremo e proteases do que a TxB, e ambas permanecem estáveis a 37⁰C e são inativadas a 60⁰C. Além disso, são inativadas por substâncias antioxidantes, embora possam ser protegidas pela adição de agentes redutores (Banno et al., 1984).

Os genes que codificam a TxA e TxB, TcdA e TcdB respectivamente, têm sido seqüenciados e encontram-se dentro do *locus* de patogenicidade do *C. difficile* (19,6Kb). As toxinas exibem um alto grau de similaridade, a começar

pelas semelhanças existentes em suas atividades bioquímicas. Ambas usam um domínio N-terminal para modificar substratos idênticos (74% de homologia) (**Figura 10**). E dentre os aminoácidos que compõem essas toxinas, a aspargina, glicina e glutamina são os que se apresentam em maiores quantidades (Banno et al., 1984; Dove et al., 1990; Barroso et al., 1990). Além disso, na região C terminal da TxA e TxB encontra-se um pequeno número de regiões homólogas chamadas oligopeptídeos repetitivos combinados, porém seus mecanismos ainda permanecem obscuros (Von Eichel-Streiber *et al.*, 1992).

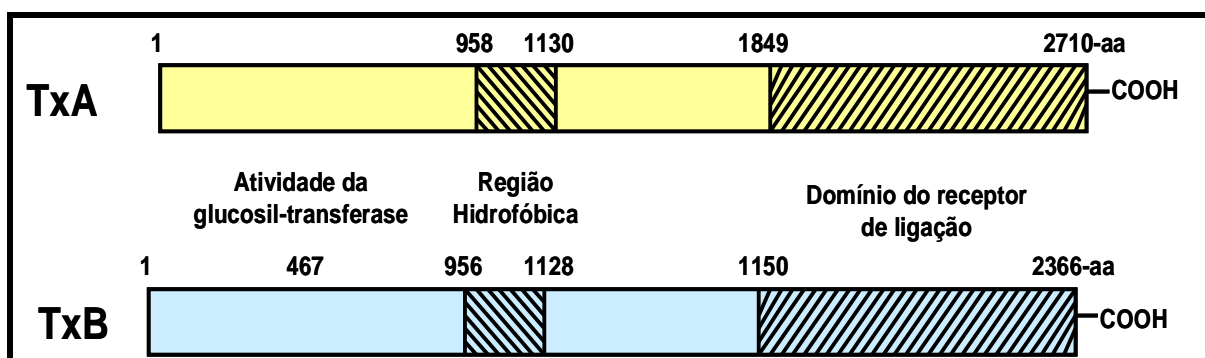


Figura 10: Estrutura molecular das Toxinas A e B do *Clostridium difficile*.

Os genes da toxina (TxA) e da toxina A (TxB) do *C. difficile* expressam homologias semelhantes com localizações similares do sítio catalítico, da região hidrofóbica e do domínio do receptor de ligação, com repetições do COOH terminal. Fonte: Adaptado de Pothoulakis e Lamont, 2001.

Embora as toxinas A e B do *C. difficile* compartilhem características moleculares devido à alta homologia de suas seqüências (63% em suas seqüências de aminoácidos) e devido a seus tamanhos semelhantes (Von Eichel-Streiber *et al.*, 1996), elas diferem entre si em alguns aspectos. Primeiramente, no que diz respeito a potência de enterotoxicidade e citotoxicidade. A TxB apresenta geralmente de 100 a 1000 vezes maior potência em relação a TxA. Alguns estudos sugerem que esta diferença de potência se deve a densidade dos receptores específicos para as toxinas na superfície celular (Von Eichel-Streiber *et al.*, 1996; Aktories K., 1997; Wilkins e

Lyerly, 1994). Em síntese, as toxinas do *C. difficile* apesar de terem semelhantes modos de ação, apresentam diferenças consideráveis em relação às suas ações biológicas (Chaves-Olarte et al., 1997). Ademais, pesquisas feitas por Chaves-Olarte e colaboradores (1997) sugerem como três principais diferenças entra as toxinas A e B do *C. difficile*: 1. ligação específica das toxinas a superfície celular (diferenças de citotoxicidade); 2. TxB apresenta atividade enzimática de 100 a 1000 vezes maior do que a TxA; 3. TxA altera um substrato adicional (Rap) (Chaves-Olarte et al., 1997).

Os genes das toxinas A e B são transcritos em uma mesma direção. O gene da TxA (8130 nucleotídeos) codifica uma única toxina bacteriana que contém 2710 aminoácidos polipeptídeos e peso molecular de 308kDa. A TxA é freqüentemente referida como enterotoxina devido a produção de secreção de fluidos, necrose inflamatória e por causar danos a mucosa intestinal detectada em animais experimentais. O gene da TxB (7098pb) encodifica uma proteína de 2366 aminoácidos e possui uma massa molecular de 270KDa que tem uma potente atividade citotóxica em cultura de células, porém não apresenta atividade enterotóxica em modelos animais em roedores (Lyerly et al., 1985; Pothoulakis e Lamont, 2001). Estudos em modelos de explantes intestinais humanos *in vitro* mostraram que ambas as toxinas puras possuem atividade enterotóxica no colón humano, contrapondo a designação de apenas uma toxina do *C. difficile* (TxA) ser específica e responsável pelos efeitos patofisiológicos induzidos pelo *C. difficile* (Lyerly et al., 1985).

Além das toxinas descritas acima, ainda há dentro do *locus* de patogenicidade do *C. difficile* outras três estruturas (TcdC, TcdD e TcdE) que estão envolvidas nas regulação da produção de toxinas ou liberação da toxina pelas células (Hammond e Johnson, 1995; McDonald et al., 2005) (**Figura 11**). A TcdC é transcrita na direção oposta aos dois genes da toxina A e B e é expressa precocemente na fase exponencial porém declina na fase estacionária, correspondendo ao aumento da toxina A e B. Estes achados sugerem que o papel funcional da TcdC seja como regulador negativo da

produção das toxinas (Spigaglia et al., 2002; Voth e Ballard, 2005). Já TcdD possui semelhanças com as proteínas que se ligam ao DNA, servindo como possível regulador positivo da expressão das toxinas (Moncriet *et al.*, 1997). O gene que codifica TcdE facilita a liberação da TcdA e TcdB pelo aumento da permeação da parede celular do *C. difficile* (Tan *et al.*, 2001). Polimorfismos ou deleções parciais do TcdC podem levar a um aumento da produção da toxina A e B (Spigaglia e Mastrantonio, 2002). Somando a este fato, uma toxina binária separada tem sido descrita no *C. difficile* (Popoff et al., 1988) (**Figura 11**). Dois genes cromossomais (cdtA e cdtB), fora do locus de patogenicidade, codificam esta toxina (Barth et al., 2004).

Recentemente ocorreram várias epidemias de uma cepa particularmente virulenta do *C. difficile* (NAP/027) isolada nos Estados Unidos, Europa e Canadá (Warny et al., 2005; Pepin et al., 2005). Essa cepa contém uma deleção de 18 bp do regulador negativo TcdC e parece aumentar em 16 vezes a produção da Toxina A e em 23 vezes a produção da Toxina B. Além disso, esta cepa também contém uma outra toxina, chamada de toxina binária (CdtA and CdtB) (Barbut et al., 2005). Esta terceira toxina, designada de CDT (possui uma atividade específica na ADP-ribosiltransferase) foi descrita de uma cepa do *C. difficile* em 1988 (Popoff et al., 1988). Ainda não está claro qual é o papel que a toxina binária exerce na patogênese do *C. difficile*, contudo um estudo recente sugeriu que a toxina binária poderia estar diretamente correlacionada com a severidade da diarreia (McEllistrem et al., 2005; Barbut et al., 2005). Clinicamente, o ponto mais significativo deste achado é que essa toxina binária seria uma cepa resistente à fluoroquinolona. McDonald e colaboradores compararam as amostras atuais com amostras antigas da cepa BI/NAP1, que contém uma deleção de 18 pb no gene *TcdC*. A toxina binária foi encontrada em todos (100%) os isolados atuais e mostraram ser resistentes às fluoroquinolonas e nenhum dos isolados anteriores eram resistentes (McDonald et al., 2005).

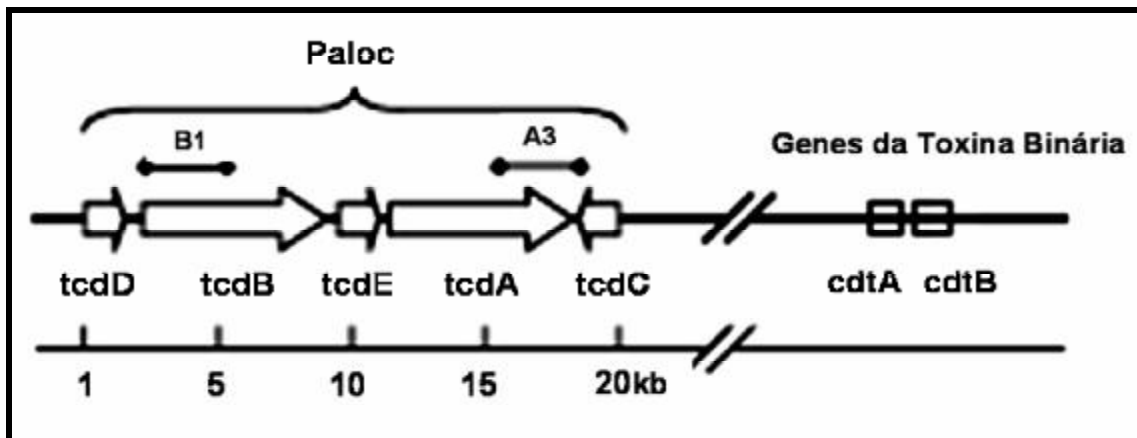


Figura 11: Figura esquemática mostrando o locus de patogenicidade (Paloc) do *Clostridium difficile* e a sua relação com os genes da toxina binária. Os genes tcdA e tcdB codificam, respectivamente, a TxA e TxB do *C. difficile*, enquanto tcdD codificam um regulador positivo da produção das TxA e TxB e o gene tcdE codifica uma proteína que pode ser importante para a liberação das toxinas nas células. O gene tcdC parece atuar como regulador negativo da produção das TxA e TxB. Os genes cdtA e cdtB estão localizados a uma distância desconhecida do Paloc que codifica a toxina binária. B1 e A3 representam a localidade e tamanho relativo dos fragmentos dos genes amplificados por PCR para toxinotipagem. Fonte: Adaptado de McDonald, 2005.

Até o presente momento, o papel da toxina B na doença associada ao *C. difficile* não está totalmente esclarecido. Há relatos de esta toxina atuar como potente agente citotóxico em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, embora seja incapaz de provocar infiltração de células inflamatórias na mucosa intestinal (Lyerly et al., 1982; Taylor et al., 1981; Baldacini et al., 1992). Na literatura, evidencia-se a existência de toxinas variantes da TxB (TxB-1470 e TxB-8864), isoladas de cepas de *C. difficile* TxA⁻ (Von Eichel-Streiber et al., 1995; Torres, 1991). Estudos mostraram que cepas TxA⁻ e TxB⁺ isoladas clinicamente de pacientes que vieram a óbito por extensiva colite pseudomembranosa foram utilizadas para identificar o papel da TxB. (Torres,

1991). O papel dessas variantes no processo patogênico das alterações gastrointestinais provocadas pelas toxinas do *C. difficile* não está totalmente esclarecido, necessitando ainda mais de pesquisas neste contexto.

1.9.4 Mecanismo de Ação das toxinas A e B do *C. difficile*

O mecanismo de ação das toxinas A e B do *C. difficile* já é bem caracterizado na literatura (**Figura 12**). Estas duas toxinas são glicosiltransferases que modificam GTPases da subfamília Rho A. Esta modificação irreversível inativa quase todas as proteínas reguladoras de baixo peso molecular da subfamília GTPases da subfamília Rho, como a subfamília Rho, Rac e Cdc42 (Voth e Ballard, 2005).

Três subfamílias constituem a família de proteínas Rho: a subfamília Rho, Rac e Cdc42. A subfamília Rho induz a formação de filamentos de sustentação de actina; a subfamília Rac, controla a consistência estrutural da membrana, assim como a atividade de NADPH-oxidase em neutrófilos; e Cdc42 regula a formação de filamentos de actina. As toxinas A e B inativam por monoglicosila as proteínas Rho que perdem a habilidade de induzir a polimerização de filamentos de actina, provocando, conseqüentemente, retração e arredondamento das células. Essa monoglicosilação compromete a função normal das GTPases, ocasionando uma interrupção na sinalização celular, resultando em desestruturação do citoesqueleto, citotoxicidade, retração celular, perda de adesão e arredondamento de células em cultura (Just et al., 1995, Hall, 1990; Voth e Ballard, 2005).

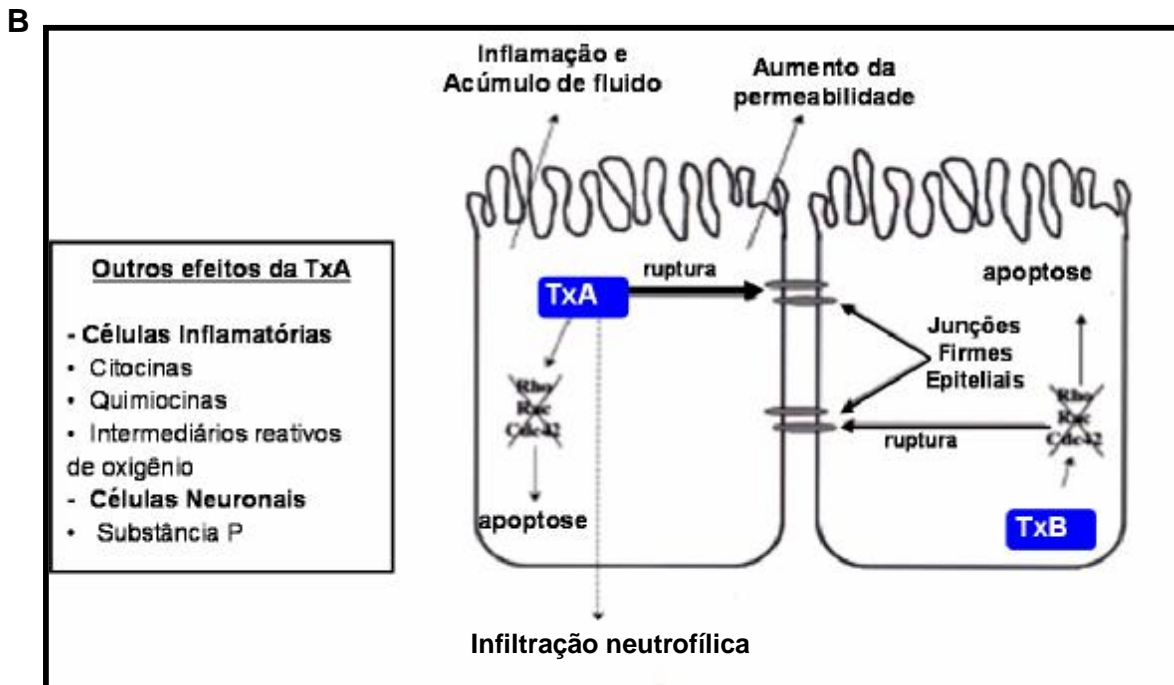
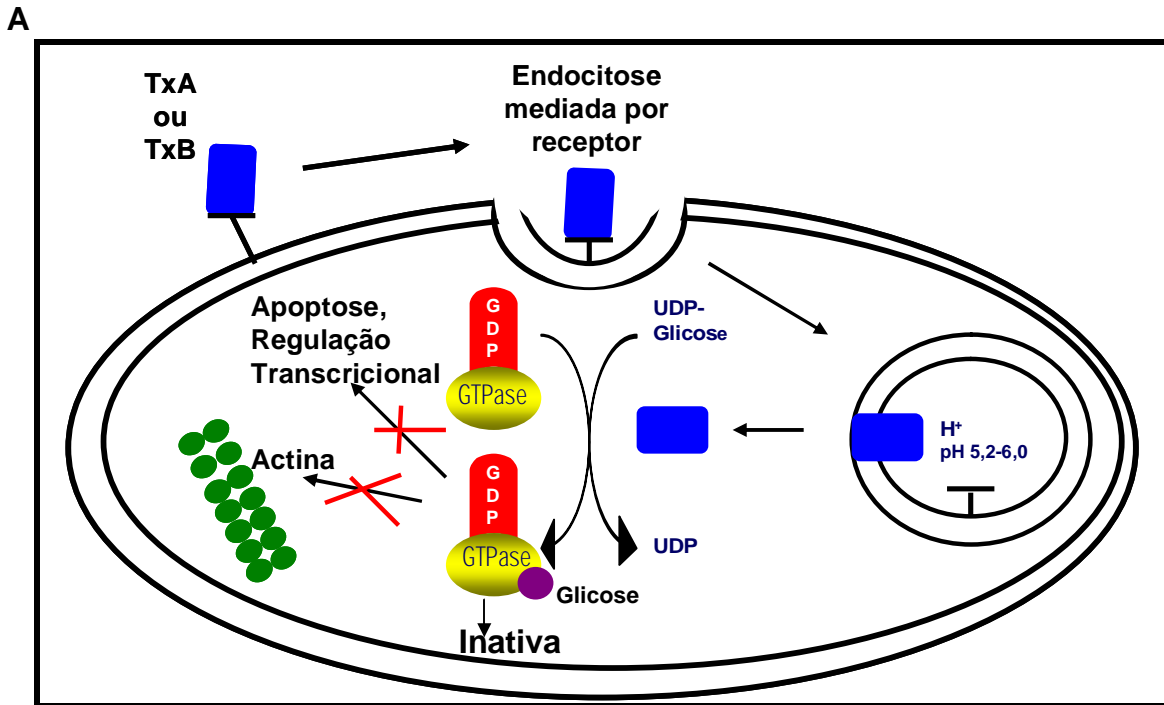


Figura 12: Alterações celulares causadas pelas toxinas A e B do *C. difficile*. (A) Visão geral das modificações intracelulares provocadas pelas TxA ou TxB do *C. difficile*. Ambas as toxinas atuam intracelularmente como glicosiltransferases, modificando e ativando as proteínas Rho, Rac e Cdc42

através da transferência de uma molécula de açúcar que utiliza como co-substrato a UDP-glicose. Os efeitos dessas modificações incluem a condensação dos filamentos de actina, ativação transcricional e apoptose. **(B)** Efeitos das TxA e TxB nas células epiteliais intestinais durante a doença. A exposição à TxA nas células epiteliais promove uma infiltração neutrofílica, produção de substância P e quimiocinas, produção de oxigênio reativo, ruptura das junções firmes e apoptose. A Txb também causa uma ruptura nas junções firmes e apoptose. A combinação de mais de uma dessas atividades gera acúmulo de fluidos e resposta inflamatória. Fonte: Adaptado de Voth e Ballard, 2005.

As toxinas A e B do *C. difficile* são peptídeos de cadeia simples que contêm pelo menos três domínios enzimáticos. O domínio enzimático o qual catalisa a reação de monoglicosilação (domínio glicosiltransferase NH₂-Terminal) está localizado na porção amino terminal de ambas as toxinas, onde contém o sítio ativo (Hofman et al., 1997). O segmento intermediário inclui um domínio transmembrana hidrofóbico (domínio de translocação), o qual provavelmente é o mediador da translocação da toxina para o citosol, mas seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado. O domínio de ligação ao receptor, responsável por ligar a toxina aos receptores na membrana celular, reside na porção carboxílica localizada em 1/3 da molécula de TxA a qual é constituída de unidades peptídicas que se repetem, as quais podem funcionar como uma proteção contra a proteólise (Von Eichel-Streiber et al., 1992; Frey e Wilkins, 1992). Elas representam a porção imunodominante da molécula, são altamente imunogênica recrutando muito dos anticorpos quando as toxinas são injetadas por via parenteral (Wren e at al., 1991). Embora ainda não tenha sido comprovado, essa porção também parece existir na TxB (Hofman et al., 1997). Alguns estudos mostram que a perda de unidades de repetição carboxílicas terminais da TxB provoca uma redução de 10 vezes na potência citotóxica (Barroso et al., 1994).

1.9.5 Receptor de ligação e internalização

A ligação a receptores específicos de membrana é o primeiro e importante passo no processo da entrada da toxina na célula. As estruturas de carboidratos são os elementos fundamentais para a ligação da toxina A na membrana celular, entretanto para a toxina B essas estruturas ainda permanecem desconhecidas (Pothoulakis et al., 1996). Investigadores mostraram que a TxA liga-se diretamente a uma estrutura de carboidrato terminal, GaL α 1-3Galp β 1-4GlcNAc, porém este receptor não parece presente em humanos, encontrado apenas em roedores e outros animais (Krivan *et al.*, 1986; Lasen et al., 1990). Provavelmente devido a uma participação de um oligossacarídeo diferente ou uma possível interação proteína-proteína (Pothoulakis, e LaMont, 2001).

Após a ligação ao receptor, a internalização começa em poucos instantes. E em poucos minutos, a ligação torna-se irreversível, não sendo possível resgatar as células por antitoxinas ou por lavagem. Em 5 a 10 minutos, a toxina está localizada na mitocôndria, sendo acompanhada por uma diminuição no ATP intracelular, liberação do citocromo c e produção de oxigênio reativo (He et al., 2000).

1.9.6 Glicosilação das proteínas Rho

Após a internalização das toxinas, a próxima etapa para que as toxinas comecem desempenhar seus efeitos citotóxicos a nível intracelular, é a monoglicosilação das GTPases Rho, resultando na inibição da sinalização por essas proteínas, por inativação e conseqüente desarranjo dos filamentos de actina (Just et al., 2000).

As pequenas proteínas GTPases Rho (A, B, C, Rac e Cdc42), pertencentes a superfamília Ras (proteínas G transdutoras de sinais intracelulares) são responsáveis por uma variedade de funções celulares, incluindo a organização do citoesqueleto, a estabilidade das junções firmes

(*tight junctions*) e aderentes, crescimento e diferenciação celular, regulação da migração celular, como também regulam o controle da transcrição, progressão e transformação do ciclo celular (Aktories et al., 2000).

As toxinas do *C. difficile* dentro das células utilizam a glicose-uridina difosfato (UDP-glicose) como substrato e a transfere para um receptor do aminoácido treonina (Thr) em quase todas as subfamílias das GTPases (Rho, Rac e Cdc42), inativando-as. O resíduo aceptor da treonina está na posição 37 da Rho e na posição equivalente (Thr-35) da Rac e da Cdc42 (Just et al., 1994; Just et al., 1995; Selzer et al., 1996; Popoff et al., 1996). Vale salientar que estudos têm confirmado que as toxinas A e B do *C. difficile* glicosilam as GTPases Rho na mesma posição e que outros membros semelhantes a família Ras não são afetados. Sugerindo que a modificação das GTPases Rho pelo *C. difficile* reduz a estabilidade dessas proteínas. Embora, tenha se visto em estudos mais recentes que a TxA, mas não a TxB, modifica a Rap2 (protótipo da superfamília Ras) em menor extensão, indicando existir uma diferença na especificidade para o substrato das TxA e TxB do *C. difficile* (Chaves-Olarte et al., 1997).

Tendo o conhecimento de que a Thr-37/35 é crucial para a função regulatória da GTPases Rho, sua glicosilação implica em muitas conseqüências, como a incapacidade de polimerizar os filamentos de actina, causando o arredondamento celular; citotoxicidade e alterações da sinalização celular (Von Eichel-Streiber et al., 1997). A ruptura das junções firmes leva a um aumento da permeabilidade celular e resistência elétrica transepitelial diminuída (Riegler et al., 1995), redução da síntese protéica e da divisão celular, apoptose ou necrose (Pothoulakis e LaMont, 2001).

Há evidências que a monoglicosilação da GTPase Rho não é a única atividade enzimática descrita para a toxina A. Na ausência de uma proteína aceptor, a TxA pode hidrolisar a UDP-glicose em UDP e glicose. Essa atividade é similar àquela de certas ADP-ribosiltransferases microbianas, tais como a toxina da cólera que ribosila ADP nas proteínas alvo, assim como

hidrolisa NAD em nicotinamida e ADP-ribose na ausência da proteína aceptora (Vaughan e Moss, 1997). Ademais, estudos realizados por Warny e colaboradores em 2000, levantaram a hipótese que algumas das importantes respostas celulares para as toxinas do *C. difficile* poderiam ocorrer antes e independentemente da glicosilação das GTPases Rho, como por exemplo um dano mitocondrial: ocorre antes e pode ser um importante mecanismo para a liberação de IL-8 dos enterócitos (Warny et al., 2000).

1.9.7 Estudos *in vivo* e *in vitro* das atividades biológicas das Toxinas A e B do *C. difficile*

Vários estudos em animais têm evidenciado os efeitos da toxina A do *C. difficile*. Lima e colaboradores utilizando modelos experimentais em coelhos mostraram que a injeção de toxina A na alça intestinal nesses animais causa, a partir das primeiras horas de observação, uma significativa secreção de fluido no lumen intestinal, ruptura das células epiteliais e uma intensa reação inflamatória (Lima et al., 1989). Outros investigadores, deste mesmo grupo de pesquisa, observaram que a excessiva reação inflamatória poderia ser bloqueada por inibidores de fosfolipases A₂, de ciclooxigenases e por antagonistas do fator de agregação plaquetária. (Fang et al., 1994; Fonteles et al., 1995).

Em 1997, Rocha e colaboradores relataram que a TxA do *C. difficile* é um potente indutor da migração neutrofílica na cavidade peritoneal de ratos e em bolsas de ar subcutâneas, via liberação de IL-1 β , TNF- α e LTB₄ (Rocha et al., 1997). Outros trabalhos relataram também a participação de mediadores importantes no processo inflamatório, como TNF- α , fator de agregação plaquetária (PAF), leucotrienos e prostaglandinas, liberados por macrófagos (Chang et al., 1990; Calderaro et al., 1991, Kandil et al., 1994. Esses mesmos autores em 2001, demonstraram que a toxina B, ao estimular macrófagos em experimentos *in vitro*, utilizando câmaras de Üssing, ao contrário da TxA, não foi capaz de induzir secreção intestinal, nem alteração no transporte eletrogênico em íleo de coelho (Rocha et al., 2001, Rocha et al., 1998).

A toxina A do *C. difficile* causa uma resposta secretória intestinal significativa, afetando a viabilidade celular pela ruptura de seu citoesqueleto além de possuir um efeito quimiotático sobre os neutrófilos, e promove liberação de prostaglandinas e leucotrienos, de mediadores contribuintes para o processo inflamatório (Lima et al., 1988; Lima et al., 1989; Rocha et al., 1998; Just et al., 1995; Rocha et al., 1997; Bartlett, 1997).

A exposição das toxinas A e B em cultura de células intestinais T84, células epiteliais intestinais do colón humano, promove uma diminuição da resistência transepitelial e aumento na permeabilidade celular (Johal et al., 2004). Estudos *in vitro* em linhas de células intestinais têm confirmado os efeitos vistos *in vivo*. Estudos demonstraram que essa alteração na permeabilidade se dá ao nível de junções firmes intercelulares, indicando que o efeito das toxinas A e B do *C. difficile* na barreira funcional epitelial pode estar relacionado com alterações ocorridas no citoesqueleto resultante das modificações das proteínas da família Rho (Hecht et al., 1988; Hecht et al., 1992). Nustrat e colaboradores mostraram uma forte evidência das proteínas Rho regulando as junções firmes e a organização dos microfilamentos de actina em monocamadas de células T84 (Nusrat et al., 1995).

Ainda em células epiteliais intestinais T84, Brito e colaboradores mostraram que a toxina A do *C. difficile* induz a apoptose por um mecanismo dependente da inativação da Rho, e da ativação das caspases efetoras, 3 e 6, e das caspases 8 e 9 (caspases iniciadoras), além da ativação do Bid e de provocar dano mitocondrial com a liberação do citocromo c (Brito et al., 2002). Em 2006, o grupo desses mesmos autores, descreveram que o receptor agonista da adenosina A₂ (ATL 313) reduz o dano no tecido e a inflamação em ratos com enterite induzida pela toxina A do *C. difficile*, sugerindo que este agonista possa contribuir na patogênese da enterite induzida pelo *C. difficile* (Carneiro et al., 2006).

Portanto, o *Clostridium difficile* é reconhecido como o principal agente etiológico da diarreia associada a antibióticos e da colite pseudomembranosa,

sendo a causa mais comum de diarreia hospitalar, por produzir, além de outras conseqüências, alterações na barreira intestinal facilitando a entrada de microrganismos no epitélio intestinal, e com isso, a translocação bacteriana (Brettle et al., 1984; George et al., 1982; Gilligan et al., 1981; Price et al., 1977; Thielman et al., 1995; Bartlett et al., 1980). Embora raros estudos tenham mostrado a importância de alguns micronutrientes necessários para um bom funcionamento do trato gastrointestinal, frente ao desafio de relevantes toxinas bacterianas, como as toxinas A e B do *C. difficile*, ainda sim, permanecem em abertas grandes lacunas a este respeito, com fundamental importância clínica. Nesta linha, Brito e colaboradores, investigaram o papel protetor de alguns micronutrientes *in vitro*, como a glutamina e alanil-glutamina, após o dano induzido pela TxA. Ambos os peptídeos reduziram a injúria epitelial provocada pela TxA, sugerindo o possível papel benéfico destes nutrientes no tratamento da colite (Brito et al., 2005). Entretanto, pouco se menciona o papel de outros micronutrientes, como a vitamina A e seus análogos, no epitélio gastrointestinal (Baltes et al., 2004; Quadro et al., 2000; Chen et al., 2003). Estudos demonstraram que a vitamina A (retinol) é um importante micronutriente para a manutenção e funcionalidade do epitélio intestinal, entretanto a base molecular do metabolismo do retinol no intestino humano ainda não está completamente esclarecido (Lampen A et al., 2000; Blomhoff et al., 1990).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A deficiência de vitamina A é um dos principais problemas de saúde pública, podendo ser agravada pela desnutrição e pela diarreia (Underwood, 1995; Guerrant et al., 2000; WHO, 2002; Guerrant et al., 1992). A carência de vitamina A compromete a integridade epitelial e aumenta a incidência e severidade das infecções, sendo freqüentemente associada a doenças diarreicas (Sommer et al., 1984; Feachem, 1987).

Tendo em vista o grande potencial da vitamina A (retinol), micronutriente requerido por vários processos biológicos, e principalmente, por esta envolvida na integridade e na manutenção das células epiteliais intestinais (Blomhoff e Blomhoff, 2006), este trabalho tem como hipótese de que vitamina A desempenhe uma função protetora na barreira funcional epitelial frente à injúria causada pela TxA do *Clostridium difficile*. Assim, propusermos estudar o possível papel benéfico do retinol utilizando modelos experimentais em culturas de células intestinais, tendo em vista a importância deste nutriente e do *C. difficile* nas doenças diarreicas. Raros estudos *in vitro* demonstraram o papel da vitamina A no reparo da barreira funcional intestinal, na prevenção contra a queda da resistência epitelial e na diminuição da apoptose e necrose, desta forma estudos adicionais são necessários para compreensão do papel desse nutriente (Baltes et al., 2004; Ara et al., 2004, Zamora et al., 2006). Ademais, pouco se conhece a cerca do mecanismo da vitamina A e seus análogos na prevenção contra danos celulares ocasionados por microrganismo, como bactérias, em especial as toxinas bacterianas, vírus e parasitas entéricos patogênicos, necessitando de maiores entendimento nesta área..

Diante do exposto, pretendemos contribuir para o esclarecimento da função da vitamina A na diarreia causada pela TxA do *C. difficile*, bem como fornecer dados científicos adicionais que auxiliem na terapia nutricional de restauração da barreira funcional epitelial durante a doença provocada pela toxina A do *C. difficile*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a modulação do retinol na lesão da barreira morfofuncional induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em culturas de células intestinais.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a análise de dose, tempo e efeito da toxina A do *C. difficile* na resistência elétrica transepitelial, proliferação, migração, apoptose e necrose em células intestinais, assim como, validar o modelo *in vitro* para medida funcional da barreira epitelial intestinal com marcadores moleculares lactulose e manitol;
- Analisar o efeito do retinol em importantes processos celulares utilizando os modelos *in vitro* de permeabilidade intestinal, migração, proliferação, apoptose e necrose em culturas de células epiteliais intestinais;
- Avaliar o possível efeito protetor do retinol na permeabilidade intestinal medida pela resistência elétrica transepitelial frente ao efeito enterotóxico da toxina A do *C. difficile* em células Caco-2;
- Avaliar o possível efeito protetor do retinol nas alterações da proliferação e migração celular induzida pela toxina A do *C. difficile* em células intestinais (IEC-6);
- Avaliar o possível efeito protetor do retinol sobre a apoptose e necrose das células epiteliais intestinais da cripta (IEC-6) na lesão provocada pela toxina A do *C. difficile*

MATERIAIS E MÉTODOS

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

4.1.1 Toxina A do *C. difficile*

A TxA purificada foi gentilmente fornecida por Dr. David Lyerly (Tech Laboratory, Blacksburg, VA, USA) através do programa internacional de colaboração entre o Instituto de Biomedicina (IBIMED)/Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC) da Universidade Federal do Ceará em parceria com a Universidade da Virgínia (USA). A TxA foi obtida do *Clostridium difficile* (VPI 10463), cultivada de acordo com o método descrito anteriormente (Sullivan et al., 1982; Lyerly et al., 1982). A purificação da toxina A foi realizada por precipitação em sulfato de amônia, através de cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose e cromatografia de imunoafinidade. A homogeneidade dessas toxinas foi demonstrada por imunoeletroforese cruzada e eletroforese em gel de poliácridamida (Lyerly et al., 1982).

A TxA foi preparada em alíquota mãe de 100 µg/mL e diluída, no meio fresco e antes de cada experimento, para as concentrações de 0,01-3 µg/mL (dependendo do modelo experimental) a partir de uma concentração estoque de 1,13 mg/mL, armazenada a 2 a 8^o C. A toxina foi diluída em salina fosfatada tamponada (PBS) estéril e sempre filtrada em ambiente estéril, dentro do fluxo laminar, imediatamente antes de ser utilizada nos experimentos.

4.1.2 Soluções e drogas

A solução de acetato de retinol solúvel em água proveniente da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) foi preparada em ambiente estéril dentro do fluxo laminar e ao abrigo da luz para proteger a vitamina A da oxidação e isomerização. O acetato de retinol foi armazenado a -20^oC e a alíquota mãe (5 µM) foi preparada em água estéril deionizada e imediatamente antes de ser utilizada nos experimentos (Ara et al., 2004). E para cada experimento realizado as alíquotas eram diluídas no meio de cultura nas concentrações

desejadas para os modelos de experimentação (0,1-100nM). Nos experimentos de migração celular, utilizamos a mitomicina C (5µg/mL) (Roche, Indianapolis, IN). Para as análises no HPLC, a solução de clorexidina (40mg/mL) (SIGMA, St Louis, MO), foi diluída em água destilada estéril e filtrada dentro do fluxo laminar, assim como também a solução de lactulose e manitol (L/M) (L = 250mg/mL; M = 50mg/mL) foi preparada de forma semelhante, com água destilada estéril e filtrada.

As soluções utilizadas no preparo dos meios de cultura dependeram da linhagem de célula utilizada no experimento (IEC-6 OU Caco-2), dentre elas, a solução de piruvato de sódio 100nM (11,004 mg/L) (GIBCO, Grand Island, NY), a solução de aminoácidos não essenciais (GIBCO, Grand Island, NY) 100nM sendo, estocadas de 2°C a 8°C. Já o soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY), insulina bovina (10µg/ml) (SIGMA, St Louis, MO), a solução de tripsina-EDTA (0.25% tripsina, 1mM EDTA) (GIBCO, Grand Island, NY) e a solução de penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (GIBCO, Grand Island, NY) contendo 10.000 unidades de penicilina (penicilina G) e 10.000 µg de estreptomina (sulfato de estreptomicina em 0,85% de salina) foram armazenadas a -5° a -20°C. E para o HPLC, utilizamos sorbitol, clorexidina e os marcadores moleculares, lactulose e manitol, provenientes da Sigma (Chemical., St Louis, MO)

4.2 Meios de cultura

Meios de cultura são formulações químicas que fornecem o aporte nutricional para o desenvolvimento e crescimento da cultura, e de um modo geral, os meios contêm em sua composição de aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e componentes orgânicos (Dulbecco et al., 1973). Os meios de cultura utilizados foram meio essencial mínimo modificado por Dulbecco - DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (1x) contendo 4500 mg/L de glicose e L-glutamina e sem piruvato de sódio (número de catálogo # 11965-092) e DMEM contendo 4500mg/L de glicose e piridoxina hidroxiclорídrica, sem L-glutamina e sem piruvato de sódio (número de catálogo # 11960-044) (Gibco;

Gaithersburg, MD, USA) foram armazenadas a 2°C a 8°C. Cada elemento constituinte dos meios DMEN (11965-092, 11960-044) está em anexo (**anexo 9.1**) enfatizando a composição dos diferentes meios, concentrações (mg/L), molaridade (mM) e pesos moleculares. A formulação dos respectivos meios de cultura utilizados para cada tipo de célula intestinal é diferente e está descrita nas tabelas abaixo.

Tabela 02 Composição do Meio de Cultura para células IEC-6

Reagentes	Volume
DMEM ^a	500mL
5 % Soro Fetal Bovino	25mL
100 U/ml Penicilina e 100µg/ml Estreptomicina	5mL
Piruvato de Sódio 1mM	5mL
Insulina Bovina 95% (10µg/ml; 500ml=5000µg)	5mg

* O pH foi corrigido para 7,4

^a Para os experimento com meio padrão o número de catálogo do DMEM (#) foi 11965-092 e para os experimentos com meio sem glutamina foi 11960-044.

Tabela 03 Composição do Meio de Cultura para células Caco-2

Reagentes	Volume
DMEM ^a	500mL
10 % Soro Fetal Bovino	50mL
100 U/ml Penicilina e 100µg/ml Estreptomicina	5mL
Piruvato de Sódio 1mM	5mL
Solução de aminoácidos não essenciais 100nM, 100X (MEM)	5mL

* O pH foi corrigido para 7,4

^a Para os experimentos com meio padrão o número de catálogo do DMEM (#) foi 11965-092 e para os experimentos com meio sem glutamina foi 11960-044.

4.3 Culturas de células Intestinais

4.3.1 Câmara de fluxo laminar

Todos os manuseios referentes à cultura de células foram realizados dentro do fluxo laminar, pois se faz necessário um ambiente estéril para manipulação das culturas de células. A câmara de fluxo laminar é o principal equipamento utilizado para a manutenção da esterilidade de materiais durante o manuseio e é onde se permite a remoção das partículas do ar originadas na área de trabalho. Além disso, permite também uma proteção contra contaminação cruzada, evitando que as partículas geradas na área de trabalho se desloquem lateralmente, contaminando outros processos e produtos (Bryan et al., 1984).

Em síntese, o funcionamento das câmaras de fluxo laminar consiste na entrada do ar onde é succionado através dos pré-filtros por meio de ventilador centrífugo, depois atravessa um filtro absoluto e é distribuído a uma velocidade constante (0,45m/s) (Pinto et al., 2002). O laboratório de Doenças Infecciosas, UPC & IBIMED da Universidade Federal do Ceará abriga uma câmara de fluxo laminar vertical classe II tipo A, onde permite 70% de recirculação do ar e pode ser usada com microrganismo de risco 2 e 3, substâncias químicas em pequenas quantidades e substâncias com traços de material radioativo. O ar contaminado após filtragem pelo filtro HEPA do exaustor passa ao ambiente onde a cabine está instalada com pelo menos 20 cm de afastamento do teto (Morgan e Darling, 1993).

Foram utilizadas duas linhas de células intestinais, uma derivada da cripta do jejuno de ratos normais (IEC-6) sendo uma linha de células epitelial não diferenciada e um outro tipo de células intestinais provenientes de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), sendo células intestinais mais diferenciadas.

4.3.2 Células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6)

A célula epitelial intestinal de rato (IEC- 6) é derivada da cripta do jejuno de ratos normais, foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Essa reconhecida linhagem de célula foi desenvolvida e caracterizada por Quaroni e colaboradores em 1979, quando foram estabelecidas suas características por critérios morfológicos e imunológicos de células não diferenciadas da cripta do intestino delgado. Verificou-se a presença de numerosas microvilosidades cobrindo a superfície da célula (na região perinuclear) e a presença de pseudópodes que se estende pela superfície celular gerando a formação de contatos intercelulares (Quaroni et al., 1979). Desta forma, essa linhagem celular é comumente utilizada em modelos *in vitro* de monocamadas de células para se avaliar, principalmente, a migração celular e outros parâmetros, após recuperação do intestino (McCormack et al., 1992). As células IEC-6, como também as células Caco-2, foram cultivadas em placas de *Opticell* para cultura de acordo com as instruções do manual de procedimento operacional do produto (*Opticell*, Orlando, USA) (**Figura 13**). Esta placa para cultura de células possui uma dimensão de 2 x 65 x 150mm, volume de 100cm² e com capacidade para 10mL de meio de cultura. O *opticell* é um novo conceito em técnica de cultivo de células que foi adotado pelo laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Ceará e foi utilizado pela primeira vez neste trabalho. O *opticell* veio substituir os frascos para cultura com o objetivo de maximizar o processo de cultura de células e assim diminuir as contaminações por microrganismos indesejáveis que acabam acarretando os insucessos dos experimentos com células. O sistema de cultura de células *Opticell* possui uma membrana transparente permeável a gás que permite uma excelente rotina de troca do ar e uma direta visualização em qualquer etapa do crescimento das células pelo microscópio, além de maximizar o espaço dentro das incubadoras de CO₂ (Duong et al., 2005; Petrarca et al., 2006).

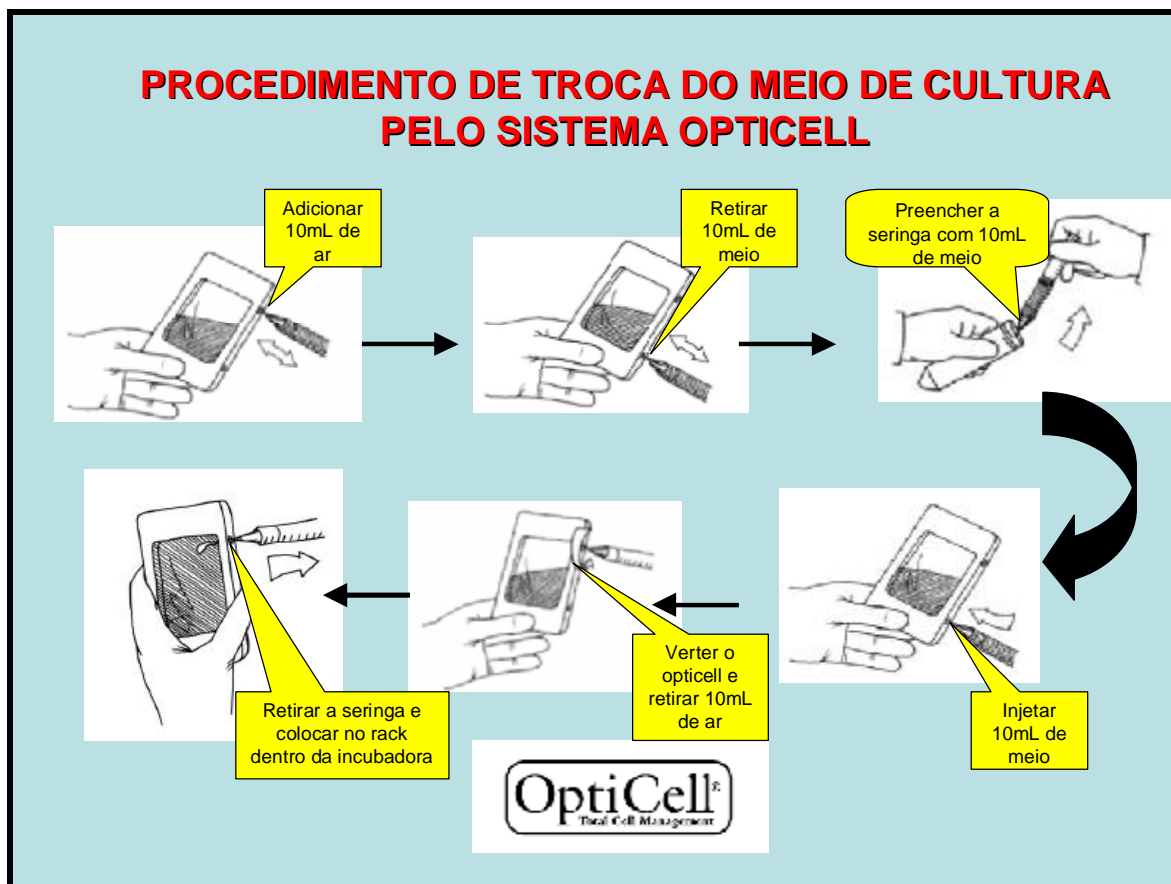


Figura 13: Esquema representativo da troca de meio de cultura pelo sistema de *Opticell*. Antes de iniciar o procedimento deve-se separar e preparar todo o material e colocá-lo dentro do fluxo laminar e deixando-os por 30 minutos sob a luz UV. No fluxo laminar, o primeiro passo para a troca de meio é unir a ponteira do Opticell (*tip*) à seringa estéril e encher a mesma com 10 mL de ar. Introduzir a ponteira no porto da placa de Opticell e injetar o ar suavemente. Remover o meio usado e descartá-lo no recipiente de lixo. Colocar assepticamente 10 mL de meio fresco em uma nova seringa estéril. Introduzir a ponta no porto do Opticell e injetar os 10 mL de meio novo no opticell. Verter a placa de opticell e retirar 10 mL de ar. Retirar a seringa e colocar na estante própria de armazenamento para as placas de opticell (*rack*) dentro da incubadora na atmosfera de 37⁰ C com 5% de CO₂ e 95% de O₂. Deve-se verificar diariamente se houve crescimento das células e se há algum tipo de contaminação. Fonte: Manual de instrução do Sistema Opticell (*Opticell*, Orlando, USA)

As células IEC-6 (**Figura 14**) foram rotineiramente cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) contendo 25mmol/L de glicose, 0,4mol/L de bicarbonato de sódio e 4 mmol/L de glutamina (anexo) acrescido de 5% de soro bovino fetal (GIBCO, Grand Island, NY), 10mg de insulina (10µg/mL) (SIGMA, St Louis, MO), 50UI/mL de penicilina (GIBCO, Grand Island, NY) e 50µg/mL de estreptomicina (GIBCO, Grand Island, NY), incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de ar e com trocas do meio de cultura às segundas, quartas e sextas-feiras.

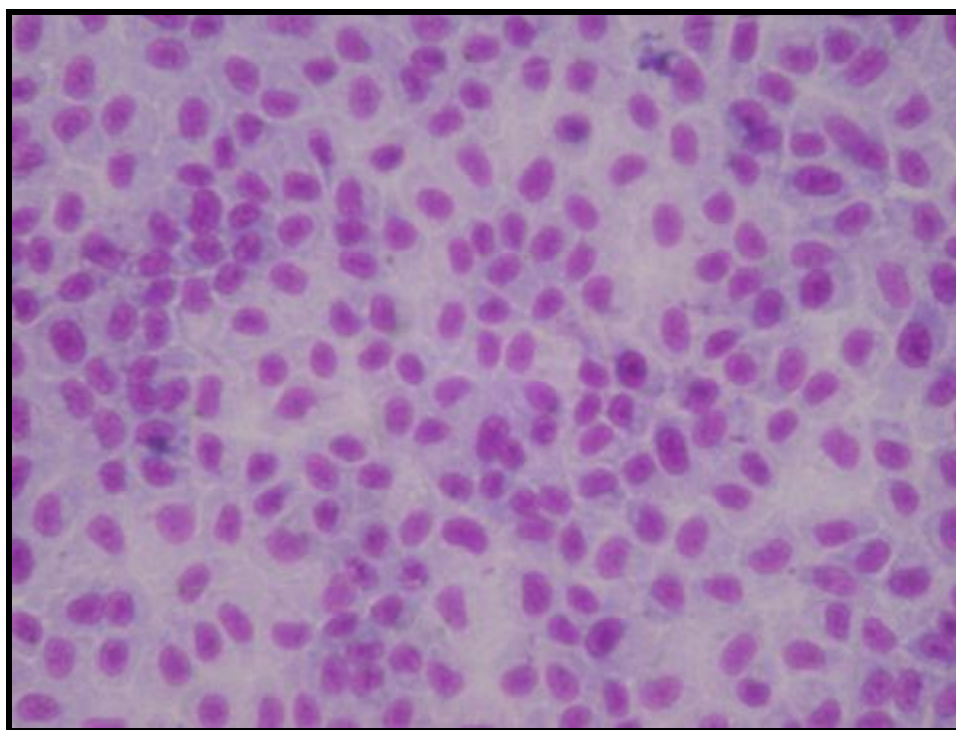


Figura 14: Morfologia das células da linhagem celular IEC-6 em cultura confluenta. Foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, x 400. As células IEC-6 são células intestinais epiteliais que expressam características de células da cripta do intestino delgado e que não apresentam características de diferenciação e são freqüentemente utilizadas como modelo de reparo da mucosa intestinal (Quaroni et al., 1979; McCormack et al., 1992).

4.3.4 Células do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2)

As células Caco-2, derivadas do adenocarcinoma de cólon humano, são monocamadas de células que em 14 a 21 dias de cultivo exibem várias classes de marcadores de diferenciação tipicamente encontrados em células intestinais maduras diferenciadas, como a presença de microvilosidades em borda de escova e a expressão da fosfatase alcalina (enzima freqüentemente usada como marcador de diferenciação celular) e as isomaltase-sucrase disacarídeos e peptidases (Mariadason et al., 2000). A fosfatase alcalina, localizada na superfície externa da célula onde exerce sua atividade, está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta, e parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea (Motta, 2000). Essas células diferenciadas exibem um fenótipo que se assemelha à células da base dos vilos e topo das criptas, sendo considerada como um modelo celular que mimetiza o que ocorre *in vivo* nas células do colón durante a migração da cripta para o topo dos vilos. Além disso, formam uma monocamada polarizada que se assemelham as características da mucosa intestinal madura (Boulenc et al., 1992; Rousset, 1986; Delie e Rubas, 1997). Por conseqüência, esse modelo de cultura em monocamada de células epiteliais intestinais ajuda a definir os processos que regulam a permeabilidade das junções firmes do epitélio intestinal em condições normais e patológicas (Hidalgo et al., 1989; Cruz et al., 1998).

As células Caco-2 têm sido amplamente utilizadas em estudos e caracterizações de inúmeros processos bioquímicos dos enterócitos do intestino delgado. Essas células quando crescidas em um suporte impermeável, como frascos de cultura ou *opicell*, evidenciam a formação de grumos ou amontoados de células indicando o transporte iônico transepitelial (Pinto et al., 1983). Em membranas permeáveis, as células Caco-2 sintetizam e liberam na face basolateral a maioria das classes de lipoproteínas intestinais e éster de colesterol. Assim como, vários estudos mostram a habilidade das

células Caco-2 na captação do ácido fólico (Vincent et al., 1985) e por apresentar receptores para o fator de crescimento epidermal (Hidalgo et al., 1989) e peptídeo intestinal vasoativo (Laburthe et al., 1987). As células Caco-2 absorvem o retinol presente da região apical ou basolateral da célula, sintetiza ésteres de retinila e podem ligar-se ao retinol ou retinal pela CRBP e CRBP II (Harrison, 1993; Quick e Ong, 1990). As células Caco-2 contêm componentes para metabolizar a nível intestinal a vitamina A, sendo capazes de para internalizar e esterificar o retinol. Portanto, essa linhagem de células serve como ferramentas disponíveis para se estudar o metabolismo da vitamina A nos humanos (Quick e Ong et al., 1990).

As linhagens de células Caco-2 (**Figura 15**) utilizadas neste trabalho foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) e incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de ar. Foram cultivadas em sistema de cultura Opicell (*Opticell*, Orlando, USA) da mesma maneira descrita para as células IEC-6. As células Caco-2 foram cultivadas rotineiramente em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) contendo 10% de soro bovino fetal, 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, além de aminoácidos não-essenciais (GIBCO, Grand Island, NY) e piruvato de sódio (GIBCO, Grand Island, NY), como já mostrado anteriormente. A troca de meio de cultura foi realizada duas vezes por semana nas terças e sextas-feiras.

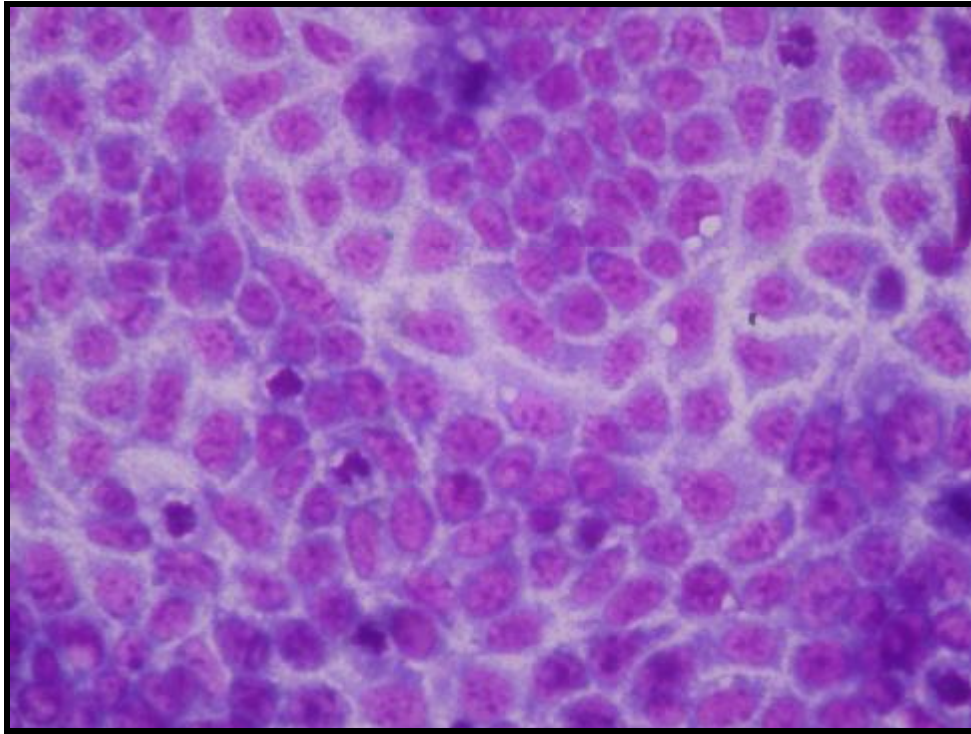


Figura 15: Morfologia das células Caco-2 em cultura confluenta. Foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, x 400. As células Caco-2, derivadas do adenocarcinoma de cólon humano que espontaneamente se diferenciam, exibindo várias características morfológicas e funcionais dos enterócitos maduros, sendo comumente utilizadas em modelos *in vitro* para avaliar a integridade do epitélio intestinal (Li et al., 2003).

4.4 Protocolos experimentais

4.4.1 Preparação das células aderidas

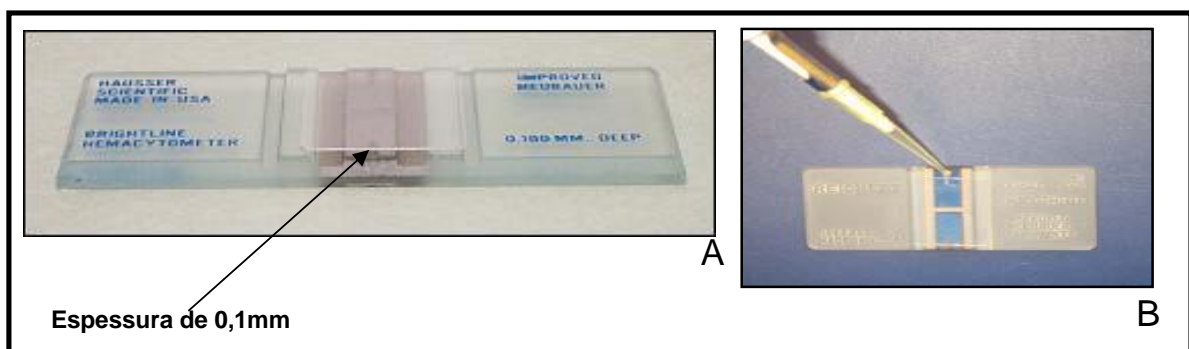
Antes da realização da contagem, as células aderidas na placa de cultura confluenta eram “liberadas” da superfície em que se encontravam aderidas. Utilizou-se tripsina-EDTA (0,05% de 1;250 de tripsina; isto é, tripsina que sob condições testadas pode digerir 250g de substrato para cada 1g de tripsina adicionada e 0,02% de EDTA). O fundamento deste princípio baseia-se no fato de que as proteínas de adesão destas células necessitam de magnésio para exercerem sua função. Devido a estas características, a tripsina e o EDTA são utilizados em conjunto. A tripsina age digerindo e clivando as proteínas de adesão; e o EDTA, por sua vez, quelos os cátions divalentes livres (Peres e Curi, 2005).

Portanto, para a liberação das células do substrato, o meio foi retirado de acordo com o procedimento de troca de meio demonstrado na figura 11, e foi adicionado 3-5mL de tripsina-EDTA permitindo que toda área em que as células se encontravam ficasse em contato com a solução. Em seguida, a placa de optiCell foi incubada a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 5-15 min para células IEC-6 e 10-20 min. para as células Caco-2. Após este período, a cultura foi examinada no microscópio para verificar se as células foram removidas das duas superfícies de adesão do optiCell. Em seguida, foram adicionados de 5 a 7mL de meio de cultura com soro misturando suavemente a solução. As proteínas do soro são clivadas pela tripsina e acabam competindo com as moléculas de adesão das células, permanecendo viáveis para seguir com o experimento. Outro ponto importante neste processo, é que a tripsina foi mantida em contato com as células por um curto período de tempo. Após o recolhimento desta solução com células, meio e tripsina-EDTA em um tubo estéril, então as células foram centrifugadas (1500 rpm por 5 min). A seguir, o sobrenadante contendo tripsina foi desprezado, e o precipitado celular (*pellet*) foi lavado com solução salina estéril e filtrada (PBS). A ressuspensão em PBS (10mL) foi feita suavemente

para que não houvesse nenhum dano às células e novamente foi centrifugada (1500 rpm por 5 min).

4.4.2 Contagem das células intestinais em lâmina pela câmara de Neubauer

Após a segunda centrifugação, foi retirado novamente o sobrenadante e acrescentou-se 5ml de meio de cultura. Um pequeno volume da suspensão (100 μ L) foi retirado com pipeta estéril e colocado em um tubo contendo meio (900 μ L) para realização da contagem. A contagem foi realizada na câmara de Neubauer (**Figura 16**), uma lâmina de vidro que apresenta duas superfícies separadas (cada uma dividida em um *grid*). O *grid* é composto por nove quadrados, onde cada qual mede 1mm de lado e é limitado por três linhas muito próximas. Uma lamínula de vidro é posicionada sobre a área central da câmara. O espaço formado entre a lamínula e a câmara é de 0,1mm. Por conseqüência, o volume é determinado por cada quadrado quando coberto pela lamínula é equivalente a 1mm x 1 mm x 0,1 mm que é igual a 0,1 mm³, ou seja, 0,1 μ L. Então, após a contagem das células existentes em um quadrado, o número de células contidas em 1mL é igual a este valor mutiplicado por 10⁴ (Freshney, 1994).



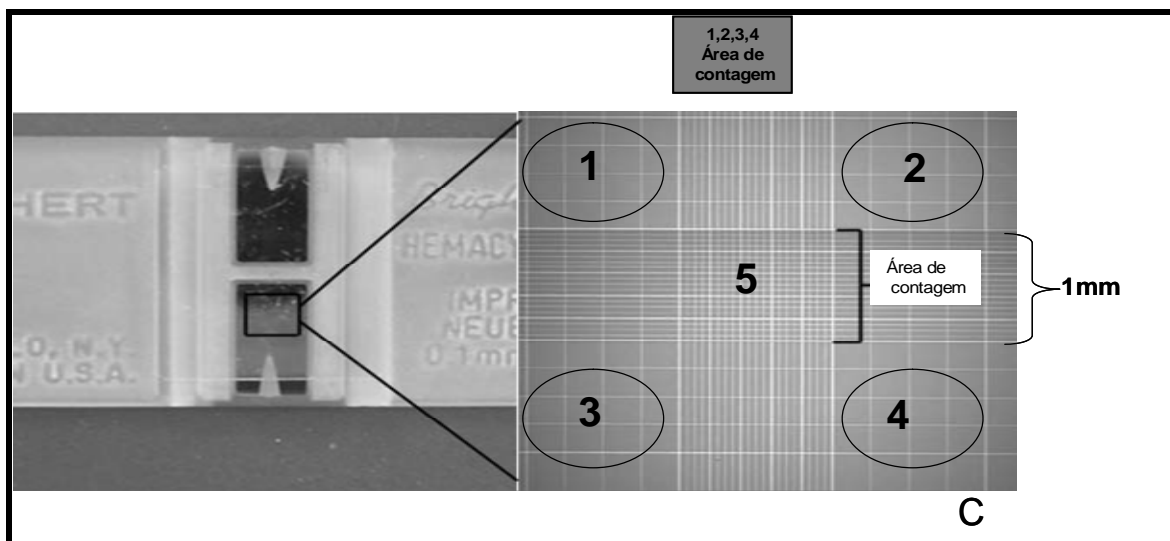


Figura 16: Câmara de Neubauer. (A) Foto da câmara de Neubauer espelhada tradicional mostrando a distância de 0,1 mm entre a lamínula de cristal e a superfície da câmara contendo o *grid*. **(B)** Foto do local onde se coloca o volume de meio com células para contagem. **(C)** Área total do *grid* mostrando os locais onde pode fazer a contagem, pode-se utilizar os quatro quadrados externos (1,2,3,4) ou o quadrado central (5). Fonte: Adaptado de Peres e Curi, 2005.

Nos experimentos nós utilizamos a contagem pelos quatro quadrados e fizemos uma média destes (a contagem de mais de um quadrado garante um resultado mais confiável), entretanto poderia ser feita também utilizando apenas o quadrado central (**Figura 16**). A contagem foi padronizada com critério de exclusão das células que estiveram sobre as linhas inferiores e da direita. A concentração total de células na suspensão original foi calculada seguindo a fórmula abaixo:

$$\frac{N^{\circ} \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{Número de quadrados contados}} = \text{Número de células /mL}$$

Desta maneira, antes de iniciar os experimentos foi feita a tripsinização das células aderidas nas placas de optiCell, logo após a contagem das células para cada protocolo de experimentação e, caso necessário, o ajuste para a concentração ideal.

4.4.3 Resistência Elétrica Transepitelial (TER)

A Resistência Elétrica transepitelial (TER) seguiu o modelo descrito por Hidalgo e colaboradores (1989) para o estudo em modelos de cultura em monocamada do epitélio intestinal, onde substâncias tóxicas como etanol, TxA do *C. difficile*, entre outras, alteram a permeabilidade das junções firmes em células intestinais diferenciadas. Neste trabalho utilizamos as células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2; passagem 40-51) semeadas em filtros cobertos por colágeno inseridos em placas contendo 12 poços (Transwell-COL, 6,5 mm de diâmetro, com área de crescimento celular de $0,33\text{cm}^2$ e o tamanho do poro do filtro de $0,4\mu\text{m}$; Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA), na concentração de 5×10^5 células/mL e incubadas a 37°C em 5% de CO_2 . Mantiveram-se dois poços sem células (leitura do poço sem células), pois este foi o branco utilizado nos cálculos matemáticos para se obter o valor da TER. O volume de meio adicionado foi de 0,4mL e 1mL na região apical e basal de cada poço, respectivamente (**Figura 17**).

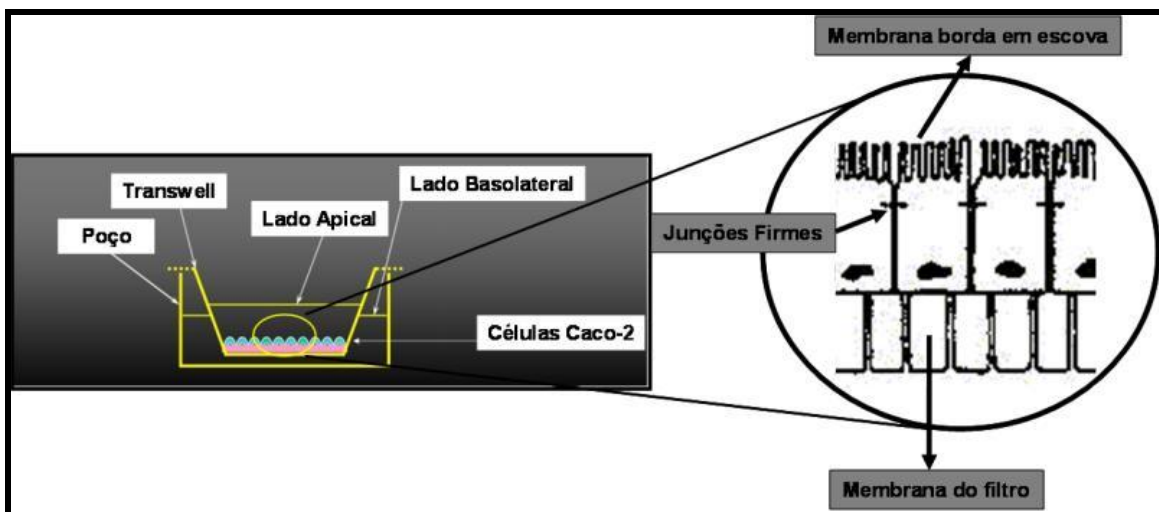


Figura 17: Figura esquemática mostrando a monocamada de células Caco-2 semeadas em filtros cobertos por colágeno (*transwell*). Os transwells foram inseridos em poços de placas de 12 poços onde se pode identificar o lado apical e lado basolateral no qual se insere os dois eletrodos (lado esquerdo) e no lado direito, em grande aumento, mostrando representativamente as células Caco-2 semeadas na membrana do filtro e as junções firmes. Fonte: Manual do fabricante de instruções de uso (Corning Incorporation, Cambridge, MA, USA),

A Resistência Elétrica Transepitelial (TER) (Ω) em monocamadas de células Caco-2 foi medida utilizando o Sistema de medição da resistência elétrica transepitelial (*Millicel Eletrical Resistance System*, Millipore Corp., Belford, MA), colocando eletrodos separados na região apical e basal dos poços de acordo com o manual de instruções do fabricante (**Figura 18**). A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas, subtraída do valor do branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$).

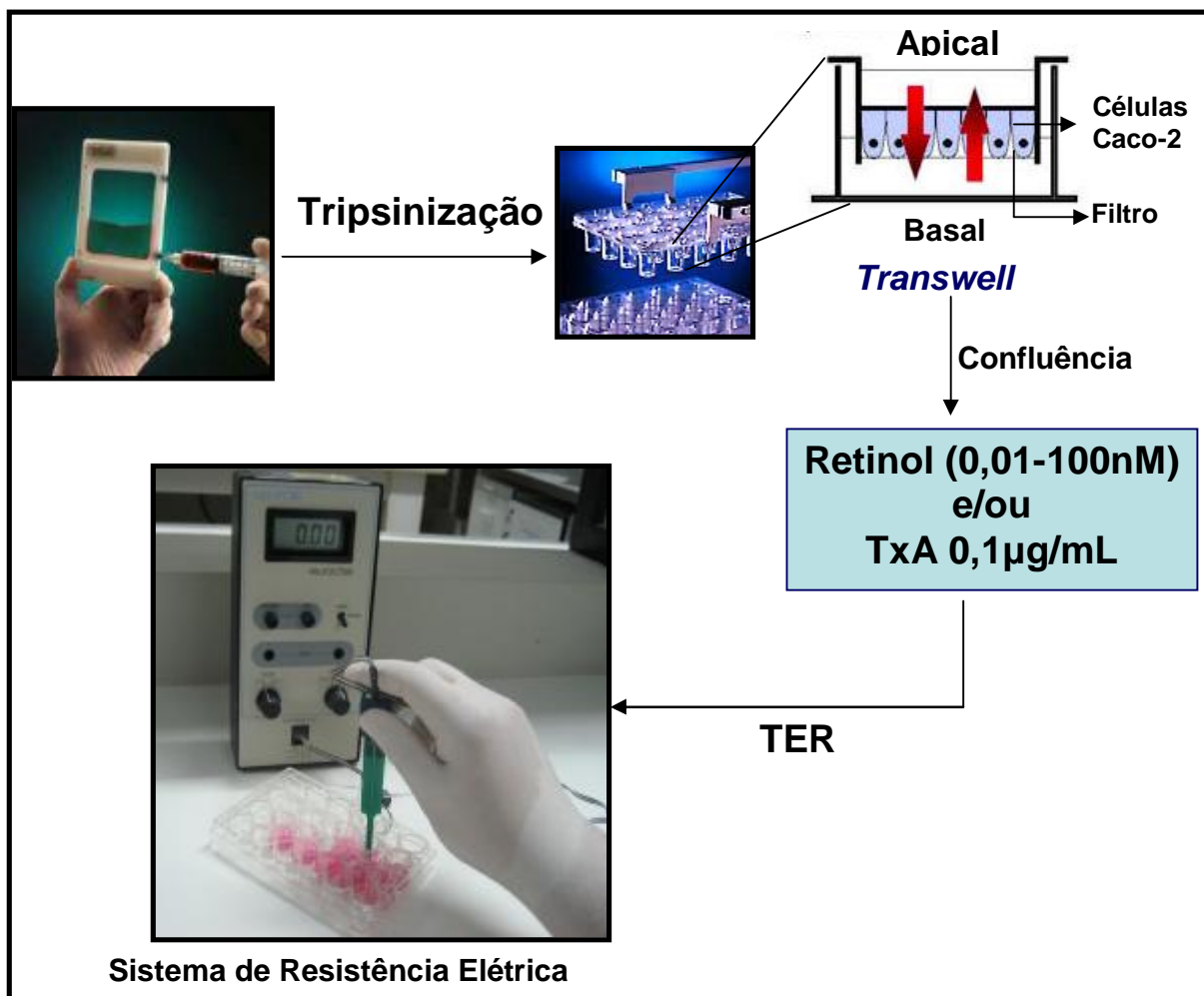


Figura 18: Ensaio para medição da resistência elétrica transepitelial. As células Caco-2 foram tripsinizadas e semeadas em filtros cobertos com colágenos (*transwells*). Após a confluência, foi adicionados TxA do *C. difficile* (0,1µg/mL) e/ou retinol (0,01-100nM) e medida a resistência elétrica transepitelial (TER) pelo sistema de medição da resistência (*Millicell Electrical Resistance System*, Millipore Corp., Belford, MA), colocando eletrodos separados na região apical e basal dos poços. A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas, subtraída do valor do branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$).

Com intuito de observar a ação do retinol na confluência de células Caco-2, após a tripsinização das células em *opticell*, o meio utilizado durante todos os experimentos foi sem glutamina para que pudéssemos obter resultados referentes à suplementação do retinol sem nenhum interferente. Este meio foi adicionado com e sem retinol durante até 120 horas quando avaliamos o papel do retinol na confluência das células Caco-2, registrando as mudanças na resistência elétrica ao longo deste período de tempo. Dando continuidade, avaliamos então, o perfil da toxina A do *C. difficile* (0,1µg/mL) na resistência após a confluência nas células Caco-2, onde foi medido a TER para cada poço nas 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 e 24 horas. E para elucidar a ação do retinol após a lesão da barreira epitelial intestinal induzida TxA do *Clostridium difficile* no modelo de resistência elétrica transmembrana (TER), uma medida indireta da permeabilidade celular, medimos a resistência nas 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 e 24 horas após adição da toxina, verificando desta forma a função do retinol na proteção da barreira epitelial intestinal da ação enterotóxica da TxA.

As células foram tratadas em diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) e o grupo controle recebeu a mesma quantidade de veículo (água estéril destilada e deionizada). E já para os experimentos onde houve apenas a ação da toxina A, o controle recebeu a mesma quantidade de PBS. Os resultados dos experimentos com a TxA foram feitos em porcentagem em relação à medida inicial.

4.4.4 Medida funcional da barreira epitelial intestinal utilizando como marcadores de lactulose e manitol *in vitro*.

A modulação funcional da barreira epitelial intestinal por enterotoxinas bacterianas e fatores tróficos intestinais ainda é pouco conhecida. Sabendo que a toxina A do *C.difficile* causa aumento da permeabilidade paracelular associado a desorganização da F-actina apical e basal, como também a dissociação de ocludina, ZO-1 e ZO-2 (Rybolt et al., 1989), este trabalho avaliou a lesão da barreira epitelial intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* *in vitro*, utilizando marcadores moleculares de lactulose (L; PM.=342) e

manitol (M; PM.=182), que permite avaliar o grau de lesão da mucosa, até então ainda não validados *in vitro*.

A lactulose (C₁₂H₂₂O₁₁) e o manitol (C₆H₁₁O₆) são açúcares hidrofílicos e apresentam baixa afinidade pelos sistemas de transporte monossacarídico da mucosa intestinal, sendo assim, são absorvidos passivamente e com vantagem de não ser metabolizados. O manitol entra nas células através da via transcelular (através da membrana celular pelos poros hidrofílicos do epitélio intestinal), enquanto que a lactulose entra através da via paracelular, por entre as células (Lima et al., 1997). Portanto, a perda da integridade da mucosa intestinal causa um aumento da absorção de lactulose e a perda das áreas absorptivas diminui a absorção do manitol (Fleming et al., 1990). Desta forma, esta razão lactulose/manitol promove uma medida quantitativa da integridade e função intestinais que geralmente está aumentada na diarreia ou em outras doenças que afetam a absorção intestinal (Lima et al., 1997, Barboza Jr et al., 1999).

Para tanto, subseqüentemente a medição da resistência elétrica transepitelial (TER), após o dano induzido pela toxina A do *Clostridium difficile* por 24 horas, marcadores moleculares como lactulose e manitol foram adicionados (40µL) aos compartimentos apicais das membranas permeáveis (*transwells*). A solução de L/M (L = 250mg/mL; M = 50mg/mL) foi preparada com água destilada estéril e filtrada. Após 24 horas, amostras do meio da região basal dos poços foram coletadas e adicionou-se 50µL de clorexidina (para preservar as amostras de células). As amostras foram analisadas e as quantidades dos açúcares medidas em cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsátil (HPLC-PAD do inglês *high-performance liquid chromatography*) como previamente descrito (Barboza Jr et al., 1999) para amostras de urina em seres humanos.

Para a análise, preparou-se primeiramente a solução-padrão, que é o padrão de referência para os açúcares (**Figura 19**), contendo os três açúcares, lactulose (0,0342g), sorbitol (0,0182g) e manitol (0,0182g) e adicionou-se, em

balão volumétrico, para completar o volume de 100mL com água deionizada, bidestilada e estéril. Outra solução padrão, chamada de solução do padrão interno (contendo o sorbitol) também foi preparada com água deionizada, bidestilada e estéril. Antes da dosagem no HPLC, as amostras de células após 24 horas incubação com a TxA, foram preparadas para a análise. As amostras de células (50 μ L) foram diluídas em 50 μ L da solução do padrão interno e adicionada 2,9 mL de água deionizada e bidestilada. Após a filtração desta solução, 50 μ L do filtrado foram utilizados para a dosagem do HPLC-PAD.

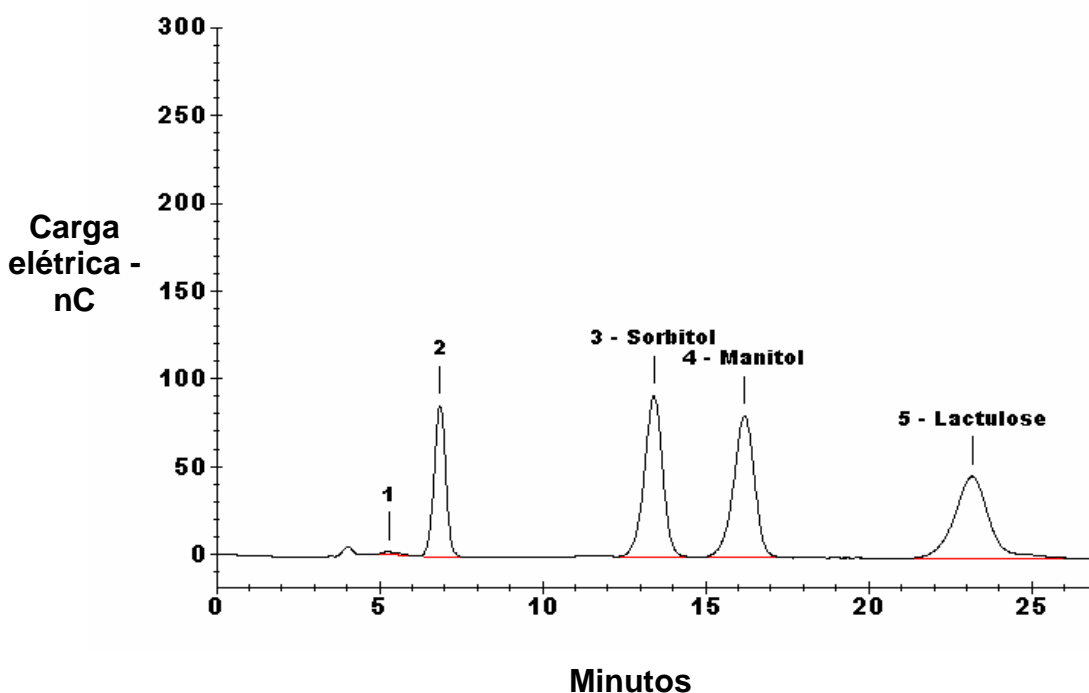


Figura 19: Figura mostrando o cromatograma dos padrões de referência para os três açúcares, sorbitol, manitol e lactulose. Os picos representados em números indicam os açúcares, onde número 3 é pico para o sorbitol, o pico 4 é o manitol e 5 é o pico da lactulose. O pico do sorbitol é usado como padrão interno para a quantificação dos açúcares.

Para a análise, preparou-se primeiramente a solução-padrão, que é o padrão de referência para os açúcares, contendo os três açúcares, lactulose (0,0342g), sorbitol (0,0182g) e manitol (0,0182g) e adicionou-se, em balão volumétrico, para completar o volume de 100mL com água deionizada, bidestilada e estéril. Outra solução padrão, chamada de solução do padrão interno (contendo o sorbitol) também foi preparada com água deionizada, bidestilada e estéril. Antes da dosagem no HPLC, as amostras de células após 24 horas incubação com a TxA, foram preparadas para a análise. As amostras de células (50µL) foram diluídas em 50 µL da solução do padrão interno (mM) e adicionada 2,9 mL de água deionizada e bidestilada. Após a filtração desta solução, 50 µL do filtrado foram utilizados para a dosagem do HPLC-PAD.

4.4.5 Migração celular em cultura de células intestinais

O ensaio da migração celular seguiu o modelo descrito anteriormente com modificações (Brito et al., 2005; McCormack et al, 1992) (**Figura 20**). As células IEC-6 foram semeadas em placa de cultura contendo seis poços em uma concentração de 10^5 células/mL em meio de cultura padrão (com glutamina) já descrito anteriormente. Ao atingirem a confluência (depois de 24 horas), após retirar 50% do meio de cultura de cada poço, foi feito um risco no centro do poço ao longo de uma distância de 30mm na monocamada de células com uma lâmina estéril, arrastando-se as células para a borda do poço (no sentido da esquerda para direita), como mostrado abaixo na figura. Após o arranhão, lavou-se duas vezes as células com tampão salina fosfato estéril (PBS) (1mL/poço) e incubadas com meio sem glutamina suplementado ou não com concentrações crescentes de retinol (0,01-100nM). Logo após, adicionou-se a TxA (0,01µg/mL) para verificar o efeito da vitamina A na migração celular após dano mecânico e da lesão da TxA, e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Depois de 12 e 24 horas, a coluna com maior taxa de migração foi selecionada e as células foram observadas em microscópio invertido (Nikon E400, Japan) em um aumento de 100x,

fotografadas e contadas com o auxílio de uma *grid* ocular, seguindo o modelo adotado por Brito et al., 2005.

Dando continuidade a este experimento, adicionamos também um inibidor da síntese de DNA, mitomicina C (Roche) ao meio durante o ensaio da migração celular, objetivando verificar a modulação do retinol ao inibimos a proliferação celular neste período de tempo de 12 e 24 horas (Bassen et al., 2000). Antes de fazer arranhão nas células IEC-6, adicionou-se aos poços a mitomicina C (5µg/mL) incubando por 15-20 minutos. O procedimento posterior ao arranhão e contagem das células migrando foi executado da mesma maneira descrita acima.

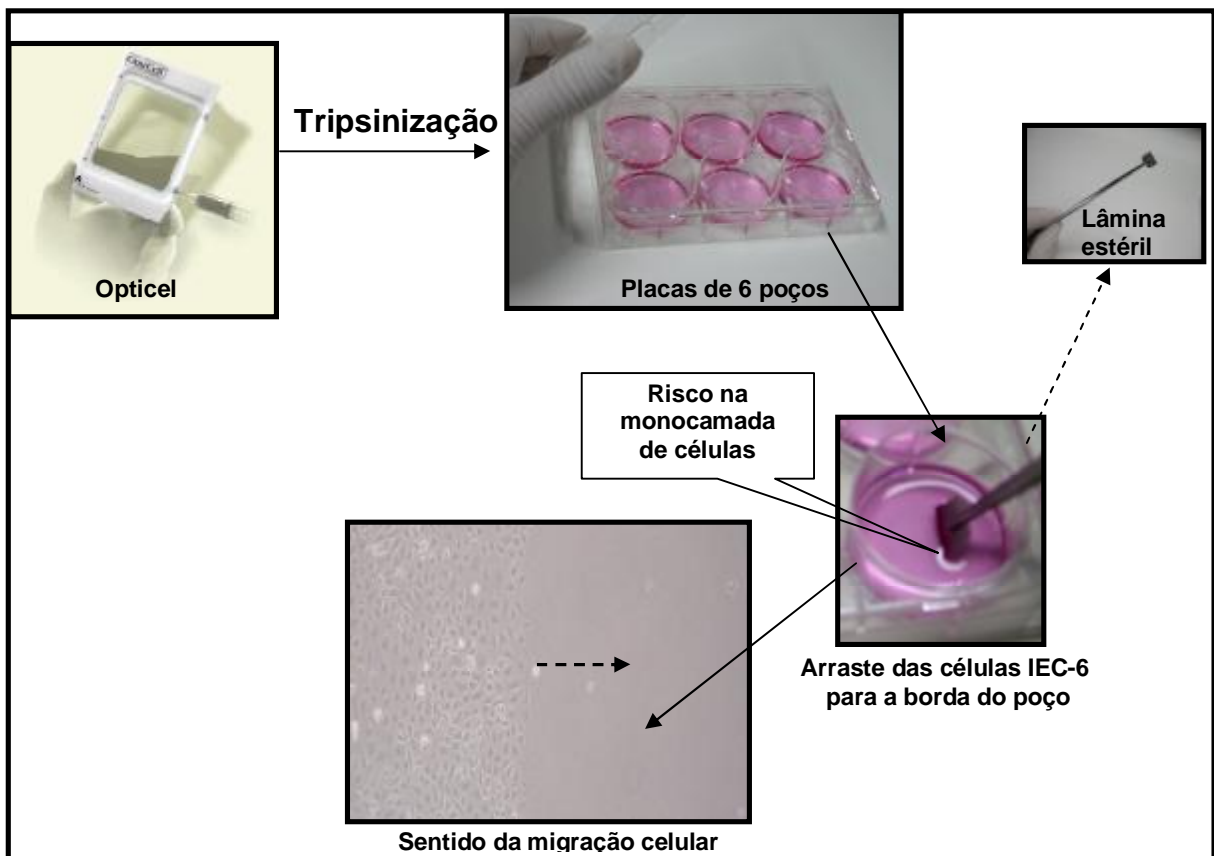


Figura 20: Figura esquemática demonstrando o modelo de migração celular em células IEC-6. (adaptado de Brito et al., 2005 e McCormack et al., 1992) As células foram tripsinizadas e semeadas em placas de seis poços até atingir a confluência (Corning Incorporation, Cambridge, MA, USA). Após

12 e 24 horas, retira-se 50% do meio e, com uma lâmina estéril, faz-se um risco na monocamada celular, arrastando-se as células para a borda do poço. As células, então, são lavadas duas vezes com meio normal estéril (1mL/poço) e incubadas com meio de cultura fresco com ou sem TxA e suplementadas ou não com diferentes concentrações de retinol. As células são observadas em microscópio invertido (AusJena, Germany) em um aumento de 100x, fotografadas e contadas com o auxílio de uma *grid* ocular, seguindo o modelo adotado por Brito et al., 2005.

4.4.6 Proliferação celular de células intestinais em cultura

A proliferação celular foi medida indiretamente usando o Kit de proliferação celular, sal tetrazólio WST-1 adquirido da ROCHE (Mannheim, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As células IEC-6 foram cultivadas em placa contendo 96 poços em uma concentração de 4×10^4 células/mL em 100 μ L de meio padrão (meio com glutamina) na incubadora a 37°C em 5% de CO². Após atingirem confluência de 20 a 30%, em torno de 48h, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão salina fosfato estéril para remoção de todo o meio de cultura e incubadas com meio (padrão ou sem glutamina) suplementado ou não com vitamina A (0,1-100nM) e acrescido ou não da TxA (0,1 μ g/mL). Após 24 e 48 horas, as células foram incubadas a 37°C em 5% de CO² por 4 horas com 10 μ L do sal tetrazólio WST-1. A absorbância foi medida pelo ELISA com filtro de 450nm. Esse composto tetrazólico modificado é reduzido a formazan (marcador solúvel em água) por células metabolicamente ativas, sob ação de uma desidrogenase (**Figura 21**). A produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis na cultura e foi observada quatro horas após a adição dos reagentes, com o auxílio do leitor de ELISA. Essa análise é uma medida indireta da proliferação celular em função do tempo.

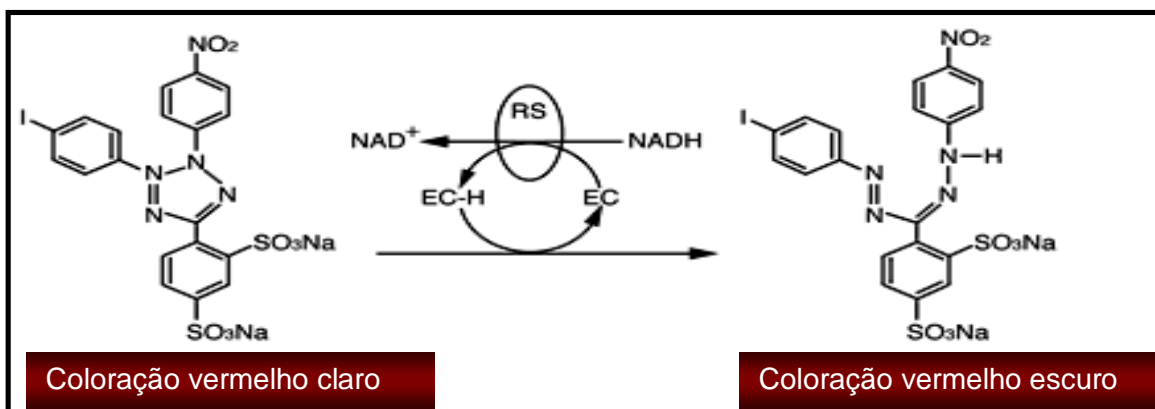


Figura 21: Redução do Composto Tetrazólico (WST-1) a formazan pelas enzimas mitocondriais nas células metabolicamente ativas. O composto tetrazólico modificado (WST-1) é reduzido a formazan por células metabolicamente ativas, sob ação de uma desidrogenase (NADH) (**Figura 19**). A produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis na cultura, portanto é uma medida indireta da proliferação celular. Fonte: Manual de instruções de uso do Kit de proliferação celular WST-1, ROCHE (Mannheim, Germany)

4.4.7 Medição da apoptose e necrose por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para determinar diferentes características das partículas biológicas, podendo ser utilizada para quantificar a apoptose e necrose celular (Ormerod et al., 1993). O princípio da citometria de fluxo se baseia no fato de que, quando a luz da fonte de excitação incide nas partículas em movimento, a luz é desviada e ocorre emissão de fluorescência. O desvio da luz que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células, e a fluorescência são determinadas para cada partícula que passa sobre a fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando um computador específico. O citômetro de fluxo pode ser descrito como quatro sistemas inter-relacionados. O primeiro é o sistema

fluídico, que transporta as partículas da amostra através do instrumento. Neste, a amostra, na forma de suspensão de partículas, atravessa a câmara dentro de um fluxo laminar, permitindo que cada célula seja analisada pela fonte de iluminação individualmente. O segundo é um sistema de iluminação, utilizado para análise da partícula. Os citômetros de fluxo usam raios *laser* como fonte luminosa para interceptar uma célula ou partícula que foi alinhada pelo sistema de fluxo. O terceiro é um sistema óptico e eletrônico para o direcionamento, armazenamento e tradução dos sinais de desvio de luz e emissão de fluorescência que resultam da iluminação das partículas. Este sistema é responsável por coletar e quantificar pelo menos cinco parâmetros dessa luz desviada e fluorescência emitida. O quarto é um sistema de controle computacional que interpreta os sinais elétricos e os transforma em dados significativos para armazenamento e posterior análise. Os sinais gerados a partir das células ou partículas são então chamados de eventos e são armazenados no computador permitindo analisar ou imprimir variações de um arquivo repetidamente (Peres e Curi, 2005; Jaroszeski e Radcliff, 1999; Shapiro, 1995).

Para os experimentos de citometria de fluxo as células IEC-6 foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^5 células/mL até atingirem a confluência. Após 24 horas, o meio foi trocado para meio fresco suplementado ou não com diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) e incubados ou não com a toxina A do *Clostridium difficile* durante 24 horas. Logo após esse período, as células foram tripsinizadas e coletadas para serem centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. Repetiu-se o processo de centrifugação e as células foram resuspensas em 200 μ L de *Binding Buffer* e incubadas por 15 minutos no escuro com 5 μ L de Anexina V e 10 μ L de iodeto de propídio. Apoptose e necrose foram quantificadas por citometria de fluxo (COULTER® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer) (**Figura 22**), utilizando o ApoAlert Annexin V Kit (Clontech, bd).

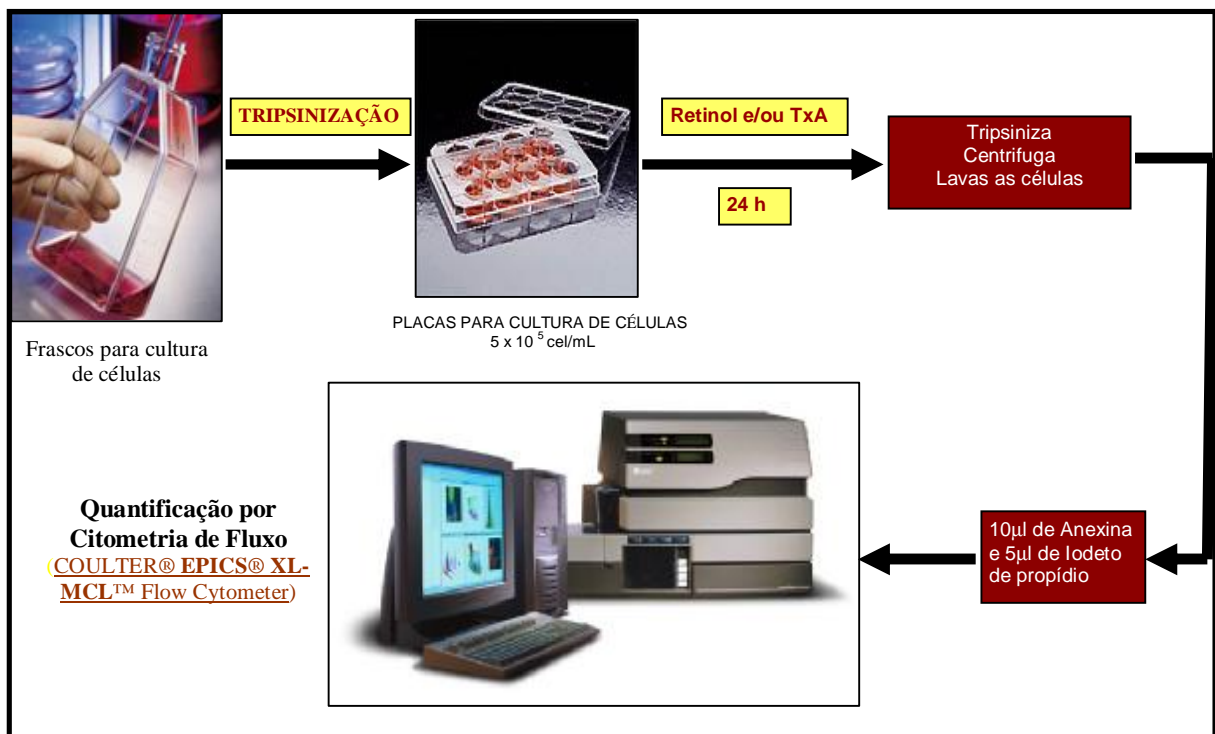


Figura 22: Ensaio para quantificação da apoptose e necrose das células IEC-6 por citometria de fluxo. As células IEC-6 foram cultivadas em frascos para culturas de células e semeadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^5 células/mL até atingirem a confluência. Após 24 horas, o meio foi trocado para meio fresco suplementado ou não com diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) e incubados ou não com a TxA do *C. difficile* durante 24 horas. Logo após esse período, foram adicionadas as células 400µL de Tripsina/EDTA e incubadas por 15 minutos. As células tripsinizadas foram coletadas e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL *Binding Buffer* lavando mais uma vez as células (centrifuga). Descartou-se o sobrenadante e foram resuspensas novamente as células em 200µL de *Binding Buffer* e incubadas por 15 minutos no escuro com 10µL de Anexina V e 5µL de iodeto de propídio (ApoAlert Annexin V Kit, Clontech, BD). Apoptose e necrose das células foram quantificadas por citometria de fluxo (COULTER® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer, Beckman-Coulter, Miami, Florida, USA). Fonte: Modelo adaptado de Ormerod et al., 1993.

O iodeto de propídio (IP), um corante não específico de DNA, imite fluorescência na faixa de 560-580nm (FL2), intercalando entre as duplas fitas dos ácidos nucléicos. O IP não passa por membranas intactas corando apenas as células mortas. Alterações na membrana, como, por exemplo, quando ocorre a apoptose, morte celular programada, pode ser detectada pela translocação de fosfatidilserina da camada interna da membrana para a camada externa. Desta forma, as células cuja membrana esteja rompida permitirão a entrada do IP que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo *laser* (Peres e Curi, 2005).

A fosfatidilserina (PS) é um fosfolípídeo carregado negativamente que é predominantemente presente na face interna da membrana das células (Op den Kamp, 1979). Desta maneira, quando ocorre a morte celular, a PS é translocada para o outro lado da membrana (face externa da célula), fato que geralmente ocorre durante as fases iniciais da apoptose celular, quando a membrana da célula ainda permanece intacta. Por outro lado, a necrose é acompanhada pela perda da integridade da membrana e conseqüente liberação de seus constituintes celulares para fora da célula (Vermees et al., 1995).

O fluorocromo verde de isotiocianato de fluoresceína (FITC) é excitável por laser de argônio (480nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1). A fosfatidilserina é fosfolípídeo presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para serem removidas. A anexina V é proteína dependente de Ca^{++} , que se liga aos fosfolípídeos, apresentando alta afinidade pela fosfatidilserina, a qual se liga especificamente (Raynal e Pollard, 1994). As células que apresentam alta fluorescência no comprimento de onda 515-530 nm são células cuja fosfatidilserina foi marcada com anexina-FITC. No entanto, essas células não devem apresentar fluorescência no comprimento 560-580 nm, que corresponde à marcação com iodeto de propídio. A marcação positiva para iodeto de propídio indica que as células perderam a integridade de membrana; portanto, a fosfatidilserina a qual a anexina-FITC se ligou ainda

está no interior da membrana celular, não sendo um indicativo de apoptose (Vermes et al., 1995). A anexina V é uma molécula que se liga ao fosfatidilserina e quando conjugada a um fluorocromo detecta células apoptóticas expressando PS na membrana celular (**Figura 23**). Para este protocolo, o iodeto de propídeo (PI) também foi usado para detectar necrose e apoptose celular tardia, a qual expressa PI dentro da membrana.

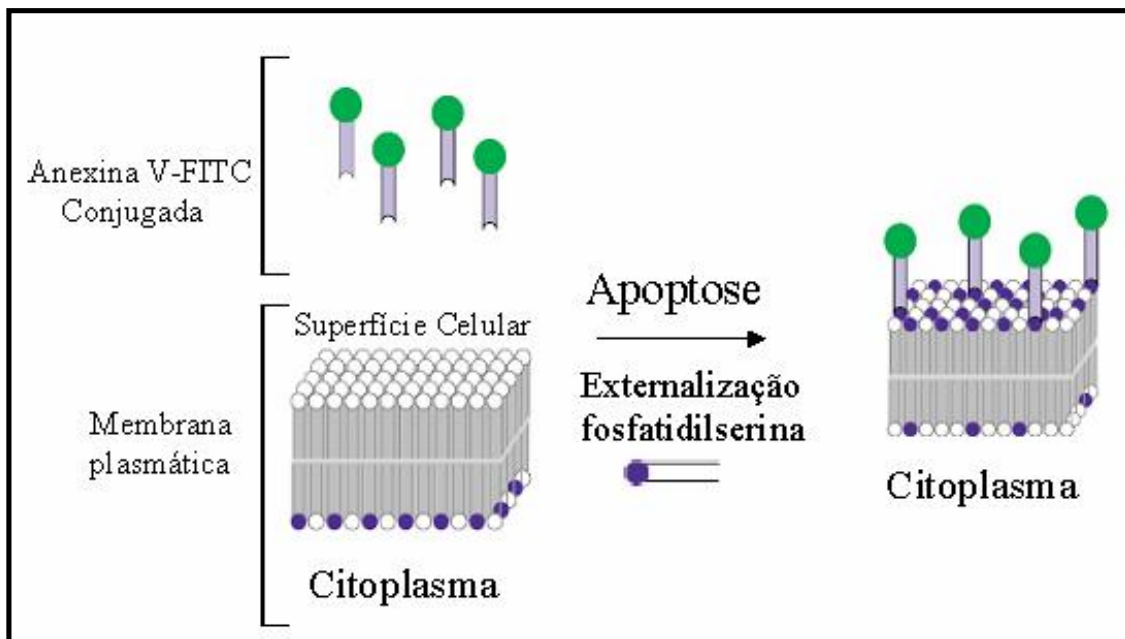


Figura 23: Desenho esquemático da ligação da Anexina V marcada com FITC a fosfatidilserina. A anexina V é uma molécula que se liga ao fosfatidilserina (PS) e quando conjugada a um fluorocromo (FITC) detecta células apoptóticas expressando PS na membrana celular. Durante a apoptose ocorre a externalização do PS que se liga anexina V marcada com FITC (isotiocianato de fluoresceína) por afinidade e detecta as células apoptóticas. O iodeto de propídeo (PI) também é usado para detectar necrose e apoptose celular tardia, a qual expressa PI dentro da membrana (não mostrado no esquema). Fonte: Manual de instruções do Kit ApoAlert Annexin V, Clontech, BD.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM), utilizando o GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni, com significância de 5%. Em alguns casos, em que um dado foi comparado apenas com outro se utilizou o teste *t* de Student apropriado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da Toxina A (TxA) do *Clostridium difficile* em cultura de células intestinais

5.1.1 Efeito da TxA na resistência elétrica transepitelial (TER): análise de dose, tempo e efeito.

Para uma melhor compreensão na dinâmica da lesão da barreira epitelial intestinal em células Caco-2 induzida pela TxA do *C. difficile*, foi necessário estabelecer o comportamento de concentrações diferentes da toxina durante o tempo de exposição. Desta maneira, verificou-se as alterações da TER induzida pela TxA do *C. difficile* durante 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12 e 24 horas de exposição, estabelecendo a curva dose, tempo e efeito, como previamente já descrito por vários pesquisadores (Liu et al., 2003; Johal et al., 2004).

A exposição da monocamada de células Caco-2 à TxA do *C. difficile* provocou uma diminuição significativa de maneira dose-dependente na resistência elétrica transepitelial das células Caco-2 (**Figura 24**). A TxA promoveu uma rápida e irreversível queda da resistência elétrica, ao longo de 24 horas para todas as doses testadas (0,1; 0,3; 1 e 3µg/ml). A partir de meia hora houve uma significativa redução ($p < 0,05$) da TER com a dose de 3µg/mL; Depois de 2 horas, as doses de 0,3µg/mL e 1µg/mL de TxA do *C. difficile* diminuíram também significativamente a resistência. E após 3 horas de incubação com a TxA, foi relatada uma diminuição da resistência para todas as dose testadas de toxina. O efeito máximo da maior e da menor dose ocorreram, respectivamente, depois de 2 e 6 horas, e não houve diferenças significativas entre essas doses neste período. A toxina A do *C. difficile* causou uma queda aguda da resistência de forma dose e tempo dependente. O tempo de início do declínio e efeito máximo da TxA da dose de 3µg/mL foi de 30

minutos e 2 horas, respectivamente. A dose de 0,1 μ g/mL de TxA foi escolhida para o estudo do papel do retinol na proliferação, TER, apoptose e necrose, devido a esta concentração induzir a queda da resistência transepitelial consistentemente como já demonstrada em outros estudos prévios, sendo também a melhor dose da TxA para modelos experimentais com cultura de células intestinais (Brito et al., 2005).

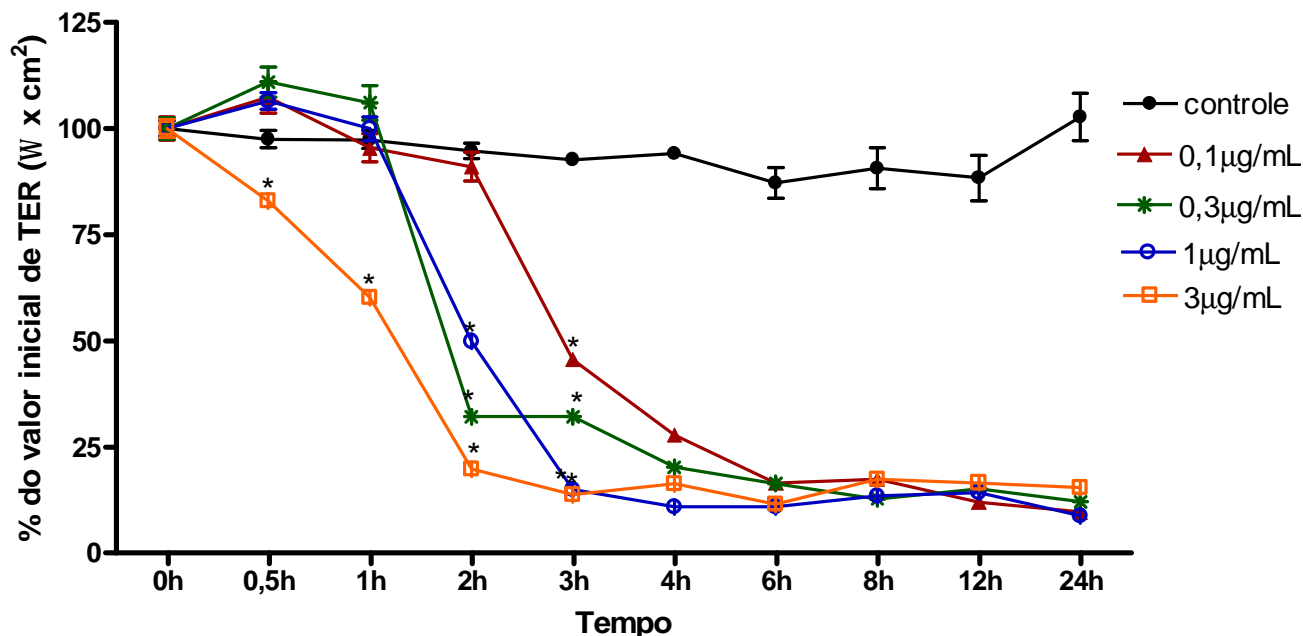


Figura 24: Efeito da toxina A do *C. difficile* (0,1-3 μ g/mL) na resistência elétrica transepitelial (TER) após a confluência das células Caco-2. As células Caco-2 foram semeadas em membranas permeáveis em meio padrão e foram expostas a variadas concentrações de TxA ou PBS estéril (controle). A TER foi medida antes, após 30 minutos e até 24 horas depois da adição da TxA. A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas, subtraída do valor do branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$). Os dados foram expressos em porcentagem dos valores iniciais da TER, sendo representados pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.1.2 Efeito da TxA do *C. difficile* na proliferação celular

A toxina A do *Clostridium difficile* (TxA) reduziu a proliferação celular de maneira dose-dependente nas 24 e 48 horas de exposição nas células IEC-6 (Figura 25). A menor dose da TxA que reduziu significativamente a proliferação celular foi 0,01 μ g/mL às 24 e 48 horas (redução de 23,54% e 6,5% vs controle, $p < 0,001$, respectivamente). A maior dose utilizada (3,0 μ g/mL) reduziu a proliferação em 86,96% e 91,52% vs controle às 24 e 48 horas, respectivamente.

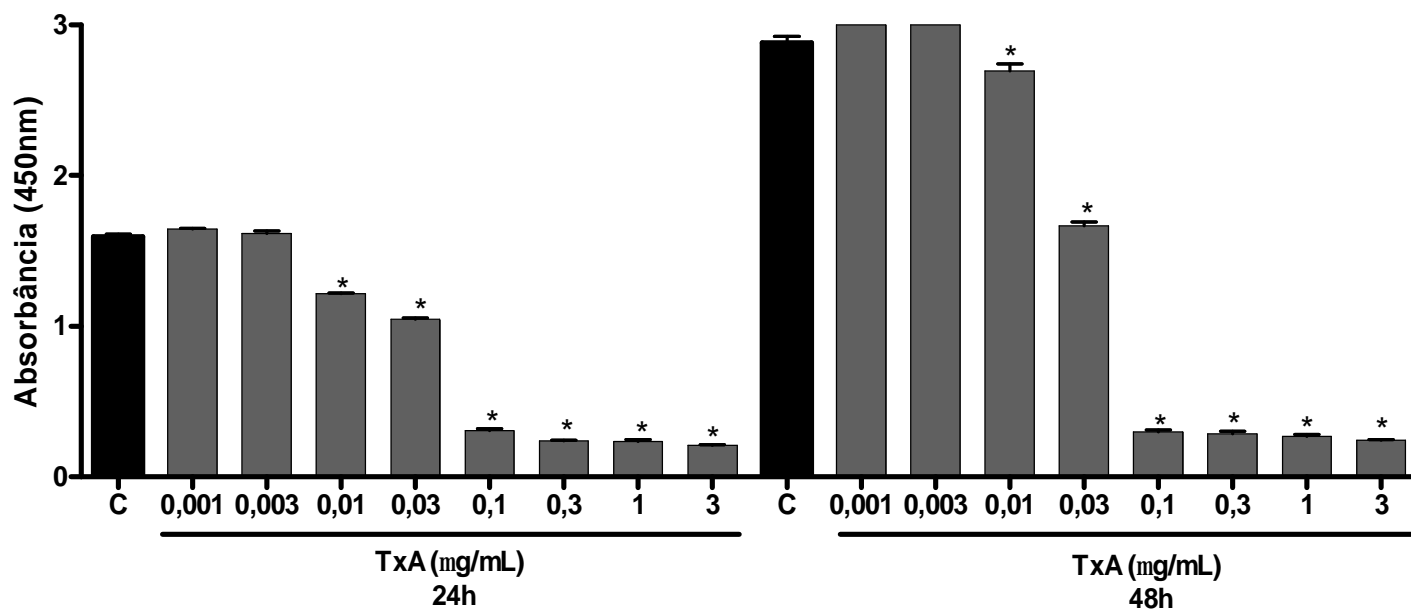


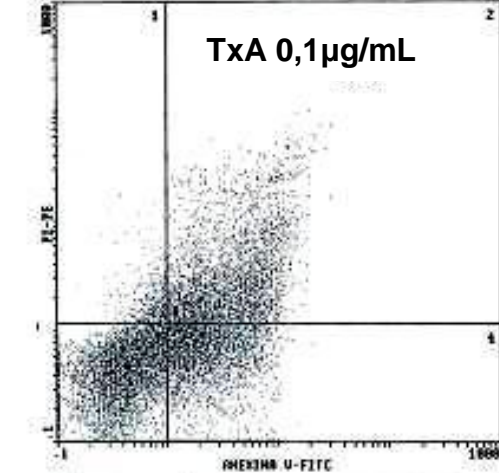
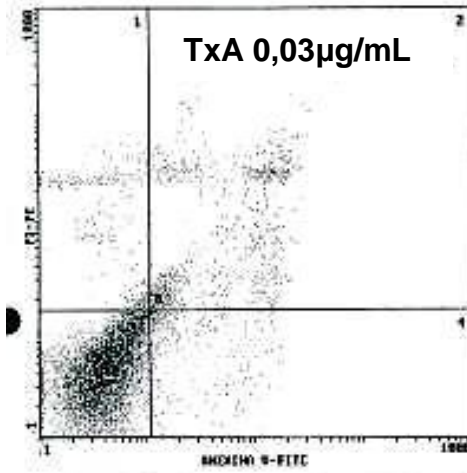
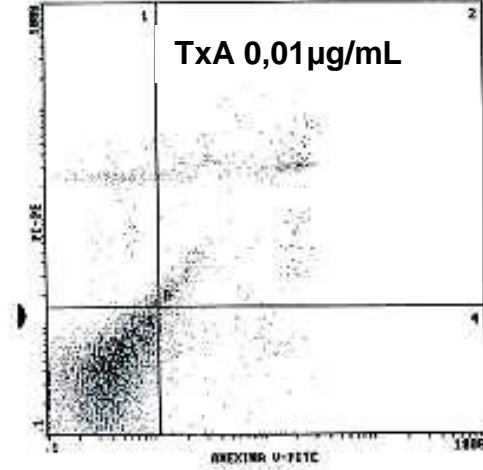
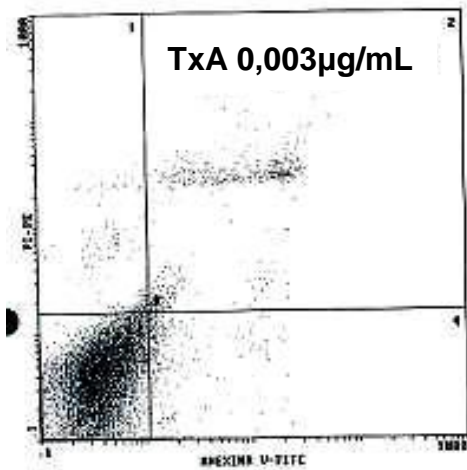
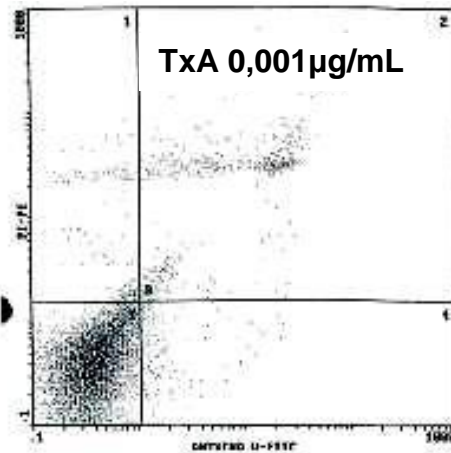
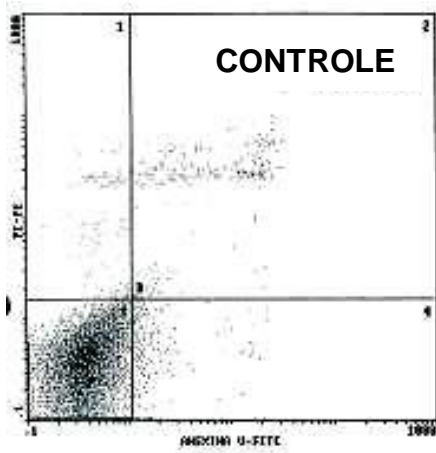
Figura 25: Ação da toxina A (TxA) do *C. difficile* (0,001-3 μ g/mL) na proliferação das células IEC-6 após 24 e 48 horas de exposição. A proliferação celular foi analisada pela leitura da absorbância, em placas de 96 poços, usando o leitor de ELISA em 450nm em 24 e 48 horas de exposição à TxA do *C. difficile*. Após 24 e 48 horas os poços foram incubados por 2 horas com sal tetrazólio e a absorbância foi medida. Os dados demonstram a inibição da proliferação celular *in vitro* de maneira tempo e dose-dependentes. Os valores foram expressos pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle não exposto à TxA (C) é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.1.3 Efeito da TxA do *C. difficile* na migração celular

Após o dano mecânico, realizado pelo arraste da monocamada de células IEC-6 para a borda do poço e a exposição dessas células à TxA do *C. difficile* (0,01µg/mL) durante 24 horas, produziu uma redução significativa na migração celular com um declínio de 31,29% do número de células em migração em relação ao controle em meio sem glutamina (SG). Desta maneira, a dose escolhida para este estudo foi de 0,01µg/mL, apoiada em dados da literatura no qual utilizaram esta mesma dose para estudo *in vitro* em modelo de migração celular em células IEC-6 (Brito et al., 2005). Doses maiores da TxA inibem totalmente a migração celular (100% de inibição), inviabilizando o experimento.

5.1.4 Efeito da TxA do *C. difficile* na viabilidade celular pela quantificação da apoptose e necrose analisada por citometria de fluxo

Após a incubação das células IEC-6 com a TxA (0,001-3µg/ml), o número de células apoptóticas foi significativamente aumentado de forma dose-dependente, iniciando pela dose de 0,1µg/mL, quando comparado ao controle não exposto à TxA ($p < 0,001$). Da mesma maneira, a taxa de células necróticas aumentou significativamente iniciando para a mesma dose de TxA (0,1µg/mL) ($p < 0,05$), embora atingissem um platô mesmo aumentando a concentração da TxA (**Figuras 26 e 27**). As células apoptóticas foram positivas para anexina V-FITC apenas (representado pelo quadrante direito inferior) e as células que apresentaram ambas, necrose e apoptose, foram positivas para ambos anexina V-FITC e iodeto de propídio (representado pelo quadrante superior direito). As células viáveis não se ligaram a anexina V-FITC nem ao iodeto de propídio.



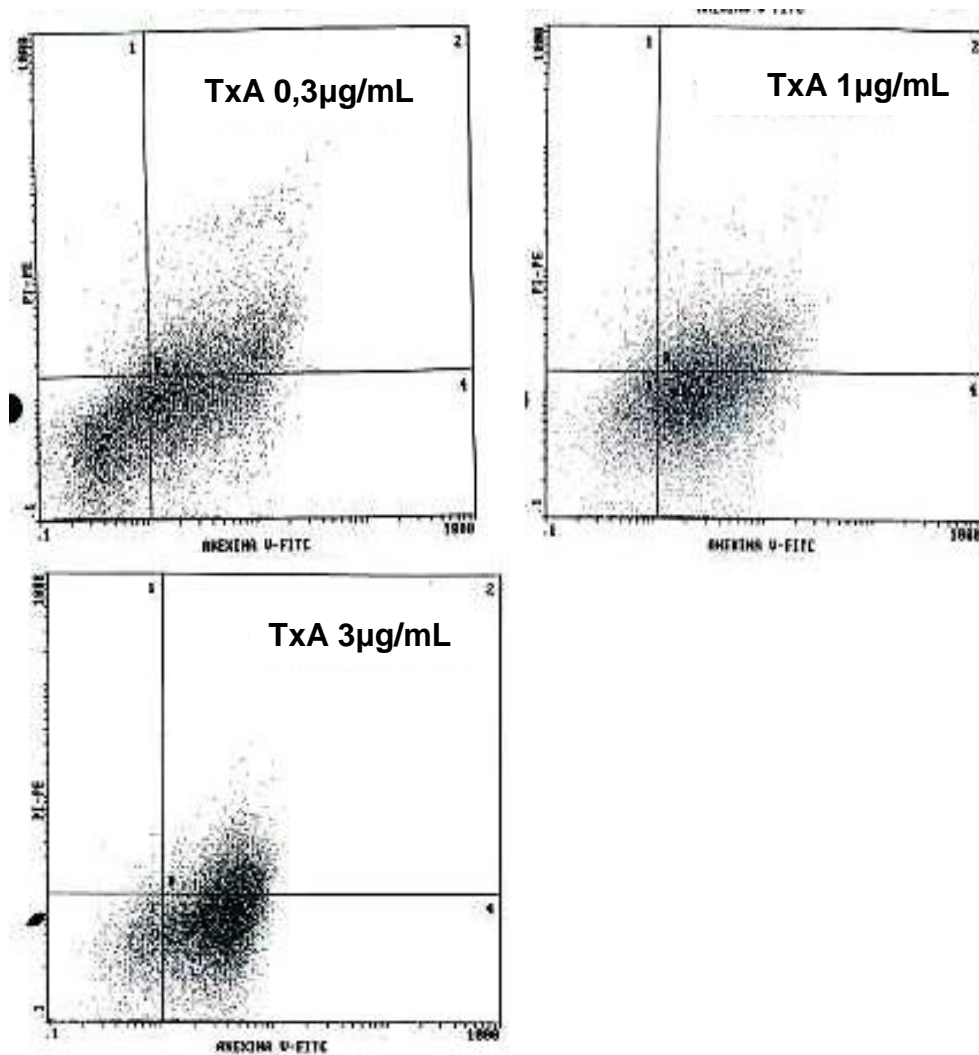


Figura 26: Apoptose e necrose induzidas pela TxA do *C. difficile* (0,001-3µg/mL) em 24 horas. As células IEC-6 foram expostas às diversas concentrações de TxA durante 24 horas. Após este período as células foram colhidas das placas de cultura de 12 poços e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e, posteriormente, quantificadas por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados pelas densidades dos *plots* com iodeto de propídio (na coordenada) vs. anexina V-FITC (na abcissa). As células viáveis têm baixa afinidade de ligação a Anexina V-FITC (quadrante esquerdo inferior) e ao iodeto de propídio (quadrante direito inferior) e as células necróticas possuem alta afinidade de ligação ao iodeto de propídio e a anexina V-FITC (quadrante direito superior). Os resultados mostram que a TxA induz de maneira dose-dependente a apoptose e necrose em células IEC-6.

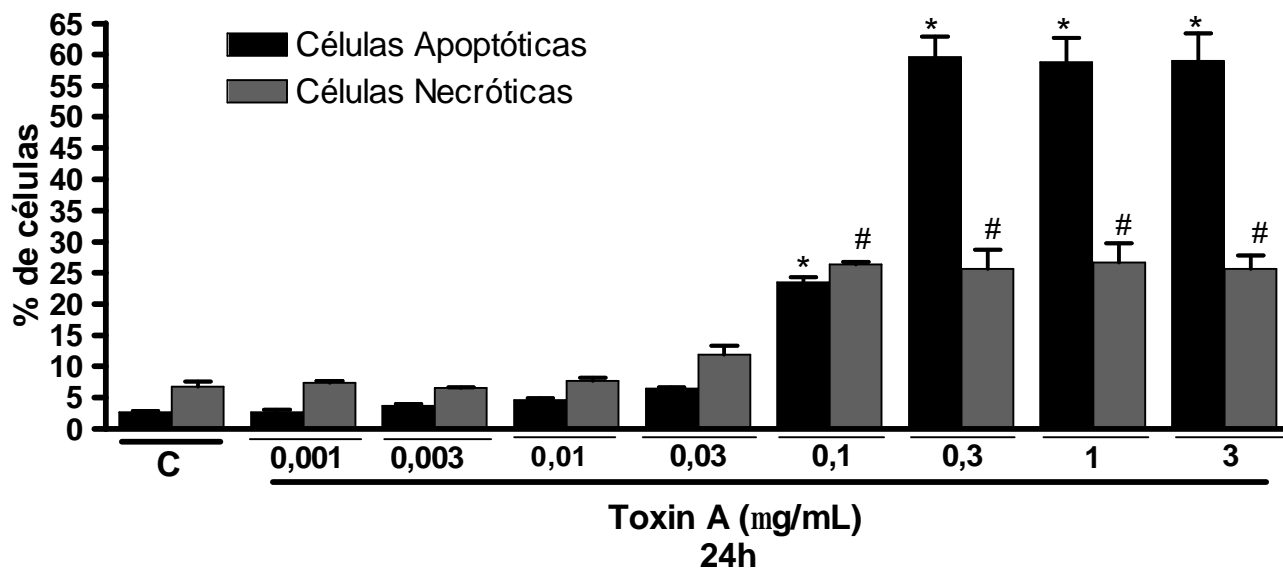


Figura 27: Gráfico em barras representativo da porcentagem de células apoptóticas e necróticas induzidas pela TxA do *C. difficile* (0,001-3 µg/mL). As células IEC-6 foram expostas às diversas concentrações de TxA durante 24 horas. Após este período as células foram colhidas das placas de cultura de 12 poços e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e, posteriormente, quantificadas por citometria de fluxo. Os valores foram expressos pela média \pm epm das porcentagens. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle em meio padrão (C) é indicada pelo asterisco (*) para as células apoptóticas e em # para as células necróticas (ANOVA; Bonferroni).

5.1.5 Efeito da TxA do *C. difficile* na barreira funcional epitelial intestinal das células Caco-2 e a medida de permeabilidade utilizando os marcadores moleculares lactulose (L) e manitol (M)

Com intuito de se verificar a modulação funcional da barreira epitelial intestinal induzida pela enterotoxina do *C. difficile* em células Caco-2 após a exposição à TxA por 24 horas, adicionou-se uma solução de L:M (L = 250mg/mL; M = 50mg/mL) na região apical de cada poço (n=5/grupo) e coletou-se amostras depois de 24 horas para serem analisados por *HPLC-PAD* com detecção amperométrica pulsátil. Os resultados mostraram que a TxA causou uma lesão significativa da barreira epitelial intestinal, como foi dito anteriormente, conforme medido através da resistência transepitelial (houve significativa diminuição da TER) e foi confirmada pela mensuração dos marcadores moleculares lactulose e manitol (**Figuras 28 e 29**). A TxA aumentou significativamente em 36,67% a permeabilidade ao manitol e em 37,93% a lactulose comparados aos respectivos controles sem a TxA (**Tabela 04**). Os dados validam o modelo *in vitro* para medida funcional da barreira epitelial intestinal com os marcadores de lactulose e manitol.

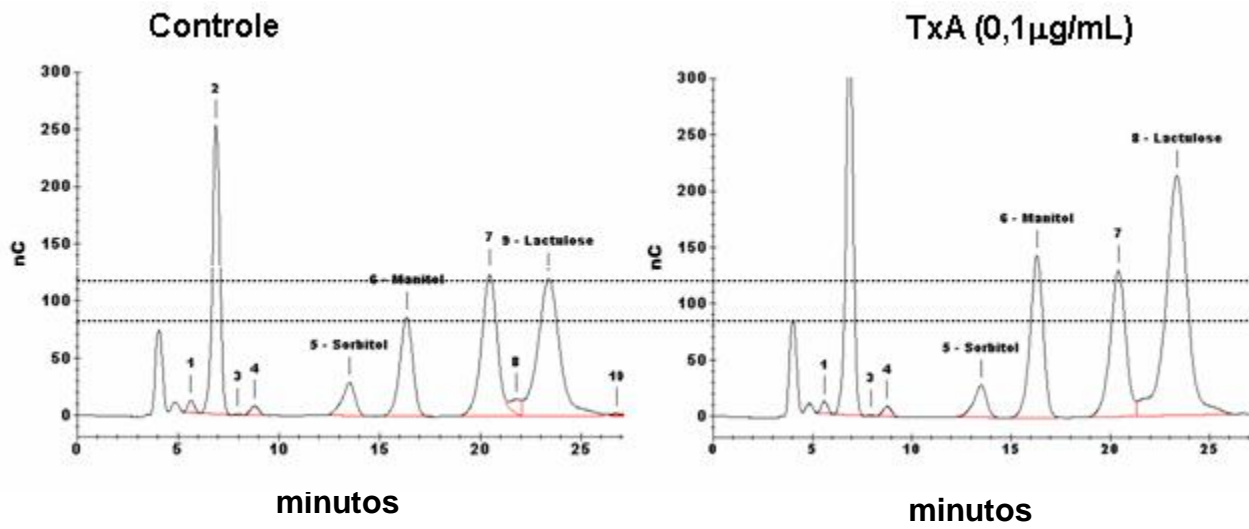


Figura 28: Detecção do fluxo de lactulose e manitol nas células IEC-6 expostas a TxA do *C. difficile*. A figura mostra cromatogramas dos picos de lactulose (L) e manitol (M) do controle (sem TxA) e das células expostas à TxA do *C. difficile* (0,1µg/mL) por 24 horas. As células foram tripsinizadas e semeadas em filtros cobertos por colágeno (*transwells*) em placas de 12 poços e expostas à TxA do *C. difficile* por 24 horas. Após a medição da resistência elétrica transepitelial (TER), marcadores moleculares (L=250mg/mL; M=50mg/mL) foram adicionados na região apical e amostras foram coletadas da região basal dos poços. As amostras foram analisadas e quantificação dos açúcares mensurada em cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsátil (HPLC-PAD do inglês *high-performance liquid chromatography*). O resultados apontam que a TxA causa lesão da barreira epitelial intestinal, conforme medido através das alterações na resistência transepitelial e nos aumentos dos fluxos de marcadores moleculares de lactulose e manitol. Os picos do sorbitol em ambos os cromatogramas representam o controle do padrão interno para a quantificação dos açúcares.

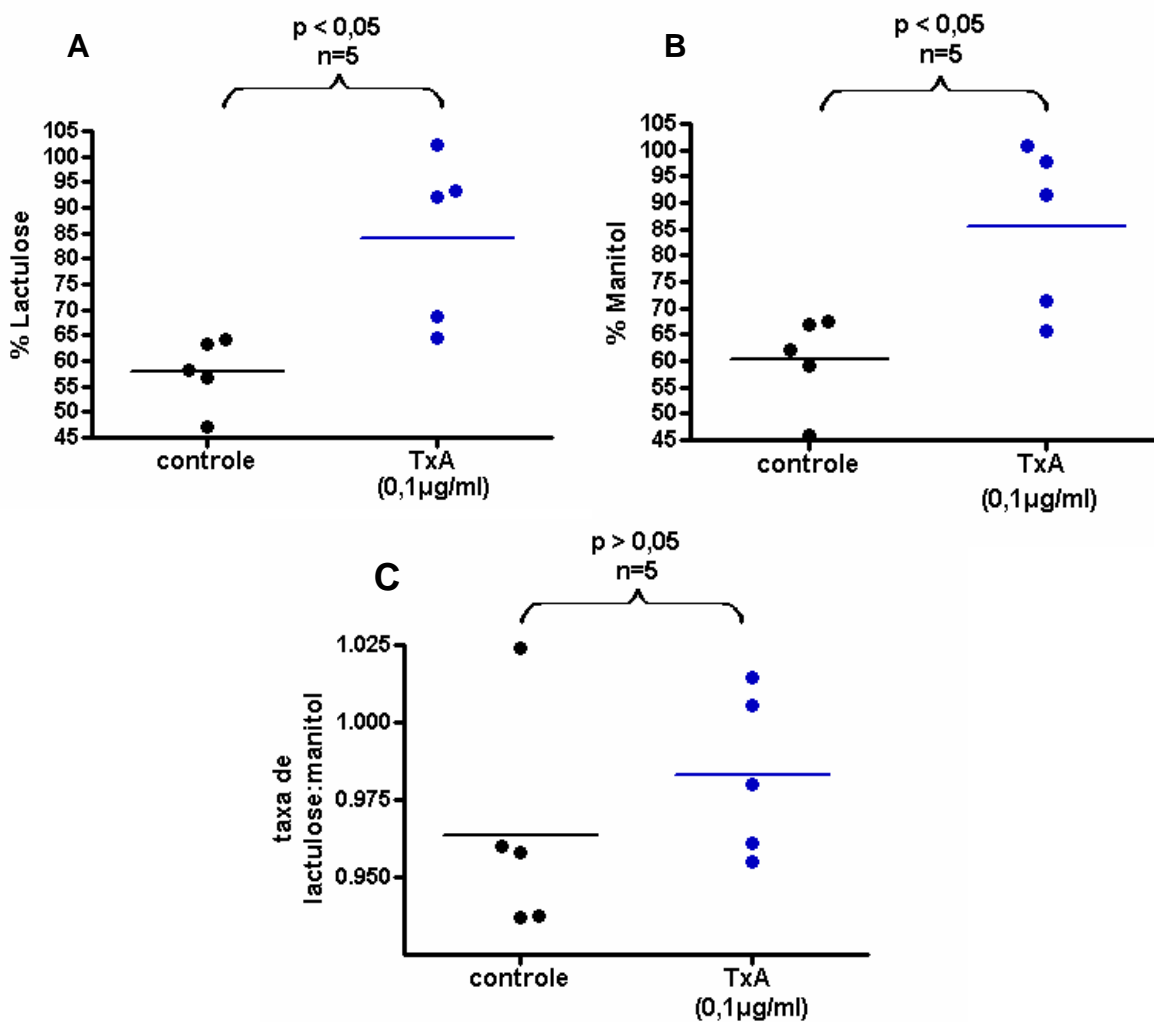


Figura 29: Percentuais de permeação ao teste lactulose/manitol em monocamadas de células Caco-2 após 24 horas de exposição à TxA do *C. difficile*. **A:** Um significativo ($p < 0,05$) aumento do fluxo de lactulose (38%) é observado no grupo exposto à TxA comparado ao grupo controle não exposto à TxA. **B:** Percentual de permeação ao marcador manitol em monocamadas de células Caco- 2 após a exposição à TxA quando comparado ao controle, indicando um aumento de 37% na permeabilidade ao manitol. **C:** A razão Lactulose/manitol não foi significativamente aumentada nas células expostas a TxA.

Tabela 04 – Parâmetros de permeabilidade em monocamadas de células intestinais Caco-2 em cultura de células.

Teste de permeabilidade a lactulose e manitol	Controle (n=5)	TxA do <i>C. difficile</i> (0,1 µg/mL) (n=5)	P
% Lactulose	58 ± 3	80 ± 7	P< 0,05
% Manitol	60 ± 4	82 ± 7	P< 0,05
Taxa de Lactulose:Manitol	0,97 ± 0,75	0,98 ± 1	P> 0,05

Dados foram expressos pela média ± erro padrão da média foram log transformados e analisados utilizando o teste *t* de Student.

5.2 *Função do retinol nas células epiteliais intestinais*

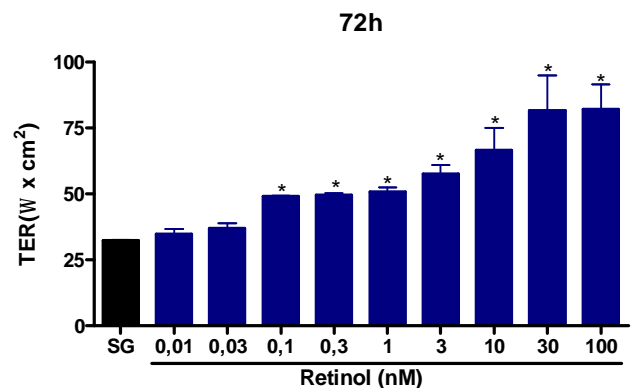
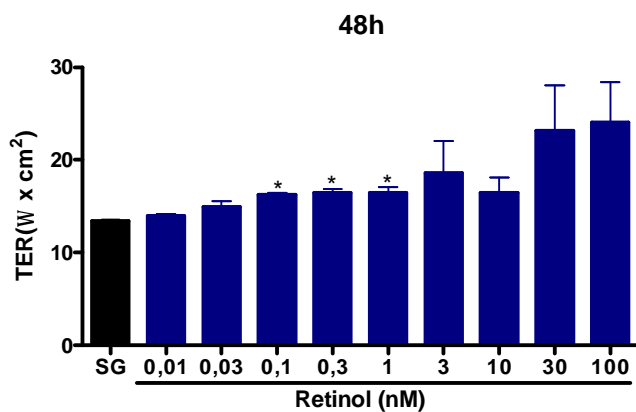
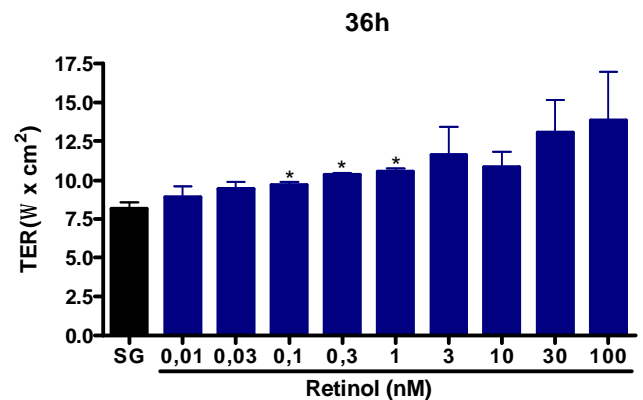
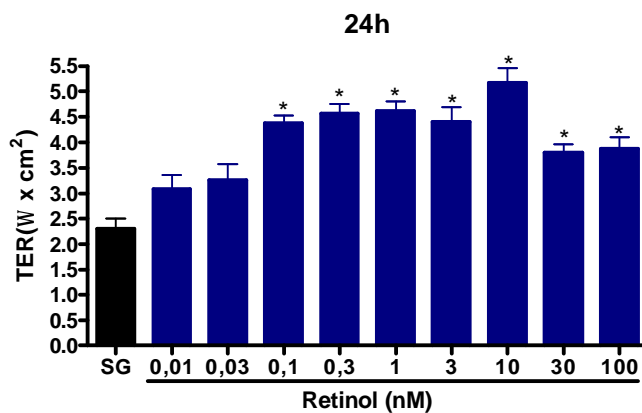
5.2.1. Efeito do retinol na barreira funcional epitelial das células Caco-2 medida pela Resistência Elétrica Transepitelial (TER)

5.2.1.1 Em meio de cultura sem glutamina

No intuito de se investigar o efeito do retinol na barreira funcional epitelial das células Caco-2, avaliamos o tempo de confluência das células na presença do retinol (0,01-100nM) em meio sem glutamina comparado com grupo controle, sem retinol e que recebeu a mesma quantidade do veículo (água destilada, deionizada e estéril). A TER (Ω) em monocamadas de células Caco-2 foi medida para cada poço nas 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas, até ser atingida a confluência conforme mostrado na figura 28.

O retinol foi capaz de permitir um rápido aumento na resistência elétrica transepitelial de maneira dose-dependente, após as 24 horas de cultivo, quando comparado ao grupo controle não tratado com retinol em meio sem glutamina (SG) ($p < 0.05$). As células tratadas com a dose de 0,1; 0,3 e 1nM de retinol apresentaram valores aumentados de resistência transepitelial em relação ao controle ($p < 0,001$) em todos os intervalos de tempo a partir de 24 horas. A resistência após o período de 120 horas nas células tratadas com as doses de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100nM foi aumentada em 4x, respectivamente, em relação ao controle. A partir do tempo de 72 horas as concentrações de retinol (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100nM) promoveram um aumento significativo na TER ($49,12 \pm 0,24$; $49,59 \pm 0,73$; $50,710 \pm 1,9$; $57,53 \pm 3,60$; $66,55 \pm 8$; $81,68 \pm 13,37$; $82,31 \pm 9,27\Omega\text{cm}^2$, respectivamente, em relação ao controle ($32,45 \pm 0,1905\Omega\text{cm}^2$), como também nos intervalos posteriores de tempo do experimento. Desta forma, as taxas de resistência foram substancialmente significativas para as dose de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100nM quando comparadas ao grupo controle, depois das 120 horas, seguida da medida inicial, embora as

doses menores (0,1-1nM) aumentaram significativamente às 36 e 48 horas, provavelmente devido aos elevados desvios da média das outras doses de retinol. As doses de 0,01 e 0,03nM de retinol não aumentaram significativamente a TER em nenhum intervalo de tempo (**Figura 30**).



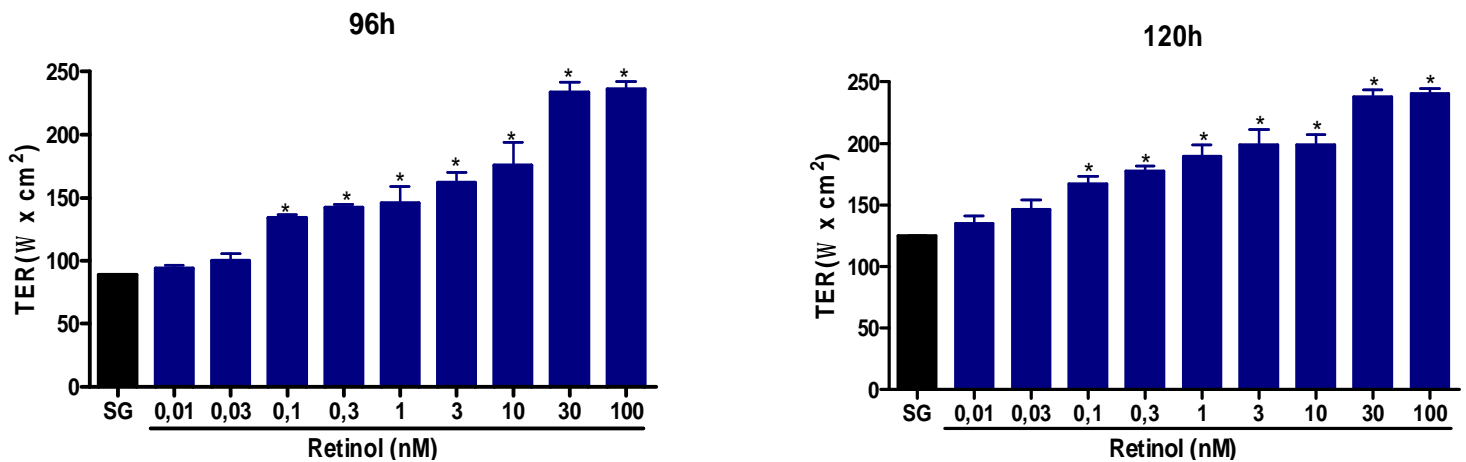
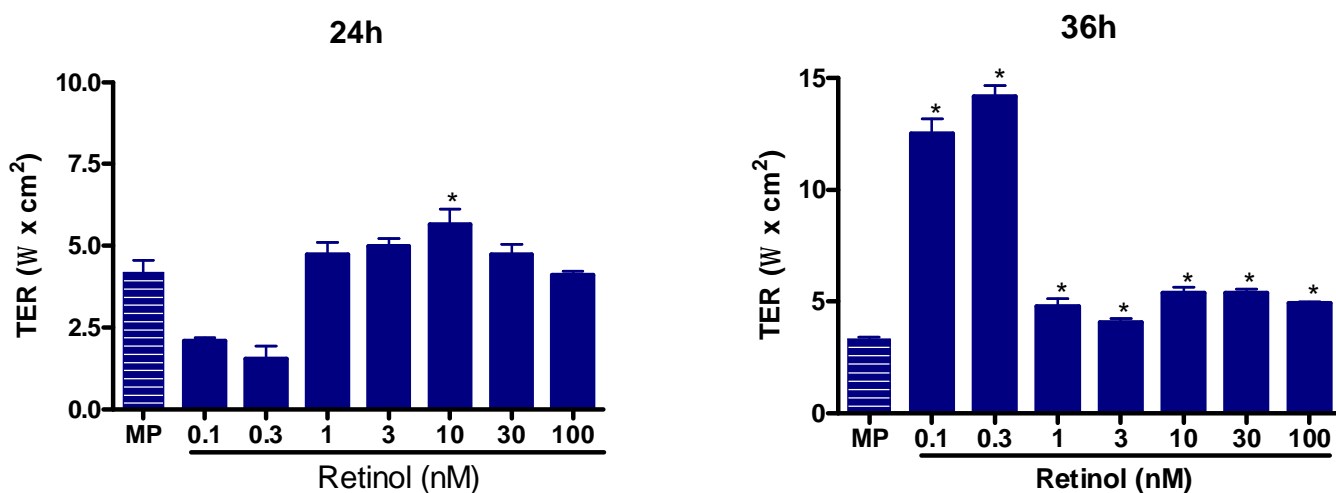


Figura 30: Efeito do retinol na barreira funcional epitelial nas células Caco-2 em meio sem glutamina. As células Caco-2 foram semeadas em membranas permeáveis (*transwells*) em meio sem glutamina suplementado com as diversas concentrações de retinol (0,01-100nM) ou com veículo (água estéril deionizada e destilada). A resistência elétrica transepitelial (TER) ($\Omega \times \text{cm}^2$) foi medida durante os intervalos de tempo de 24, 36, 48, 72, 96, 120 horas. A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas, subtraída do valor do branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$). Os valores são expressos pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle (SG) é indicada pelo asterisco (*) (Teste *T de Student*).

Observou-se que o melhor efeito do retinol foi obtido com as doses maiores de 30 ($237,8 \pm 5,77 \Omega\text{cm}^2$) e 100 ($240,14 \pm 4,34 \Omega\text{cm}^2$) nM, em relação ao controle ($124,9 \pm 0,29 \Omega\text{cm}^2$) às 120 horas (**Figura 30**).

5.2.1.2 Em meio de cultura com glutamina

Da mesma maneira, avaliou-se o efeito do retinol na barreira funcional epitelial das células Caco-2, agora na presença de glutamina (4mM) no meio de cultura. Medimos a TER durante o tempo de confluência das células na presença do retinol nas diversas concentrações (0,1-100nM) (n=6/grupo) e o grupo controle (n=9/grupo) sem retinol e que recebeu a mesma quantidade do veículo (água destilada, deionizada e estéril). A TER (Ω) em monocamadas de células Caco-2 foi medida para cada poço nas 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, ou até ser atingida a confluência. Nas 24 horas, apenas a concentração de 10nM foi significativa e nas 36 e 48 horas, todas as concentrações de retinol apresentaram valores aumentados de resistência transepitelial em relação ao controle (MP) ($p < 0,001$) e ainda, nas 72 horas as concentrações de entre 0,1-10nM tiveram aumento da TER em relação ao controle (MP, meio padrão). Já no intervalo de tempo de 96 e 120 horas, para as doses entre 0,1-3nM. Vale ressaltar que para as menores doses de retinol (0,1-0,3nM), houve uma elevação na TER extremamente significativa, quando comparada ao grupo controle a partir das 36 horas (**Figura 31**).



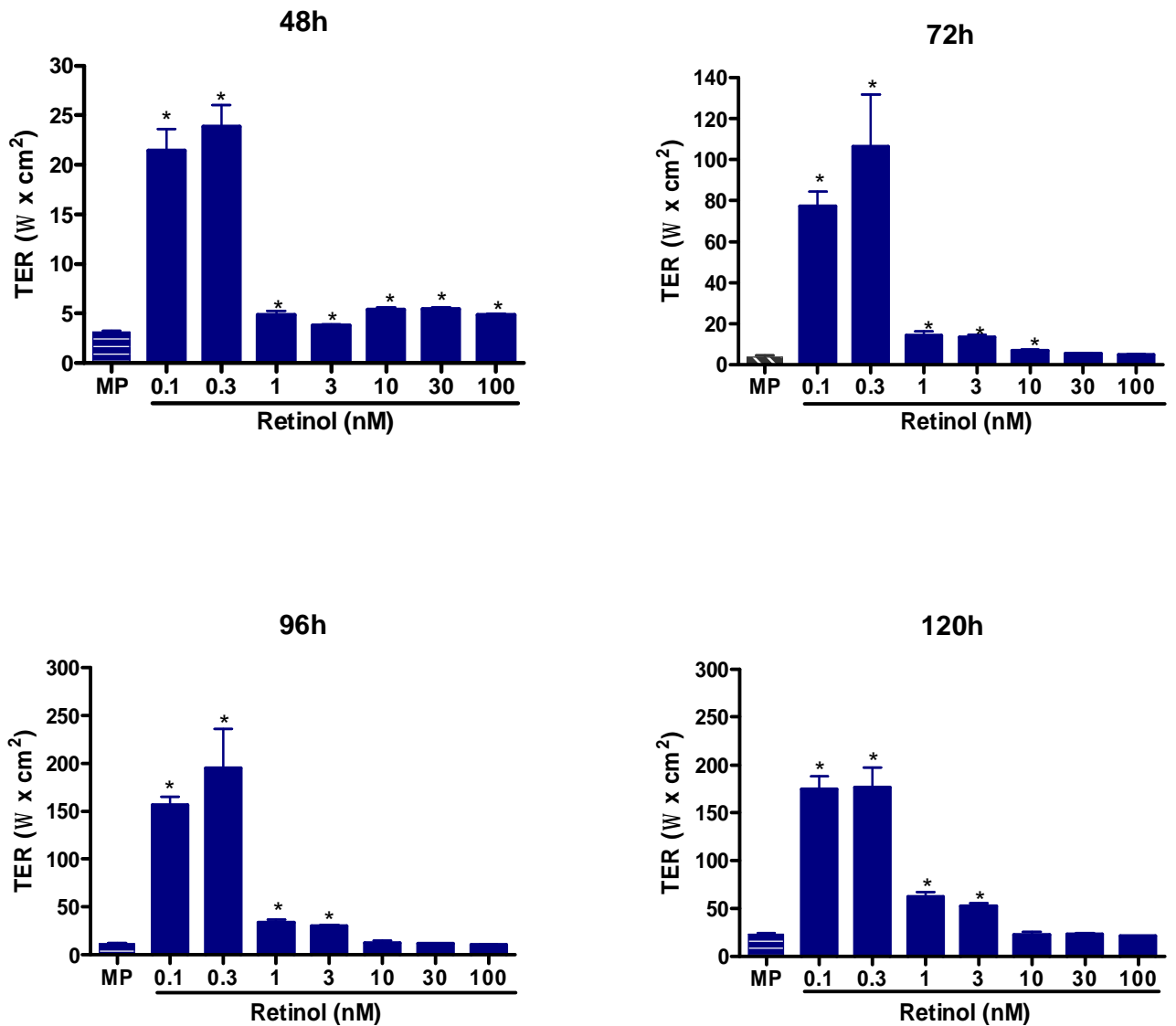


Figura 31: Efeito do retinol na barreira funcional epitelial nas células Caco-2 em meio com a presença de glutamina. As células Caco-2 foram semeadas em membranas permeáveis (*transwells*) em meio com glutamina (4mM) suplementado com as diferentes concentrações de retinol (0,1-100nM) ou com veículo (água estéril deionizada e destilada). A resistência elétrica transepitelial (TER) ($\Omega \times \text{cm}^2$) foi medida durante os intervalos de tempo de 24, 36, 48, 72, 96, 120 horas. A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas subtraída do valor do branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da

membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$). Os valores são expressos pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle (MP, meio padrão) é indicada pelo asterisco (*) (Teste *T de Student*).

5.2.2 Efeito do retinol na migração celular em células epiteliais IEC-6

5.2.2.1 Em meio de cultura sem glutamina

A suplementação com retinol na migração celular em meio de cultura sem glutamina aumentou a migração das células IEC-6, por 24 horas, nas doses de 0,1; 0,3; 1 e 100nM ($n=6/\text{grupo}$) em 44,6%; 39,75%; 17,36% e 13,13%, respectivamente ($p < 0,05$), em relação ao controle (SG) ($n=6/\text{grupo}$) com meio sem retinol e sem glutamina, exceto para a dose de 10nM (**Figura 32**).

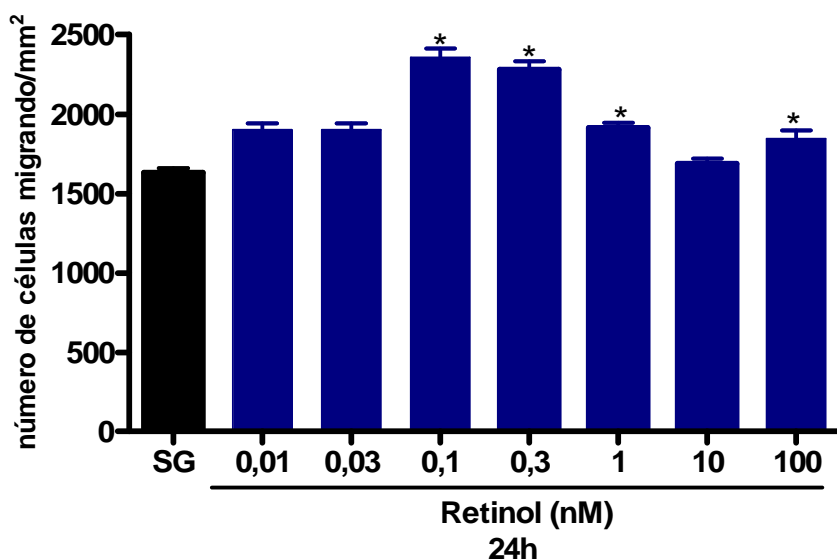


Figura 32: Ação do retinol na migração das células IEC-6 em meio sem glutamina (SG) após 24 horas de incubação. Após a confluência, foi feita uma raspagem na monocamada de células IEC-6, com subsequente incubação por diferentes doses de retinol (0,01-100nM) diluído no meio sem glutamina por 24 horas, imediatamente depois da retirada do meio padrão. As barras são representadas pela média \pm epm do número de células migrando por mm^2 da

área raspada. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle com meio sem glutamina e ausente de retinol (SG) é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.2.2.2 Em meio de cultura com glutamina

O efeito do retinol na migração celular, em 24 horas, em meio de cultura padrão (com a presença de glutamina) promoveu um aumento significativo de 46,59% apenas para a dose de 100nM vs controle sem retinol e que recebeu a mesma quantidade do veículo (água destilada, deionizada e estéril) (MP) ($n=6$ /grupo; $p < 0,001$) Nas demais doses esse efeito não foi encontrado (**Figura 33**).

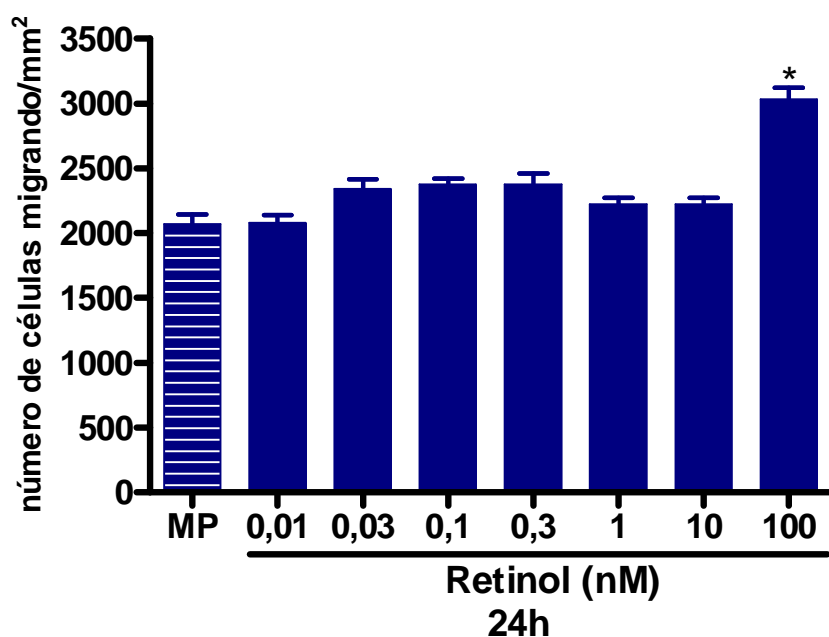


Figura 33: Ação do retinol na migração das células IEC-6 em meio padrão (MP) após 24 horas de incubação. Após a confluência das células IEC-6, fez-se uma raspagem na monocamada com posterior incubação com diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) diluídas no meio sem glutamina por 24 horas, imediatamente depois da retirada do meio padrão. As barras são

representadas pela média \pm epm do número de células migrando por mm^2 da área raspada. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle (MP), meio com glutamina e ausente de retinol, é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.2.3 Efeito do Retinol na proliferação celular em células epiteliais IEC-6

5.2.3.1 Em meio de cultura sem glutamina

A suplementação das células IEC-6 com retinol diluído em meio sem glutamina (SG) aumentou a proliferação celular na dose 0,3nM (9,8% vs controle - SG, $p < 0,01$) durante 24 horas de incubação com retinol. Após 48 horas de incubação com retinol as doses de 0,1 e 0,3nM aumentaram a proliferação celular em relação ao controle com meio sem glutamina (SG) (6,4% e 7,2% vs controle- SG, $p < 0,01$ (respectivamente) (**Figura 34**).

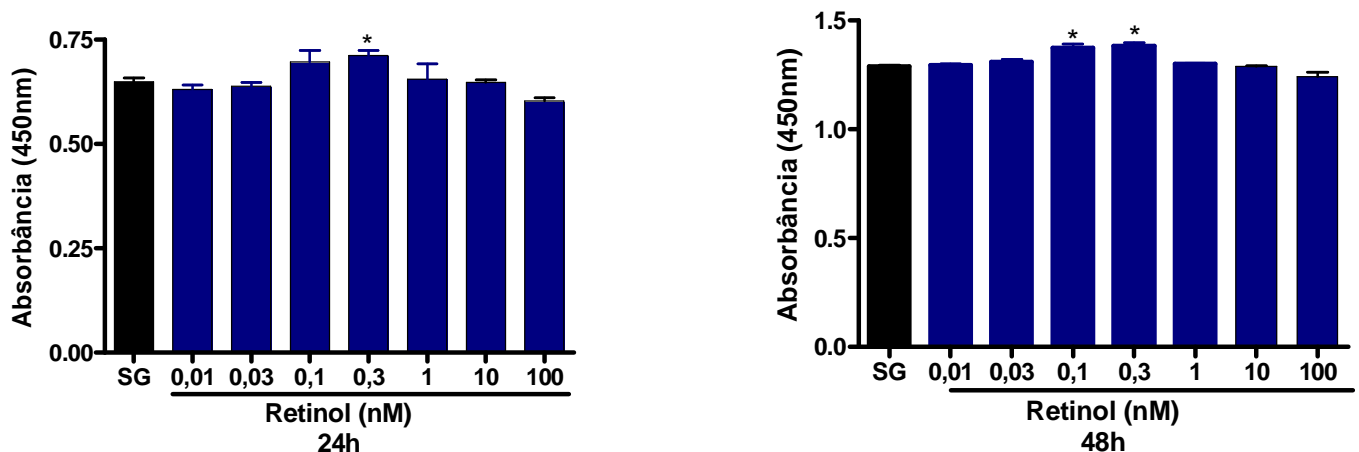


Figura 34: Efeito do retinol na proliferação das células IEC-6 em 24 e 48 horas, em meio sem glutamina (MP). As células IEC-6 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 e 48 horas com retinol (0,01-100nM) diluído em meio padrão. Após estes períodos de tempo, foram adicionados 10 μ L do sal tetrasólio aos poços e incubados por 2 horas em 5% de CO₂. A absorbância foi mensurada pelo leitor de ELISA em 450nm. Os valores foram expressos pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada

com controle com meio sem glutamina (MP) é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni) (*) (Teste *T de Student*, 24 horas; ANOVA; Bonferroni, 48 horas).

5.2.3.2 Em meio de cultura com glutamina

A incubação com retinol em meio padrão (MP) durante 24 e 48 horas não mostrou aumento significativo na proliferação celular para nenhuma das doses testadas (**Figura 35**).

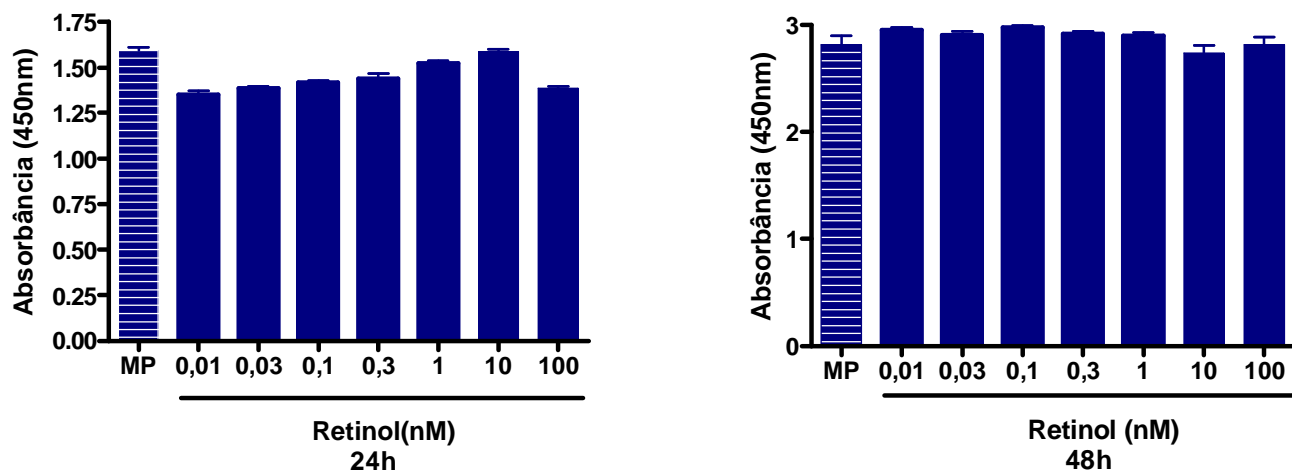
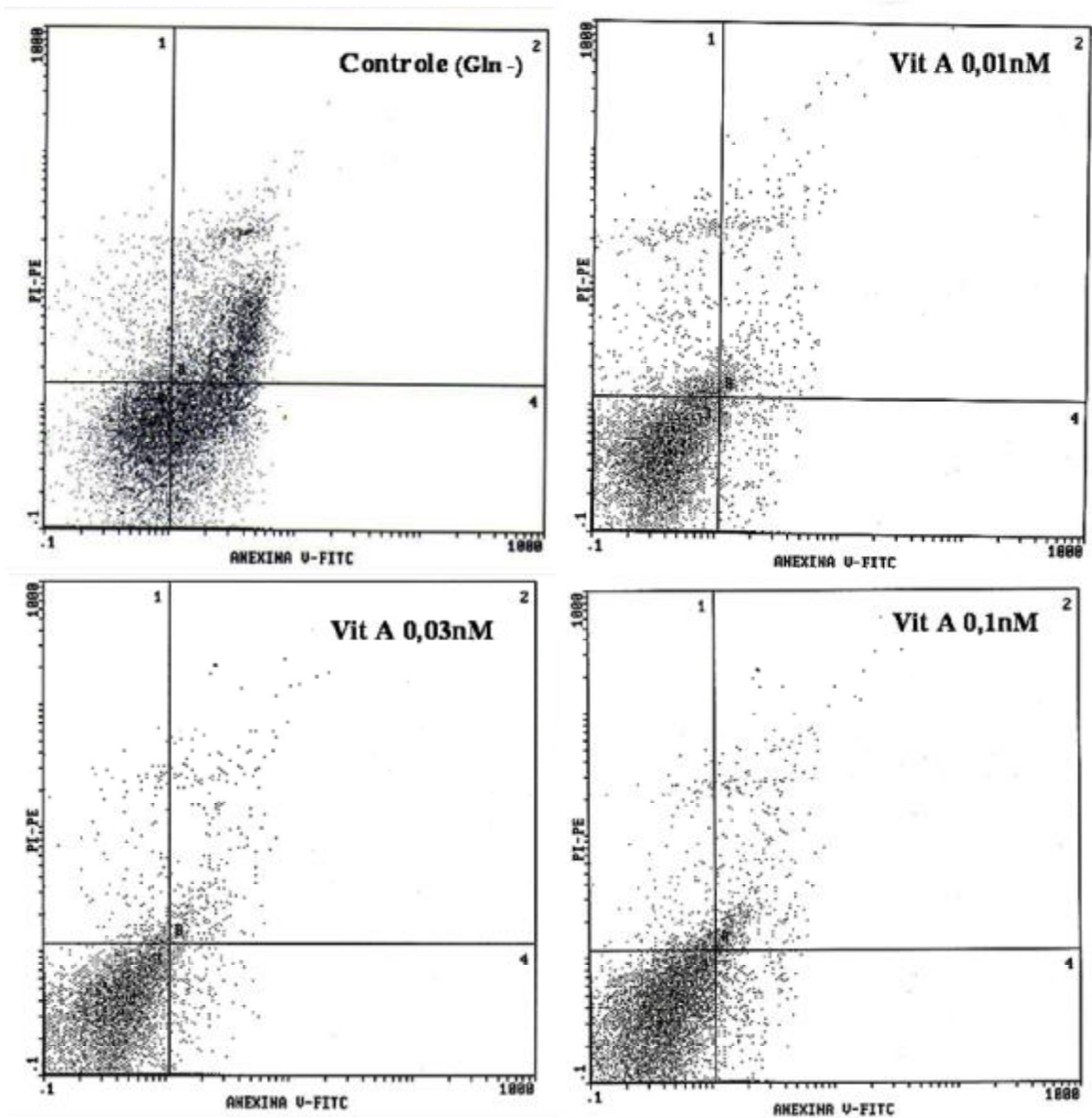


Figura 35: Efeito do retinol na proliferação das células IEC-6 em 24 e 48 horas, em meio padrão (MP). As células IEC-6 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 e 48 horas com retinol (0,01-100nM) diluído em meio padrão. Após estes períodos de tempo, foram adicionados 10 μ L do sal tetrasólio aos poços e incubados por 2 horas em 5% de CO₂. A absorbância foi medida usando o leitor de ELISA em 450nm. Os valores foram expressos pela média \pm epm. Não houve significância estatística (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.2.4 Efeito do Retinol na apoptose e necrose das células epiteliais IEC-6

Avaliamos a ação do retinol (0,01-100nM) na apoptose e necrose em meio sem a presença de glutamina durante 24 horas. Os gráficos são mostrados pela densidade dos plots evidenciam as células apoptóticas positivas apenas para anexina V-FITC (representado pelo quadrante direito inferior) e as células que apresentaram ambas, necrose e apoptose, foram positivos para os dois, anexina V-FITC e iodeto de propídio (representado pelo quadrante superior direito). As células viáveis não se ligaram a anexina V-FITC nem ao iodeto de propídio. O retinol reduziu significativamente ($p < 0,001$) o número de células apoptóticas em todas as doses (0,01- 100nM) em 79-86%. O retinol reduziu significativamente de ($p < 0,05$) a necrose apenas nas concentrações menores de 0,01 e 0,03nM em 53,4 e 59,2%, respectivamente, em comparação as células sem a suplementação de retinol e em meio livre de glutamina (**Figura 36**).



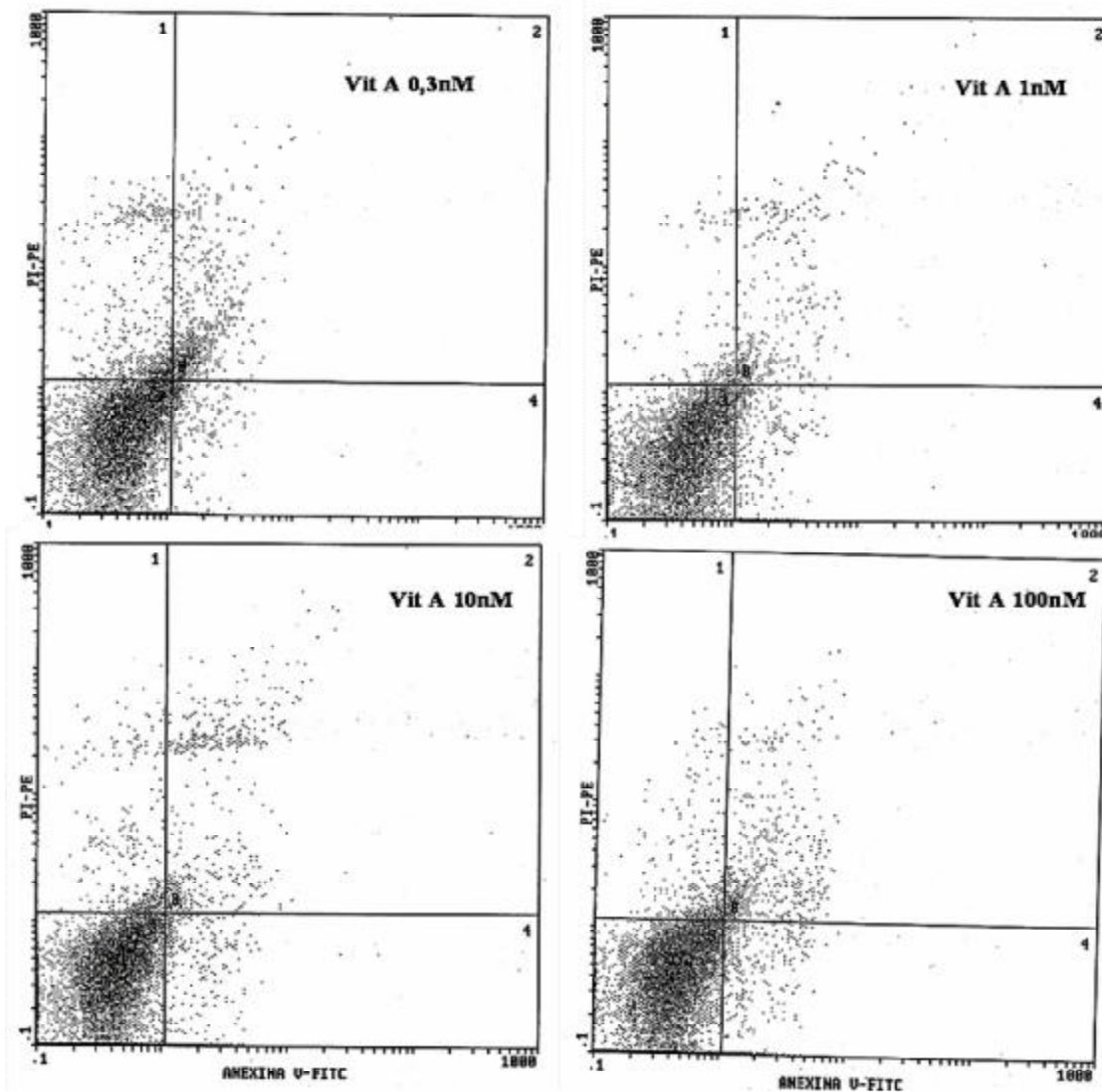
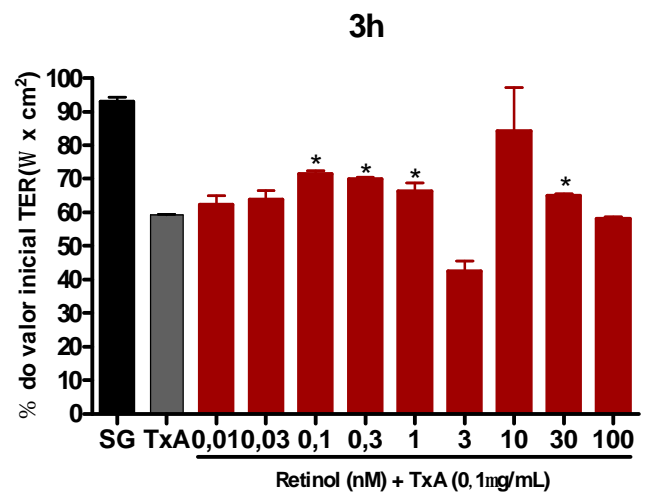
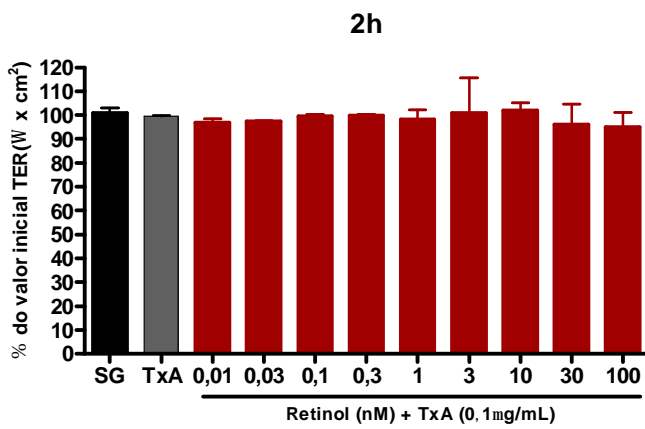
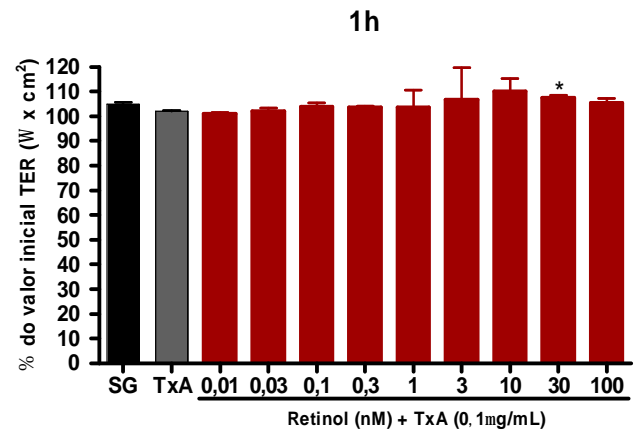
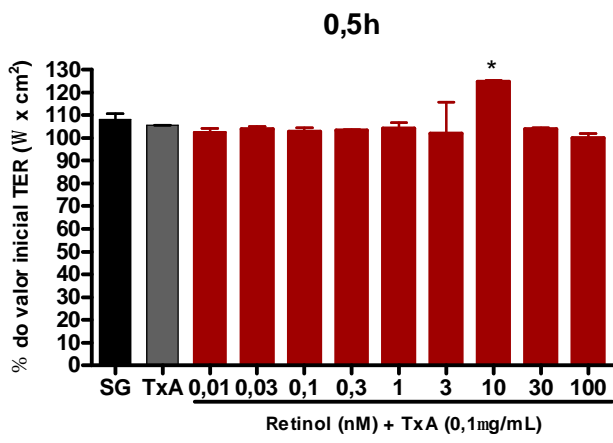


Figura 36: Redução na apoptose e necrose das células IEC-6 pela suplementação de diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) em 24 horas. Todas as concentrações de retinol diminuíram a apoptose em relação ao controle. Apenas as concentrações menores de retinol (Vit A 0,01 e 0,03nM) foram capazes de reduzir significativamente a necrose em relação ao controle em meio sem glutamina (Gln-). Os resultados são mostrados pelas densidades dos *plots* com iodeto de propídio vs. anexina V-FITC, quantificados pela citometria de fluxo. As células viáveis têm baixa afinidade de ligação à Anexina V-FITC (quadrante esquerdo inferior) e ao iodeto de propídio (quadrante direito inferior) e as células necróticas possuem alta afinidade de ligação ao iodeto de propídio e à anexina V-FITC (quadrante direito superior).

5.3 Modulação do retinol nas alterações da resistência elétrica transepitelial (TER) provocadas pela exposição à TxA do *C. difficile* (0,1mg/mL) em culturas de células intestinais Caco-2.

Para elucidar o efeito do retinol na lesão da barreira funcional intestinal induzida pela TxA do *C. difficile* medimos a TER no curso temporal de meia hora até 24 horas de exposição nas células Caco-2. Após meia hora de incubação com a TxA, a concentração de retinol 10nM preveniu a redução da TER em relação ao controle ($124,6 \pm 0,66\Omega\text{cm}^2$ vs $105,5 \pm 0,15$; $p < 0,05$). O retinol nas concentrações de 0,1nM ($59,3 \pm 1,3\Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$), 0,3nM ($69,86 \pm 0,6 \Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$), 1nM ($66,4 \pm 2,3\Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$), e 30nM ($65,03 \pm 0,62\Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$) preveniram a redução da TER (Ω) (% do valor inicial), em 3 horas de exposição à TxA, em relação ao controle não suplementado com retinol e exposto à TxA ($59,3 \pm 1,3\Omega\text{cm}^2$). As doses de 30 nM ($107,5 \pm 1,17$ vs. $102,2 \pm 0,84\Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$) de retinol a 1 hora e as doses de 0,1; 0,3 e 10nM ($36,17 \pm 0,02$; $33,5 \pm 1,8$; $50,63 \pm 2,33$ vs. $27,31 \pm 0,23\Omega\text{cm}^2$; $p < 0,05$), respectivamente, nas 4 horas preveniram a redução da TER em relação ao controle com TxA. Depois de 6 horas seguidas de exposição à TxA, a severidade da citotoxicidade da TxA não foi mais revertida, como visto nas primeiras horas com efeito benéfico da proteção do retinol (**Figura 37**).



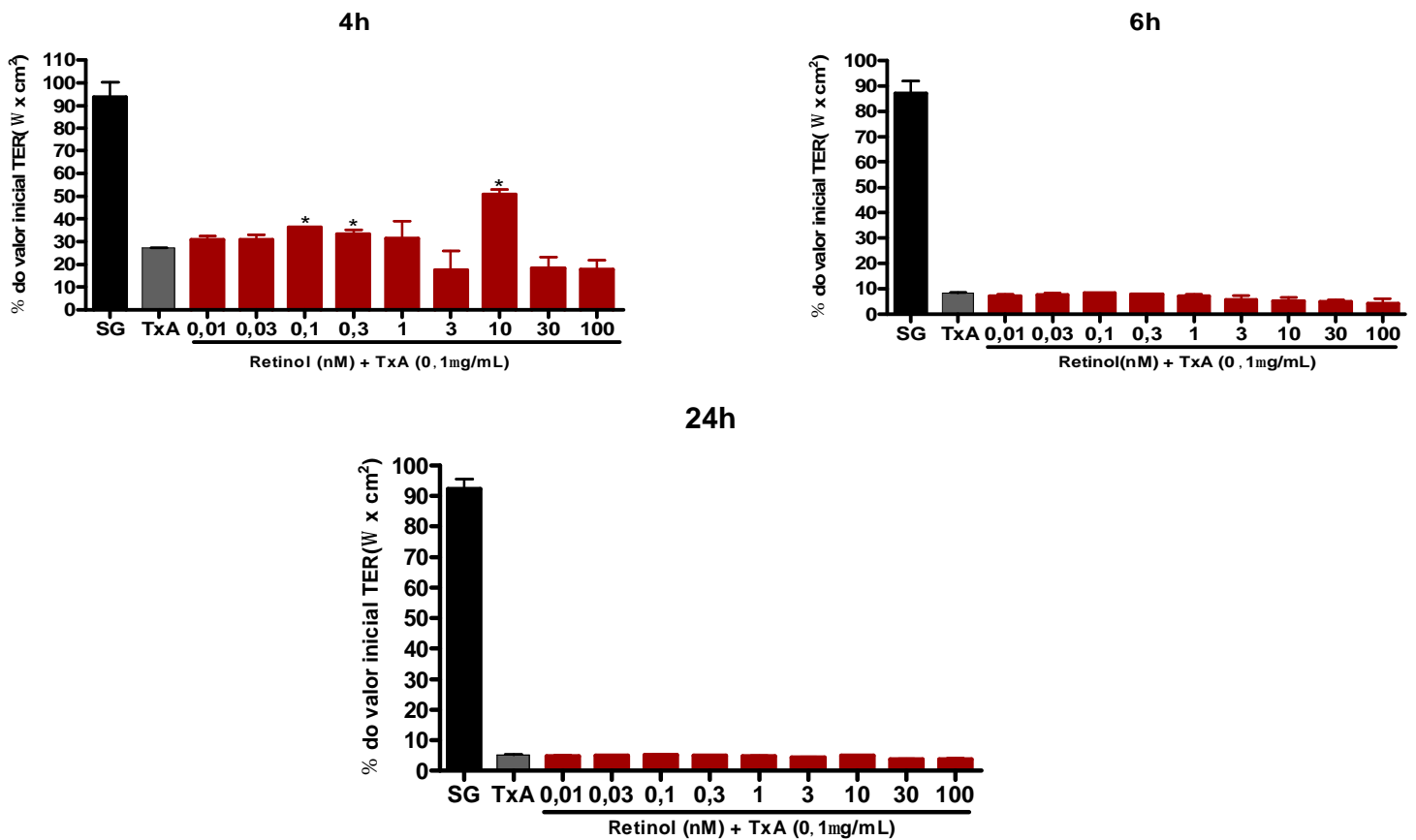
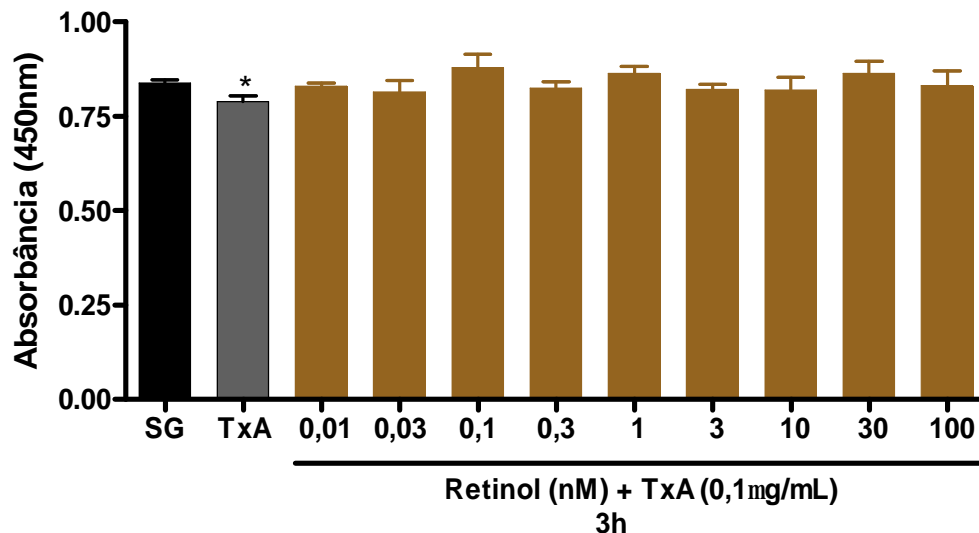


Figura 37: Efeito do retinol (0,01-100nM) na resistência elétrica transepitelial (TER) após o dano celular causado pela toxina A do *C. difficile* (0,1µg/mL). A resistência elétrica transepitelial (TER) na monocamada de células Caco-2 foi medida utilizando *Millicel Electrical Resistance System* inserindo eletrodos na região apical e basal dos poços durante 24 horas. Após a confluência, a TxA foi adicionada no lado apical na concentração de 0,1µg/mL. Essas células foram tratadas com diferentes concentrações de retinol (0,1-100nM) e grupo controle recebeu água estéril, deionizada e destilada como veículo, em meio sem glutamina (SG). A TER para cada poço foi obtida a partir da média de duas leituras realizadas, subtraída do valor do

branco (medida da resistência de um poço sem células contendo somente o meio) e multiplicada pela área da membrana para obter TER ($\Omega \times \text{cm}^2$). Os dados foram expressos em porcentagem dos valores iniciais da TER sendo representados pela média \pm epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle (TxA) é indicada pelo asterisco (*) (Teste *T de Student*).

Considerando o exposto, procuramos verificar se neste período de tempo (nas 3 e 4 horas) em que o retinol mostrou-se benéfico na proteção contra o dano causado pela TxA, se existiria algum fator, além da vitamina A, que estivesse aumentando a resistência elétrica transepitelial. Para tanto, experimentos adicionais foram executados com intuito de verificar a taxa de proliferação nas três e quatro horas depois que adicionamos o retinol e toxina A do *C. difficile* nas culturas de células Caco-2. Esses resultados suplementares mostraram que realmente não há aumento significativo da proliferação celular para todas as doses testadas de retinol nas células Caco-2 (**Figura 38**).



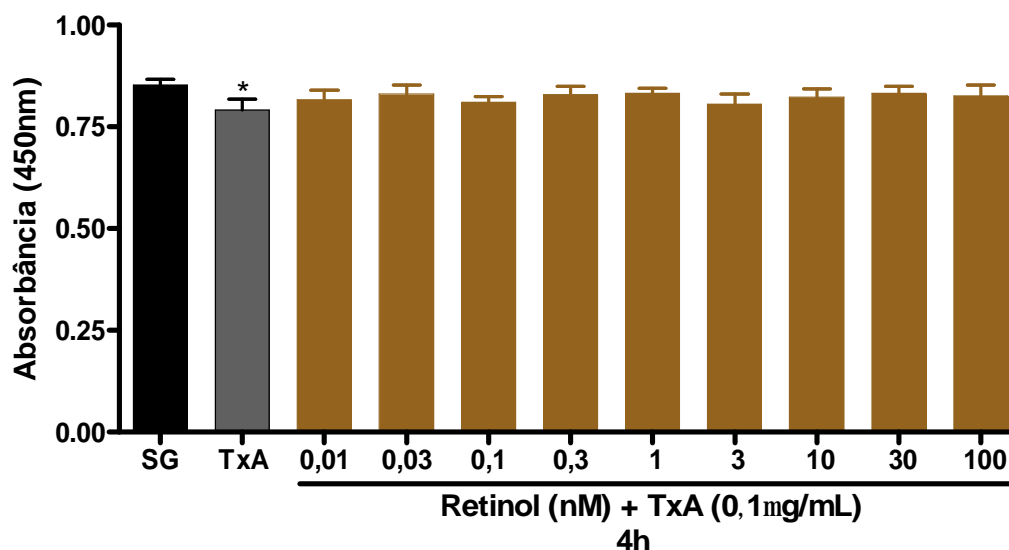


Figura 38: Efeito do retinol na proliferação das células Caco-2 após 3 a 4 horas da lesão induzida pela toxina A do *C. difficile* (0,1µg/mL). As células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 3 e 4 horas com retinol (0,01-100nM) diluído em meio sem glutamina (SG) na presença da TxA. Após essas horas, adicionou-se 10µL do sal tetrasólio aos poços. Depois de 2 horas a absorbância foi mensurada pelo leitor de ELISA em 450nm. Os valores foram expressos pela média ± epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com meio dem glutamina é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.4 Modulação do retinol nas alterações da proliferação celular induzida pela TxA do *C. difficile* (0,1mg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6

Para se avaliar a modulação do retinol na proliferação celular utilizamos a dose de 0,1µg/ml TxA do *C. difficile* para estudar o efeito do retinol na proliferação celular, levando em consideração que esta concentração induziu significativamente a redução da proliferação em 24 horas (80,72% de declínio, $p < 0,001$). A suplementação do retinol aumentou a proliferação celular no meio sem glutamina após o dano induzido pela TxA (0,1µg/mL) em uma taxa de 14,2; 23,8; 59,8; 38,4; 30,2; 44,18% (para as doses de 0, 01; 0,03; 0,1; 1; 10;

100nM de retinol, respectivamente), quando comparada com o controle incubado apenas com a TxA *C. difficile* (Figura 39).

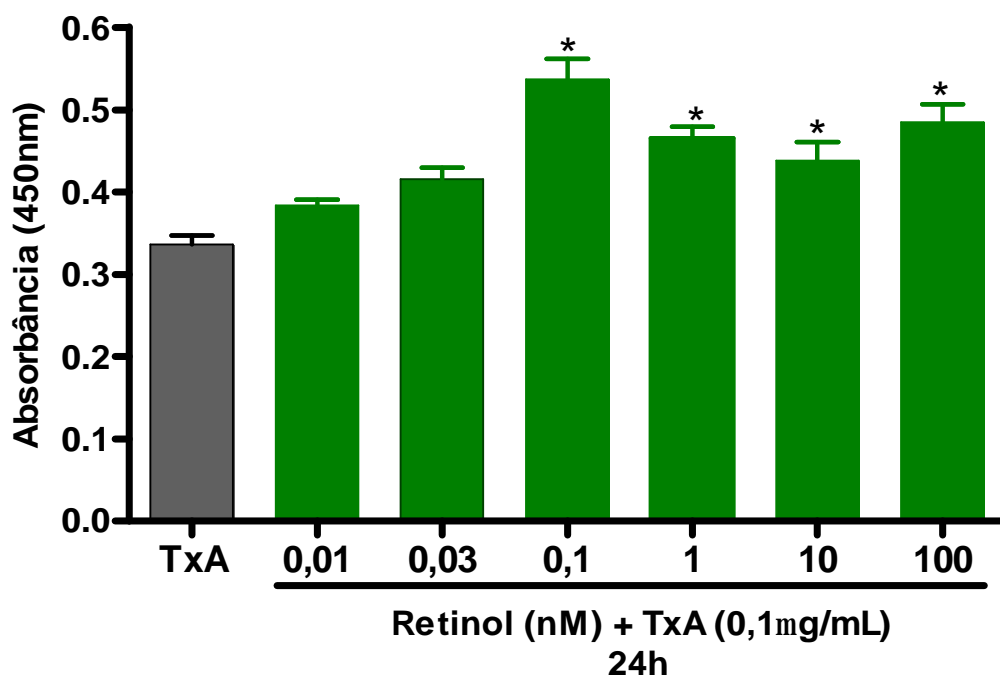


Figura 39: Efeito do retinol na proliferação celular das células IEC-6 após a lesão induzida pela toxina A do *C. difficile* (0,1µg/mL). As células IEC-6 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas com retinol (0,01-100nM) diluído em meio sem glutamina na presença da TxA. Após as 24 horas, adicionou-se 10µL do sal tetrasólio aos poços. Depois de 2 horas a absorbância foi mensurada pelo leitor de ELISA em 450nm. Os valores foram expressos pela média ± epm. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle com 0,1µg/mL de TxA é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

5.5 Modulação do retinol nas alterações da migração celular induzida pela TxA do *C. difficile* (0,01mg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6

Após o dano mecânico feito com uma lâmina estéril e na presença da ação citotóxica da TxA do *C. difficile* (0,01µg/mL), suplementou-se as células IEC-6 com variadas concentrações de retinol em meio sem glutamina (SG). No período de 12 e 24 horas de incubação das células IEC-6 suplementada e com TxA, o retinol aumentou significativamente ($p < 0,05$) a migração celular nas doses de 0,1-100nM quando comparadas ao controle apenas com a TxA. Nas 12 horas a suplementação com retinol nas doses de 0,1; 0,3; 1; 10 e 100nM a migração celular aumentou em 32,4%, 49,33%, 47,13%, 88,26%, 62,58 em relação ao controle apenas com TxA. E em 24 horas as mesmas doses aumentaram em 66,46%, 72%, 81,78%, 92,18% e 112,3%, respectivamente, em relação ao controle apenas com TxA. As menores doses de 0,01 e 0,03nM não mostraram benefício na migração celular. Desta forma, o retinol aumentou na migração das células intestinais IEC-6 após a lesão induzida pela TxA do *C. difficile* (Figura 40).

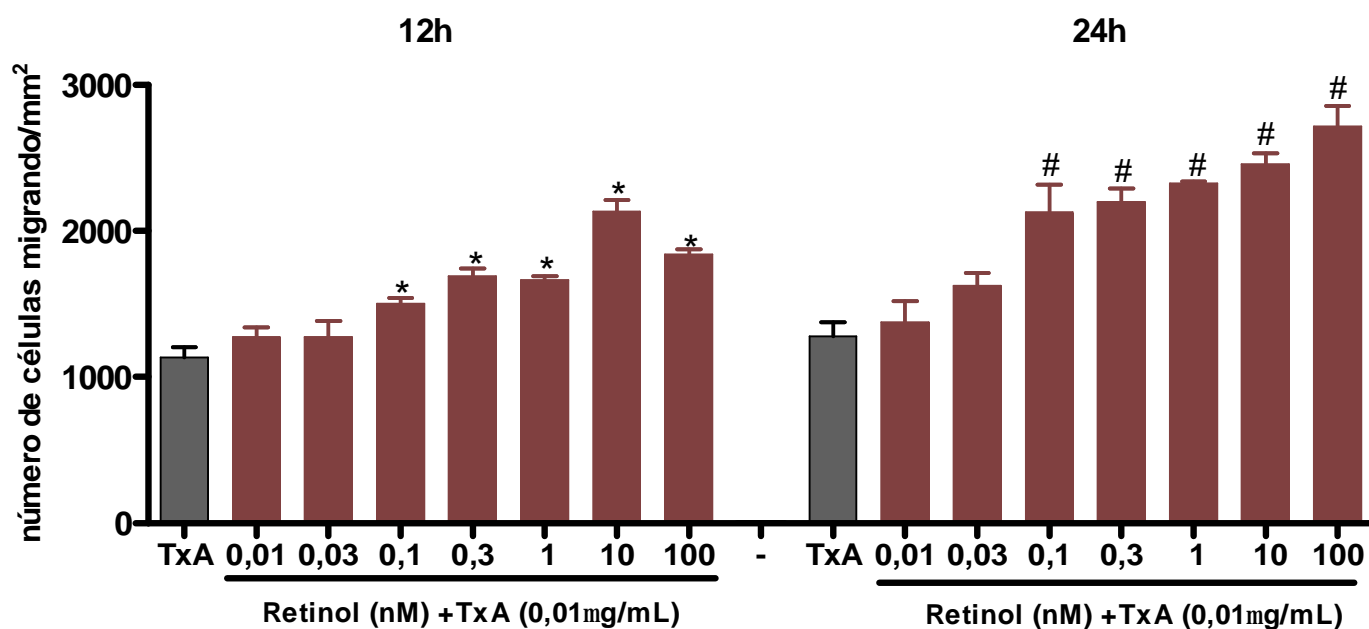


Figura 408: Modulação do retinol na migração das células IEC-6 após a exposição à toxina A do *C. difficile* (0,01µg/mL) durante 12 e 24 horas.

Após a confluência, foi feita uma raspagem na monocamada de células IEC-6, com subsequente incubação por diferentes doses de retinol (0,01-100nM) e na presença da TxA por 24 horas, imediatamente depois da retirada do meio. As barras são representadas pela média \pm epm do número de células migrando por mm² da área raspada. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle apenas com TxA (TxA) é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni). As barras representam a média \pm epm para o número de células que migrarão por mm² da área na qual foi feito o risco na monocamada de célula IEC-6. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada ao controle com 0,01µg/mL de toxina A é indicada pelo asterisco (*) para as 12 horas e pelo símbolo # para as 24 horas(ANOVA; Bonferroni).

Dando continuidade a este experimento, conduzimos um experimento adicional, da mesma maneira que foi realizada a migração citada acima, com intuito de verificar a modulação do retinol quando inibimos a proliferação neste período de tempo de 12 e 24 horas, pela adição da mitomicina C, inibidor da síntese de DNA (Bassen et al., 2000). Nas 12 horas de migração celular, os resultados obtidos mostraram que as concentrações de retinol a partir de 0,01 a 100nM aumentaram significativamente (4 a 8x) a migração células após a exposição a TxA, em relação ao controle com A TxA (0,01µg/mL) e a mitomicina C (TxA M+)(**Figura 41A**). Nas 24 horas, verificamos um aumento de 5 a 9x na migração celular nas mesmas concentrações de retinol (0,01-100nM) quando comparamos com o controle com a TxA (0,01µg/mL) e a mitomicina C (TxA M+) em 24 horas (**Figura 41B**). A figura 42 mostra as fotos tiradas da diferente com concentrações de retinol na lesão da TxA (0,01µg/mL) na presença e ausência da mitomicina C em 24 horas. Esses resultados confirmam que mesmo com a inibição da proliferação celular, o retinol aumentou a migração das células IEC-6 significativamente após a indução da lesão pela TxA, reforçando ainda mais a função do retinol na migração celular.

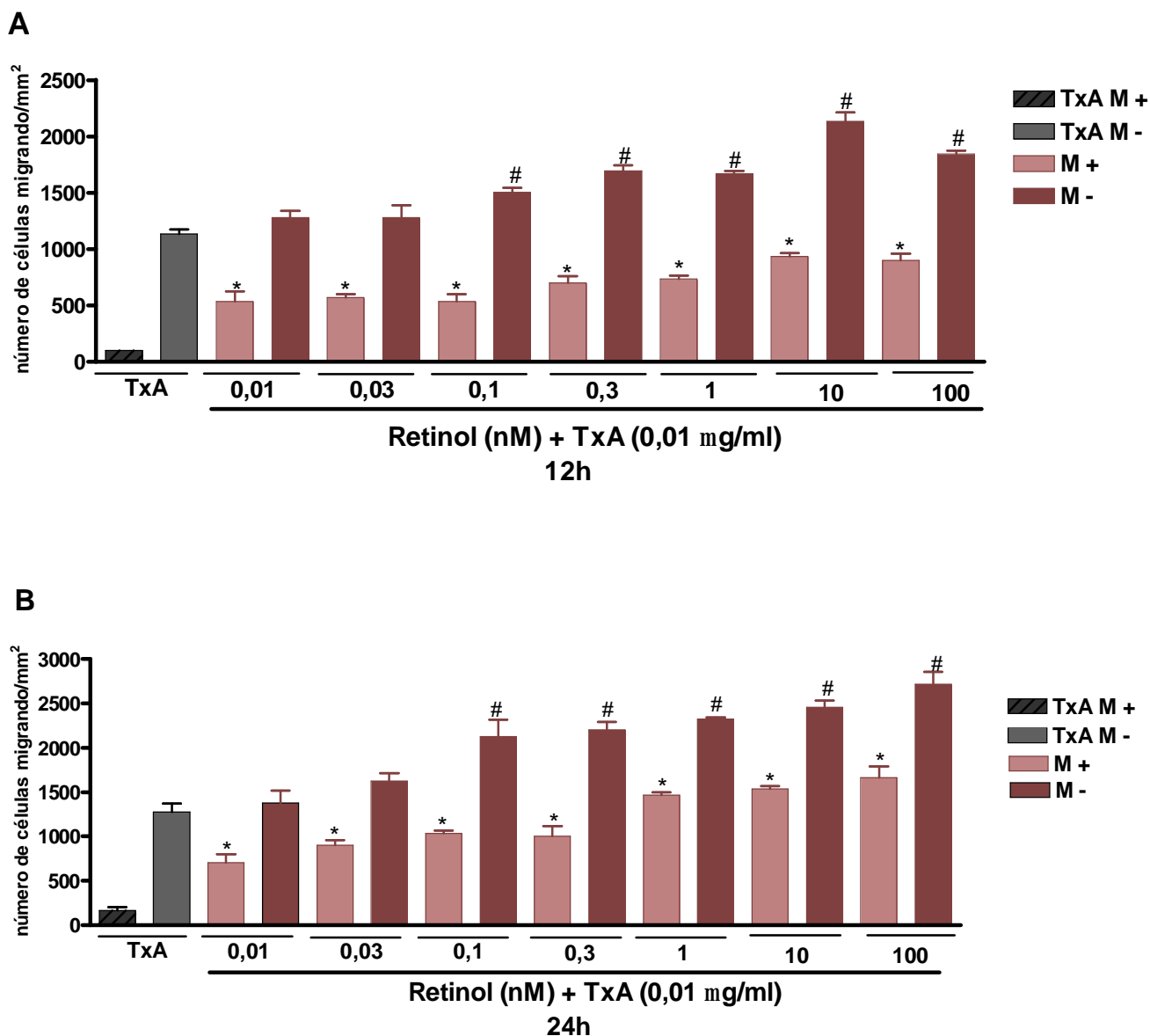
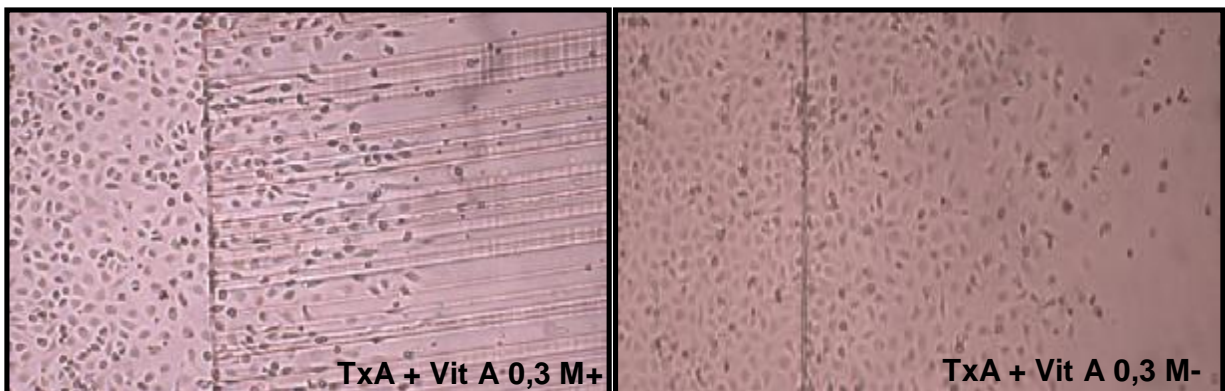
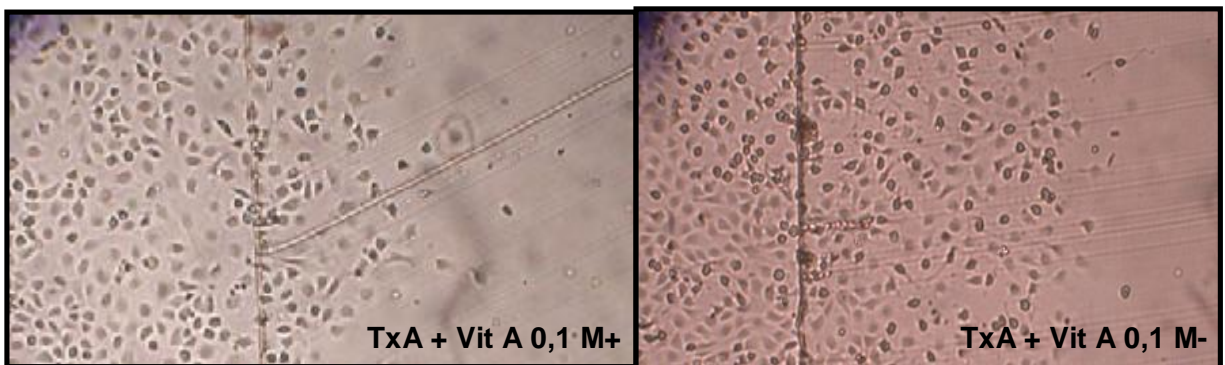
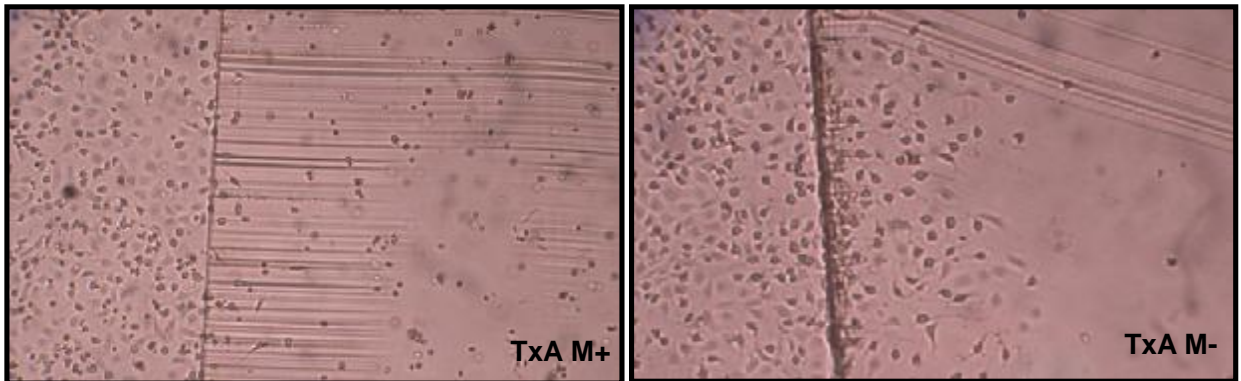


Figura 41: Modulação do retinol na migração das células IEC-6 após a exposição à toxina A do *C. difficile* (0,01µg/mL) durante 12 e 24 horas, com a adição da mitomicina C. Ao atingir a confluência, foram adicionados aos poços mitomicina C (5µg/mL) de 15-20 minutos. Após este período, fez-se uma raspagem na monocamada de células, com subsequente incubação por diferentes concentrações de retinol (0,01-100nM) e na presença da TxA por 12 (A) e 24 horas (B), imediatamente depois da retirada do meio com a

mitomicina. As barras são representadas pela média \pm epm do número de células migrando por mm^2 da área raspada. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada ao controle com $0,01\mu\text{g/mL}$ de toxina A com mitomicina (TxA M+) é indicada pelo asterisco (*) para as 12 horas e pelo símbolo # para as 24 horas (ANOVA; Bonferroni).



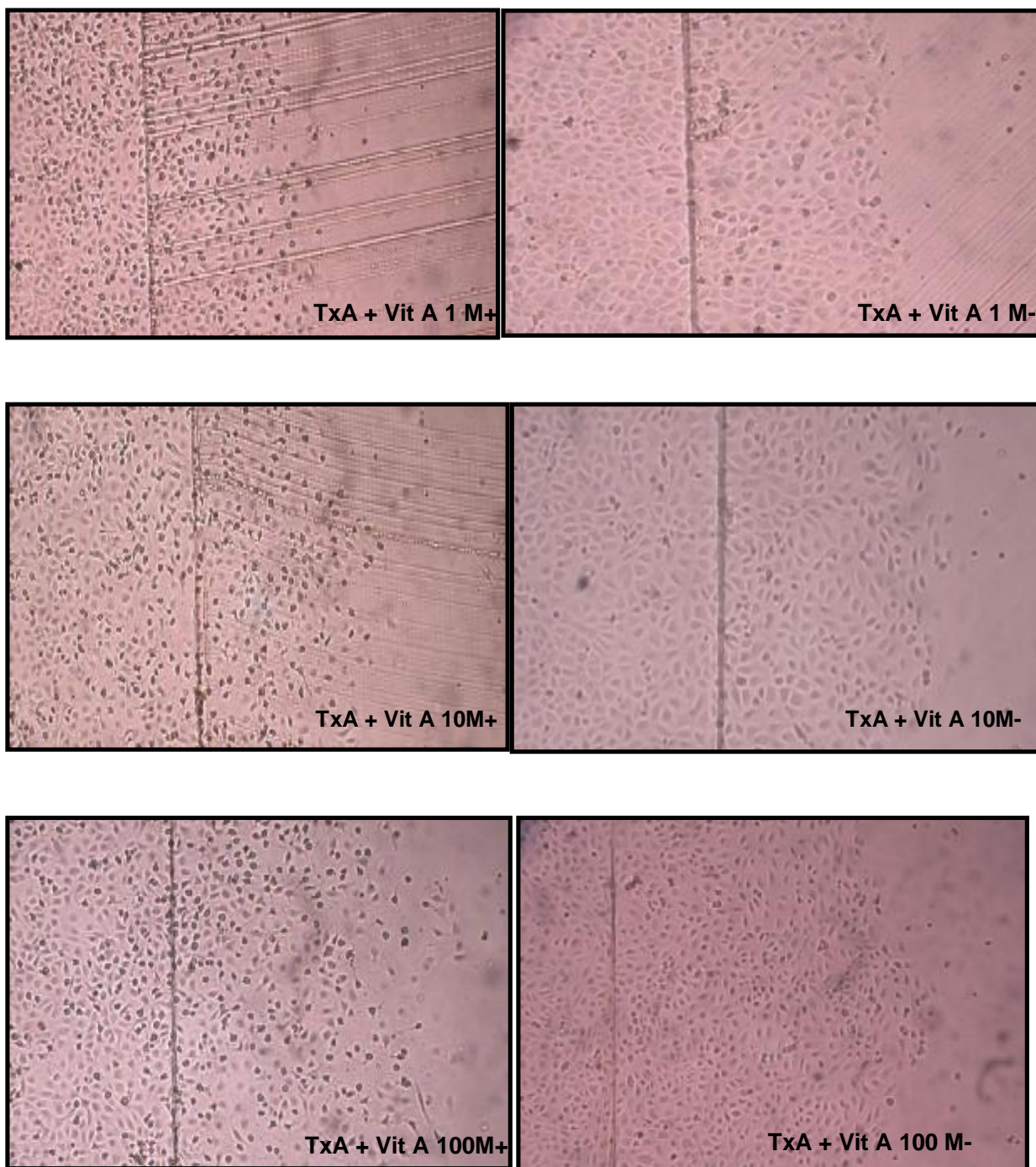
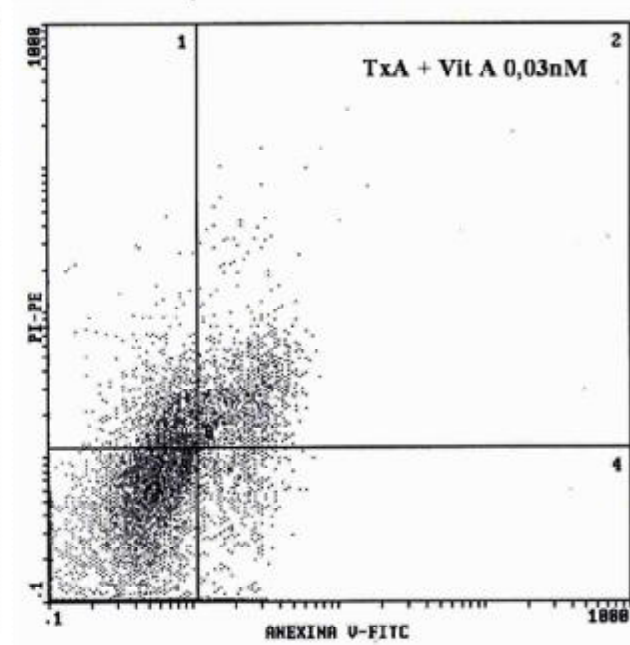
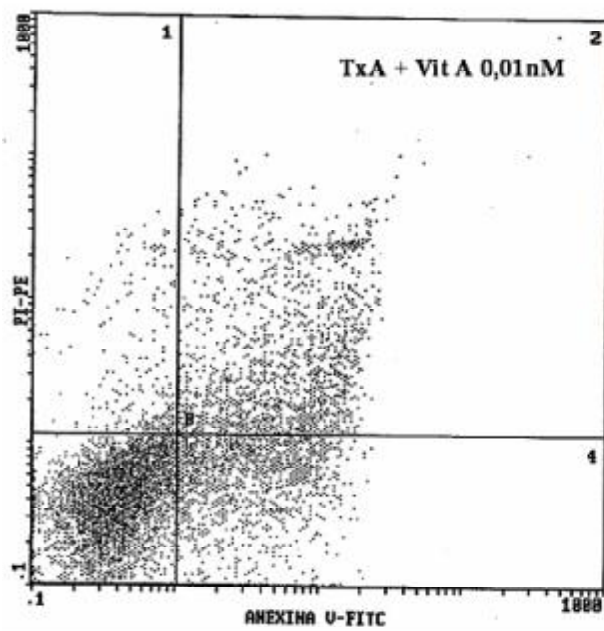
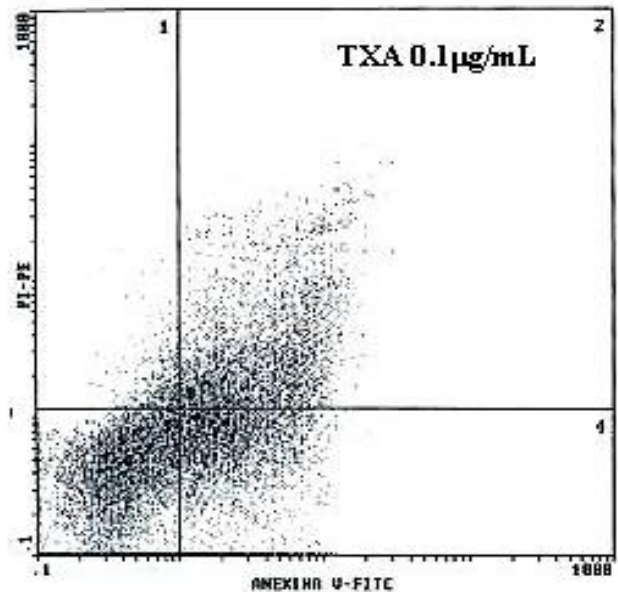
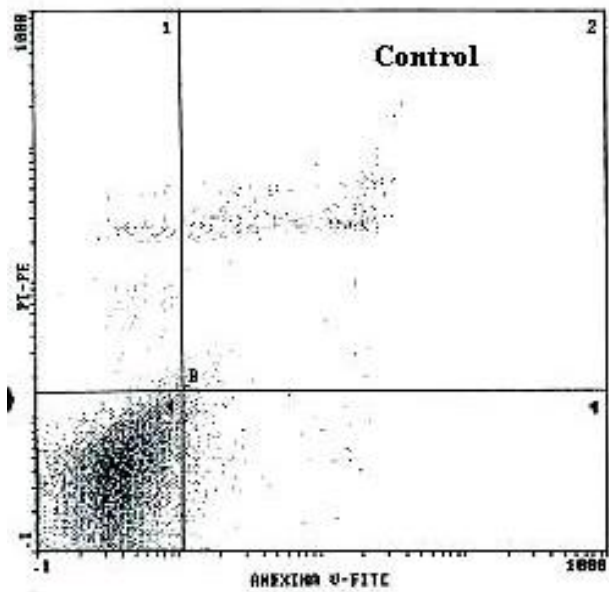


Figura 42: Fotos da migração das células IEC-6 suplementadas com diferentes concentrações de retinol (0,1-100nM) após 24 horas de exposição à toxina A do *C. difficile* (0,01µg/mL), com (M+) e sem mitomicina (M-).

5.6 Modulação do retinol na apoptose e necrose induzida pela TxA do *C. difficile* (0,1mg/mL) em culturas de células intestinais IEC-6

Por último, investigamos a modulação do retinol (0,01-100nM) na apoptose e necrose induzida pela TxA (0,1µg/mL) durante 24 horas. Os gráficos são mostrados pela densidade dos plots evidenciam as células apoptóticas positivas apenas para anexina V-FITC (representado pelo quadrante direito inferior) e as células que apresentaram ambas, necrose e apoptose, foram positivos para os dois, anexina V-FITC e iodeto de propídio (representado pelo quadrante superior direito). As células viáveis não se ligaram a anexina V-FITC nem ao iodeto de propídio. O gráfico mostra que a suplementação do retinol reduz do número de células apoptótica e necrótica em relação ao controle não suplementado com retinol (**Figura 43**). O retinol reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de células apoptóticas nas doses de 0,03; 0,1; 1; 10nM em 50,6; 34,2; 29,9; 29,8, respectivamente (**Figura 44A**). A suplementação do retinol reduziu a necrose nas doses de 0,03; 0,1; 1; 10 e 100nM em 50; 40,5; 38,5; 22,2; 26,6% ($p < 0.05$), respectivamente em comparação com as células apenas exposta a TxA sem suplementação do retinol (**Figura 44B**).



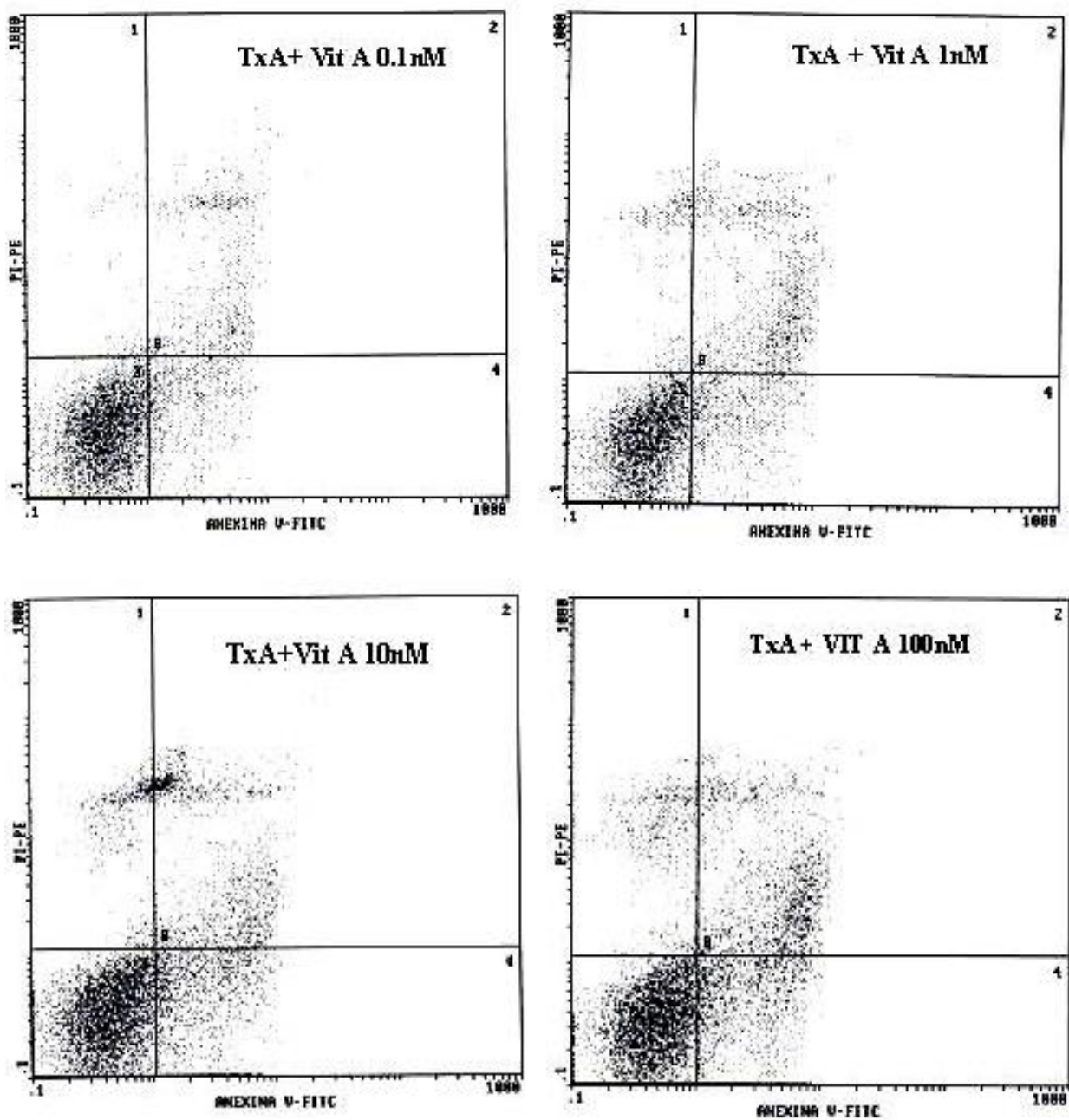
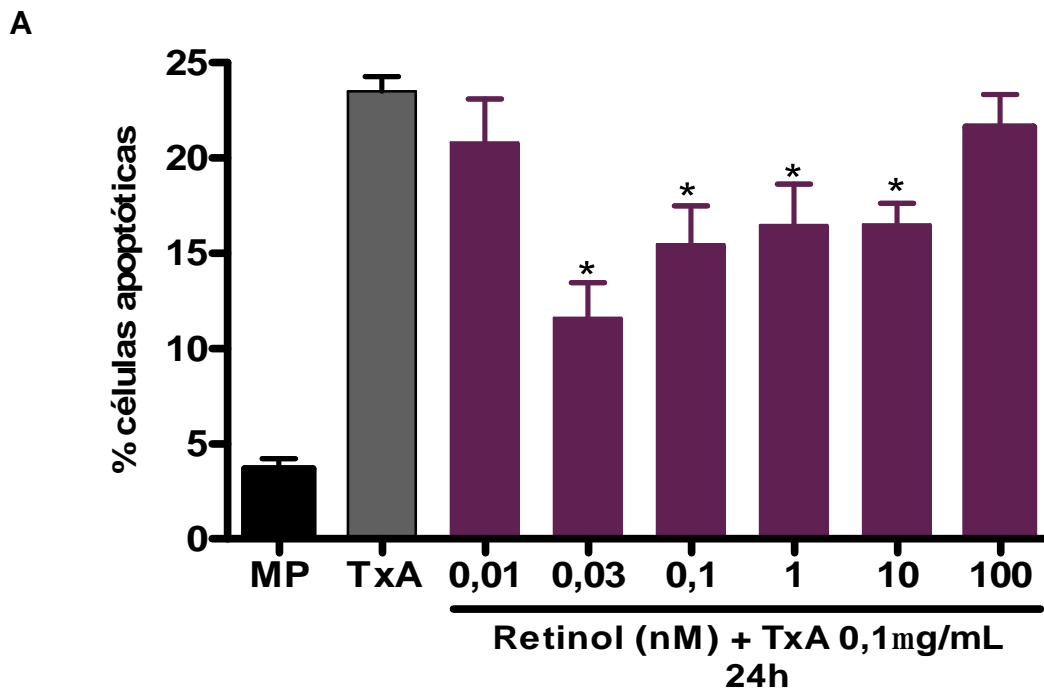


Figura 43: A indução da apoptose e da necrose pela TxA do *C. difficile* (0,1µg/mL) foi inibida pelo retinol em 24 horas de exposição às células IEC-6. As concentrações de retinol (0,03-10nM) diminuiram significativamente a apoptose induzida pela TxA. Na necrose, as concentrações de 0,03-100nM de retinol reduziram significativamente o número de células necróticas em relação ao controle sem o retinol. As células foram incubadas com a toxina A

em meio de cultura sem glutamina contendo ou não retinol. Os resultados são mostrados pelas densidades dos *plots* com iodeto de propídio vs. anexina V-FITC quantificados pela citometria de fluxo. As células viáveis têm baixa afinidade de ligação a Anexina V-FITC (quadrante esquerdo inferior) e ao iodeto de propídio (quadrante direito inferior) e as células necróticas possuem alta afinidade de ligação ao iodeto de propídio e a anexina V-FITC (quadrante direito superior).



B

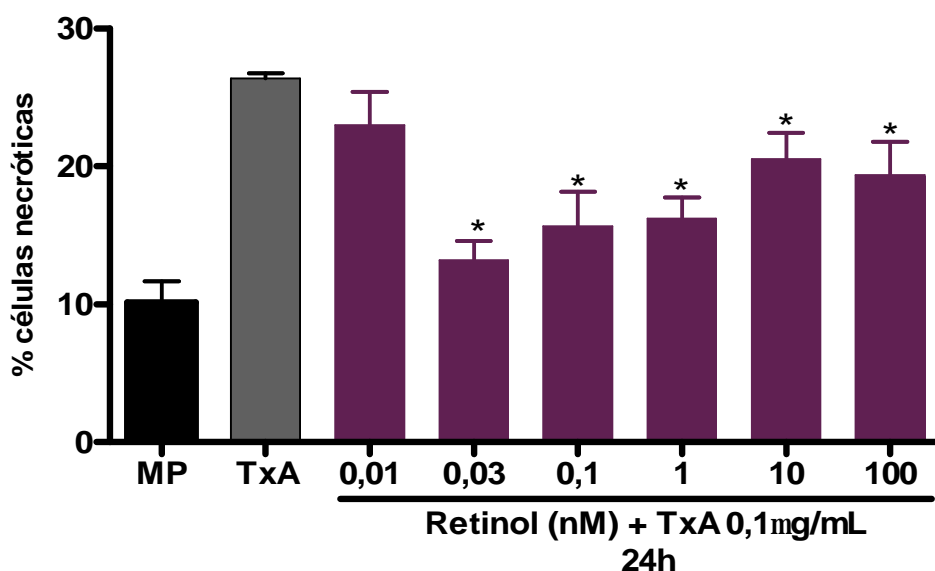


Figura 44: Gráfico em barras representam a porcentagem de células apoptóticas (A) e necróticas (B) induzidas pela TxA do *C. difficile* (0,1µg/mL) com a suplementação do retinol ou não, em 24 horas, quantificados pela citometria de fluxo. As células IEC-6 foram expostas a TxA (0,1µg/mL) e suplementadas com retinol (0,01-100nM) durante 24 horas. Após este período, as células foram coletadas das placas de cultura de 12 poços e incubadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio e, posteriormente, quantificadas por citometria de fluxo. Os valores foram expressos pela média ± epm das porcentagens. A significância estatística ($p < 0,05$) comparada com controle com a TxA é indicada pelo asterisco (*) (ANOVA; Bonferroni).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado que os retinóides desempenham fundamental importância em vários processos fisiológicos como o crescimento, diferenciação, e particularmente, na manutenção e integridade de vários tecidos epiteliais (De Luca, 1991). Partindo deste princípio, o retinol (forma oxidada da vitamina A) tem sido mostrado, a nível transcripcional, ativando ou desativando um grande número de genes que codificam hormônios, fatores de crescimento, fatores de transcrição, proteínas estruturais, e as vias de morte celular (Blomhoff e Blomhoff, 2006). Esta habilidade do retinol, principalmente no que concerne o ácido retinóico, em regular a expressão de vários genes através da ligação a fatores de transcrição nuclear poderia explicar a maioria das funções exercidas pela vitamina A a nível celular. (Kubota et al., 2001). A vitamina A poderia, portanto, através desses mediadores alterar a expressão de RNAm de diversas proteínas estruturais bem como de enzimas importantes para o metabolismo celular. Embora alguns estudos tenham reportado que a ativação da modulação transcripcional pelo retinol envolve membros dos receptores nucleares do ácido retinóico e os receptores X dos retinóides (RXR), porém, em relação às vias de sinalização, essas ainda não estão bem esclarecidas necessitando de mais pesquisas nesta área. O presente estudo deu enfoque a duas linhas de células intestinais (Caco-2 e IEC-6) para avaliar os benefícios do retinol em um modelo *in vitro* de dano celular induzido pela toxina A do *C. difficile* ainda não explorado neste contexto.

A literatura tem evidenciado o papel dinâmico da vitamina A na expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular, a família de ciclinas e de proteínas de supressão tumoral (p53), resultando na inibição da proliferação celular como demonstrado por estudos anteriores. (Lotan, 1980; Ara et al., 2004, Zamora et al., 2006). No entanto, outras pesquisas evidenciaram, interessante, um papel importante da vitamina A, estimulando a proliferação celular principalmente diante de um contexto de estresse oxidativo *in vivo* (Wang et al., 2007). No entanto, não foi elucidado o mecanismo exato

da vitamina A no estímulo a proliferação nesse estudo, já que não foi possível isolar o papel de vias indiretas que levariam a um aumento da proliferação celular. Uma hipótese que poderia explicar esses achados seria um possível estímulo do sistema imunológico, já que trata de um estudo *in vivo*, e, portanto, que envolve o organismo como um todo (Jason et al., 2002). Portanto, esse estudo, por ser, *in vitro*, teria como analisar de forma isolada, utilizando as células intestinais, sem a influência do sistema imune, o papel da vitamina A após indução de estresse celular pela Toxina A. Os resultados desse estudo evidenciaram que a vitamina A não possui efeito na proliferação celular sem dano celular induzido pela toxina A. Estando de acordo com observações reportadas anteriormente, onde foi mostrado que o ácido retinóico inibe a proliferação medida pela atividade da ornitina descaborsilase e estimula a diferenciação em células Caco-2, vistoa pelo aumento da atividade das enzimas de borda em escova estimuladas pela elevação da atividade de transglutaminases, dependendo da concentração e do estágio em que as células se encontram (McCormack et al., 1996). Devido a estes achados a, vitamina A tem sido freqüentemente citada em trabalho experimentais tendo efeito na prevenção contra o desenvolvimento do câncer (Maziere et al., 1997; Zamora et al., 2006).

Corroborando essas informação, estudos em cultura de células intestinais, IEC-6, também têm caracterizado o efeito anti-proliferativo do ácido retinóico totalmente *trans*, sugerindo que este efeito inibitório seja primeiramente devido a uma saída do ciclo celular na fase G1 (intervalo 1) para a fase G0. Na fase G1, fase mais longa do ciclo, onde há contínuo crescimento e síntese de enzimas. Muito da importância deste período é a decisão celular, se continua proliferando ou se interrompe o ciclo, entrando em estado quiescente (Bohnsack e Hirschi, 2004). Em outros estudos, em células ovarianas de carcinoma, o ácido retinóico também induziu um efeito anti-proliferativo no crescimento celular através da regulação da ciclina E e c-Myc, componente essencial final para a transição da fase G1 para fase S (Dimberg et al., 2003; Dimberg e Oberg, 2003). Em células mielóides também foi

demonstrado que o ácido retinóico reduz a expressão de proteínas quinase C α (PKC α) e a atividade de proteínas quinases ativada por mitógenos (MAPK) (Nakagawa et al., 2003). Em 2004, Chanchevalap e colaboradores mostraram que o ácido retinóico inibiu a expressão de KLF5 (fator de transcrição Krüppel) correlacionando com a diminuição da taxa de proliferação celular em células IEC-6, sugerindo que KLF5 pode ser um potencial mediador do efeito inibitório do ácido retinóico na proliferação das células epiteliais intestinais (Chanchevalap et al., 2004).

Entretanto, no presente estudo houve uma melhora significativa da proliferação celular após a indução da lesão com TxA do *C. difficile*. Apoiando esses achados, foi demonstrado que a vitamina A poderia de fato atuar diretamente ativando a proliferação celular (Thomas et al., 2005; Wang et al., 2007). Thomas e colaboradores mostraram que a vitamina A está correlacionada com a proliferação de células da cripta devido a presença de altos níveis de ácido retinóico nestas células como também as enzimas que estão envolvidas neste processo, sugerindo uma possível atuação da vitamina A na proliferação e diferenciação das células intestinais epiteliais (Thomas et al., 2005). Além disso, neste trabalho, o efeito da vitamina A foi avaliado em meio de cultura privado de glutamina de 4mM (meio sem gln), já que diversos estudos evidenciaram que em situações de estresse celular, como a de exposição a toxina A, a concentração sérica de glutamina está bastante reduzida (Tuhacek et al., 2004; Papaconstantinou et al., 1998; Chow e Zhang, 1998). Dessa forma, com intuito de se avaliar o papel isolado da vitamina A no epitélio intestinal lesado pela toxina A, optou-se retirar a glutamina do meio de cultura.

Durante a migração e proliferação celular, o citoesqueleto de actina é a estrutura base alvo necessária para as mudanças requeridas nestes processos, os quais demandam uma rápida reorganização do citoesqueleto sendo desempenhada pelos ciclos de polimerização e despolimerização dos monômeros de actina (G-actina) e em forma de filamentos (F-actina) e suas reorganizações dentro das células (Pollard e Cooper, 1986). Essa

reorganização é carregada pela disposição de proteínas que se liga à actina em resposta aos sinais extracelulares e intracelulares. Durante a migração, as células epiteliais formam uma espécie de pseudópodes largos (lameloploidia). Estas estruturas são saliências ou protusões da membrana da célula sobre os filamentos de actina que garantem o movimento da célula. Todo este conjunto impulsiona as células a mover-se para frente pela força exercida através dos filamentos de actina, orientando a migração celular, além do envio de sinais de um lado a outro da célula (Heidemann e Buxbaum, 1998; McCormack et al., 1999; McCormack e Johnson, 2001).

A migração celular é modulada por uma variedade de fatores incluindo peptídeos regulatórios, substratos metabólicos, citocinas, integrinas, matriz extracelular e poliaminas (McCormack e Johnson, 2001). Vários estudos têm focado a importância de vários nutrientes na migração celular em células intestinais (Kaur e Potten, 1988; McCormack et al., 1999; McCormack e Johnson, 2001), entretanto pouco se sabe sobre a base molecular dessas ações. Este estudo investigou a função do retinol na migração celular em um modelo in vitro adaptado de McCormack, e colaboradores, em culturas de células IEC-6. A suplementação do retinol em meio padrão parece não melhorar a migração das células IEC-6. Entretanto em meio livre de glutamina e suplementado com retinol, observou-se um aumento do número de células migratórias, embora isso não tenha sido visto em todas as doses. Brito e colaboradores em 2005 mostraram que a glutamina e alanil-glutamina, aminoácidos essenciais para inúmeras funções do organismo durante o estado catabólico, aumentaram a migração celular. Entretanto parece que quando se administra simultaneamente os dois micronutrientes, a vitamina A e glutamina, esse efeito benéfico não é tão observado quanto os efeitos desses nutrientes separadamente. Pesquisas do grupo têm evidenciado em projeto coorte em áreas endêmicas de diarreia, que a suplementação em crianças desnutridas os dois micronutrientes, vitamina A e glutamina, da mesma forma que nossos relatos in vitro, tiveram benefício na terapia não combinada.

Além disso, o presente trabalho pretendeu investigar a modulação do retinol na proliferação e migração celular após o dano provocado pela toxina A do *C. difficile* TxA em células IEC-6, linhagem de células não diferenciadas da cripta de rato. A migração e a proliferação celular são fenômenos cinéticos que atuam em conjunto para substituição e nas membranas epiteliais durante o mecanismo de reparo (Dignass, 2001). Essas mudanças têm sido observadas ao longo das criptas intestinais depois de uma injúria extensa à mucosa, podendo levar a hiperplasia compensatória da cripta (Carneiro-Filho et al., 2004), evento necessário para a restauração rápida do epitélio. Os resultados deste trabalho indicaram que o retinol melhorou a migração celular após o dano induzido pela TxA do *C. difficile*, sugerindo que a vitamina A seja requerida ao metabolismo celular durante processo fisiopatológico de recuperação da mucosa após o dano causado pela TxA. Sabendo-se que as proteínas da família RhoA são essenciais para a migração de células IEC-6 (Santos et al., 1997) e que a TxA do *C. difficile* inativa as proteínas da família Rho, glicosilando as proteínas Rho (A, B e C), Rac e as proteínas Cdc42 (Just et al., 1995), o qual resulta na destruturação do citoesqueleto (base essencial para o processo da migração celular), sugere-se que o retinol possa estar relacionado com a expressão de alguma proteína envolvida neste processo, sendo ainda mais necessário, principalmente quando há dano celular para aumentar a eficiência da migração celular em células intestinais epiteliais.

Com o propósito de se avaliar separadamente o fator proliferativo durante 12 e 24 horas em que foi avaliada a migração celular, adicionamos mitomicina C, um inibidor da síntese de DNA (Bassen et al., 2000), e verificamos que, mesmo sem proliferação celular, o retinol aumentou a migração celular significativamente em todas as doses de retinol testadas, reforçando ainda mais a função do retinol na migração celular. Ainda, confirmamos que para que haja o fenômeno de migração celular é obrigatório a proliferação celular. Além disso, segundo Mc Cormack e colaboradores, o reparo inicial do epitélio desnudo, ocorre principalmente pela migração, depois há envolvimento da proliferação. Embora já se tivesse reportado na literatura

que a proliferação celular inicia-se apenas após 12 horas depois de dano celular (Silen, 1987) e além de outros trabalhos mostrarem que a migração celular não é inibida quando a síntese de DNA é reduzida por inúmeras estratégias, como ausência de soro ou isoleucina (McCormack et al., 1992).

Também nvestigamos a modulação do retinol na barreira morfofuncional de células diferenciadas de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), monitorando a resistência elétrica transepitelial (TER) ao longo do tempo de confluência das células, tentando verificar qual seria a influência do retinol nas células intestinais. As células Caco-2 são linhagens de células intestinais mais diferenciadas, já que formam uma monocamada de células polarizadas, desenvolvendo um padrão similar de diferenciação como visto nos enterócitos humanos *in vivo* (Mariadason et al., 2000; Baltes et al., 2004). A relação entre a membrana plasmática, citoesqueleto e os contatos celulares, são considerados fundamentais na determinação da polaridade da célula como também na conservação da sua forma e intergridade (Cowin e Burke, 1996). Os enterócitos, células que revestem a superfície da mucosa do intestino delgado, estão envolvidos no metabolismo da vitamina A, desde que essas células adicionem os ésteres de retinil altamente hidrofóbico aos quilomícrons para serem liberados no sistema linfático, e sendo criticamente comprometidos pela deficiência de vitamina A, quando ocorre algum dano na mucosa (Thomas et al., 2005). A linhagem de células Caco-2 tem se provado útil em estudos e da caracterização bioquímicas no enterócito (Lissoos et al., 1995; Quick e Ong, 1990). Em culturas pós-confluentes, essas células espontaneamente se diferenciam, formando uma monocamada polarizada, em epitélio colunar com complexos juncionais apicais, e microvilosidades formando uma borda de escova (Quick e Ong, 1990). Estas células quando banhadas por meio de cultura enriquecido podem absorver retinol, além de serem capazes de gerar ésteres de retinila (Quick et al., 1990; Levin at al., 1993). Podem ainda expressar proteínas celulares de ligação ao retinol tipo II (CRBP-II), que é essencial para a solubilização do retinol dentro do citoplasma, como também para os processos de absorção e do metabolismo intestinal do retinol (Lissoos

et al., 1995) e finalmente, também parecem exercer papel na resposta adaptativa do intestino delgado contra injúria na mucosa intestinal (Wang et al., 1997).

A resistência elétrica transepitelial (TER) é um resultado da ligação física envolvendo o contato célula-a-célula, formação das junções firmes ou compactas (*tight junctions*) no lado apical das células (Madara e Trier, 1994; Musch et al., 2006, Brito et al., 2002), exercendo um papel relevante na diferenciação celular. Os achados deste trabalho mostraram que o retinol aumentou a resistência nas células durante o período de confluência para todas as doses testadas quando comparado ao controle em meio sem glutamina. Entretanto, para os experimentos conduzidos em meio com glutamina, o retinol teve uma melhor influência durante às horas iniciais da observação experimental, entre 36 e 48 horas. Esses resultados sugerem, mais uma vez, que os dois nutrientes não são sinérgicos, porém fundamenta o papel do suprimento de retinol intimamente relacionado com a integridade e diferenciação do epitélio. Pelo fato de que o retinol pode reduzir a permeabilidade paracelular, aumentando a TER, embora existam poucas informações disponíveis a respeito dos mecanismos de diferenciação epitelial na mucosa intestinal, o qual engloba inúmeros processos ainda não totalmente esclarecidos (Baltés et al., 2004; McCormack et al., 1996).

Um suporte adicional para esta evidência tem sido observado em estudos clínicos onde a vitamina A e retinóides exercem uma grande importância na manutenção da integridade epitelial, que, por consequência, é de vital importância para proteção contra organismos patogênicos e a translocação bacteriana (McCullough et al., 1999; Grotto et al., 2002; Benn et al., 2005; Vilamor e Fawzi, 2000; Filteau et al., 2001; Bhan e Bhandari et al., 1998; Barreto et al., 1994).

Alguns pesquisadores têm demonstrado também o efeito benéfico da vitamina A em estudos *in vivo*. Reifen e colaboradores mostraram que a deficiência de vitamina A em ratos leva a uma redução da altura dos vilos, do número de células caliciformes e dos enterócitos, e a uma marcante diminuição

da atividade da fofatase alcalina no inestino (Reifen et al., 1998). A deficiência de vitamina A em ratos reduz significativamente a altura do vilos e as atividades da maltase e sucrase (Warden et al., 1997; Zaiger et al, 2004), sendo também associada com o impedimento da migração celular da cripta e impedimento da síntese protéica na mucosa no nível de tradução (Zile et al, 1977). Estudos em galinhas, a deficiência de vitamina A pode levar a uma hiperplasia e hipertrofia (Uni et al., 1998). Outro estudo identificou alterações morfológicas no epitélio intestinal em cordeiros com carência de vitamina A (Holland et al., 1993). Um estudo mais recente em ratos submetidos a maciça ressecção do intestino delgado, demonstrou que a vitamina A está envolvida na resposta adaptativa do intestino por modular a apoptose, migração e proliferação do enterócito (Swartz-Basile et al., 2003).

Poucos trabalhos na literatura têm utilizado modelos *in vitro*, em especial, os modelos do epitélio intestinal para investigar a influência dos retinóides a nível molecular na diferenciação do epitélio intestinal (Plateroti et al., 1993; McComarck et al., 1996; Fukushima et al., 1998). E interessante, raros pesquisadores têm descrito o papel do retinol na formação das junções firmes e na permeabilidade paracelular. Apesar de ter sido relatado que muitos dos componentes das junções firmes, serem também alvos dos retinóides (Tobioka et al., 1996; Kubota et al., 2001), nenhum desses estudos referem-se ao epitélio intestinal. Os resultados desta pesquisa apontam para uma modulação do retinol na permeabilidade paracelular evidenciada pelo aumento da resistência em cultura de células intestinais Caco-2.

No decorrer desta investigação exploramos ainda as modificações ocorridas na integridade da monocamada epitelial intestinal após a injúria causada pela toxina A do *C. difficile*, utilizando como parâmetros a proliferação, migração, apoptose e necrose celular em culturas de células intestinais e avaliamos através das curvas dose-resposta e tempo-efeito, a lesão ocorrida nas células devido à exposição à enterotoxina do *C. difficile*. O presente trabalho confirmou o potente efeito citotóxico da toxina A do *Clostridium difficile*

e de maneira tempo e dose-dependente, como anteriormente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa e outros investigadores (Brito et al., 2002; Shawinder et al., 2005; Johal et al., 2004). Os valores diminuídos da TER refletem com o aumento da permeabilidade paracelular como também ao aumento do fluxo de lactulose e manitol, marcadores de permeabilidade, como consistentemente visto em outros relatos da literatura (Ma et al., 1995; Li et al., 2003). Este aumento da permeabilidade está relacionado com os efeitos da TxA no citoesqueleto alterando assim as estruturas fundamentais da barreira epitelial intestinal que garante sua integridade (Hecht et al., 1988). Além de monoglicosilar e inativar a família das proteínas Rho, a TxA também utiliza de outros mecanismos, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-8), liberação do citocromo c e ativação da cascata apoptótica (Just t al., 1995; Liu te al., 2003). Em síntese, este estudo mostrou o efeito crítico da TxA em importantes aspectos do processo de reparo da mucosa intestinal: migração, proliferação, TER, apoptose e necrose em células epiteliais intestinais, em concordância com achados anteriores sobre esse aspecto da TxA (Brito et al., 2005; Brito et al., 2002).

Além do mais, os resultados deste estudo validaram o modelo *in vitro* para medida funcional da barreira epitelial intestinal, utilizando os marcadores moleculares lactulose e manitol, confirmando que a TxA causa lesão da barreira epitelial intestinal. Um apoio suplementar para este fato é que outros investigadores demonstraram que a permeabilidade e integridade da monocamada celular podem ser mensuradas por outros marcadores moleculares como a dextran e a inulina (Li et al., 2003; DeMarco et al., 2003). Além disso, a ruptura da barreira epitelial intestinal ao nível das junções firmes tem sido implicada no aumento da permeabilidade paracelular de substâncias tóxicas, as quais podem levar a inflamação intestinal e injúria da mucosa (Lima et al., 1988).

Uma etapa subsequente deste trabalho foi investigar a ação do retinol na manutenção da integridade epitelial após a injúria provocada pela toxina A do *C. difficile* TxA, em células Caco-2, avaliando as alterações da resistência

elétrica transepitelial. Os resultados encontrados comprovaram um papel benéfico do retinol que foi evidenciado pelo aumento da TER, nas quatro primeiras horas de incubação com a TxA, principalmente em meio de cultura sem a glutamina. Este resultado encontrado não poderia ser unicamente atribuído a um aumento na proliferação celular, porém para comprovar esta hipótese, de que neste período curto de tempo não houve proliferação, realizamos experimentos adicionais para verificar a taxa de proliferação nas três e quatro horas depois que adicionamos o retinol e toxina A do *C. difficile* nas culturas de células. Esses dados suplementares mostraram que realmente não há aumento significativo da proliferação celular para todas as doses testadas de retinol nas células Caco-2, e que possivelmente este efeito protetor seja devido ao retinol. Entretanto não se pode atribuir que fora deste período inicial de tempo não poderíamos ter a proliferação celular como um fator adicional para gerar uma elevação da TER.

Os resultados alcançados neste trabalho destacaram a importância da suplementação do retinol em melhorar a função da barreira intestinal após uma condição estressante, quando outros nutrientes tróficos ao intestino estejam em privação ou em situações onde há um aumento do requerimento do nutriente. Um ponto a favor desta observação foi mostrado neste estudo no qual a suplementação com a vitamina A foi mais benéfica em acelerar a confluência das células Caco-2 não expostas à TxA, quando semeadas em meio sem glutamina do que no meio padrão. Além disso, em recente estudo usando monocadas de células, foi encontrado um efeito benéfico da suplementação com ácido retinóico totalmente *trans* em melhorar a diferenciação e prevenir apoptose apenas sob condições livres de soro fetal bovino (Baltes et al., 2004). A suplementação da vitamina A, em modelo de ressecção do intestino delgado, resultou em uma parcial inversão dos efeitos apoptóticos nos enterócitos provocados pela deficiência de vitamina A, embora tenha alcançado uma total recuperação na proliferação das células da cripta e na migração dos enterócitos, sugerindo que uma alta disponibilidade de vitamina A seja

necessária para uma renovação cinética (Swartz-Basile et al., 2000; Swartz-Basile et al., 2003).

Essas afirmativas fundamentam alguns achados que mostram o benefício da suplementação da vitamina A em crianças sob uma alta frequência de diarreia quando outros micronutrientes, como a glutamina, geralmente são deficientes (Chen et al., 2003; Walser et al., 1996). A ação protetora do retinol após a exposição à TxA em linhagens de células epiteliais, em melhorar a proliferação e migração celular, como também a sua ação anti-apoptótica, pode explicar a rápida recuperação da barreira funcional intestinal, com a suplementação do retinol, nas doenças diarréicas em locais menos favorecidos dos países em desenvolvimento (Walser et al., 1996).

Somando a estes fatos, sugerimos que o papel desempenhado pelo retinol na viabilidade celular após a exposição à TxA do *C. difficile*, pelo estudo da apoptose e necrose das células IEC-6, está intimamente correlacionado com o balanço na direção da renovação celular *in vivo*. O papel do retinol em impedir apoptose e necrose ocasionados pela ação enterotóxica da toxina A do *C. difficile* sugere um completo envolvimento via receptores mitocondriais e de morte celular, pois se sabe que o mecanismo apoptótico induzido pela TxA do *C. difficile* envolve vias intrínsecas e extrínsecas de ativação das caspases (3, 6, 8, 9), pela inativação das proteínas GTPase da família Rho, pelo dano mitocondrial seguido de liberação do citocromo c, e ainda por uma interferência da ativação do Bid, como mostrado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa com células T-84 (Brito et al., 2002; Carneiro et al., 2006). Em tecidos não intestinais, o ácido retinóico mostrou ser anti-apoptótico pela redução oxidativa mediada pela ativação da via proteína-1 (AP-1) (Kitamura et al., 2002). Por outro lado, os retinóides podem exercer um efeito pró-apoptótico por favorecer a diferenciação ao invés da proliferação em células tumorais, um papel que tem sido extensivamente estudado para desenvolvimentos da terapia anti-câncer (Simoni e Tolomeo, 2001; Zamora et al., 2006). Entretanto, os mecanismos dos efeitos anti-apoptóticos após a lesão induzida pela TxA do *C. difficile* precisam ser mais explorados.

Portanto, o benefício da suplementação do retinol em melhorar as repostas adaptativas do intestino contra o desafio da toxina A do *C. difficile* apóia o uso do retinol como uma ferramenta valiosa na terapêutica contra doença entérica. A atenção médica para a fisiopatologia das infecções hospitalares induzidas pelo *Clostridium difficile* tem aumentado devido à emergência de uma cepa mais resistente e virulenta, conseqüentemente as terapias adicionais de suporte são de extrema importância (Musher et al., 2006; Voth e Ballard, 2005). Baseado nesses achados, este estudo leva há uma nova vertente no papel da terapia nutricional para restaurar a barreira funcional epitelial na diarréia provocada pela toxina A do *C. difficile*, embora mecanismos moleculares e possíveis efeitos sinérgicos com outros nutrientes tróficos do intestino necessitam ainda serem elucidados. Nessa linha, mecanismos específicos e interações farmacológicas do retinol sozinho ou em combinação com outros micronutrientes na proteção após a lesão induzida pela toxina A do *C. difficile* estão sendo investigados, especialmente focando as ciclinas e *Wnt* como importante vias de regulação da proliferação celular. Em conclusão, estudos adicionais são necessários para compreensão da fisiopatologia específica deste nutriente lipossolúvel, a vitamina A e seus análogos, no reparo da barreira funcional intestinal, na proliferação, migração e apoptose celular durante infecções.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Utilizando modelos *in vitro* para demonstrar o papel da vitamina A na barreira funcional epitelial frente à injúria causada pela toxina A do *Clostridium difficile* em culturas de células intestinais, concluímos que:

1- Foi possível revalidar os modelos *in vitro* de lesão da barreira epitelial intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile*, confirmados pela redução na TER, na proliferação e migração celular e pelo aumento da apoptose e necrose, os quais foram dose e tempo dependentes.

2- O modelo *in vitro* para medida funcional da barreira epitelial intestinal frente à injúria causada pela toxina A do *C. difficile* foi validado utilizando os marcadores moleculares lactulose e manitol.

3- O retinol promoveu um aumento da TER, migração, e diminuição da necrose e apoptose celular, embora não se tenha visto este efeito benéfico na proliferação celular e em meio enriquecido com glutamina em culturas de células intestinais.

4- O retinol foi capaz de proteger a barreira funcional epitelial intestinal, através da medição da TER (resistência elétrica transepitelial), após a injúria induzida pela Toxina A do *C. difficile*, nas 3 e 4 horas de exposição às células Caco-2.

6- O retinol beneficiou a proliferação e migração celular frente ao efeito enterotóxico da toxina A do *C. difficile* em células intestinais IEC-6, linhas de células não diferenciadas da cripta de rato.

7- O retinol reduziu a apoptose e necrose das células epiteliais intestinais da cripta (IEC-6) na lesão provocada pela toxina A do *C. difficile*.

8 – O retinol beneficia as repostas adaptativas do intestino contra a TxA do *C. difficile*, podendo ser utilizado como uma ferramenta valiosa na terapêutica esta doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD OB, LOPEZ AD, INOUE M. The decline in child mortality: a reappraisal. **Bull World Health Organ.**, v. 78, n.10, p. 1175-91, 2000.

AHMED F, JONES DB, JACKSON AA. The interaction of vitamin A deficiency and rotavirus infection in the mouse. **Br J Nutr.**, v. 63, n. 2, p. 363-73, 1990.

AKTORIES K, SCHMIDT G, JUST I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. **Biol Chem.**, v. 381, n. 5-6, p. 421-6, 2000.

AKTORIES K. Bacterial toxins that target Rho proteins. **J Clin Invest.**, v. 99, n. 5, p. 827-9, 1997.

ALISI A, LEONI S, PIACENTANI A, CONTI DEVIRGILIIS L. Retinoic acid modulates the cell-cycle in fetal rat hepatocytes and HepG2 cells by regulating cyclin-cdk activities. **Liver Int.**, v. 23, n. 3, p. 179-86, 2003.

ALLEN SD, BARON EJ. *Clostridium*. In Balows A, Hausler W J Jr, Hermann K Jr, et al (eds): **Manual of Clinical Microbiology**, 5th ed. 505. Washington DC, American Society for microbiology, 1991.

ANGST BD, MARCOZZI C, MAGEE AI. The cadherin superfamily. **J Cell Sci.**, v. 114, n. 4, p. 625-6, 2001.

ARA C, DEVIRGILIIS LC, MASSIMI M. Influence of Retinoic Acid on Adhesion Complexes in Human Hepatoma Cells: A Clue to Its Antiproliferative Effects. **Cell Communication and Adhesion**, v. 11, p. 13-23, 2004.

ARAUJO RL, ARAUJO BDG, SIERO RO, MACHADO RDP, LEITE BV. Diagnóstico da situação da hipovitaminose A e da anemia nutricional na população do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. **Arch Latino Am Nutr.**, v. 36, p. 642-53, 1986.

ARAÚJO RL, DINIZ AS, SANTOS LMP. Diagnóstico e evolução de casos de ceratomalácia e xeroftalmia. **J Pediat.**, v. 57, p. 419-24, 1984.

ARROYAVE G, CALCAÑO M. Descenso de los niveles sericos de retinol y su proteina de enlace (RBP) durante las infecciones. **Arch Latino an Nutr.**, v. 29, n. 2, p. 233-260, 1979.

ARTHUR P, KIRKWOOD B, ROSS D, MORRIS S, GYAPONG J, TOMKINS A, ADDY H. Impact of vitamin A supplementation on childhood morbidity in northern Ghana. **Lancet**, v. 339, n. 8789, p. 361-2, 1992.

ASSIS AMO, PRADO MS, FREITAS MCS, CRUZ MM. Deficiência de vitamina A e desnutrição energético-protéica em crianças de localidades do semi-árido baiano. **Rev Nutr PUCAMP**, v. 10, p. 70-8, 1997.

AXEL DI, FRIGGE A, DITTMANN J, RUNGE H, SPYRIDOPOULOS I, RIESSSEN R, VIEBAHN R, KARSCH KR. All-*trans* retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.**, v. 49, n. 4, p. 851-62, 2001.

AZAIS-BRAESCO V, PASCAL G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, n. 5, p. 1325S-33S, 2000.

BALDA MS, MATTER K. Tight junctions. **J Cell Sci.**, v. 111, n. 5, p. 541-7, 1998.

BALDACINI O, GIRARDOT R, GREEN GA, RIHN B, MONTEIL H. Comparative study of immunological properties and cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin B and *Clostridium sordellii* toxin L. **Toxicon**, v. 30, n. 2, p. 129-40, 1992.

BALTES S, NAU, H., LAMPEN, A. All-*trans* retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. **Dev. Growth Differ.**, v. 46, n. 6, p. 503-514, 2004.

BANNO Y, KOBAYASHI T, KONO H, WATANABE K, UENO K, NOZAWA Y. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. **Rev Infect Dis.**, v. 6, n. 1, p. S11-20, 1984.

BARBOZA JUNIOR MS, SILVA TM, GUERRANT RL, LIMA AA. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Braz J Med Biol Res.**, v. 32, n. 12, p. 1499-504, 1999.

BARBUT F, DECRE D, LALANDE V, BURGHOFFER B, NOUSSAIR L, GIGANDON A, ESPINASSE F, RASKINE L, ROBERT J, MANGEOL A, BRANGER C, PETIT JC. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. **J Med Microbiol.**, v. 54, n. 2, p. 181-5, 2005.

BARCLAY AJ, FOSTER A, SOMMER A. Vitamin A supplements and mortality related to measles: a randomised clinical trial. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 294, n. 6567, p. 294-6, 1987.

BARRETO, ML, SANTOS LM, ASSIS AM, ARAUJO MP, FARENZENA GG, SANTOS PA, FIACCONE RL. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infections in young children in Brazil. **Lancet.**, v. 344, n. 8917, p. 228-231, 1994.

BARROSO LA, MONCRIEF JS, LYERLY DM, WILKINS TD. Mutagenesis of the *Clostridium difficile* toxin B gene and effect on cytotoxic activity. **Microb Pathog.**, v. 16, n. 4, p. 297-303, 1994.

BARROSO LA, WANG SZ, PHELPS CJ, JOHNSON JL, WILKINS TD. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 13, p. 4004, 1990.

BARTH H, AKTORIES K, POPOFF MR, STILES BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 68, n. 3, p. 373-402, 2004.

BARTLETT JG, MOON N, CHANG TW, TAYLOR N, ONDERDONK AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **Gastroenterology.**, v. 75, n. 5, p. 778-82, 1978.

BARTLETT JG. *Clostridium difficile* infection: pathophysiology and diagnosis. **Semin Gastrointest Dis.**, v. 8, n. 1, p. 12-21, 1997.

BARTLETT JG. *Clostridium difficile*-associated Enteric Disease. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 4, n. 6, p. 477-483, 2002.

BARTLETT, JG, TAYLOR NS, CHANG T, DZINK J. Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. **Am J Clin Nutr.**, v. 33, n. 11, p. 2521-2526, 1980.

BARUA AB, FURR HC. Properties of retinoids. Structure, handling, and preparation. **Mol Biotechnol.**, v. 10, n. 2, p. 167-82, 1998.

BASSON MD, EMENAKER NJ, SANDERS MA. Alpha integrin subunits regulate human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation and phenotype. Mitomycin C inhibits DNA synthesis. **Cell Physiol Biochem.**, v. 10, n. 1-2, p. 27-36, 2000.

BASU TK. Avitaminosis and congenital malformations. **Int J Vitam Nutr Res Suppl.**, v. 24, p. 9-14, 1983.

BATTEN ML, IMANISHI Y, MAEDA T, TU DC, MOISE AR, ET AL. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 10422-32, 2004.

BEATON GH, MARTORELL R, ARONSON KJ, EDMONSTON B, MCCABE G, ROSS AC, HARVEY B. **Effectiveness of vitamin a supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries.** (Discussion paper nº. 13). Geneva: United Nations Administrative Committee on Coordination/ Subcommittee on Nutrition State of the Art Series Nutrition Policy, 1993.

BEISEL WR. Trace element in infectious processes. **Med Clin North Am.**, v. 60, n. 4, p. 831-49, 1976.

BENDICH A, LANGSETH L. Safety of vitamin A. **Am J Clin Nutr.**, v. 49, n. 2, p. 358-71, 1989.

BEYZADEOGLU M, BALKAN M, DEMIRIZ M, TIBET H, DIRICAN B, ONER K, PAK Y. Protective effect of vitamin A on acute radiation injury in the small intestine. **Radiat Med.**, v. 151, p. 1-5, 1997.

BJERKNES M & CHENG H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. **Gastroenterology.**, v. 116, p. 7-14, 1999.

BLACK RE, BROWN KH, BECKER S. Malnutrition is a determining factor in diarrheal duration, but not incidence, among young children in a longitudinal study in rural Bangladesh. **Am J Clin Nutr.**, v. 39, n. 1, p. 87-94, 1984.

BLOMHOFF R, BLOMHOFF HK. Overview of retinoid metabolism and function. **J Neurobiol.**, v. 66, n. 7, p. 606-30, 2006.

BLOMHOFF R, GREEN MH, BERG T, NORUM KR. Transport and storage of vitamin A. **Science**, v. 250, p. 399-404, 1990.

BLOMHOFF R, GREEN MH, GREEN JB, BERG T, NORUM KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. **Physiol Rev.**, v. 71, p. 951-90, 1991.

BLOMHOFF R, HELGERUD P, RASMUSSEN M, BERG T, NORUM KR. In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79. p. 7326-30, 1982.

BLOMHOFF R, HOLTE K, NAESS L, BERG T. Newly administered [3H]retinolis transferred from hepatocytes to stellatecells in liver storage. **Exp Cell Res.** v. 150, p. 186-93, 1984.

BLOMHOFF R. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. **Physiol Rev.**, v. 71, p. 951-990, 1991.

BOHNSACK BL, HIRSCHI KK. Nutrient regulation of cell cycle progression. **Annu Rev Nutr.**, v. 24, p. 433-53, 2004.

BONET ML, RIBOT J, FELIPE F, PALOU A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. **Cell Mol Life Sci.**, v. 60, n. 7, p. 1311-21, 2003.

BONGAERTS GP, LYERLY DM. Role of bacterial metabolism and physiology in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. **Microb Pathog.**, v. 22, n. 4, p. 253-6, 1997.

BONGAERTS GP, LYERLY DM. Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. **Microb Pathog.**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1994.

BORGSTRÖM B, ERLANSON C. Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. **Eur. J. Biochem.**, v. 37, p. 60–68, 1973.

BORRIELLO SP, DAVIES HA, KAMIYA S, REED PJ, SEDDON S. Virulence factors of *Clostridium difficile*. **Rev Infect Dis.**, v. 12, n. 2. p. S185-91, 1990.

BOULENC X, BOURRIE M, FABRE I, ROQUE C, JOYEUX H, BERGER Y, FABRE G. Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 263, n. 3, p. 1471-8, 1992.

BRETTLE RP, WALLACE E. *Clostridium difficile*–associated diarrhea. **J Infect.**, v. 8, p. 123–8, 1984.

BRITO GA, FUJJI J, CARNEIRO-FILHO BA, LIMA AA, OBRIG T, GUERRANT RL. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **J Infect Dis.**, v. 186, n. 10. p. 1438-1447, 2002.

BRITO GA, CARNEIRO-FILHO B, ORIA RB, DESTURA RV, LIMA AA, GUERRANT RL. *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig Dis Sci.**, v. 50, n. 7, p. 1271-1278, 2005.

BRIVIBA K, SCHNABELE K, SCHWERTLE E, BLOCKHAUS M, RECHKEMMER G. Beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. **Biol Chem.**, v. 382, n. 12, p. 1663-8, 2001.

BROCKMAN HL. **General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches.** In *Lipases*, ed. B. Borgström, HL Brockman, pp. 3–46. Amsterdam/NY/Oxford: Elsevier, 1984.

BROWN KH, LANATA CF, YUEN ML, PEERSON JM, BUTRON B, LONNERDAL B. Potential magnitude of the misclassification of a population's trace element status due to infection: example from a survey of young Peruvian children. **Am J Clin Nutr.**, v. 58, n. 4, p. 549-54, 1993.

BRUNKEN GS, FLORES H. Consumption of vitamin A rich foods. **Xerophthalmia Club Bulletin.**, v. 54, p. 3-4, 1993.

BRUNKEN GS, FLORES H. Why do diets lack vitamin A. **Nutriview**, v. 3. p. 1-3, 1994.

BRYAN D, MARBACK RC. Laminar-airflow equipment certification: what the pharmacist needs to know. **Am J Hosp Pharm.**, v. 41, n. 7, p. 1343-9, 1984.

BRYCE J, BOSCHI-PINTO C, SHIBUYA K, BLACK RE. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147-52, 2005.

BURDON DW, GEORGE RH, MOGG GA, ARABI Y, THOMPSON H, JOHNSON M, ALEXANDER-WILLIAMS J, KEIGHLEY MR. Faecal toxin and severity of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. **J Clin Pathol.**, v. 34, n. 5, p. 548-51, 1981.

CALDERARO V, DE SIMONE B, GIOVANE A, QUAGLIUOLO L, SERVILLO L, GIORDANO C, BALESTRIERI C. Mechanism of arachidonic acid transport across rabbit distal colonic mucosa. **Am J Physiol.**, v. 261, n. 3 Pt 1, p. G451-7, 1991.

CAMPBELL DI, ELIA M, LUNN PG. Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. **J Nutr.**, v. 133, n. 5, p. 1332, 2003.

CARLIER C, MOULIA-PELAT JP, CECCON JF, MOUREY MS, MALVY D, FALL M, N'DIAYE M, AMEDEE-MANESME O. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Diourbel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: a controlled study. **Am J Clin Nutr.**, v. 53, n. 1, p. 74-7, 1991.

CARMEM LBA, FLORISBELA ACSC, ZELYTA PF. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev Nutr.**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

CARNEIRO BA, FUJII J, BRITO GA, ALCANTARA C, ORIA RB, LIMA AA, OBRIG T, GUERRANT RL. Caspase and bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infect Immun.**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2006.

CARNEIRO-FILHO BA, ORIA RB, WOOD RK, BRITO GA, FUJII J, OBRIG T, LIMA AA, GUERRANT RL. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**, v. 20, n. 10, p. 934-941, 2004.

CARPENTER TO, PETTIFOR JM, RUSSELL RM, PITHA J, MOBARHAN S, OSSIP MS, WAINER S, ANAST CS. Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake. **J Pediatr.**, v. 111, n. 4, p. 507-12, 1987.

CARVALHO CMG, FARFAN JÁ, WILKE BC, VENCOVSKY R. Prevalência de hipovitaminose A em crianças da periferia do Município de São Paulo, Brasil. **Cadernos Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 85-96, 1995.

CARVALHO PB, DUTRA DE OLIVEIRA JE. Disponibilidade de vitamina "A" na alimentação de um grupo de pré-escolares na cidade de Ribeirão Preto. **ABIA/SAPRO**, v. 44, p. 18-28, 1979.

CASTAGLIUOLO I, LAMONT JT. Pathophysiology, diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. **Keio J Med.**, v. 48, n. 4, p. 169-74, 1999.

CEREIJIDO M, SHOSHANI L, CONTRERAS RG. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, n. 3, p. G477-82, 2000.

CERQUETTI M, PANTOSTI A, STEFANELLI P, MASTRANTONIO P. Purification and characterization of an immunodominant 36 kDa antigen present on the cell surface of *Clostridium difficile*. **Microb Pathog**, v. 13, n. 4, p. 271-9, 1992.

CHAGAS MHC, FLORES H; CAMPOS FACS, SANTANA RA, LINS ECB. Teratogenia da vitamina A. **Revista do IMIP.**, v. 3, n. 3, p. 247-252, 2003.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J.**, v. 10, p. 940-954, 1996.

CHANCHEVALAP S, NANDAN MO, MERLIN D, YANG VW. All-trans retinoic acid inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by inhibiting expression of the gene encoding Kruppel-like factor 5. **FEBS Lett.**, v. 578, n. 1-2, p. 99-105, 2004.

CHANG EB, MUSCH MW, MAYER L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1518-24, 1990.

CHAUHAN MJ, KANSAL VK. Effect of vitamin A deficiency on rat intestinal digestive & absorptive functions. **Indian J Med Res.**, v. 90, p. 448-52, 1989.

CHAVES N. **Nutrição Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

CHAVES-OLARTE E, WEIDMANN M, EICHEL-STREIBER C, THELESTAM M. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. **J Clin Invest.**, v. 100, n. 7, p. 1734-41, 1997.

CHEN JY, CLIFFORD J, ZUSI C, STARRETT J, TORTOLANI D, OSTROWSKI J, RECZEK PR, CHAMBON P, GRONEMEYER H. Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. **Nature**, v. 382, n. 6594, p. 819-22, 1996.

CHEN P, SOARES AM, LIMA AA, GAMBLE MV, SCHORLING JB, CONWAY M, BARRETT LJ, BLANER WS, GUERRANT RL. Association of vitamin A and zinc status with altered intestinal permeability: analyses of cohort data from northeastern Brazil. **J Health Popul Nutr.**, v. 21, n. 4, p. 309-315, 2003.

CHOW A, ZHANG R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. **J Nutr.**, v. 128, n. 8, p. 1296-301, 1998.

CLAGETT-DAME M, DELUCA HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. **Annu Rev Nutr.**, v. 22, p. 347-81, 2002.

COELHO CSP, RAMALHO RA, ACCIOLY E. O inquérito dietético na avaliação do estado nutricional de vitamina A em gestantes. **Clínica Médica**, v. 628, p. 44-60, 1995.

COGHLAN D, CRANSWICK NE. Complementary medicine and vitamin A toxicity in children. **Med J Aust.**, v. 175, n. 4, p. 223-4, 2001.

COLLARES-BUZATO CB, MCEWAN GT, JEPSON MA, SIMMONS NL, HIRST BH. Paracellular barrier and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca²⁺ in cultured epithelia. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1222, n. 2, p. 147-58, 1994.

COLLINS MD, LAWSON PA, WILLEMS A, CORDOBA JJ, FERNANDEZ-GARAYZABAL J, GARCIA P, CAI J, HIPPE H, FARROW JA. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 44, n. 4, p. 812-26, 1994.

COUSOUDIS A, BROUGHTON M, COOVADIA HM. Vitamin A supplementation reduces measles morbidity in young African children: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 54, n. 5, p. 890-5, 1991.

COWIN P, BURKE B. Cytoskeleton-membrane interactions. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 8, n. 1, p. 56-65, 1996.

CROQUET V, PILETTE C, LESPINE A, VUILLEMIN E, ROUSSELET MC, OBERTI F, SAINT ANDRE JP, PERIQUET B, FRANCOIS S, IFRAH N, CALES P. Hepatic hyper-vitaminosis A: importance of retinyl ester level determination. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 12, n. 3, p. 361-4, 2000.

CRUZ N, QI L, ALVAREZ X, BERG RD, DEITCH EA. The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. **J Burn Care Rehabil.**, v. 15, n. 3, p. 207-12, 1994.

CZEIZEL AE, ROCKENBAUER M. Prevention of congenital abnormalities by vitamin A. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 68, n. 4, p. 219-31, 1998.

DARLOW BA, GRAHAM PJ. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in very low birthweight infants. **Cochrane Database System Revist.**, v. 2, p. 501-506, 2000.

DAULAIRE NM, STARBUCK ES, HOUSTON RM, CHURCH MS, STUKEL TA, PANDEY MR. Childhood mortality after a high dose of vitamin A in a high risk population. **BMJ**, v. 304, n. 6821, p. 207-10, 1992.

DAVIES HA, BORRIELLO SP. Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. **Microb Pathog.**, v. 9, n. 2, p. 141-6, 1990.

DAVIS JT, ONG DE. Synthesis and secretion of retinol-binding protein by cultured rat Sertoli cells. **Biol Reprod.**, v. 47, n. 4, p. 528, 1992.

DE LUCA LM, ADAMO S, KATO S. Retinoids and cell adhesion. **Methods Enzymol.**, v. 190. p. 81-91, 1990.

DEGOS L, WANG ZY. All *trans* retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. **Oncogene**, v. 20, n. 49, p. 7140-5, 2001.

DELIE F, RUBAS W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.**, v. 14, n. 3, p. 221-86, 1997.

DEMARCO VG, LI N, THOMAS J, WEST CM, NEU J. Glutamine and barrier function in cultured Caco-2 epithelial cell monolayers. **J Nutr.**, v. 133, n. 7, p. 2176-9, 2003.

DENICOURT C, DOWDY SF. Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1411-3, 2004.

DENKER BM, NIGAM SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. **Am J Physiol.**, v. 274, v. 1 Pt 2, p. F1-9, 1998.

DEW SE, ONG DE. Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. **Biochemistry**, v. 33, p. 12340-45, 1994.

DICKMAN ED, SMITH SM. Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. **Dev Dyn.**, p. 206, n. 1, p. 39-48, 1996.

DICKMAN KG, HEMPSON SJ, ANDERSON J, LIPPE S, ZHAO L, BURAKOFF R, SHAW RD Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 4, p. G757-66, 2000.

DIGNASS, AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 7, n. 1, p. 68-77, 2001.

DIMBERG A, KARLBERG I, NILSSON K, OBERG F. Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 254-61, 2003.

DIMBERG A, OBERG F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. **Leuk Lymphoma**, v. 44, n. 10, p. 1641-50, 2003.

DIMITROV NV, MEYER C, ULLREY DE. Bioavailability of b-caroteno in humans. **Am J Clin Nutr.**, v. 48, p. 298-304, 1988.

DOLINSKY D, RAMALHO A. Deficiência de Vitamina A: Uma Revisão Atualizada. **COMPACTA NUTRIÇÃO**, v. 4, n. 2, p. 2-18, 2003.

DOVE CH, WANG SZ, PRICE SB, PHELPS CJ, LYERLY DM, WILKINS TD, JOHNSON JL. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. **Infect Immun.**, v. 58, n. 2, p. 480-8, 1990.

DOWELL VR JR, MCCROSKEY LM, HATHEWAY CL, LOMBARD GL, HUGHES JM, MERSON MH. Coproexamination for botulinal toxin and *clostridium botulinum*. A new procedure for laboratory diagnosis of botulism. **JAMA**, v. 238, n. 17, p. 1829-32, 1977.

DUESTER G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. **Eur J Biochem.**, v. 267, n. 14, p. 4315-24, 2000.

DUGGAN C, GANNON J, WALKER WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **Am J Clin Nutr.**, v. 75, p. 789-808, 2002.

DUITSMAN PK, COOK LR, TANUMIHARDJO SA, OLSON JA. Vitamin A inadequacy in socioeconomically disadvantaged pregnant lowan women as assessed by the modified relative dose response (MRDR) test. **Nutr Res.**, v. 15, p. 1263-1276, 1995.

DUONG HS, LE AD, ZHANG Q, MESSADI DV. A novel 3-dimensional culture system as an in vitro model for studying oral cancer cell invasion. **Int J Exp Pathol.**, v. 86, n. 6. p. 365-74, 2005.

DURING A, HARRISON EH. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Arch Biochem Biophys**, v. 430, n. 1, p. 77-88, 2004.

ELIAS PM, WILLIAMS ML. Retinoids, cancer, and the skin. **Arch Dermatol.** V. 117, n. 3, p. 160-8, 1981.

ELLIS JK, RUSSELL RM, MAKRAUER FL, SCHAEFER EJ. Increased risk for vitamin A toxicity in severe hypertriglyceridemia. **Ann Intern Med.**, v. 105, n. 6, p. 877-9, 1986.

FALASCA L, FAVALE A, GUALANDI G, MAIETTA G, CONTI DEVIRGILIIS L. Retinoic acid treatment induces apoptosis or expression of a more differentiated phenotype on different fractions of cultured fetal rat hepatocytes. **Hepatology.** V. 28, n. 3, p. 727-37, 1998b.

FALASCA L, FAVALE A, SERAFINO A, ARA C, CONTI DEVIRGILIIS L. The effect of retinoic acid on the re-establishment of differentiated hepatocyte phenotype in primary culture. **Cell Tissue Res.**, v. 293, n. 2, p. 337-47, 1998a.

FALASCA L, MARCELLINI P, ARA C, RUFO A, DEVIRGILIIS LC. Growth inhibition and induction of specific hepatic phenotype expression by retinoic acid in HEPG2 cells. **Anticancer Res.**, v. 19, n. 4B, p. 3283-92, 1999.

FANG G, LIMA AAM, THIELMAN N, FONTELES M, YOTSEFF P, LYERLY D, GUERRANT RL. Role of phospholipase A2 in the histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile*. **Biomed J.**, v. 1, p. 1-5, 1994.

FASANO A, NATARO JP. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 56, n. 6, p. 795-807, 2004.

FAWZI WW, CHALMERS TC, HERRERA MG, MOSTELLER F. Vitamin A supplementation and child mortality. **A meta-analysis. JAMA**, v. 269, n. 7, p. 898-903, 1993.

FERGUSON RN, EDELHOCH H, SAROFF HA, ROBBINS J, CAHNMANN HJ. Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. Preparation of tritium-labeled 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid. **Biochemistry**, v. 14, n. 2, p. 282-9, 1975.

FILTEAU SM, MORRIS SS, ABBOTT RA, TOMKINS AM, KIRKWOOD BR, ARTHUR P, ROSS DA, GYAPONG JO, RAYNES JG. Influence of morbidity on serum retinol of children in a community-based study in northern Ghana. **Am J Clin Nutr.**, v. 58, n. 2, p. 192-7, 1993.

FILTEAU SM, ROLLINS NC, COUTSODIS A, SULLIVAN KR, WILLUMSEN JF, TOMKINS AM. The effect of antenatal vitamin A and beta-carotene supplementation on gut integrity of infants of HIV-infected South African women. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 32, n. 4, p. 464-70, 2001.

FILTEAU SM, TOMKINS AM. Vitamin A supplementation in developing countries. **Arch Dis Child.**, v. 72, n. 2, p. 106-7, 1995.

FILTEAU SM, WILLUMSEN JF, SULLIVAN K, SIMMANK K, GAMBLE M. Use of the retinol-binding protein: transthyretin ratio for assessment of vitamin A status during the acute-phase response. **Br J Nutr.**, v. 83, n. 5, p. 513-20, 2000.

FITEAU SM, RICE AL, BALL JJ, CHAKRABORTY J, STOLTZFUS R, DEFRANCISCO A, WILLUMSEN JF. Breast milk immune factors in Bangladeshi women supplemented postpartum with retinol or beta-carotene. **Am J Clin Nutr.**, v. 69, p. 953-958, 1999.

FLORES H, ARAÚJO CR. Liver level of retinol in unselected necropsy specimens: a prevalence survey of vitamin A deficiency in Recife, Brazil. **Am J Clin Nutr.**, v. 40, p. 146-152, 1984.

FLORES H, AZEVEDO MCNA, CAMPOS FACS, BARRETO-LINS MC, CAVALCANTI ACA, SALZANO, AC, VARELA RM, UNDERWOOD BA. Serum Vitamin A Distribution Curve For Children Aged 2-6 Y Known To Have Adequate Vitamin A Status: A Reference Population. **Am J Clin Nutr.**, v. 54, p. 701-711, 1991.

FLORES H, CAMPOS F, ARAUJO CRC, UNDERWOOD BA. Assessment of marginal vitamin A deficiency in Brazilian children using the relative dose response procedure. **Am J Clin Nutr.**, v. 40, p. 1281-89, 1984.

FLORES H, GROUP TL. The Relative Dose Response (Rdr) In Malnourished Children. **Xerophthalmia Bulletin**, v. 49, p. 4-5, 1992.

FLORES H. **Frequency Distribution Of Serum Vitamin A Levels In Cross-Sectional Surveys And In Surveys Before And After Vitamin A Supplementation.** In: Nutrition Foundadtion. (Org.). A Brief guide to current methods of assessing vitamin A status. Washington, Usa: The Nutrition Foundation, Inc., p. 09-11, 1993.

FONTELES M, FANG G, THIELMAN NM, YOTSEFF PS, GUERRANT RL. Role of platelet activating factor in the inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v. 11, n. 2, p. 133-43, 1995.

FRAME B, JACKSON CE, REYNOLDS WA, UMPHREY JE. Hypercalcemia and skeletal effects in chronic hypervitaminosis A. **Ann Intern Med**, v. 80, n. 1, p. 44-8, 1974.

FRASER PD, BRAMLEY PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog Lipid Res.**, v. 43, p. 228–265, 2004.

FREEMANTLE SJ, SPINELLA MJ, DMITROVSKY E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7305-15, 2003.

FRESHNEY R I. Culture of Animal Cells. 3ed. New York, Wiley-liss, 1994.

FREY, S. M., AND T. D. WILKINS. Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A. **Infect Immun**. V. 60, p. 2488–2492, 1992.

FUKUSHIMA K, SASAKI I, TAKAHASHI K, NAITO H, OGAWA H, SATO S, MATSUNO S. Lipopolysaccharide exhibits synergistic enhancement of butyrate-induced and retinoic acid-mediated alkaline phosphatase activity on small intestinal epithelial cell line, IEC-6. **Digestion**, v. 59, n. 6, p. 683-8, 1998.

FURR HC, AMEDEE-MANESME O, CLIFFORD AJ, BERGEN HR 3RD, JONES AD, ANDERSON DP, OLSON JA. Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. **Am J Clin Nutr.**, v. 49, n. 4, p. 713-6, 1989.

FURR HC. Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. **J Nutr.**, v. 134, v. 1, p. 281S-285S, 2004.

FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI T, FUJIMOTO K, TSUKITA S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J Cell Biol.**, v. 141, n. 7, p. 1539-50, 1998.

FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, TSUKITA S, TSUKITA S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **J Cell Biol.**, v. 123, n. 6 Pt 2, p. 1777-88, 1993.

GAMBLE MV, RAMAKRISHNAN R, PALAFOX NA, BRIAND K, BERGLUND L, BLANER WS. Retinol binding protein as a surrogate measure for serum retinol: studies in vitamin A-deficient children from the Republic of the Marshall Islands. **Am J Clin Nutr.**, v. 73, n. 3, p. 594-601, 2001.

GEORGE RH, SYMONDS JM, DIMOCK F, BROWN JD, ARABI Y, SHINAGAWA N, KEIGHLEY MR, ALEXANDER-WILLIAMS J, BURDON DW. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **Br Med J.**, v. 1, n. 6114, p. 695, 1978.

GEORGE WL, ROLFE RD, HARDING GK, KLEIN R, PUTNAM CW, FINEGOLD SM. *Clostridium difficile* and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis. **Infection**, v. 10, p. 205–8, 1982.

GEORGE WL, SUTTER VL, CITRON D, FINEGOLD SM. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 214-9, 1979.

GERSTER H. Vitamin A--functions, dietary requirements and safety in humans. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 67, n. 2, p. 71-90, 1997.

GHANA VAST STUDY TEAM. Vitamin A supplementation in northern Ghana: effects on clinic attendances, hospital admissions, and child mortality. **Lancet**, v. 342, n. 8862, p. 7-12, 1993.

GIBSON RS. **Principles of nutritional Assessment**. New York: Oxford University Press, 1990.

GIGUERE V, ONG ES, SEGUI P, EVANS RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. **Nature**, v. 330, p. 624–629, 1987.

GILLER T, BUCHWALD P, BLUM-KAELIN D, HUNZIKER W. Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2: differences in colipase dependence and in lipase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 16509–16, 1992.

GILLIGAN PH, MCCARTHY LR, GENTA VM. Relative frequency of *Clostridium difficile* in patients with diarrheal disease. **J Clin Microbiol**, v. 14, p. 26–31, 1981.

GILMAN GA, HARDMAN JG, LIMBIRD LE. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a ed., McGraw-hill Interamericana do Brasil, 2007.

GLASZIOU PP, MACKERRAS DE. Vitamin A supplementation in infectious diseases: a meta-analysis. **BMJ**, v. 306, n. 6874, p. 366-70, 1993.

GODOY JA, LUNAR R, TORRES-SCHUMANN S, MORENO J, RODRIGO RM, PINTOR-TORO JA. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. **Plant Mol Biol**, v. 26. n. 6, p. 1921-34, 1994.

GOODMAN DS, BLANER WS. **Biosynthesis, absorption, and hepatic metabolism of retinol**. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The Retinoids*. New York: Academic Press. v. 2, p 1-39, 1984.

GOODMAN DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. **N Engl J Med.**, v. 310, n. 16, p. 1023-31, 1984.

GOODWIN TW. Biosynthesis of carotenoids and plant triterpenes. **Biochem J.**, v. 123, n. 3, p. 293-329, 1971.

GOODWIN TW. **The Biosynthesis of Vitamin A and Related Compounds**. London: Academic, 1963.

GORODESKI GI, ECKERT RL, PAL D, UTIAN WH, RORKE EA. Retinoids regulate tight junctional resistance of cultured human cervical cells. **Am J Physiol.**, v. 273, n. 5 Pt 1, p. C1707-13, 1997.

GROTTO I, MIMOUNI M, GDALEVICH M, MIMOUNI D.J. Vitamin A supplementation and childhood morbidity from diarrhea and respiratory infections: a meta-analysis. **Pediatr.**, v. 142, n. 3, p. 297-304, 2003.

GUDAS LJ. Retinoids and vertebrate development. **J Biol Chem.**, v. 269, n. 22, p. 15399-402, 1994.

GUERRANT DI, MOORE SR, LIMA AA, PATRICK PD, SCHORLING JB, GUERRANT RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 707-13, 1999.

GUERRANT RL, KOSEK M, LIMA AA, LORNTZ B, GUYATT HL. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 191-3, 2002.

GUERRANT RL, ORIA R, BUSHEN OY, PATRICK PD, HOUPTE E, LIMA AA. Global impact of diarrheal diseases that are sampled by travelers: the rest of the hippopotamus. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 8, p. S524-30, 2005.

GUERRANT RL, SCHORLING JB, MCAULIFFE JF, DE SOUZA MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 47, n. 1Pt2, p. 28-35, 1992.

GUERRANT RL, HUGHES JM, LIMA NL, CRANE J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Rev Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. S41-S50, 1990.

GUILLONEAU M, JACQZ-AIGRAIN E. Teratogenic effects of vitamin A and its derivatives. **Arch Pediatr.**, v. 4, n. 9, p. 867-74, 1997.

GUMBINER B, LOWENKOPF T, APATIRA D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88. n. 8, p. 3460-4, 1991.

GUMBINER BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 345-57, 1996.

GUMBINER BM. Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. **Neuron.**, v. 11. n. 4, p. 551-64, 1993.

GUNDERSEN TE, BLOMHOFF R. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. **J Chromatogr A.**, v. 935. n. 1-2, p. 13-43, 2001.

HALL IC, O`TOOLE E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobic: *bacillus difficilis*. **Am J Dis Child**, v. 49, p. 390-402, 1935.

HALL, A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. **Science**, v. 249, p. 635-640, 1990.

HAMMOND GA, JOHNSON JL. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. **Microb Pathog.**, v. 19, n. 4, p. 203-13, 1995.

HARRISON EH, HUSSAIN MM. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1405-8, 2001.

HARRISON EH. Enzymes catalyzing the hydrolysis of retinyl esters. **Biochim Biophys Acta**, v. 1170, n. 2, p. 99-108, 1993.

HARRISON EH. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. **Annu Rev Nutr.**, v. 25, p. 87-103, 2005.

HARTMANN S, BRORS O, BOCK J, BLOMHOFF R, BAUSCH J, WIEGAND UW, HARTMANN D, HORNIG DH. Exposure to retinoic acids in non-pregnant women following high vitamin A intake with a liver meal. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 75, n. 3. p. 187-94, 2005.

HARTWELL LH, KASTAN MB. Cell cycle control and cancer. **Science.**, v. 266, n. 5192, p. 1821-8, 1994.

HASKINS J, GU L, WITTCHEN ES, HIBBARD J, STEVENSON BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. **J Cell Biol.**, v. 141, n. 1, p. 199-208, 1998.

HATHCOCK JN, HATTAN DG, JENKINS MY, MCDONALD JT, SUNDARESAN PR, WILKENING VL. Evaluation of vitamin A toxicity. **Am J Clin Nutr.**, v. 52,n. 2, p. 183-202, 1990.

HAYES WC, COBEL-GEARD SR, HANLEY TR JR, MURRAY JS, FRESHOUR NL, RAO KS, JOHN JA. Teratogenic effects of vitamin A palmitate in Fischer 344 rats. **Drug Chem Toxicol.**, v. 4, n. 3, p. 283-95, 1981.

HAZZARD WR, BIERMAN EL.. Delayed clearance of chylomicron remnants following vitamin A-containing oral fat loads in broad-beta disease (type III hyperlipoproteinemia). **Metab Clin Exp.**, v. 25, p. 777-801, 1976.

HE D, HAGEN C, POTHOUKAKIS M, CHEN N D, MEDINA M, WARNY JT. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. **Gastroenterology**, v. 119, p. 139-150, 2000.

HECHT G, KOUTSOURIS A, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, MADARA JL. *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. **Gastroenterology**, v. 102, n. 2, p. 416-23, 1992.

HECHT G, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, MADARA JL. *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. **J Clin Invest**, v. 82, n. 5, p. 516-24, 1988.

HEIDEMANN SR, BUXBAUM RE. Cell crawling: first the motor, now the transmission. **J Cell Biol.**, v. 141. n. 1, p. 1-4, 1998.

HEISKALA M, PETERSON PA, YANG Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. **Traffic.**, v. 2. n. 2, p. 93-8, 2001.

HENNING B, STEWART K, ZAMAN K, ALAM AN, BROWN KH, BLACK RE. Lack of therapeutic efficacy of vitamin A for non-cholera, watery diarrhoea in Bangladeshi children. **Eur J Clin Nutr.**, v. 46, n. 6, p. 437-43, 1992.

HERNELL O, STAGGERS JE, CAREY MC.. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. **Biochemistry**, v. 29, p. 2041-56, 1990.

HETTS SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. **JAMA.**, v. 279, n. 4, p. 300-7, 1998.

HIDALGO IJ, RAUB TJ, BORCHARDT RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 736-49, 1989.

HO M, YANG D, WYLE FA, MULLIGAN ME. Increased incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea following decreased restriction of antibiotic use. **Clin Infect Dis.**, v. 23, n. 1, p. S102-6, 1996.

HOAG KA, NASHOLD FE, GOVERMAN J, HAYES CE. Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3736-9, 2002.

HOFFMAN RT, HALL MO, ANDERSON RE. Linkage of retinal to opsin. **Nat New Biol**, v. 229, n. 8, p. 249-50, 1971.

HOFMANN FC, BUSCH U, PREPENS I, JUST AND K, AKTORIES. Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 11074–11078, 1997.

HOLLAND RE, PFEIFFER CJ, BRUNS NJ, WEBB KE, JR. Morphologic alterations in small intestinal epithelium of lambs fed vitamin A-depleted diet. **Digestive Diseases & Sciences**, v. 38, n. 2, p. 333-43, 1993.

HOSSAIN S, BISWAS R, KABIR I, SARKER S, DIBLEY M, FUCHS G, MAHALANABIS D. Single dose vitamin A treatment in acute shigellosis in Bangladesh children: randomised double blind controlled trial. **BMJ**. V. 316, n. 7129, p. 422-6, 1998.

HOWELL JM, THOMPSON JN, PITT GA. Histology of the lesions produced in the reproductive tract of animals fed a diet deficient in vitamin A alcohol but containing vitamin A acid. I. The male rat. **J Reprod Fertil**. 5:159-67, 1963. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 173-80, 2002.

HUANG HS, GOODMAN DS. Vitamin A and carotenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of ¹⁴C-labeled vitamin A alcohol and β -carotene in the rat. **J Biol Chem.**, v. 240, p. 2839–44, 1965.

HUMPHREY JH, AGOESTINA T, JULIANA A, SEPTIANA S, WIDJAJA H, CERRETO MC, WU LS, ICHORD RN, KATZ J, WEST KP. Neonatal vitamin A supplementation: effect on development and growth at 3 y of age. **Am J Clin Nutr.**, v. 68, n. 1, p. 109-17, 1998.

HUMPHREY JH, AGOESTINA T, WU L, USMAN A, NURACHIM M, SUBARDJA D, HIDAYAT S, TIELSCH J, WEST KP, SOMMER A. Impact of neonatal vitamin A supplementation on infant morbidity and mortality. **J Pediatr.**, v. 128, n. 4, p. 489-96, 1996.

HUMPHREY JH, WEST KP JR, SOMMER A. Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. **Bull World Health Organ.**, v. 70, n. 2, p. 225-32, 1992.

HUSSAIN MM, KANCHA RK, ZHOU Z, LUCHOOMUN J, ZU H, BAKILLAH A.. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. **Biochim Biophys Acta.**, v.1300 p. 151–70, 1996

HUSSEY GD, KLEIN M. A randomized, controlled trial of vitamin A in children with severe measles. **N Engl J Med.**, v. 323, n. 3, p. 160-4, 1990.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2003. **Síntese de Indicadores Sociais**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 18 de Janeiro, 2007.

INGENBLEEK Y, VAN DEN SCHRIECK HG, DE NAYER P, DE VISSCHER M. The role of retinol-binding protein in protein-calorie malnutrition. **Metabolism.**, v. 24, n. 5, p. 633-41, 1975.

Institute of Medicine (IOM). National Academy of Sciences. **Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. Washington, DC: National Academy Press: p. 95-185, 2000.

Institute of Medicine (IOM). National Academy of Sciences. Vitamin A. In: **Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. Washington, DC: National Academy Press: p. 65-126, 2001.

International Union of Pure and Applied Chemistry—International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB). 1982. Nomenclature of retinoids. Recommendations. **Eur J Biochem.**, v. 129, p. 1–5, 1981.

IWAMOTO M, KOJI T, MAKIYAMA K, KOBAYASHI N, NAKANE PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. **J Pathol.**, v.180, n. 2, p. 152-9, 1996.

IWATA M, ESHIMA Y, KAGECHIKA H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. **Int Immunol.**, v. 15, n. 8, p. 1017-25, 2003.

IWATA M, HIRAKIYAMA A, ESHIMA Y, KAGECHIKA H, KATO C, SONG SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527-38, 2004.

IWATA M, MUKAI M, NAKAI Y, ISEKI R. Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. **J Immunol.**, v.149 , n. 10, p. 3302-8, 1992.

JACSON J, ARCHIBALD LK, NWANYANWU OC, SOWELL AL, BUCHANAN I, LARNED J, BELL M, KAZEMBE PN, DOBBIE H, JARVIS WR. Vitamin A levels and immunity in humans. *Clin Diag Lab Immu.*, v. 9, n. 3, p. 616-621, 2002.

JAROSZESKI MJ E RADCLIFF G. Fundamentals of flow cytometry. **Mol Biotech.**, v. 11, p. 37-53, 1999.

JENNENS ML, LOWE ME. Rat GP-3 is a pancreatic lipase with kinetic properties that differ from colipase-dependent pancreatic lipase. **J Lipid Res.**, v. 36, p. 2374-82, 1995.

JETTEN AM, BRODY AR, DEAS MA, HOOK GE, REARICK JI, THACHER SM. Retinoic acid and substratum regulate the differentiation of rabbit tracheal epithelial cells into squamous and secretory phenotype. Morphological and biochemical characterization. **Lab Invest.**, v. 56, n. 6, p. 654-64, 1987.

JICK H. Retinoids and teratogenicity. **J Am Acad Dermatol.**, v. 39, n. 2-3, p. S118, 1998.

JIN Z, EL-DEIRY WS. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther.**, v. 4, n. 2, p. 139-63, 2005.

JOHAL SS, SOLOMON K, DODSON S, BORRIELLO SP, MAHIDA YR. Differential effects of varying concentrations of *clostridium difficile* toxin A on epithelial barrier function and expression of cytokines. **J Infect Dis.**, v. 189, n. 11, p. 2110-2119, 2004.

JUST I, HOFMANN F, AKTORIES K. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 250, p. 55-83, 2000.

JUST I, WILM M, SELZER J, REX G, VON EICHEL-STREIBER C, MANN M, AKTORIES K. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 23, p. 13932-6, 1995.

JUST I, SELZER J, WILM M, VON EICHEL-STREIBER C, MANN M, AKTORIES K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. **Nature**, v. 375, p. 500-503, 1995.

KANAI M, RAZ A, GOODMAN DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **J Clin Invest.**, v. 47, n. 9, p. 2025-44, 1968.

KANDA Y, GOODMAN DS, CANFIELD RE, MORGAN FJ. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. **J Biol Chem.**, v. 249, n.21, p. 6796-805, 1974.

KANDIL HM, BERSCHNEIDER HM, ARGENZIO RA. Tumour necrosis factor alpha changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gut**, v. 35, n. 7, p. 934-40, 1994.

KASTNER P, MARK M, CHAMBON P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? **Cell**, v. 83, p. 859–869, 1995.

KAUR P, POTTEN CS. Effects of puromycin, cycloheximide and noradrenaline on cell migration within the crypts and on the villi of the small intestine. A model to explain cell movement in both regions. **Cell Tissue Kinet.**, v. 19, n. 6, p. 611-25, 1986.

KELLY CP, BECKER S, LINEVSKY JK, JOSHI MA, O'KEANE JC, DICKEY BF, LAMONT JT, POTHOUKAKIS C. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. **J Clin Invest.**, v. 93, n. 3, p. 1257-65, 1994.

KIM GJ, KIM CJ, CHO SY, CHUNG IP, PARK SH, LEE MJ, CHI JG. Activation of trkA induces differentiation and inhibits the growth of JK-GMS Askin tumor cells. **Lab Invest**, v. 82, n. 2, p. 221-9, 2002.

KITAMURA M, ISHIKAWA Y, MORENO-MANZANO V, XU Q, KONTA T, LUCIO-CAZANA J, FURUSU A, NAKAYAMA K. Intervention by retinoic acid in oxidative stress-induced apoptosis. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 17 n. 9. p. 84-87, 2002.

KONEMAN E W, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN JR WC. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**, ED Medsi, 5ª edição, 2001.

KORANSKY JR, ALLEN SD, DOWELL VR JR. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. **Appl Environ Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 762-5, 1978.

KOSAKA C, SASAGURI T, KOMIYAMA Y, TAKAHASHI H. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. **Hypertens Res.**, v. 24, n. 5, p. 579-88, 2001.

KOSEK M, BERN C, GUERRANT RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KRASINSKI SD, RUSSELL RM, OTRADOVEC CL, SADOWSKI JA, HARTZ SC, JACOB RA, MCGANDY RB. Relationship of vitamin A and vitamin E intake to fasting plasma retinol, retinol-binding protein, retinyl esters, carotene, alpha-tocopherol, and cholesterol among elderly people and young adults: increased

plasma retinyl esters among vitamin A-supplement users. **Am J Clin Nutr.**, v. 49 n. 1, p. 112-20, 1989.

KRIVAN HC, CLARK GF, SMITH DF, WILKINS TD. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. **Infect Immun.**, v. 53, n. 3, p. 573-81, 1986.

KUBOTA H, CHIBA H, TAKAKUWA Y, OSANAI M, TOBIOKA H, KOHAMA G, MORI M, SAWADA N. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. **Exp Cell Res.**, v. 263, n.1, p.163-72, 2001.

KUCUKBAY H, YAKINCI C, KUCUKBAY FZ, TURGUT M. Serum vitamin A and beta-carotene levels in children with recurrent acute respiratory infections and diarrhoea in Malatya. **J Trop Pediatr.**, v. 43, n. 6, p. 337-40, 1997.

KYNE L, HAMEL MB, POLAVARAM R, KELLY CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Clin Infect Dis.**, v. 34, n. 3, p. 346-53, 2002.

LABURTHE M, ROUSSET M, ROUYER-FESSARD C, COUVINEAU A, CHANTRET I, CHEVALIER G, ZWEIBAUM A. Development of vasoactive intestinal peptide-responsive adenylate cyclase during enterocytic differentiation of Caco-2 cells in culture. Evidence for an increased receptor level. **J Biol Chem.**, v. 262, n. 21, p. 10180-4, 1987.

LAI L, BOHNSACK BL, NIEDERREITHER K, HIRSCHI KK. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. **Development**, v. 130, n. 26, p. 6465-74, 2003.

LAMB TD, PUGH EN JR. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. **Prog Retin Eye Res.**, v. 23, n. 3, p. 307-80, 2004.

LAMPEN A, MEYER S, ARNHOLD T, NAU H. Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 295, n. 3, p. 979-85, 2000.

LARSEN RD, RIVERA-MARRERO CA, ERNST LK, CUMMINGS RD, LOWE JB. Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-alactosyltransferase cDNA. **J Biol Chem.**, v. 265, n. 12, p. 7055-61, 1990.

LEE MO, HAN SY, JIANG S, PARK JH, KIM SJ. Differential effects of retinoic acid on growth and apoptosis in human colon cancer cell lines associated with the induction of retinoic acid receptor beta. **Biochem Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p. 485-96, 2000.

LEVIN MS, DAVIS AE. Retinoic acid increases cellular retinol binding protein II mRNA and retinol uptake in the human intestinal Caco-2 cell line. **J Nutr.**, v. 127, p. 13–17, 1997.

LEVIN MS. Cellular retinol-binding proteins are determinants of retinol uptake and metabolism in stably transfected Caco-2 cells. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 8267–76, 1993.

LI E, NORRIS AW. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 16. p. 205–34, 1996.

LI N, LEWIS P, SAMUELSON D, LIBONI K, NEU J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 287, p. G726–G733, 2004.

LI E, TSO P. Vitamin A uptake from foods. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 14, n. 3, p. 241-247, 2003.

LIMA AA, BRITO LF, RIBEIRO HB, MARTINS MC, LUSTOSA AP, ROCHA EM, LIMA NL, MONTE CM, GUERRANT RL. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 40, n. 1, p. 28-35, 2005.

LIMA AA, GUERRANT RL. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol Rev.**, v. 14, p. 222-42, 1992.

LIMA AA, INNES DJ JR, CHADEE K, LYERLY DM, WILKINS TD, GUERRANT RL. *Clostridium difficile* toxin A. Interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab Invest.**, v. 61, n. 4. p. 419-25, 1989.

LIMA AA, LYERLY DM, WILKINS TD, INNES DJ, GUERRANT RL. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infect Immun.**, v. 56, n. 3, p. 582-8, 1988.

LIMA AA, MOORE SR, BARBOZA MS JR, SOARES AM, SCHLEUPNER MA, NEWMAN RD, SEARS CL, NATARO JP, FEDORKO DP, WUHIB T, SCHORLING JB, GUERRANT RL. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J Infect Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-51, 2000.

LIMA AA, SILVA TM, GIFONI AM, BARRETT LJ, MCAULIFFE IT, BAO Y, FOX JW, FEDORKO DP, GUERRANT RL. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am J Gastroenterol.**, v. 92. n.10, p. 1861-6, 1997.

LIMA NL, PEREIRA CR, SOUZA IC, FACANHA MC, LIMA AA, GUERRANT RL, FARR BM. Selective surveillance for nosocomial infections in a Brazilian hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 14, n. 4, p. 197-202, 1993.

LIPPMAN SM, HEYMAN RA, KURIE JM, BENNER SE, HONG WK. Retinoids and chemoprevention: clinical and basic studies. **J Cell Biochem Suppl.**, v. 22, p. 1-10, 1995.

LISSOOS TW, DAVIS AE, LEVIN MS. Vitamin A trafficking in Caco-2 cells stably transfected with cellular retinol binding proteins. **Am J Physiol.**, v. 268, p. G224-31, 1995.

LIU TS, MUSCH MW, SUGI K, WALSH-REITZ MM, ROPELESKI MJ, HENDRICKSON BA, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, CHANG EB. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. **Am J Physiol Cell Physiol Epub.**, v. 284, n. 4, p. C1073-82, 2003.

LIVERA G, ROUILLER-FABRE V, PAIRAULT C, LEVACHER C, HABERT R. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction.**, v. 124, n. 2, p. 173-80, 2002.

LOERCH JD, UNDERWOOD BA, LEWIS KC. Response of plasma levels of vitamin A to a dose of vitamin A as an indicator of hepatic vitamin A reserves in rats. **J Nutr.**, v. 109, n. 5, p. 778-86, 1979.

LONG KZ, SANTOS JI, ROSADO JL, LOPEZ-SAUCEDO C, THOMPSON-BONILLA R, ABONCE M, DUPONT HL, HERTZMARK E, ESTRADA-GARCIA T. Impact of vitamin A on selected gastrointestinal pathogen infections and associated diarrheal episodes among children in Mexico City, Mexico. **J Infect Dis.**, v. 194, n. 9, p. 1217-25, 2006.

LOTAN R, KRAMER RH, NEUMANN G, LOTAN D, NICOLSON GL. Retinoic acid-induced modifications in the growth and cell surface components of a human carcinoma (HeLa) cell line. **Exp Cell Res.**, v. 130, n. 2, p. 401-14, 1980.

LOTAN R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. **Biochim Biophys Acta.**, v. 605, n. 1, p. 33-91, 1980.

LUNN PG. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proc Nutr Soc.**, v. 59, n. 1, p. 147-54, 2000.

LYERLY DM, BALL DW, TOTH J, WILKINS TD. Characterization of cross-reactive proteins detected by Culturette Brand Rapid Latex Test for *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol.**, v. 26, n. 3, p. 397-400, 1988.

LYERLY DM, KRIVAN HC, WILKINS TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clin Microbiol Rev.**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 1988.

LYERLY DM, LOCKWOOD DE, RICHARDSON SH, WILKINS TD. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect Immun.**, v. 35, n. 3, p. 1147-50, 1982.

LYERLY DM, SAUM KE, MACDONALD DK, WILKINS TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. **Infect Immun.**, v. 47, n. 2, p. 349-52, 1985.

MA TY, HOLLANDER D, TRAN LT, NGUYEN D, HOA N, BHALLA D. Cytoskeletal regulation of Caco-2 intestinal monolayer paracellular permeability. **J Cell Physiol.**, v. 164, n. 3, p. 533-45, 1995.

MACDONALD PN, ONG DE. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 12478-82, 1988.

MADARA JL, DHARMSATHAPHORN K. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. **J Cell Biol.**, v. 101, n. 6, p. 2124-33, 1985.

MADARA JL, TRIER JS. Structure and permeability of goblet cell tight junctions in rat small intestine. **J Membr Biol.**, v. 66, n. 2, p. 145-57, 1982.

MADARA JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. **Annu Rev Physiol.**, v. 60, p. 143-59, 1998.

MADEN M. The role of retinoids in developmental mechanisms in embryos. **Subcell Biochem.**, v. 30, p. 81-111, 1998.

MAJUMDAR M, GHOSH AK. Effect of vitamin A deficiency on blood glucose level & intestinal disaccharidases activities. **Indian J Med Res.**, v. 86, p. 511-5, 1987.

MALABA LC, ILIFF PJ, NATHOO KJ, MARINDA E, MOULTON LH, ZIJENAH LS, ZVANDASARA P, WARD BJ, HUMPHREY JH; the ZVITAMBO Study Group. Effect of postpartum maternal or neonatal vitamin A supplementation on infant mortality among infants born to HIV-negative mothers in Zimbabwe. **Am J Clin Nutr.**, v. 81, n. 2, p. 454-60, 2005.

MAN Y, HART VJ, RING CJ, SANJAR S, WEST MR. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 23, n. 5, p. 610-7, 2000.

MANGELS AR, HOLDEN JM, BEECHER GR, FORMAN MR, LANZA E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **J Am Diet Assoc.**, v. 93, n. 3, p. 284-96, 1993.

MANGELSDORF DJ, EVANS RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841-50, 1995.

MANGELSDORF DJ. Vitamin A receptors. **Nutr Rev.**, v. 52, n. 2, p. S32-44, 1994.

MARIADASON JM, RICKARD KL, BARKLA DH, AUGENLICHT LH, GIBSON PR. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. **J Cell Physiol.**, v. 183, n. 3, p. 347-54, 2000.

MARKOWITZ LE, NZILAMBI N, DRISKELL WJ, SENSION MG, ROVIRA EZ, NIEBURG P, RYDER RW. Vitamin A levels and mortality among hospitalized measles patients. **J Trop Pediatr.**, v. 35, n. 3, p. 109-12, 1989.

MARLER LM, SIDERS JA, WOLTERS LC, PETTIGREW Y, SKITT BL, ALLEN SD. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. **J Clin Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 514-6, 1992.

MARTIN-PADURA I, LOSTAGLIO S, SCHNEEMANN M, WILLIAMS L, ROMANO M, FRUSCELLA P, PANZERI C, STOPPACCIARO A, RUCO L, VILLA A, SIMMONS D, DEJANA E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. **J Cell Biol.**, v. 142, n. 1, p. 117-27, 1998.

MASUDA K, ITOH M, KAWATA T. Characterization and reassembly of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile* GAI 4131. **Microbiol Immunol.**, v. 33, n. 4, p. 287-98, 1989.

MATES JM, SEGURA JA, ALONSO FJ, MARQUEZ J. Pathways from glutamine to apoptosis. **Front Biosci.**, v. 11, p. 3164-80, 2006.

MAZIERE S, CASSAND P, NARBONNE JF, MEFLAH K. Vitamin A and apoptosis in colonic tumor cells. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 67, n. 4, p. 237-41, 1997.

MCAULIFFE J, SANTOS LMP, DINIZ AS, BATISTA FILHO M, BARBOSA RCC. **A deficiência de vitamina A e estratégias para seu controle: um guia para as secretarias municipais de saúde.** Projeto Hope, Fortaleza. p.29, 1991.

MCCAFFERY P, DRAGER UC. Retinoic acid synthesizing enzymes in the embryonic and adult vertebrate. **Adv Exp Med Biol.**, v. 372, p. 173-83, 1995.

MCCOLE DF, DOHERTY ML, BAIRD AW, DAVIES WC, MCGILL K, TORGERSON PR. T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. **Parasite Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 1999.

MCCOLLUM E, DAVIS M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. **J Biol Chem.** v. 15, p. 167-175, 1913.

MCCORMACK SA, JOHNSON LR. Polyamines and cell migration. **J Physiol Pharmacol.**, v. 52, n. 3, p. 327-49, 2001.

MCCORMACK SA, RAY RM, BLANNER PM, JOHNSON LR. Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin beta4 in migrating IEC-6 cells. **Am J Physiol.**, v. 276, n.1-2, p. C459-68, 1999.

MCCORMACK SA, VIAR MJ, JOHNSON LR. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3-1, p. G426-35, 1992.

MCCORMACK SA, VIAR MJ, TAGUE L, JOHNSON LR. Altered distribution of the nuclear receptor RAR beta accompanies proliferation and differentiation changes caused by retinoic acid in Caco-2 cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 32, n. 1. p. 53-61,1996.

MCCULLOUGH FS, NORTHROP-CLEWES CA, THURNHAM DI. The effect of vitamin A on epithelial integrity. **Proc Nutr Soc.**, v. 58, n. 2, p. 289-93, 1999.

MCDONALD LC, KILLGORE GE, THOMPSON A, OWENS RC JR, KAZAKOVA SV, SAMBOL SP, JOHNSON S, GERDING DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **N Engl J Med.**, v. 353, n. 23, p. 2433-41, 2005.

MCELLISTREM MC, CARMAN RJ, GERDING DN, GENHEIMER CW, ZHENG L. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. 2, p. 265-72, 2005.

MCLAREN D, FRIGG M. **Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiência de vitamina A (VADD).** Washington: OPAS/OMS; 1999.

MEHTA NJ. Dietary intervention with dark green leafy vegetables spinach (*Spinach oleracea*) to combat subclinical vitamin A deficiency (SVAD) in slum children of Dharavi. Mumkbai, India. **Sight Life Newslett.** v. 4, p. 32-33, 2001.

MEHTA S, FAWZI W. Effects of Vitamins, Including Vitamin A, on HIV/AIDS Patients. **Vitam Horm.**, v. 75, p. 355-83, 2007.

MELHUS H, NILSSON T, PETERSON PA, RASK L. Retinol-binding protein and transthyretin expressed in HeLa cells form a complex in the endoplasmic reticulum in both the absence and the presence of retinol. **Exp Cell Res.**, v. 197, n. 1, p. 119-24, 1991.

MITIC LL, ANDERSON JM. Molecular architecture of tight junctions. **Annu Rev Physiol.**, v. 60, p. 121-42, 1998.

MITIC LL, VAN ITALLIE CM, ANDERSON JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, n. 2, p. G250-4, 2000.

MITRA AK, ALVAREZ JO, GUAY-WOODFORD L, FUCHS GJ, WAHED MA, STEPHENSEN CB. Urinary retinol excretion and kidney function in children with shigellosis. **Am J Clin Nutr.**, v. 68, n. 5, p. 1095-103, 1998.

MONCRIEF JS, BARROSO LA, AND WILKINS TD. Positive regulation of *Clostridium difficile* toxins. **Infect Immun.**, v. 65, p. 1105–1108, 1997.

MONTEIRO CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. **Estudos Avançados.**, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003.

MOORE T. Vitamin A and carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. **Biochem J.**, v. 24, p. 692– 702, 1930.

MORGAN SJ, DARLING DC. **Animal Cell Culture.** Oxford, BIOS Scientific Publ., 1993.

MORRIS-KAY GM, SOKOLOVA N. Embryonic development and pattern formation. **FASEB J.**, v. 10, n. 9, p. 961-8, 1996.

MOTTA VT. **Bioquímica Clínica: princípios e interpretações.** 3^a ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau., v. 1, p 388, 2000.

MUHILAL, PERMEISIH D, IDJRADINATA YR, MUHERDIYANTININGSIH, KARYADI D. Vitamin A-fortified monosodium glutamate and health, growth, and survival of children: a controlled field trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 48, n. 5, p. 1271-6, 1988.

MURRAY CJL, LOPEZ AD. **The global burdeen of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factores in 1990 and projected to 2020.** Cambridge, MA: Harvard University Press, 1997.

MUSCH MW, WALSH-REITZ MM, CHANG EB. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 290, n. 2, p. G222-G231, 2006.

MUSHER DM, LOGAN N, MEHENDIRATTA V. Epidemic *Clostridium difficile*. **N Engl J Med.**, v. 354, n. 11, p. 1199-1203, 2006.

NAKAGAWA S, FUJII T, YOKOYAMA G, KAZANIETZ MG, YAMANA H, SHIROUZU K. Cell growth inhibition by all-*trans* retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. **Mol Carcinog.**, v. 38, n. 3, p. 106-16, 2003.

NAPOLI JL, RACE KR. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. **J Biol Chem.**, v. 263, p. 17372– 17377, 1988.

NAU H AND BLANER WJ. **Retinoids. The biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoids Actions.** Springer, New York. eds, 1999.

NEWCOMER ME, JAMISON RS, ONG DE. Structure and function of retinoidbinding proteins. **Subcell Biochem.**, v. 30, p. 53–80, 1998.

NICKE B, KAISER A, WIEDENMANN B, RIECKEN EO, ROSEWICZ S. Retinoic acid receptor alpha mediates growth inhibition by retinoids in human colon carcinoma HT29 cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 261, n. 3, p. 572-7, 1999.

NIEHAUS MD, MOORE SR, PATRICK PD, DERR LL, LORNTZ B, LIMA AA, GUERRANT RL. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 66, n. 5, p. 590-3, 2002.

NILES RM. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. **Nutrition**, v. 16, n. 11-12, p. 1084-9, 2000.

NOH SK, KOO SI. Intraduodenal infusion of lysophosphatidylcholine restores the intestinal absorption of vitamins A and E in rats fed a low-zinc diet. **Exp Biol Med.**, v. 226, p. 342–48, 2001.

NUNEZ G, BENEDICT MA, HU Y, INOHARA N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3237-45, 1998.

NUSRAT A, GIRY M, TURNER JR, COLGAN SP, PARKOS CA, CARNES D, LEMICHEZ E, BOQUET P, MADARA JL. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 23, p. 10629-33, 1995.

NUSRAT A, VON EICHEL-STREIBER C, TURNER JR, VERKADE P, MADARA JL, PARKOS CA. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. **Infect Immun.**, v. 69, p. 1329-1336, 2001.

NUSRAT A, TURNER JR, MANDARA JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, p. G851-G857, 2000.

NUSRAT A, VON EICHEL-STREIBER C, TURNER JR, VERKADE P, MADARA JL, PARKOS CA. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. **Infect Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1329-1336, 2001.

OGARO FO, ORINDA VA, ONYANGO FE, BLACK RE. Effect of vitamin A on diarrhoeal and respiratory complications of measles. **Trop Geogr Med.**, v. 45, n. 6, p. 283-6, 1993.

OLSON JA. Bioavailability of carotenoids. **Arch Latinoam Nutr.**, v. 49, n. 1, p. 21-5, 1999.

OLSON JA. The metabolism of the fat-soluble vitamins. **Prog Clin Biol Res.** v. 77, p. 137-46, 1981.

OLSON JA. Vitamin A. In: Ziegler EE, Filer IJ Jr. Eds. **Present knowledge in nutrition.** 7th ed. Washington. DC: International Life Sciences Institute Press. 109-19, 2001.

OLSON JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.119, n.1, p.105-108, 1989.

OMS (Organização mundial de Saúde). **Vitamina A na gestação e na lactação: recomendações e relatório de uma consultoria.** Recife: A Organização (Série Micronutrientes. WHO/NUT/98.4), 2001.

ONG DE, KAKKAD B, MACDONALD PN. Acyl-CoA-dependent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. **J Biol Chem.**, v. 262, p. 2729-36, 1987.

ONG DE. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. **Nutr Rev.**, v. 52, p. S24-31, 1994.

OP DEN KAMP JA. Lipid asymmetry in membranes. **Annu Rev Biochem.**, v. 48, p. 47-71, 1979.

ORMEROD MG, SUN XM, BROWN D, SNOWDEN RT, COHEN GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. **Acta Oncol.**, v. 32, n. 4, p. 417, 1993.

PAIK J, VOGEL S, QUADRO L, PIANTEDOSI R, GOTTESMAN M, LAI K, HAMBERGER L, ET AL. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. **J Nutr.** v. 134, p. 276S–280S, 2004.

PAKALA R, BENEDICT CR. RAR gamma agonists inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 35, n. 2, p. 302-8, 2000.

PANTOSTI A, CERQUETTI M, VITI F, ORTISI G, MASTRANTONIO P. Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. **J Clin Microbiol.**, v. 27, n. 11, p. 2594-7, 1989.

PAPACONSTANTINO HT, HWANG KO, RAJARAMAN S, HELLMICH MR, TOWNSEND CM JR, KO TC. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. **Surgery**, v. 124, v. 2, p. 152-9; 1998.

PAPPENHEIMER JR. Scaling of dimensions of small intestines in non-ruminant eutherian mammals and its significance for absorptive mechanisms. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 121, n. 1, p. 45-58, 1998.

PARACHA PI, JAMIL A, NORTHROP-CLEWES CA, THURNHAM DI. Interpretation of vitamin A status in apparently healthy Pakistani children by using markers of subclinical infection. **Am J Clin Nutr.**, v. 72, n. 5, p. 1164-9, 2000.

PASSMORE R. Letter: Units of energy in nutrition. **Lancet**, v. 2, n. 7895, p. 1508, 1974.

PELLETIER DL, FRONGILLO EA, HABICHT JP. Epidemiologic evidence for a potentiating effect of malnutrition on child mortality. **Am J Public Health.** V. 83, n. 8, p. 1130-3, 1993.

PELLETIER DL, FRONGILLO EA. Changes in child survival are strongly associated with changes in malnutrition in developing countries. **J Nutr.**, v. 133, n. 1, p. 107-19, 2003.

PENNISTON KL, TANUMIHARDJO SA. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. **Am J Clin Nutr.**, v. 83, n. 2, p. 191-201, 2006.

PEPIN J, VALIQUETTE L, COSSETTE B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. **CMAJ**, v. 173, n. 9, p. 1037-42, 2005.

PERES C M, CURI R. **Como cultivar células**. Ed. Guanabara Koogan S A, 2005.

PETRARCA C, PERRONE A, VERNA N, VERGINELLI F, PONTI J, SABBIONI E, DI GIAMPAOLO L, DADORANTE V, SCHIAVONE C, BOSCOLO P, MARIANI COSTANTINI R, DI GIOACCHINO M. Cobalt nano-particles modulate cytokine *in vitro* release by human mononuclear cells mimicking autoimmune disease. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, v. 19, n. 4, p. 11-4, 2006.

PINTO TJ, KANEKO TM, BOU-CHACA N A. **Medicamentos, correlatos e cosméticos**. In: Hirata, M H e Mancini Filho J (eds). Manual de Biossegurança. Barueri, Manole, p. 281-88, 2002.

PLACK PA. Occurrence, absorption and distribution of vitamin A. **Proc Nutr Soc.**, v. 24, n. 2, p. 146-53, 1965.

PLATEROTI M, SAMBUY Y, NOBILI F, BISES G, PEROZZI G. Expression of epithelial markers and retinoid-binding proteins in retinol- or retinoic acid-treated intestinal cells *in vitro*. **Exp Cell Res.**, v. 208, n. 1, p. 137-47, 1993.

POLLARD TD, COOPER JA. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **Annu Rev Biochem.**, v. 55, p. 987-1035, 1986.

POPOFF MR, CHAVES-OLARTE E, LEMICHEZ E, VON EICHEL-STREIBER C, THELESTAM M, CHARDIN P, CUSSAC D, ANTONNY B, CHAVRIER P, FLATAU G, GIRY M, DE GUNZBURG J, BOQUET P. Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. **J Biol Chem.** v. 271, n. 17, p. 10217-24, 1996.

POPOFF MR, RUBIN EJ, GILL DM, AND BOQUET P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. **Infect Immun.**, v. 56, p. 2299–2306, 1988.

POTHOULAKIS C, LAMONT JT. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 280, n. 2, p. G178-83, 2001.

POTHOULAKIS C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 8, n. 11, p. 1041-7, 1996.

POTTEN CS, BOOTH C. The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.**, v. 118, n. 3, p. 473-8, 1997.

POTTEN CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. **Am J Physiol.**, v. 273, p. G253-7, 1997.

POXTON IR, BYRNE MD. Detection of *Clostridium difficile* toxin by counterimmunoelectrophoresis: a note of caution. **J Clin Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 349, 1981.

POXTON IR, CARTMILL TD. Immunochemistry of the cell-surface carbohydrate antigens of *Clostridium difficile* Two carbohydrate cell-surface. **J Gen Microbiol.**, v. 128, n. 6, p. 1365-70, 1982.

POXTON IR, MCCOUBREY J, BLAIR G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. **Clin Microbiol Infect.**, v. 7, n. 8, p. 421-7, 2001.

PRICE AB, DAVIES DR. Pseudomembranous colitis. **J Clin Pathol**, v. 30, p. 1-12, 1977.

QUADRO L, GAMBLE MV, VOGEL S ET AL. Retinol and retinol-binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. **J Infect Dis.**, v. 182, n.1, p. S97-S102, 2000.

QUADRO L, GAMBLE MV, VOGEL S, LIMA AA, PIANTEDOSI R, MOORE SR, COLANTUONI V, GOTTESMAN ME, GUERRANT RL, BLANER WS. Retinol and retinol-binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. **J Infect. Dis.**, v. 182, n. 1, p. S97-S102, 2000.

QUARONI A, WANDS J, TRELSTAD RL, ISSELBACHER KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **J Cell Biol.**, v. 80, n. 2, p. 248-65, 1979.

QUICK TC, ONG DE. Vitamin A metabolism in the human intestinal Caco-2 cell line. **Biochemistry**, v. 29, n. 50, p. 11116-23, 1990.

RACKE MK, BURNETT D, PAK SH, ALBERT PS, CANNELLA B, RAINE CS, MCFARLIN DE, SCOTT DE. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. **J Immunol.**, v. 154, n. 1, p. 450-8, 1995.

RAHMATHULLAH L, UNDERWOOD BA, THULASIRAJ RD, MILTON RC, RAMASWAMY K, RAHMATHULLAH R, BABU G. Reduced mortality among children in southern India receiving a small weekly dose of vitamin A. **N Engl J Med.**, v. 323, n. 14, p. 929-35, 1990.

RAHNER C, MITIC LL, ANDERSON JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 411-22, 2001.

RAMALHO RA, FLORES H, SAUNDERS C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Rev Panam Salud Publica**, v. 12, n. 2, p. 117-122, 2002.

RAMALHO RA, SAUNDERS C. Reflexões sobre alimentação na busca de superar carências nutricionais. **Rev Nutr.**, v. 13, n. 1, p. 11-16, 2000.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, LOORE PK. **FARMACOLOGIA**. 5^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2004.

RAYNAL P, POLLARD HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

RAZ A, SHIRATORI T, GOODMAN DS. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. **J Biol Chem.**, v. 245, n. 8, p. 1903-12, 1970.

REARICK JI, JETTEN AM. Effect of substratum and retinoids upon the mucosecretory differentiation of airway epithelial cells in vitro. **Environ Health Perspect.** 80:229-37, 1989.

REDDY V, BHASKARAM P, RAGHURAMULU N. Relationship between measles, malnutrition, and blindness: a prospective study in Indian children. **Am J Clin Nutr.**, v. 44, p. 924-930, 1986.

REDDY V. Control of vitamin A deficiency and blindness. **Acta Paediatr Scand Suppl.**, v. 374, p. 30-7, 1991.

REIFEN R, ZAIGER G, UNI Z. Effect of vitamin A on small intestinal brush border enzymes in a rat. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 68, n. 5, p. 281-6, 1998.

RIEGLER, M., R. SEDIVY, C. POTHOUKAKIS, G. HAMILTON, J. ZACHERL, G. BISCHOF, E. COSENTINI, W. FEIL, R. SCHIESSEL, J. T. LAMONT, ET AL. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. **J Clin Investig.**, v. 95, p. 2004–2011, 1995.

ROCHA MF, MAIA ME, BEZERRA LR, LYERLY DM, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, LIMA AA. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. **Infect Immun.**, v. 65, n. 7, p. 2740-6, 1997.

ROCHA MF, SOARES AM, FLORES CA, STEINER TS, LYERLY DM, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, LIMA AA. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1beta. **Infect Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4910-6, 1998.

ROCHA MF, SOARES AM, RIBEIRO RA, LIMA AA. Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin B on rabbit ileum. **Toxicon**, v. 39 n. 2-3, p. 335-40, 2001.

ROJANAPO W, LAMB AJ, OLSON JA. The prevalence, metabolism and migration of goblet cells in rat intestine following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency. **J Nutr.**, v. 110, n. 1, p. 178-88, 1980.

ROLIG EC. Vitamins: physiology and deficiency states. **Nurse Pract.**, v. 11, n. 7, p. 38, p. 43-4, p. 46-8, 1986.

RONCADA MJ, MAZZILLI RN. Fontes de vitaminas nas dietas de populações se SÃO Paulo, Brasil. **Alimentação e nutrição**, v. 1, p. 71-81, 1998.

ROSALES FJ, RITTER SJ, ZOLFAGHARI R, SMITH JE, ROSS AC. Effects of acute inflammation on plasma retinol, retinol-binding protein, and its mRNA in the liver and kidneys of vitamin A-sufficient rats. **J Lipid Res.**, v. 37, n. 5, p. 962-71. 1996.

ROSS AC, STEPHENSEN CB. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. **FASEB J.**, v.10, n. 9, p. 979-85, 1996.

ROSS AC, STEPHENSEN CB. THURNHAM DI. Impact of disease on markers of micronutrient status. **Proc Nutr Soc.**, v. 56, n. 1B, p. 421-31, 1997.

ROSS DA, KIRKWOOD BR, BINKA FN, ARTHUR P, DOLLIMORE N, MORRIS SS, SHIER RP, GYAPONG JO, SMITH PG. Child morbidity and mortality following vitamin A supplementation in Ghana: time since dosing, number of doses, and time of year. **Am J Public Health.**, v. 85, n. 9, p. 1246-51, 1995.

ROSS SA, MCCAFFERY PJ, DRAGER UC, DE LUCA LM. Retinoids in embryonal development. **Physiol Rev.**, v. 80, n. 3, p. 1021-54, 2000.

ROTHMAN KJ, MOORE LL, SINGER MR, NGUYEN US, MANNINO S, MILUNSKY A. Teratogenicity of high vitamin A intake. **N Eng J Med.**, n. 333, v. 21, p. 1369-73, 1995.

ROUSSET M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie**, v. 68, n. 9, p. 1035-40, 1986.

RUIFROK AC, MASON KA, THAMES HD. Changes in clonogen number and radiation sensitivity in mouse jejunal crypts after treatment with dimethylsulfoxide and retinoic acid. **Radiat Res.**, v. 145, n. 6, p.740-5, 1996.

RUSSELL RM. New views on the RDAs for older adults. **J Am Diet Assoc.**, v. 97, n. 5, p. 515-8, 1997.

RYBOLT AH, BENNETT RG, LAUGHON BE, THOMAS DR, GREENOUGH WB 3RD, BARTLETT JG. Protein-losing enteropathy associated with *Clostridium difficile* infection. **Lancet** v. 1, n. 8651, p. 1353-5, 1989.

SAARI JC, BREDBERG DL, NOY N. Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. **Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 3106-12, 1994.

SALAZAR-LINDO E, SALAZAR M, ALVAREZ JO. Association of diarrhea and low serum retinol in Peruvian children. **Am J Clin Nutr.**, v. 58, n. 1, p. 110-3, 1993.

SANTOS LMP, ASSIS AMO, MARTINS MC, ARAUJO MPN, MORRIS SS, BARRETO ML. Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-árido da Bahia (Brasil): II - Hipovitaminose A. **Rev Saúde Pública**, v 30, p. 67-74, 1996.

SANTOS MF, MCCORMACK SA, GUO Z, OKOLICANY J, ZHENG Y, JOHNSON LR, TIGYI G. Rho proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. **J Clin Invest.**, v. 100, n. 1, p. 216-25, 1997.

SAUERBORN M, VON EICHEL-STREIBER C. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 6, p. 1629-30, 1990.

SAVIDGE TC, PAN WH, NEWMAN P, O'BRIEN M, ANTON PM, POTHOUKAKIS C. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 413-20, 2003.

SCHORLING JB, MCAULIFFE JF, DE SOUZA MA, GUERRANT R. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int J Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p. 728-35, 1990.

SCRIMSHAW, TAYLOR CE, GORDON JE. **Interactions of nutrition and infection**. 57th ed. Geneve: World Health Organization, 1968.

SEARS CL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogens. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, n. 6, p. G1129-34, 2000.

SEDDON SV, HEMINGWAY I, BORRIELLO SP. Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. **J Med Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 169-74, 1990.

SELZER J, HOFMANN F, REX G, WILM M, MANN M, JUST I, AKTORIES K. Clostridium novyi alpha-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. **J Biol Chem.**, v. 271, n.41, p. 25173-7, 1996.

SEMBA RD. The role of vitamin A and related retinoids in immune function. **Nutr Rev**, v. 56, n. 1- 2, p. S38-48, 1998.

SEMBA RD. Vitamin A and immunity to viral, bacterial and protozoan infections. **Proc Nutr Soc.**, v. 58, n. 3, p. 719-27, 1999.

SETTLE CD, WILCOX MH. Review article: antibiotic-induced *Clostridium difficile* infection. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 10, n. 6, p. 835-41, 1996.

SETTLE CD. *Clostridium difficile*. **Br J Hosp Med.**, v. 56, n. 8, p. 398-400, 1996.

SHAPIRO HM. **Practical flow cytometry**, 3rd ed., New York, Wiley-Liss, 1995.

SHELTON DN, SANDOVAL IT, EISINGER A, CHIDESTER S, RATNAYAKE A, IRELAND CM, JONES DA. Up-regulation of CYP26A1 in adenomatous polyposis coli-deficient vertebrates via a WNT-dependent mechanism: implications for intestinal cell differentiation and colon tumor development. **Cancer Res.**, v. 66, n. 15, p. 7571-7, 2006.

SHERR CJ, ROBERTS JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, 1999.

SIENDONES E, JIMÉNEZ-GÓMEZ Y, MONTERO JL, GÓMEZ-DÍAZ C, VILLALBA JM, MUNTANÉ J. PGE1 abolishes the mitochondrial-independent cell death pathway induced by D-galactosamine in primary culture of rat hepatocytes. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 20, n. 1, p. 108-16, 2005.

SILEN W. The clinical problem of stress ulcers. **Clin Invest Med.**, v. 10, n. 3, p. 270-4, 1987.

SIMONI D, TOLOMEO M. Retinoids, apoptosis and cancer. **Curr Pharm Des.**, v. 7, n. 17, p. 1823-1837, 2001.

SINGH S, SONI GL, SINGH R. Changes in the activity of vitamin A ester hydrolase (EC.3.1.1.21) in liver of rats in relation to quality of protein and level of vitamin A in diet. **Indian J Med Sci.**, v. 41, n. 11, p. 245-50, 1987.

SIVAKUMAR B, REDDY V. Absorption of labelled vitamin A in children during infection. **Br J Nutr.**, v. 27, n. 2, p. 299-304, 1972.

SMITH JE, MUTO Y, MILCH PO, GOODMAN DS. The effects of chylomicron vitamin A on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. **J Biol Chem.** v. 248, n. 5, p. 1544-9, 1973.

SOMMER A, WEST K P. **Vitamin A deficiency-health, survival and vision.** New York: US Oxford University Press, p. 150-162, 1996.

SOMMER A, KATZ J, TARWOTJO I. Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. **Am J Clin Nutr.**, v. 40, p. 1090-5, 1984.

SOMMER A, TARWOTJO I, DJUNAEDI E, WEST KP JR, LOEDEN AA, TILDEN R, MELE L. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. **Lancet**, v. 1, n. 8491):1169-73, 1986.

SOMMER A, TARWOTJO I, DJUNAEDI E, WEST KP, LOEDEN AA, TILDEN R. Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. **Lancet**, v. 1, n. 849, p. 1169-73, 1986.

SOMMER A, TARWOTJO I, KATZ J. Increased risk of xerophthalmia following diarrhea and respiratory disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 45, n. 5, p. 977-80, 1987.

SOMMER A, WEST KP. **Vitamin A deficiency-health, survival and vision.** New York: US Oxford University Press, p.150-162, 1996.

SOMMER A. **Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to detection and control - Epidemiology.** 3th ed. Geneva: World Health Organization, p.65, 1995.

SOMMER A. Vitamin A deficiency today: conjunctival xerosis in cystic fibrosis. **J R Soc Med.**, v 82, n. 1, p. 1-2, 1989.

SOMMER A. Xerophthalmia and vitamin A status. **Prog Retin Eye Res.**, v. 17, n. 1, p. 9-31, 1998.

SPIGAGLIA P, MASTRANTONIO P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 40, n. 9, p. 3470-5, 2002.

SPORN MB, DUNLOP NM, NEWTON DL, HENDERSON WR. Relationships between structure and activity of retinoids. **Nature**, v. 263, n. 5573, p. 110-3, 1976.

SPORN MB, DUNLOP NM, NEWTON DL, SMITH JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed Proc.**, v. 35 p. 1332–1338, 1976.

SPORN MB, ROBERTS AB. What is a retinoid? **Ciba Found Symp.**, v. 113, p. 1-5, 1985.

STAGGERS JE, HERNELL O, STAFFORD RJ, CAREY MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 1. Phase behavior and aggregation states of model systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings. **Biochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2028-40, 1990.

STARR JM, ROGERS TR, IMPALLOMENI M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 426-8, 1997.

STEPHENSON CB, GILDENGORIN G. Serum retinol, the acute phase response, and the apparent misclassification of vitamin A status in the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Am J Clin Nutr.**, v. 72, n. 5, p. 1170-8, 2000.

STEPHENSON CB, RASOOLY R, JIANG X, CEDDIA MA, WEAVER CT, CHANDRARATNA RA, BUCY RP. Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. **J Immunol.**, v. 168, n. 9, p. 4495-503, 2002.

STEVENSON BR, SILICIANO JD, MOOSEKER MS, GOODENOUGH DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. **J Cell Biol.**, v. 103, n. 3, p. 755-66, 1986.

STOLTZFUS RJ, HAKIMI M, MILLER KW, RASMUSSEN KM, DAWIESAH S, HABICHT JP, DIBLEY MJ. High dose vitamin A supplementation of breastfeeding Indonesian mothers: effects on the vitamin A status of mother and infant. **J Nutr.**, v. 123, n. 4, p. 666-75, 1993.

STRYER L. Molecular mechanism of visual excitation. **Harvey Lect.**, v. 87, p. 129-43, 1991-1992.

STUCKMANN I, EVANS S, LASSAR AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. **Dev Biol.**, v. 255, n. 2, p. 334-49, 2003.

SULLIVAN NM, PELLETT S, WILKINS TD. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect Immun.**, v. 35, n. 3, p. 1032-40, 1982.

SULLIVAN PB, LUNN PG, NORTHROP-CLEWES C, CROWE PT, MARSH MN, NEALE G. Persistent diarrhea and malnutrition--the impact of treatment on small bowel structure and permeability. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 14, n. 2, p. 208-15, 1992.

SULLIVAN PB, MARSH MN, MIRAKIAN R, HILL SM, MILLA PJ, NEALE G. Chronic diarrhea and malnutrition--histology of the small intestinal lesion. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 195-203, 1991.

SULLIVAN PB. Studies of the small intestine in persistent diarrhea and malnutrition: the Gambian experience. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 34 p. S11-13, 2002.

SWARTZ-BASILE DA, RUBIN DC, LEVIN MS. Vitamin A status modulates intestinal adaptation after partial small bowel resection. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 24, n. 2, p. 81-88, 2000.

SWARTZ-BASILE DA, WANG L, TANG Y, PITT HA, RUBIN DC, LEVIN MS. Vitamin A deficiency inhibits intestinal adaptation by modulating apoptosis, proliferation, and enterocyte migration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 285, n. 2, p. G424-G432, 2003.

SWARTZBERG JE, MARESCA RM, REMINGTON JS. Clinical study of gastrointestinal complications associated with clindamycin therapy. **J Infect Dis.**, v. 135, p. S99-103, 1977.

TAKEICHI M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. **Annu Rev Biochem.**, v. 59, p. 237-52, 1990.

TAN KS, WEE BY, SONG KP. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. **J Med Microbiol.**, v. 50, p. 613-619, 2001.

TANUMIHARDJO SA. Can lack of improvement in vitamin A status indicators be explained by little or no overall change in vitamin A status of humans. **J Nutr.**, v. 131, n. 12, p. 3316-8, 2001.

TANUMIHARDJO SA. Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 72, n. 1, p. 40-5, 2002.

TASTEYRE A, KARJALAINEN T, AVESANI V, DELMEE M, COLLIGNON A, BOURLIOUX P, BARC MC. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. **J Clin Microbiol.**, v. 38, n. 9, p. 3179-86, 2000.

TAUCHER E. Tendências demográficas en América Latina. In Lopez G, YuneS J Solis JA, Omran AR. **Salud reproductiva en las Americas**. Washington Organization Panamericana de la Salud, 1992.

TAYLOR NS, THORNE GM, BARTLETT JG. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. **Infect Immun.**, v. 34, n. 3, p. 1036-43, 1981.

TEDESCO FJ, BARTON RW, ALPERS DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. **Ann Intern Med.**, v. 81, n. 4, p. 429-33, 1974.

THALLER C, HOFMANN C, EICHELE G. 9-*cis*-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplications in the chick wing bud. **Development**, v. 118, n. 3, p. 957-65, 1993.

THIELMAN NM, GUERRANT RL. *Clostridium difficile* and its toxins. In: Iglewski B, Moss J, Tu AT, Vaughn M, eds. **Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, p. 327-66, 1995.

THOMAS, S., PRABHU, R., BALASUBRAMANIAN, K.A. Retinoid metabolism in the rat small intestine. **Br J Nutr.**, v. 93, n. 1, p. 59-63, 2005.

THURNHAM DI, MBURU AS, MWANIKI DL, DE WAGT A. Micronutrients in childhood and the influence of subclinical inflammation. **Proc Nutr Soc.**, v. 64, n. 4, p. 502-9, 2005.

THURNHAM DI, NORTHROP-CLEWES CA, MCCULLOUGH FS, DAS BS, LUNN PG. Innate immunity, gut integrity, and vitamin A in Gambian and Indian infants. **J Infect Dis.**, v. 182, n. 1, p. S23-8, 2000.

TOBIOKA H, SAWADA N, ZHONG Y, MORI M. Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration. **Br J Câncer**, v. 74, n. 3, p. 439-45, 1996.

TOMKINS A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. **Proc Nutr Soc.**, v. 59, n. 1, p. 135-46, 2000.

TORRES JF. Purification and characterisation of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A. **J. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 40-44, 1991.

TRIGO M. Análise de situação alimentar de dois núcleos populacionais de Marabá, Pará. **Alimentação**, v. 80, p. 17-27, 1985.

TROYANOVSKY SM. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 11, n. 5, p. 561-6, 1999.

TRUMBO P, YATES AA, SCHLICKER S, POOS M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **J Am Diet Assoc.**, v. 101, p. 294–301, 2001.

TSO P, LEE T, DEMICHELE SJ. Randomized structured triglycerides increase lymphatic absorption of tocopherol and retinol compared with the equivalent physical mixture in a rat model of fat malabsorption. **J Nutr.**, v. 131, p. 2157–63, 2001.

TUHACEK LM, MACKEY AD, LI N, DEMARCO VG, STEVENS G, NEU J. Substitutes for glutamine in proliferation of rat intestinal epithelial cells. **Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 292-297, 2004.

TZIMAS G, NAU H. The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis. **Curr Pharm Des.**, v. 7, n. 9, p. 803-31, 2001.

Um mundo para as crianças. UNICEF 2005. Disponível em: <http://www.unicef.org/brasil>. Acessado em 18 de Janeiro, 2007.

UNDER WOOD BA. Vitamina A in human nutrition, public health considerations. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. **The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine**. 2nd ed. New York: Raven Press, p. 211-228, 1994.

UNDERWOOD BA, LOERCH JD, LEWIS KC. Effects of dietary vitamin A deficiency, retinoic acid and protein quantity and quality on serially obtained plasma and liver levels of vitamin A in rats. **J Nutr.**, v. 109, n. 5, p. 796-806, 1979.

UNDERWOOD BA. **Estratégias a largo plazo para el control de las deficiencias de micronutrientes**. Vitamin A Field Support Project (VITAL), Arlington, Virginia: USAID., p 70-76. [Informe IN-14], 1993.

UNDERWOOD BA. **Overview of current status of vitamin A deficiency as a Public Health problem**. Bethesda, Maryland. National eye. Institute-NIH, p. 45, 1990,

UNDERWOOD BA. Vitamin A deficiency. **Bull World Helth Organ.**, v. 76, n. 2, p. S124-S125, 1998.

UNI Z, ZAIGER G, REIFEN R. Vitamin A deficiency induces morphometric changes and decreased functionality in chicken small intestine. **Br J Nutr.**, v. 80, n. 4, p. 401-7, 1998.

US INST. MED. FOOD NUTR. BOARD. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.** Washington, DC: Natl. Acad. Press, 2000.

VAN DAMME P, MARTENS L, VAN DAMME J, HUGELIER K, STAES A, VANDEKERCKHOVE J, GEVAERT K. Related Articles, Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis. **Nat Methods**, v. 2, n. 10, p. 771-7, 2005.

VAN JAARSVELD PP, EDELHOCH H, GOODMAN DS, ROBBINS J. The interaction of human plasma retinol-binding protein and prealbumin. **J Biol Chem.**, v. 248, n. 13, p. 4698-705, 1973.

VARLAMOV O, FRICKER LD, FURUKAWA H, STEINER DF, LANGLEY SH, LEITER EH. Beta-cell lines derived from transgenic Cpe(fat)/Cpe(fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4883-92, 1997.

VAUGHAN M, MOSS J. Activation of toxin ADP-ribosyltransferases by the family of ADP-ribosylation factors. **Adv Exp Med Biol.**, v. 419, p. 315-20, 1997.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VIJAYARAGHAVAN K, RADHAIHAH G, SURYA PB, RAMESHWAR SKV, REDDY V. Effect of massive dose vitamin A on morbidity and mortality in Indian children. **Lancet**, v. 2, p. 1342-1345, 1990.

VILLAMOR E, FAWZI WW. Vitamin A supplementation: implications for morbidity and mortality in children. **J Infect Dis.**, v. 182, n. 1, p. S122-33, 2000.

VINCENT ML, RUSSELL RM, SASAK V. Folic acid uptake characteristics of a human colon carcinoma cell line, Caco-2. A newly-described cellular model for small intestinal epithelium. **Hum Nutr Clin Nutr.**, v. 39, n. 5, p. 355-60, 1985.

VON EICHEL-STREIBER C, BOQUET P, SAUERBORN M, THELESTAM M. Large clostridial cytotoxins- a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. **Trends Microbiol.**, v. 4, n.10, p. 375-82, 1996.

VON EICHEL-STREIBER C, SAUERBORN M, KURAMITSU HK. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. **J Bacteriol.**, v. 174, n. 20, p. 6707, 1992.

VON EICHEL-STREIBER C, MEYER ZU HERINGDORF D, HABERMANN E, AND SARTINGEN S. Closing in on the toxic domain through analysis of a variant *Clostridium difficile* cytotoxin B. **Mol Microbiol.**, v. 17, n. 2, p. 313-21, 1995.

VOTH DE, BALLARD JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. **Clin Microbiol Rev.**, v. 18, n. 2, p. 247-263, 2005.

WALD G. Molecular basis of visual excitation. **Science**, v. 162, p. 230–239, 1968.

WALSER BL, LIMA AA, GUERRANT RL. Effects of high-dose oral vitamin A on diarrheal episodes among children with persistent diarrhea in a northeast Brazilian community. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n. 6, p. 582-585, 1996.

WANG JL, SWARTZ-BASILE DA, RUBIN DC, LEVIN MS. Retinoic acid stimulates early cellular proliferation in the adapting remnant rat small intestine after partial resection. **J Nutr.**, v. 127, n. 7, p.1297-1303, 1997.

WANG L, TANG Y, RUBIN DC, LEVIN MS. Chronically administered retinoic acid has trophic effects in the rat small intestine and promotes adaptation in a resection model of short bowel syndrome. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 292, n. 6, p. G1559-69, 2007.

WARDEN RA, NOLTORP RS, FRANCIS JL, DUNKLEY PR, O'LOUGHLIN EV. Vitamin A deficiency exacerbates methotrexate-induced jejunal injury in rats. **J. Nutr.**, v. 127, n. 5, p. 770-776, 1997.

WARNY M, PEPIN J, FANG A, KILLGORE G, THOMPSON A, BRAZIER J, FROST E, MCDONALD LC. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1079-84, 2005.

WARNY M, KEATES AC, KEATES S, CASTAGLIUOLO I, ZACKS JK, ABOUDOLA S, QAMAR A, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, KELLY CP. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. **J Clin Investig.**, v. 105, p. 1147–1156, 2000.

WEST KP JR, HOWARD GR, SOMMER A. Vitamin A and infection: public health implications. **Annu Rev Nutr.**, v. 9, p. 63-86, 1989.

WEST KP JR, POKHREL RP, KATZ J, LECLERQ SC, KHATRY SK, SHRESTHA SR, PRADHAN EK, TIELSCH JM, PANDEY MR, SOMMER A. Efficacy of vitamin A in reducing preschool child mortality in Nepal. **Lancet**, v. 338, n. 8759, p. 67-71, 1991.

WHO. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life.** Geneva: World Health Organization, 2002.

WHO. **Vitamin A mortality and morbidity studies.** Geneva: WHO/USAID/NEI, 1992.

WILKINS TD, LYERLY DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 531-4, 2003.

WILKINS TD, LYERLY DM. Tox-A Test for *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol.**, v. 32, n. 9, p. 2338, 1994.

WILKINS TD, LYERLY DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 531-534, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global prevalence of vitamin A deficiency. - Micronutrient deficiencies information system.** Working paper n^o2. Geneva: WHO, 1995 (Micronutrient Series, WHO/NUT/95.3, n2).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Health Report**, 2001.

WREN BW, RUSSELL RR, TABAQCHALI S. Antigenic crossreactivity and functional inhibition by antibodies to *Clostridium difficile* toxin A, *Streptococcus mutans* glucan-binding protein, and a synthetic peptide. **Infect Immun.**, v. 59, p. 3151–3155, 1991.

YANG Y, VACCHIO MS, ASHWELL JD. 9-cis-retinoic acid inhibits activation-driven T-cell apoptosis: implications for retinoid X receptor involvement in thymocyte development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n.13, p. 6170-4, 1993.

YAP AS, BRIEHER WM, GUMBINER BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 13, p. 119-46, 1997.

YOON PW, BLACK RE, MOULTON LH, BECKER S. The effect of malnutrition on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children < 2 y of age in Cebu, Philippines. **Am J Clin Nutr.**, v. 65, n. 4, p. 1070-7, 1997.

YUZA Y, AGAWA M, MATSUZAKI M, YAMADA H, URASHIMA M. Gene and protein expression profiling during differentiation of neuroblastoma cells triggered by 13-cis retinoic acid. **J Pediatr Hematol Oncol.**, v. 25, n. 9 p. 715-20, 2003.

ZAIGER G, NUR T, BARSHACK I, BERKOVICH Z, GOLDBERG I, REIFEN R. Vitamin A exerts its activity at the transcriptional level in the small intestine. **Eur J Nutr.**, v. 28, p. 1-8, 2004.

ZAMORA M, ORTEGA JA, ALANA L, VINAS O, MAMPEL T. Apoptotic and anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid. Adenine nucleotide translocase sensitizes HeLa cells to all-trans retinoic acid. **Exp Cell Res.**, v. 312, n. 10, p. 1813-1819, 2006.

ZAMZAMI N, EL HAMEL C, MAISSE C, BRENNER C, MUNOZ-PINEDO C, BELZACQ AS, COSTANTINI P, VIEIRA H, LOEFFLER M, MOLLE G, KROEMER G. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 54, p. 6342-50, 2000.

ZIEGLER TR, EVANS ME, FERNANDEZ-ESTIVARIZ C, JONES DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annu Rev Nutr.**, v. 23, p. 229-261, 2003.

ZILE M, BUNGE C, DELUCA HF. Effect of vitamin A deficiency on intestinal cell proliferation in the rat. **J Nutri.**, v. 107, n. 4, p. 552-60, 1977.

ZILE M, DELUCA HF, AHRENS H. Vitamin A deficiency and urinary calcium excretion in rats. **J Nutr.**, v. 102, n. 10, p. 1255, 1972.

ZILE MH, CULLUM ME. The function of vitamin A: current concepts. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 172, n. 2, p. 139-52, 1983.

ZILE M, BUNGE C, DELUCA HF. Effect of vitamin A deficiency on intestinal cell proliferation in the rat. **J. Nutr.**, v. 107, n. 4, p. 552-560, 1977.

ZOVICH DC, OROLOGA A, OKUNO M, KONG LW, TALMAGE DA, PIANTEDOSI R, GOODMAN DS, BLANER WS. Differentiation-dependent expression of retinoid-binding proteins in BFC-1 beta adipocytes¹. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 20, p. 13884-9, 1992.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1 TABELAS DE COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURAS

TABELA 05 – COMPONENTES DE DMEM COM GLUTAMINA

COMPONENTES DO DMEM COM GLUTAMINA (# 11965-092)	Peso Molecular	Concentração (mg/L)	Molaridade (mM)
Aminoácidos			
Glicina	75	30	0,400
L-Arginina hidrocloreídrica	211	84	0,398
L-Cisteína 2HCl	313	63	0,201
L-Glutamina	146	584	4.00
L-Histidina hidrocloreídrica-H ₂ O	210	42	0,200
L-Isoleucina	131	105	0,802
L-Leucina	131	105	0,802
L-Lisina hidrocloreídrica	183	146	0,798
L-Metionina	149	30	0,201
L-Fenilalanina	165	66	0,400
L-Serina	105	42	0,400
L-Treonina	119	95	0,798
L-Triptofan	204	16	0,0784
L-Tirosina sal disódica dihidratada	261	104	0,398
L-Valina	117	94	0,803
Vitaminas			
Cloreto de colina	140	4	0,0286
D-pantotenato de cálcio	477	4	0,00839
Ácido fólico	441	4	0,00907
i-Inositol	180	7.2	0,0400
Niacinamida	122	4	0,0328
Piridoxina hidrocloreídrica	204	4	0,0196
Riboflavina	376	0.4	0,00106
Tiamina hidrocloreídrica	337	4	0.0119
Sais Inorgânicos			

Cloreto de cálcio (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.80
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0,1	0,000248
Sulfato de magnésio (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0,814
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400	5.33
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	84	3700	44.05
Cloreto do sódio (NaCl)	58	6400	110.34
Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	125	0,906
Outros Componentes			
D-Glicose (Dextrose)	180	4500	25.00
Vermelho de fenol	376.4	15	0,0399

TABELA 06 – COMPONENTES DE DMEM SEM GLUTAMINA

COMPONENTES DO DMEM SEM GLUTAMINA (# 11960-044)	Peso molecular	Concentração (mg/L)	Molaridade (mM)
Aminoácidos			
Glicina	75	30	0,400
L-Arginina hidrocloreídrica	211	84	0,398
L-Cisteína 2HCl	313	63	0,201
L-Histidina hidrocloreídrica - H ₂ O	210	42	0,200
L-Isoleucina	131	105	0,802
L-Leucina	131	105	0,802
L-Lisina hidrocloreídrica	183	146	0,798
L-Metionina	149	30	0,201
L-Fenilalanina	165	66	0,400
L-Serina	105	42	0,400
L-Treonina	119	95	0,798
L-Triptofan	204	16	0,0784

L- Tirosina sal disódica dihidratada	261	104	0,398
L-Valina	117	94	0,803
Vitaminas			
Cloreto de colina	140	4	0,0286
D-pantotenato de cálcio	477	4	0,00839
Ácido fólico	441	4	0,00907
i-Inositol	180	7.2	0,0400
Niacinamida	122	4	0,0328
Piridoxina hidrocloreídica	204	4	0,0196
Riboflavina	376	0.4	0,00106
Tiamina hidrocloreídica	337	4	0,0119
Sal inorgânico			
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	111	200	1.80
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0,1	0,000248
Sulfato de magnésio (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0,814
Cloreto de Potássio (KCl)	75	400	5.33
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	84	3700	44.05
Cloreto do sódio (NaCl)	58	6400	110.34
Fosfato de sódio monobásico	138	125	0,906
Outros Componentes			
D-Glicose (Dextrose)	180	4500	25.00
Vermelho de fenol	376.4	15	0,0399

9.2 FICHAS EXPERIMENTAIS

9.2.1 Resistência Elétrica Transepitelial

Experimento Resistência Transepitelial - Confluência
TER LIDA

DATA: _____

Pesquisador: _____

Placa (): Descrição e branco

Poço - lado B	0h	24h	36h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Branco p1									
p2									
p3									
p4									
p5									
p6									

PLACA(): Descrição e branco

Poço - lado C	0h	24h	36h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Branco p1									
p2									
p3									
p4									
p5									
p6									

TER LIDA – COM TxA

Placa (): Descrição e branco

Poço - lado C	0h	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
p1									
p2									
p3									
p4									
p5									
p6									

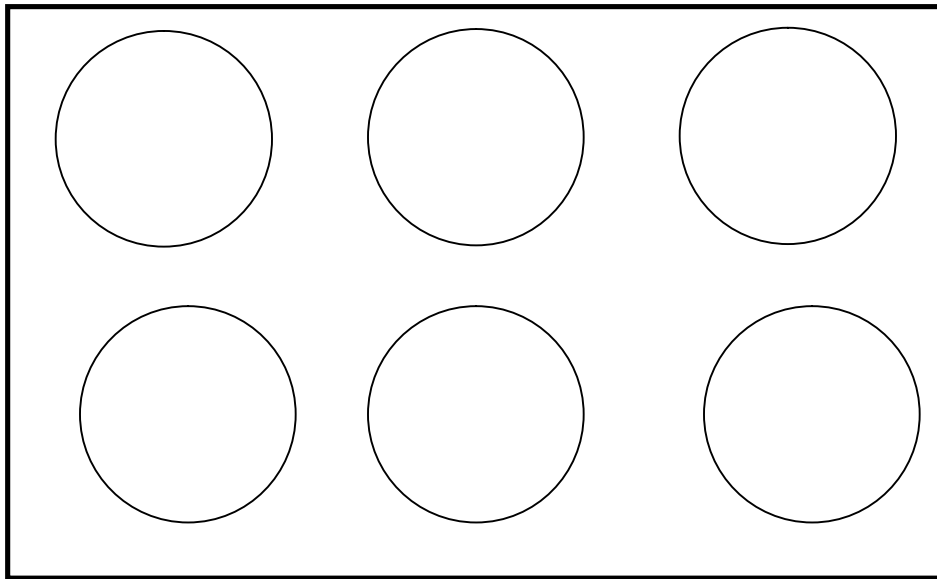
Placa () Descrição e branco

Poço - lado B	0h	0,5h	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24H
p1									
p2									
p3									
p4									
p5									
p6									

9.2.2 Migração celular

Experimento Migração celular

DATA:



DESCRIÇÃO DOS POÇOS

1.

2.

3.

4.

5.

6.

N^o células/N^o foto

9.2.3 Proliferação celular

EXPERIMENTO PROLIFERAÇÃO CELULAR

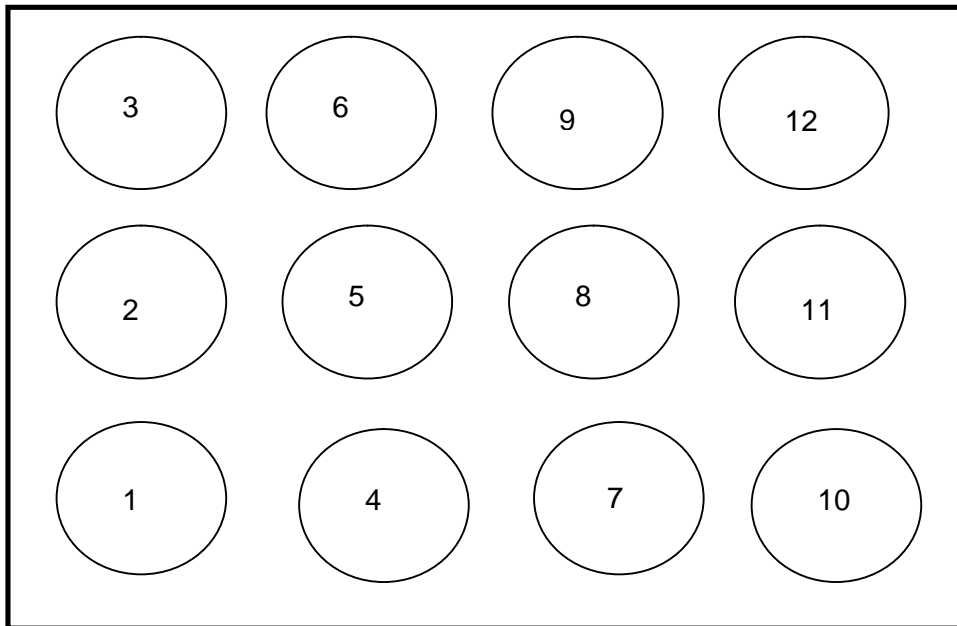
DATA: _____/_____/_____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

9.2.4 Citometria de Fluxo

Experimento Citometria

DATA:



DESCRIÇÃO DOS POÇOS

%apo/necrose

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10.
- 11.
- 12.