

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

TIÊ BEZERRA COSTA

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE AS CÉLULAS SECRETORAS
DO EPITÉLIO INTESTINAL EM UM MODELO *IN VITRO* DE ENTEROIDE**

**FORTALEZA
2014**

TIÊ BEZERRA COSTA

EFEITO DA PRIVAÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE AS CÉLULAS SECRETORAS DO
EPITÉLIO INTESTINAL EM UM MODELO *IN VITRO* DE ENTEROIDE

Dissertação submetida à
Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Médicas, da Universidade
Federal do Ceará, como
exigência parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr.
Reinaldo Barreto Oriá.

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C87e Costa, Tiê Bezerra.
Efeito da privação da glutamina sobre as células secretoras do epitélio intestinal em um modelo *in vitro* de enteroide / Tiê Bezerra Costa. – 2014.
71 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Mestrado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Biologia Celular.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. In vitro. 2. Glutamina. 3. Células de Paneth. I. Título.

CDD 616.34

TIÊ BEZERRA COSTA

EFEITO DA PRIVAÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE AS CÉLULAS SECRETORAS DO
EPITÉLIO INTESTINAL EM UM MODELO *IN VITRO* DE ENTEROIDE

Dissertação submetida à
Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Médicas, da Universidade
Federal do Ceará, como
exigência parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr.
Reinaldo Barreto Oriá.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Sean Ryan Moore
Cincinnati Children's Hospital Medical Center - CCHMC

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor Reinaldo Barreto Oriá pela orientação.

Aos professores Sean Moore e Noah Shroyer por abrirem seus laboratórios, sua orientação e apoio durante minha estadia nos Estados Unidos.

Aos técnicos Ricardo e Rosangêla Teixeira pelo apoio aqui no Brasil e a Jeff Valance, Jill Pruszka e Liz Maier nos Estados Unidos.

À Marjorie Guedes pelo auxílio na realização do qPCR nos Estados Unidos.

À professora Enilza Espreafico da USP de Ribeirão Preto por me abrir o seu laboratório onde fui treinado em cultura de células e microscopia confocal.

Aos alunos de Ribeirão Preto, Anelisa, Roberto, Cristiano, Rodrigo, Ana Paula, Cibele, Carlos e Bruno.

Aos alunos do LABICONTE, Camila, Davi, Orleâncio, Celina, Luís, Ítalo, Cristhyanne, Josiane, Amanda, Rakel e Fabrícia.

Aos funcionários das coordenações de pós-graduação, Ivone, Rita e Carol.

Aos amigos Marcos, Eunice e Vinicius por me incentivarem a começar o mestrado.

RESUMO

O epitélio intestinal é formado e mantido por uma população de células-tronco capaz de gerar diferentes linhagens celulares, mantendo a pluripotência e a capacidade de auto-renovação. A glutamina é um aminoácido essencial condicional importante para a manutenção do epitélio do intestino. No entanto, poucos estudos têm explorado o papel da glutamina na regulação fina do *turnover* celular da cripta intestinal. Com o propósito de avaliar o papel da glutamina no *turnover* de células da cripta, foi utilizado um modelo *in vitro* de enteroide, onde as células-tronco são capazes de gerar um epitélio contendo as principais linhagens de células secretoras intestinais (célula de Paneth, célula caliciforme e célula enteroendócrina), além dos enterócitos absorptivos, com a formação de uma estrutura tipo vilosidade-cripta. Este modelo foi usado para testar o efeito de 24 horas de privação de glutamina (meio padrão com glutamina a 2 mM vs meio livre de glutamina) no *turnover* epitelial através da contagem de células marcadas por Edu/número total por secção e ainda na apoptose celular, através da contagem de células marcadas para caspase 3-clivada/número total por secção. A fim de avaliar a função secretora das criptas, as razões das células de Paneth e caliciformes por cripta (célula alvo/número total de células secretoras por cripta) foram medidas. O número de células de Paneth e caliciformes foi obtido com o auxílio da microscopia confocal e imunomarcagem para lisozima e mucina-2. Além disso, os transcritos dos produtos das células de Paneth e caliciformes (lisozima e mucina, respectivamente) foram analisados utilizando o método de PCR quantitativo em tempo real. Com intuito de avaliar o potencial papel imunomodulador da glutamina, transcritos de elementos da imunidade inata, receptor de tipo Toll e sua proteína acessória MD-2, e citocinas, a saber: TNF- α , IL-1 β e CXCL-1, foram medidos. A privação de glutamina reduziu o número de células Edu positivas, em comparação com o enteroide sob meio padrão ($p=0,006$). Não houve diferença significativa em relação às razões das células de Paneth e células caliciformes entre os grupos após privação de glutamina. A privação da glutamina diminuiu significativamente os transcritos de lisozima, em comparação com o enteroide sob meio padrão ($p = 0,007$), mas não para mucina-2, transcrição relacionada com a função das células caliciformes. Uma transcrição reduzida para TNF- α e MD-2 ($p=0,005$ e $p=0,016$, respectivamente) foi observada após a privação de glutamina. Ao todo, nossos achados reforçam o papel positivo da glutamina sobre o *turnover* do epitélio intestinal e, além disso, sugerem um importante efeito regulador da glutamina sobre as células de Paneth e resposta imune inata. O modelo enteroide fornece uma ferramenta importante para dissecar os mecanismos de proteção pela glutamina e guiar estudos futuros.

Palavras-chave: Enteroide, Glutamina, células de Paneth

ABSTRACT

The intestinal epithelium is formed and sustained by a population of stem cells capable of generating different cell lines while maintaining pluripotent and self-renewal capacity. Glutamine is a conditional essential amino acid important for the maintenance of the intestinal epithelium. However, few studies to date have explored the role of glutamine in the fine regulation of the intestinal crypt cell turnover. In order to evaluate the role of glutamine in the crypt cell turnover, an *in vitro enteroid* model was used, where stem cells are capable of generating an epithelium containing the main intestinal secretory cell lines (Paneth, goblet, and enteroendocrine cells) and absorptive enterocytes as well, while forming a villus-crypt like structure. This model was used to test the effect of 24h of glutamine deprivation (standard media with 2mM glutamine vs glutamine-free media) on epithelial turnover by counting EdU-labeled cells/total number per section and cell apoptosis by counting cleavage-caspase 3-labeled cells/total number per section. In order to assess crypt secretory function, Paneth and goblet crypt cell ratios (target secretory cell/total cell number per crypt) were measured. The number of Paneth and goblet cells was measured with the aid of confocal microscopy and lysozyme and mucin-2 immunostaining. In addition, Paneth and goblet cell product transcripts (lysozyme and mucin, respectively) were measured using quantitative Real-time PCR. In order to assess the potential immunomodulatory role of glutamine, innate immune element transcripts, Toll like receptor and their accessory protein MD-2, and cytokines, as follows: TNF- α , IL-1 β and CXCL-1, were measured. Glutamine deprivation reduced the number of EdU positive cell ratio as compared with the enteroid under the standard media (p=0.006). No significant differences regarding Paneth and goblet cell ratios were seen between groups following glutamine deprivation. Glutamine deprivation significantly decreased lysozyme transcripts as compared with the enteroid under the standard media (p=0.007), but not for mucin-2 transcripts, related to goblet cell function. Decreased TNF- α and MD-2 transcription (p=0.005 and p=0.016, respectively) were found following glutamine deprivation. Altogether, our findings reinforce the glutamine positive role on the intestinal epithelial turnover and furthermore suggest an important glutamine regulatory effect over Paneth cells and the innate immune system. The enteroid model provides an important tool to dissect the mechanisms of glutamine protection and shed light for future studies

Keywords: Glutamine, Enteroid, Paneth

Lista de ilustrações

Figura 1. Linhagens provenientes de uma única célula-tronco.....	14
Figura 2. Estrutura do epitélio intestinal e principais vias de sinalização atuantes	14
Figura 3. Via de sinalização Wnt	16
Figura 4. Sinalização intracelular Notch	18
Figura 5. Interação entre via Wnt e Notch na progênie das células do epitélio intestinal.....	19
Figura 6. Sinalização intracelular BMP	21
Figura 7. Células caliciformes, camada de muco e mucina não secretada no intestino delgado.....	25
Figura 8. Reconhecimento de LPS através de ligação a TLR4 com participação de MD-2....	28
Figura 9. Formação de um enteroide a partir de uma única célula-tronco.....	30
Figura 10. Figura esquemática de um enteroide	30
Figura 11. Mecanismos propostos para as funções da glutamina nas células intestinais.....	31
Figura 12. Ensaio de proliferação celular.....	45
Figura 13. Ensaio de resgate de glutamina em enteroides privados por 24 horas.....	47
Figura 14. Quantificação do número de células de Paneth em criptas de enteroides.....	50
Figura 15. Quantificação do número de células caliciformes em criptas de enteroides.....	51
Figura 16. Expressão relativa de transcritos para lisozima-2 e mucina-2 extraídos de enteroides.....	52
Figura 17. Expressão relativa de transcritos para TLR-4 e MD-2 extraídos de enteroides.....	53
Figura 18. Expressão relativa de transcritos para IL-1 β , TNF- α e CXCL-1 extraídos de enteroides.....	54

Lista de abreviaturas

- AP-1 → proteína ativadora 1
- APC → Pólipo adenomatoso de cólon
- ATB0/ASCT2 → Transportador de aminoácido B(0)/*ASC transporter 2*
- ATP → Adenosina trifosfato
- BLAST → *Basic Local Alignment Search Tool*
- BMP → Proteína morfogenética óssea
- BMPR → Receptor da proteína morfogenética óssea
- BSA → Albumina sérica bovina
- CBC → Base da cripta colunar
- cDNA → DNA complementar
- CKI → Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina
- COX-2 → Ciclooxygenase-2
- CXCL-1 → Ligante 1 de Quimiocina (motivo C-X-C)
- Dll 1-4 → Ligante tipo Delta 4
- DMEM → Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
- DNA → Ácido desoxiribonucleico
- Dsh → *Dishevelled*
- DSS → Dextran sulfato de sódio
- EDTA → Ácido Ethylenediaminetetraacético
- EdU → 5-Etínil-2-deoxiuridina
- EGF → Fator de crescimento epidérmico
- EGFR → Receptor do Fator de crescimento epidérmico
- ELK-1 → Proteína contendo domínio ETS
- ERK → Quinase de regulação de sinais extracelulares
- GIP → Peptídeo insulínico dependente de glicose
- Gln → glutamina
- GLP-1 → Peptídeo tipo glucagon
- GSK3 β → Quinase de sintase de glicogênio 3 beta
- hsp → Proteína de choque térmico
- IGF-1 → Fator de crescimento tipo insulina 1
- IL → Interleucina
- ISC → Célula-tronco intestinal
- LgR5 → Receptor rico em leucina repetidas acopladas a proteína G - 5

LPS → lipopolissacarídeo
LRC → Célula retentora de marcação
LRP5,6 → Proteína relacionada a receptores de lipoproteínas de baixa densidade
MAP kinase → Quinase proteica ativada por mitógeno
MD-2 → Diferenciação mieloide 2
MEK → Quinase de proteína quinase ativada por mitógeno
Myd88 → Gene de resposta primária da diferenciação mieloide 88
NCBI → *National Center for Biotechnology Information*
NFκB → Fator nuclear kappa B
NHE 2,3 → Trocador sódio-hidrogênio 2,3
PAMPs → Padrões de moléculas associado a patógenos
PBS → Salina tamponada com fosfato
PCR → Reação em cadeia da polimerase
PFA → Paraformaldeído
PYY → Peptídeo Tirosina Tirosina
qRT-PCR → Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa
RBP-jk → Proteína recombinante ligadora supressora de *hairless*
RegIIIγ → Proteína derivada de ilhetas regeneradoras 3 gama
RNA → Ácido ribonucleico
RNAm → Ácido ribonucleico mensageiro
Sfrp5 → proteína secretada relacionada à *frizzled 5*
Sox9 → Caixa HMG relacionada a Serina
TA → Amplificadas de forma transitória
TCF → Fator de célula T
TCF4 → Fator de transcrição de célula T 4
TGF-β → Fator de crescimento transformador beta
TLR → Receptor do tipo Toll
TNFR1 → Receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa
TNF-α → Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL → Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
Wnt → Integrina relacionada a *Wingless*
ZO-1 → Proteína da zona de oclusão 1

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Histogênese e homeostasia do epitélio intestinal.....	11
1.1.1 Célula-tronco intestinal.....	11
1.1.2 Sinalização e diferenciação do epitélio intestinal.....	15
1.1.2.1 Via Wnt.....	15
1.1.2.2 Via de sinalização Notch.....	17
1.1.2.3 Interação entre as vias Notch e Wnt e diferenciação celular.....	18
1.1.2.4 Via de sinalização da Proteína morfogênica óssea (BMP).....	20
1.2 Células Secretoras do epitélio Intestinal.....	22
1.2.1 Células de Paneth.....	22
1.2.2 Célula caliciforme.....	23
1.2.3 Células enteroendócrinas.....	26
Tabela 1. Resumo dos diferentes tipos de células enteroendócrinas, suas localizações, produtos e funções.....	26
1.3 Reconhecimento de patógenos pelo epitélio intestinal.....	27
1.4 Modelo de cultivo de organoides intestinais.....	29
1.5 Efeitos da Glutamina.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Reagentes e Soluções.....	36
4.3 Equipamentos e Insumos.....	38
4.4 Extração e cultivo de células-tronco (modelo enteroide).....	39
4.5 Imunomarcção de enteroide para contagem de linhagens celulares em microscopia confocal.....	40
4.6 Ensaio de proliferação celular em enteroide.....	40
4.7 Ensaio de apoptose celular.....	40
4.7 Aquisição de imagens por microscopia confocal.....	41
4.8 Extração e purificação de RNA.....	41

4.9 Ensaio de PCR em tempo real com transcriptase reversa.....	43
4.10 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Proliferação celular.....	44
5.2 Resgate da Glutamina.....	46
5.3 Apoptose por Caspase-clivada-3.....	48
5.4 Número de células secretoras (Paneth, Caliciforme e Enteroendócrina) no epitélio da cripta do enteroide.....	49
5.5 Análise da transcrição de produtos celulares das células de Paneth e caliciformes	52
5.6 Expressão de RNAm para TLR e MD-2.....	53
5.7 Expressão de RNAm para citocinas, IL1- β , CXCL1 e TNF- α	54
6 DISCUSSÃO.....	55
6.1 Glutamina é necessária para proliferação do epitélio intestinal.....	55
6.2 Apoptose Celular.....	56
6.3 Progênie de Células de Paneth e Células Caliciformes.....	57
6.4 Conteúdo das células secretoras.....	58
6.5 Reconhecimentos de patógenos pelo epitélio intestinal (TLR e MD-2).....	59
6.6 Expressão de citocinas.....	60
7 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histogênese e homeostasia do epitélio intestinal

1.1.1 Célula-tronco intestinal

Na base da cripta intestinal, existe uma população de células-tronco responsável pela formação de toda a arquitetura epitelial, criptas, vilos, e as diferentes linhagens epiteliais lá presentes, em um constante ciclo de autorrenovação e proliferação. Estas células produzem e respondem a estímulos gerados por células vizinhas com a finalidade de manter a homeostasia e promover a formação ou a recuperação tecidual.

A incrível capacidade de renovação do epitélio intestinal, se renovando completamente em um período de 3-5 dias (HEATH, 1996), torna esse órgão alvo para o estudo das células-tronco. Estas células-tronco multipotentes residentes do fundo das criptas intestinais (ISC), através de um processo altamente regulado, são responsáveis pela produção e manutenção de um epitélio absorptivo e secretório, dobrado em unidades repetidas, compostas de invaginações, chamadas de criptas de Lieberkühn, e protusões, chamadas de vilos, que aumentam a área de absorção, permitindo uma melhor absorção dos nutrientes presentes no lúmen (MARSHMAN *et al.*, 2002) (MOLOFSKY *et al.*, 2004).

O número exato de ISCs em cada cripta e sua localização ainda não está bem definido. Estudos clonais sugerem algo em torno de 4-6 ISCs por cripta (WONG *et al.*, 2000). Quanto à sua exata localização, estudos apontam para duas distintas populações de ISC. Uma que permanece em estado de quiescência e outra que se divide ativamente (LI; CLEVERS, 2010). A última seria responsável pela regeneração na homeostase do epitélio intestinal, e a outra representaria uma população “reserva” que entra em atividade para reparar danos teciduais mais intensos.

A hipótese mais aceita para a localização das ISCs quiescentes é das células retentoras do marcador +4 (LRC +4), que a identifica na posição +4 a partir do fundo da base da cripta, na origem do epitélio colunar migratório. Essa hipótese foi proposta através de estudos que mostram que essas células são sensíveis à radiação X e γ (MEDEMA & VERMEULEN, 2011), características de células-tronco, com expressão elevada de *bmi1*, um gene possivelmente envolvido na manutenção dessas células (SANGIORGI & CAPECCHI, 2008).

Em relação às ISCs proliferativas, o modelo mais aceito é o da base da cripta colunar (CBC), que coloca essas células na posição 1-4, intercaladas com as células de Paneth. Esse modelo foi desenvolvido através de observações com microscopia eletrônica, que evidenciou células delgadas, imaturas e se dividindo entre as células de Paneth, e que ao sofrerem efeitos de mutagênicos, geram criptas com até 90% de células mutantes, de diferentes linhagens (TESORI et al, 2013).

Embora o estudo das células-tronco seja algo indiscutivelmente importante, estas representam uma parcela muito pequena da população intestinal. Ainda existem dificuldades em determinar seu número, localização e até mesmo identidade. Vários marcadores foram utilizados na tentativa de melhor identificar essas células. Um dos marcadores mais bem caracterizado é um receptor acoplado a proteína G contendo repetições ricas em leucina (Lgr5), expresso por células que se enquadram no modelo CBC (BARKER & CLEVERS, 2010).

As ISCs, que possuem capacidade de autorrenovação, também geram células filhas com alta capacidade proliferativa através de divisão assimétrica (BARKER; CLEVERS, 2010). Estas sofrem rápidas divisões enquanto migram em direção ao ápice do vilo, se diferenciando: em enterócitos absorptivos que compõem a maior parcela das células do epitélio intestinal; células caliciformes, que secretam muco; e células secretoras de hormônios, as enteroendócrinas. Há também as células de Paneth, que não migram em direção ao vilo, permanecendo na base da cripta, onde produzem lisozima, mantendo a esterilidade do ambiente das células-tronco. (BARKER; CLEVERS, 2010). Após completarem o seu ciclo, as células diferenciadas, morrem e se desprendem do epitélio, sendo descartadas no lúmen.

Existe uma complexa e dinâmica relação entre as células-tronco e o ambiente em que elas se encontram, que as provêm com os estímulos necessários para se adaptarem e responderem às necessidades do tecido, proliferando e mantendo a capacidade de autorrenovação e gerando diferentes linhagens celulares. Esse nicho celular, que compõe o microambiente, protege e estimula as ISCs. Ele é composto da matriz extracelular, células neurais, linfócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células do músculo liso e miofibroblastos (LI & XIE, 2005) (OHLSTEIN *et al.*, 2004) (NUSSE *et al.*, 2008) que ativam várias vias de sinalização, como Wnt, Notch, proteína morfogenética óssea (BMP) e Hedgehog (SHAKER & RUBIN, 2010) (SÉMONT *et al.*, 2010) (YEN & WRIGHT, 2006) (ISHIZUYA-OKA *et al.*, 2006) (ISHIZUYA-OKA & HASEBE, 2008).

A via de sinalização Wnt possui um papel crucial na proliferação para manutenção das ISCs (CLEVERS, 2006) (FODDE & BRABLETZ, 2007) (PINTO & CLEVERS, 2005), sendo composta por moléculas citoplasmáticas que regulam o destino celular no eixo vilo-cripta do epitélio intestinal normal e estão implicadas com a autorrenovação das ISCs (YEUNG et al., 2011). A perda da sinalização Wnt *in vivo* bloqueia a proliferação, destruindo o epitélio (KORINEK *et al.*, 1998). As células de Paneth fazem parte do nicho que mantém as ISCs e secretam Wnt3a. A redução do número de células de Paneth experimentalmente reduz o número de células-tronco por cripta. (TESORI *et al.*, 2013).

Existe um gradiente de sinalização Wnt ao longo do eixo vilo-cripta. À medida que se distanciam da cripta, elas perdem a estimulação Wnt, levando a redução da capacidade de proliferar (TESORI *et al.*, 2013). A atividade dessa via, juntamente com outras, como Notch e BMP, é essencial para a formação de um epitélio intestinal diverso e organizado.

A **figura 1** ilustra as diferentes células epiteliais formadas a partir de uma única célula tronco pluripotente e a **figura 2** resume a estrutura do epitélio intestinal, sinalizando a posição das células-tronco, células diferenciadas e indicando um gradiente das principais vias de sinalização que lá atuam.

Figura 1. Linhagens celulares epiteliais provenientes de um única células-tronco

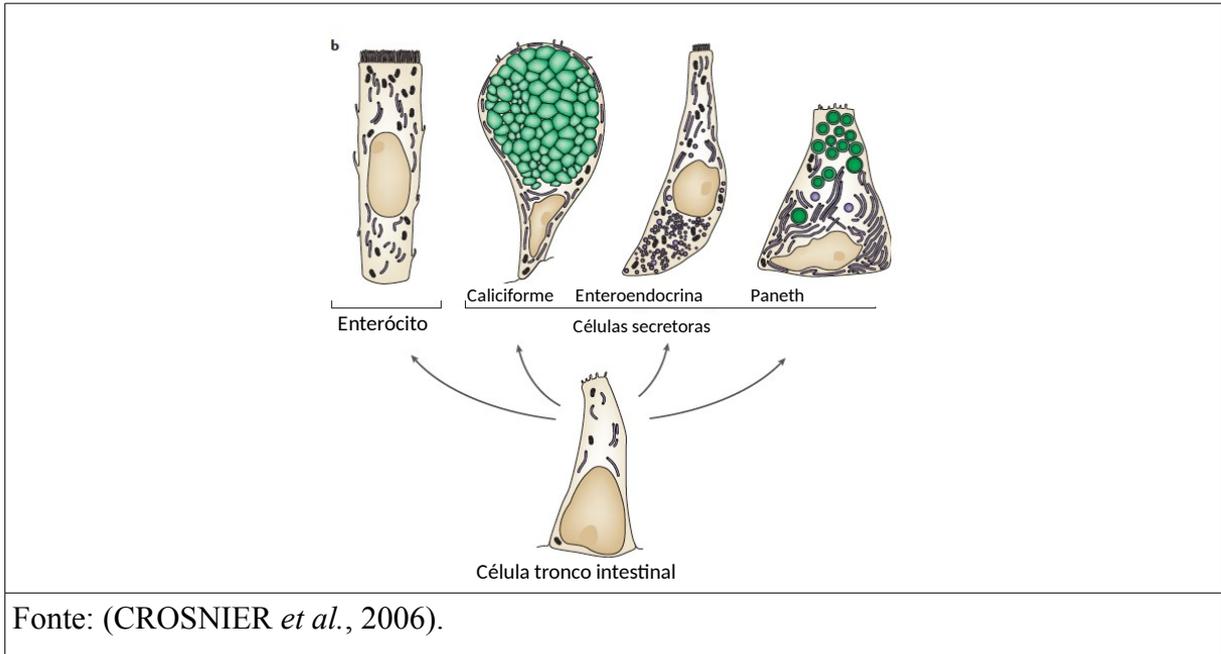
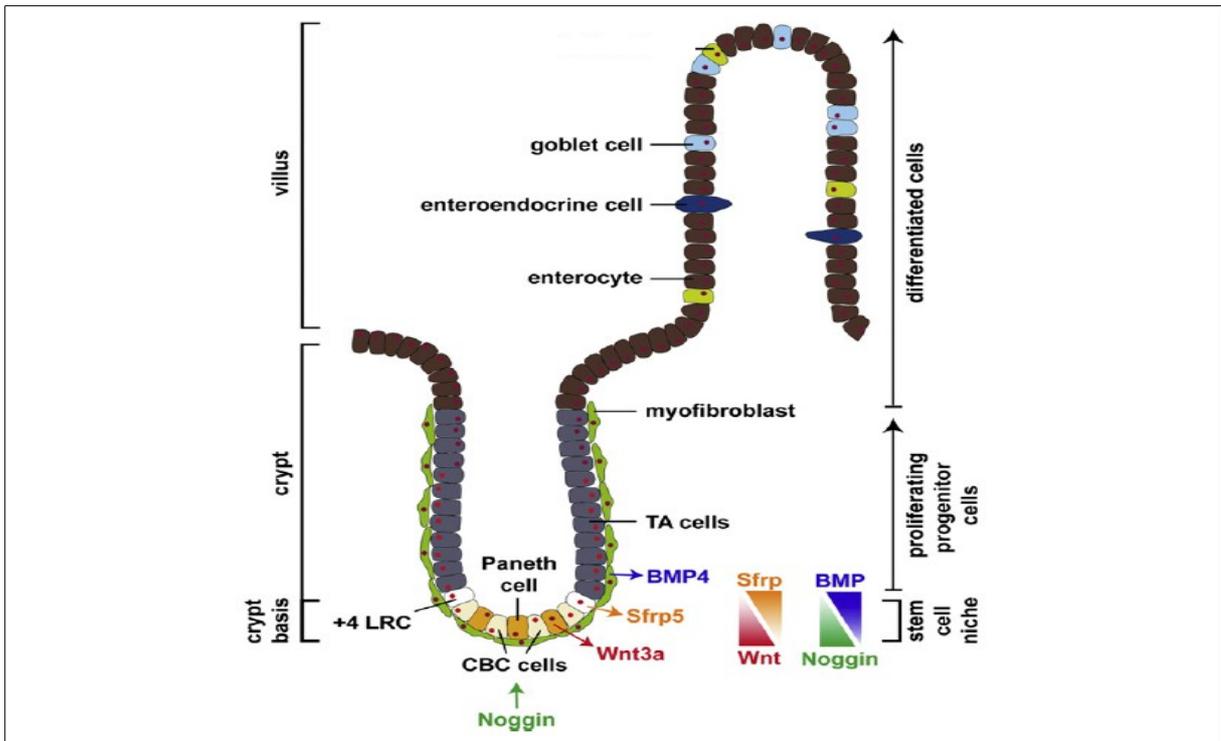


Figura 2. Estrutura do epitélio intestinal e principais vias de sinalização envolvidas.



1.1.2 Sinalização e diferenciação do epitélio intestinal

1.1.2.1 Via Wnt

A via de sinalização Wnt pode ser dividida em duas, a canônica (dependente de fator de células T) e não canônica (não dependente de fator de células T). A sinalização Wnt canônica tem um importante papel na manutenção da proliferação celular nas criptas intestinais, diferenciação das células de Paneth e em direcionar a migração celular ao longo do eixo do vilão. (RICHMOND & BREAUULT, 2010).

Os ligantes Wnt são moléculas secretadas que se ligam ao complexo receptor Wnt, formado por um receptor Frizzled e um co-receptor LRP-5 ou 6. Na ausência de ligantes Wnt, a β -catenina, uma proteína solúvel no citoplasma, é rapidamente degradada pelo seu complexo de destruição (formado por Axina, APC e GSK3 β), entretanto, na presença de um ligante, a β -catenina é separada desse complexo e é translocada para o núcleo, onde se liga aos fatores de transcrição do fator de célula T, deslocando o repressor Wnt, Groucho, promovendo assim a expressão de genes alvos, como por exemplo cMyc e ciclina D. (RICHMOND & BREAUULT, 2010).

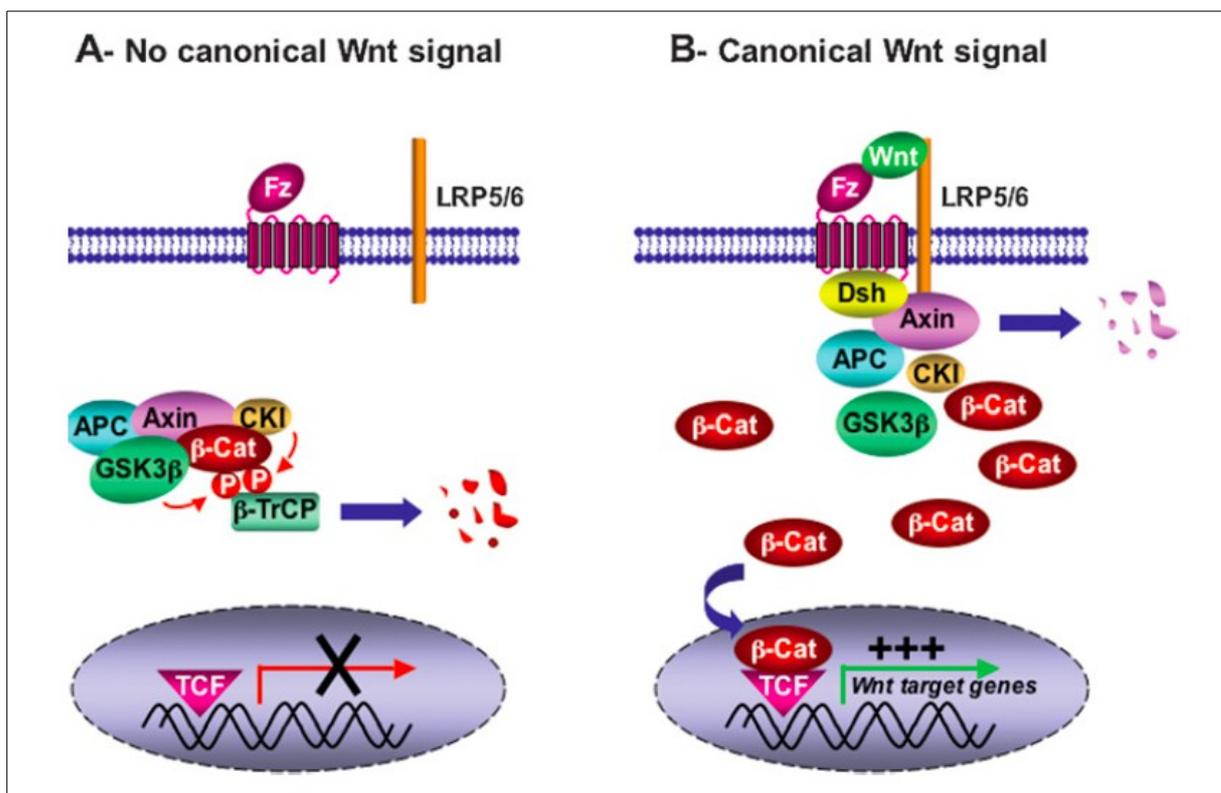
No intestino delgado, os principais ligantes Wnt são: Wnt3, Wnt 6 e Wnt9B, expressos principalmente em células epiteliais da cripta, onde também se encontram os seus receptores, Frizzled 5, 6, 7 e seus co-receptores LRP5 e 6 (GREGORIEFF et al., 2005) (RICHMOND & BREAUULT, 2010).

A deleção de TCF4, um dos principais efetores da via, leva à perda de proliferação epitelial e morte logo após o nascimento, sugerindo a sua necessidade para manutenção da cripta (KORINEK *et al.*, 1998). De maneira semelhante, ablação da β -catenina no epitélio intestinal também resulta na perda de função proliferativa das criptas e morte por falência intestinal (KUHNERT *et al.*, 2004) (FEVR *et al.*, 2007). A ablação condicional do gene alvo cMyc leva ao aparecimento reduzido de criptas e com tamanho reduzido, mas sem aumento de apoptose (MUNCAN *et al.*, 2006), enquanto que a super-expressão da via Wnt, através da deleção do complexo de destruição da β -catenina, leva a um aumento aberrante das criptas e diminuição do tamanho dos vilos, causando uma fusão das criptas levando ao aparecimento de grandes pólipos adenomatosos compostos de várias criptas aberrantes (SANSOM *et al.*, 2004)(ANDREU *et al.*, 2005).

A via Wnt também parece ter influência sobre a diferenciação celular, com a ablação condicional do receptor Frizzled5, leva ao surgimento de células de Paneth imaturas, que não se encontram mais restritas a base da cripta, mas dispersas por todo o eixo vilo-cripta, enquanto a deleção do gene Sox9, um fator de transcrição dependente de Wnt, leva a formação de um epitélio desprovido de células de Paneth e com 40% a menos de células caliciformes (ES & JAY; et al., 2005).

A **figura 3** ilustra a via de sinalização canônica Wnt/ β -catenina.

Figura 3. Via de sinalização Wnt/ β -catenina



Fonte: (PINTO & CLEVERS, 2005)

Legenda: **A** representa a via Wnt não ativa, onde o complexo de destruição da β -catenina (formado por APC, Axina e GSK3 β) está livre para destruir a β -catenina no citoplasma e em **B**, com a ligação do receptor Frizzeld e co-receptor LRP 5/6 o complexo é translocado para o receptor, deixando a β -catenina livre para atuar nos fatores de transcrição TCF, levando a ativação de genes alvo Wnt.

1.1.2.2 Via de sinalização Notch

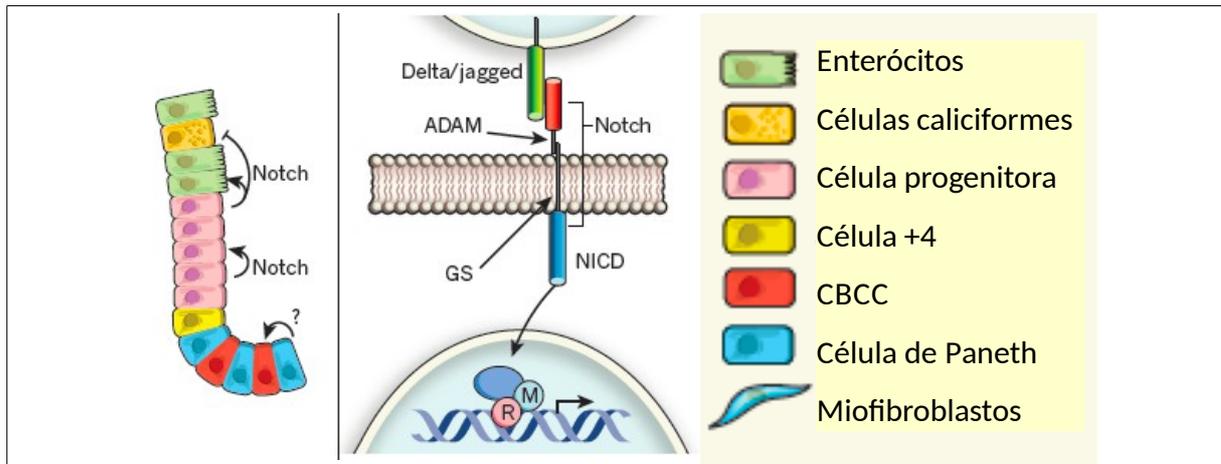
A atividade de Notch determina a diferenciação das células secretoras, caliciformes e Paneth, e também das células absortivas (não secretoras), os enterócitos, A completa inibição do controle regulatório Notch promove um aumento do número de células caliciformes, enquanto a sua super-regulação promove uma completa depleção dessa linhagem celular (TESORI *et al.*, 2013).

Existem ainda evidências de uma relação entre Notch e Wnt, onde Notch parece promover a proliferação celular quando a atividade Wnt está elevada, como na cripta, e promove diferenciação em enterócitos, quando essa atividade está reduzida, como ocorre no vilo (MEDEMA & VERMEULEN, 2011).

A via de sinalização Notch atua juntamente com a via Wnt para distribuição espacial e determina o destino de células adjacentes. Os ligantes Jagged 1 e 2, Delta-like 1,3 e 4, se ligam a receptores Notch 1-4, permitindo a comunicação de células adjacentes entre si (RICHMOND & BREAUULT, 2010) e são expressos quase exclusivamente no epitélio intestinal da cripta, sugerindo que seu principal alvo de atuação é o compartimento proliferativo (SCHRÖDER & GOSSLER, 2002).

A sinalização ocorre após a interação do ligante ao receptor, que inicia a quebra proteolítica deste por γ -secretases, permitindo a sua translocação ao núcleo, onde se combina com RBP-Jk e passa a ativar fatores de transição, tais como o Hes1. Este atua na proliferação/diferenciação, estando superregulado em adenomas de células intestinais indiferenciadas (ES & CLEVERS, 2005). A infrarregulação da via, como por exemplo pela ablação de RBP-Jk, leva a um aumento dramático do número de células secretoras e uma diminuição da linhagem absortiva (ES & CLEVERS, 2005). A supressão parcial de Hes1 gera um epitélio com um número aumentado de células caliciformes e enteroendócrinas (CROSNIER *et al.*, 2005)(JENSEN *et al.*, 2000). Em contraste a superregulação de Notch leva a uma redução de todas as células secretoras no epitélio (FRE *et al.*, 2005) (RICHMOND & BREAUULT, 2010)

A **figura 4** ilustra a sinalização intercelular Notch.

Figura 4. Sinalização intercelular Notch

Fonte: (MEDEMA & VERMEULEN, 2011)

Legenda: Ligantes Delta/Jagged na superfície de uma célula ativam receptores Notch em uma célula vizinha. Isto é seguido por dois eventos proteolíticos catalisados por ADAM e GS, que libera o NICD, este segue para o núcleo e com o auxílio de mediadores como Proteína recombinante ligadora supressora de hairless (R) e a proteína Mastermind-like 1 (M) promove a transcrição de genes alvo Notch.

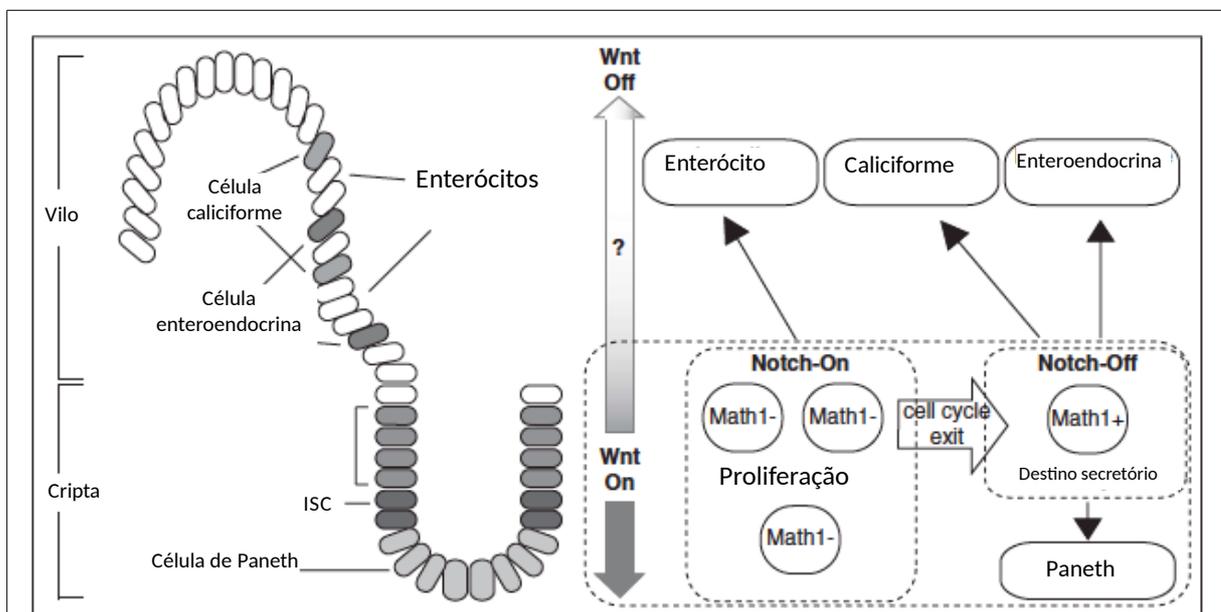
1.1.2.3 Interação entre as vias Notch e Wnt e diferenciação celular

Ambas as vias parecem ser necessárias para manutenção da proliferação celular nas criptas intestinais. Com a inibição de Notch, o número de células secretoras é exacerbado, mas a proliferação é inibida (ES, VAN; GIJN, VAN; *et al.*, 2005) e esta não é revertida quando Notch é super-expresso e o sinal da via Wnt canônico inibido, indicando uma necessidade de ambas as vias de sinalização para a manutenção do estado proliferativo (ZECCHINI *et al.*, 2005).

Em relação à diferenciação celular, o conceito de que a sinalização Notch depende de uma comunicação entre células adjacentes, o que pode ser utilizado para inibição lateral, impedindo que células vizinhas se comprometam com um único destino celular, e o fato que a sinalização Wnt é restrita espacialmente na base da cripta intestinal devido ao seus limites de difusão surge um modelo de inter-regulação que propõe explicar a diferenciação celular do epitélio (RICHMOND & BREAUULT, 2010), ver **figura 5**.

A sinalização Wnt leva a expressão de componentes da via Notch, estes então através de inibição lateral, atuam em células Wnt ativadas para que algumas expressem ligantes Notch (jagged/Delta) e permaneçam Notch(-) e outras, sem Jagged ou Delta, se tornem Notch(+) (ES, VAN; GIJN, VAN; *et al.*, 2005). As células Wnt(+) e Notch(-) se tornam comprometidas precocemente a linhagem secretora e não proliferam mais, enquanto as células Wnt(+) e Notch(+) continuam indiferenciadas e proliferam até sair da base cripta, se distanciando da sinalização Wnt, estas passam então a se diferenciar, se tornando células absorptivas Notch(+) ou secretórias Notch(-) (CROSNIER *et al.*, 2006).

Figura 5. Papel das via Wnt e Notch na proliferação e diferenciação das células intestinais.



Fonte: (NAKAMURA *et al.*, 2007)

Legenda: O lado esquerdo da figura exemplifica a organização vilo-cripta presente no epitélio intestinal. As células-tronco intestinais (ISC) são responsáveis pela geração das outras 4 principais linhagens sendo delas 3 com papel secretor (Paneth, caliciforme e enteroendócrinas) e uma absorptiva (enterócitos). O acúmulo de β -catenina nuclear é predominantemente observado nas células situadas na cripta, com o seu gradiente reduzindo-se em direção ao vilos. A escolha entre proliferação e o comprometimento com as linhagens secretoras se dá através do fator de transcrição *Math1* que é regulado negativamente por Notch. As células Notch ativadas entre as células com atividade Wnt continuam proliferando e se diferenciam em células enteroendócrinas enquanto aquelas que não sofrem ativação Notch saem do ciclo celular e adquirem um destino secretório.

1.1.2.4 Via de sinalização da Proteína morfogênica óssea (BMP)

A BMP pertence a uma família de ligantes que engloba os membros da família TGF- β , agindo sobre a cascata de sinais intracelulares SMAD (KODACH *et al.*, 2008) e sua atividade no epitélio intestinal parece ser a de interromper a proliferação nas extremidades do eixo vilocripta, ao invés de promover diferenciação (MEDEMA & VERMEULEN, 2011). Animais que não possuem o receptor para BMP ou que super-expressam o seu inibidor, Noggin, apresentam hiperproliferação e um fenômeno chamado de fissão de cripta (TESORI *et al.*, 2013).

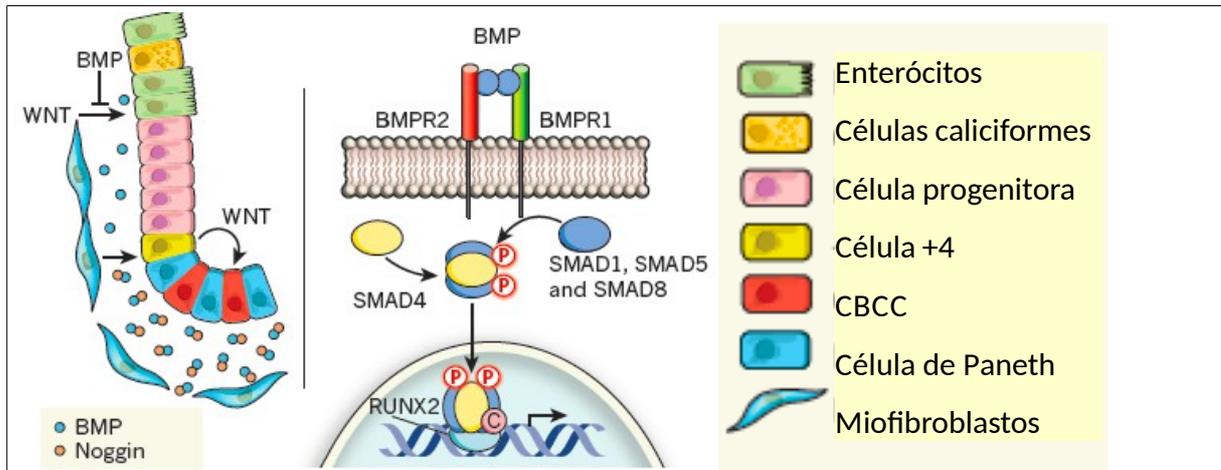
A proliferação celular da cripta intestinal também é em parte regulada pela sinalização entre epitélio e mesênquima e um dos fatores atuantes são as BMPs, pertencentes à família do TGF- β (RICHMOND & BREAUULT, 2010). BMPs são expressas principalmente no mesênquima e atuam sobre receptores epiteliais. Sua sinalização é balanceada pelo seu antagonista Noggin, que é expresso no epitélio da cripta por células na posição +4 e abaixo, bem como na submucosa, exatamente nas mesmas regiões onde as BMPs são mais expressas (HE *et al.*, 2004) (HARAMIS *et al.*, 2004a).

BMPs se ligam ao complexo de receptor do tipo 1 e 2, que levam a fosforilação de proteínas SMAD 1, 4, 5 e 8, e uma vez fosforiladas, SMAD 1, 5 e 8 formam dímeros com SMAD 4, translocam para o núcleo onde ativam fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento e homeostasia intestinal (SCOVILLE *et al.*, 2008). Os eventos descritos anteriormente estão ilustrados na **figura 6**.

Camundongos knockouts para BMPR1A, BMP2 e BMP4 não sobrevivem além do período embrionário, enquanto análise de mutantes condicionais para BMPR1A no epitélio e estroma revelou o aparecimento de criptas e formação de pólipos (HE *et al.*, 2004). No entanto, com a deleção ocorrendo somente no epitélio, ocorre o aumento do número de criptas, mas não a formação de pólipos, sugerindo o envolvimento do estroma nesse processo.

Em animais adultos, a BMP4 é localizado no mesênquima perto da posição +4, enquanto o receptor BMPR1A é expresso no epitélio nessa mesma posição, sugerindo a participação dessa via na proliferação das células-tronco que se encontram nessa posição em um mecanismo independente da via Wnt (HE *et al.*, 2004). A super-expressão do antagonista Noggin leva ao aparecimento de um número mais elevado de criptas e em posições ectópicas, provavelmente devido a um aumento de β -catenina intracelular em um “cross-talk” com a via Wnt (HE *et al.*, 2004).

Figura 6. Sinalização intracelular BMP



Fonte: (MEDEMA; VERMEULEN, 2011)

Legenda: Proteínas BMPs são produzidas por células estromais e contrabalanceiam o sinal proliferativo WNT, interrompendo a proliferação e levando a diferenciação. No fundo da cripta, BMPs são bloqueados por Noggin, que se liga a elas e bloqueia a sua ação nos receptores. A sinalização BMP depende da interação com o heterodímero formado por BMPR1 e BMPR2, o que leva a fosforilação de SMAD 1, SMAD 5 e SMAD 8, estes quando fosforilados (P) translocam-se para o núcleo e com a ajuda de RUNX2 e Co-fator (C) levam a transcrição de genes alvo.

1.2 Células Secretoras do epitélio Intestinal

1.2.1 Células de Paneth

As células de Paneth, assim chamadas porque foram primeiramente descritas pelo Dr. Josef Paneth em 1888 (KESHAV, 2006), são células de formato piramidal, com núcleo na posição basal, e com grandes grânulos na posição apical. Seu primeiro produto específico isolado foi a lisozima, uma substância bactericida, por Alexander Flemming (KESHAV, 2006).

Estas células possuem um importante papel na imunidade inata no intestino delgado, produzindo uma ampla diversidade de peptídeos e enzimas, com ação antimicrobiana, tais como a própria lisozima, criptidinas, defensinas (FARIN, VAN ES, & CLEVERS, 2012) e RegIII- γ , uma lectina com propriedades bactericida (CASH *et al.*, 2006) (DRICKAMER, 1999).

Além disso, as células de Paneth atuam na homeostasia das células-tronco, produzindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), o ligante Notch Dll4 e ligantes Wnt, todos essenciais para a manutenção das células-tronco (SATO *et al.*, 2011). Tal importância pode ser evidenciada por um estudo que mostra que ao serem destruídas, mecanismos entram em ação para substituí-las em horas (SAWADA *et al.*, 1991).

As células de Paneth são as principais produtoras de peptídeos antimicrobianos no trato gastrointestinal, estas substâncias se distinguem de outros antibióticos naturais, tais como a penicilina, porque são sintetizados nos ribossomos, ao invés de produtos de metabolismo secundário, como acontece em micro-organismos (BEVINS & SALZMAN, 2011). Dois desses peptídeos são a lisozima, que possui ação contra bactérias gram negativas e RegIII- γ , que possui ação contra bactérias gram positivas (BEVINS & SALZMAN, 2011).

A lisozima é uma glicosidase que hidrolisa principalmente peptideoglicanos. A sua identificação décadas atrás foi a primeira pista para as funções antimicrobianas dessas células (PORTER *et al.*, 2002)(BEVINS & SALZMAN, 2011). Além de ser secretada pelas células de Paneth, a lisozima está presente nos grânulos de macrófagos e neutrófilos, e embora sua atividade seja baixa, a sua alta concentração em alguns locais *in vivo* sugere que tenha importante papel na imunidade inata (BEVINS & SALZMAN, 2011).

Outro produto antimicrobiano produzido pelas células de Paneth são as lectinas tipo-C, sendo a principal a RegIII α (RegIII γ em camundongos) (CASH *et al.*, 2006). Estas proteínas se ligam a peptídeos glicanos e são bactericidas para espécies gram positivas (BRANDL *et al.*, 2007)(MUKHERJEE *et al.*, 2008). Elas são abundantemente expressas por células de Paneth e são expressas também por enterócitos. (BEVINS & SALZMAN, 2011)

Ao contrário de outros antimicrobianos produzidos pelas células de Paneth que são produzidos constitutivamente, as lectinas têm sua expressão induzida através da sinalização de TLR (VAISHNAVA *et al.*, 2008) e a redução de bactérias no intestino, através do uso de antibióticos, leva a uma redução na sua expressão (BRANDL *et al.*, 2008)(BEVINS & SALZMAN, 2011)

1.2.2 Célula caliciforme

A outra célula secretora do epitélio intestinal é a célula caliciforme, assim chamada devido sua morfologia, sendo encontrada tanto no epitélio de revestimento do vilão, quanto na cripta. As células caliciformes, como as células de Paneth, protegem o epitélio intestinal de bactérias e produtos bacterianos, mas seu principal produto, o muco, não possui ação bactericida. Estudos recentes mostraram que o muco é muito importante para a ancoragem de micro-organismos comensais, servindo inclusive como alimento (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

O muco possui importantes funções na defesa do epitélio contra patógenos. Existe na verdade duas camadas de muco recobrando o epitélio (JOHANSSON *et al.*, 2008) (BURGER-VAN PAASSEN *et al.*, 2012), a primeira é mais compacta e estéril, provavelmente devido aos produtos bactericidas que nela se aderem, como por exemplo a lisozima, secretada pela células de Paneth, dificultando a colonização bacteriana nessa camada mais próxima ao epitélio (VAISHNAVA *et al.*, 2011). A camada mais externa parece ter a função oposta sendo mais frouxa e possuindo estruturas filamentosas que facilitam a adesão de bactérias (MCGUCKIN *et al.*, 2011), provavelmente para facilitar a permanência da microbiota intestinal comensal. As células caliciformes contam ainda com uma terceira camada da proteína mucina que não forma muco, mas fica ligada a membrana da célula, formando uma camada ciliar, dificultando a ligação de micro-organismos que conseguiram escapar do muco alcançando às células (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

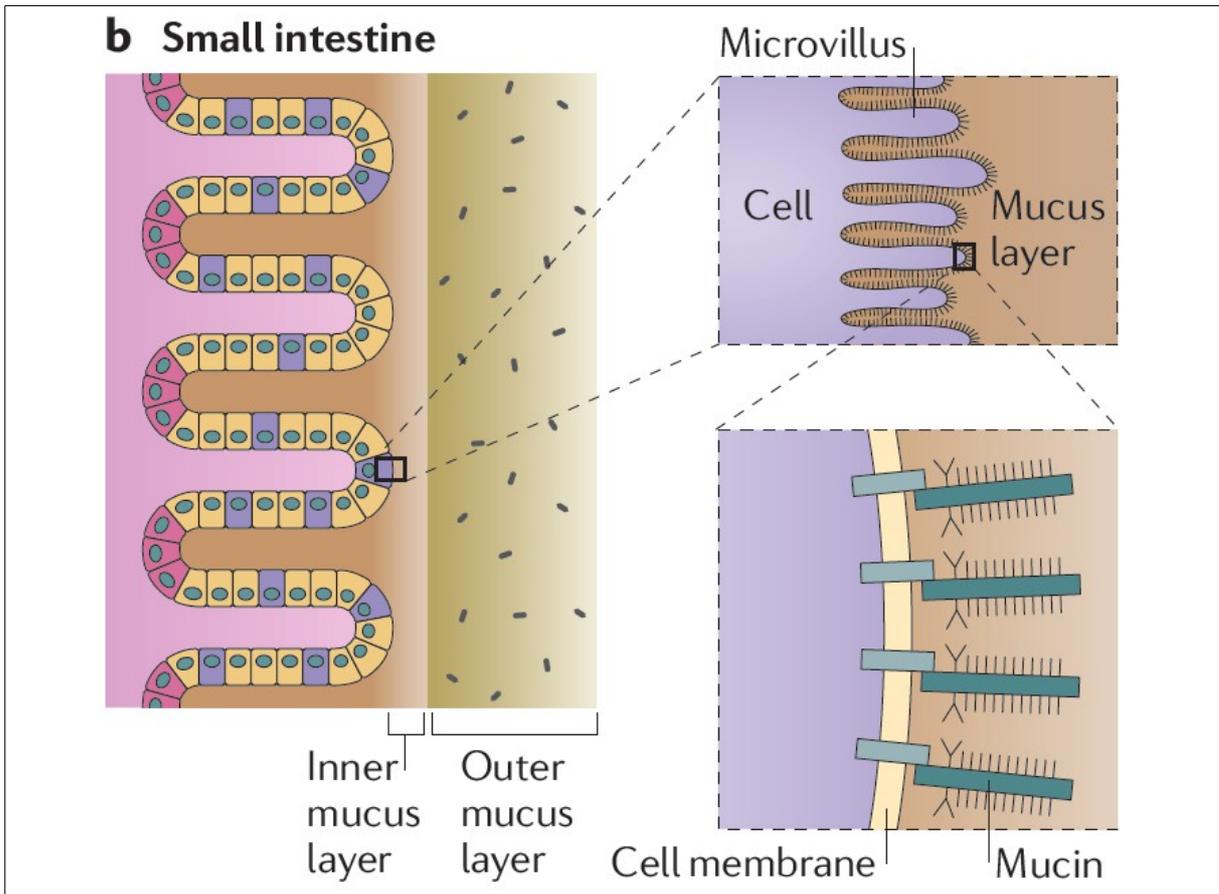
O muco é encontrado por todo o trato gastrointestinal em composição e espessura variadas, sendo de 700µm no estômago e intestino grosso e de 150-300µm no intestino delgado. Essa diferença se deve provavelmente a necessidade de absorver nutrientes nessa região (ATUMA *et al.*, 2001) (MCGUCKIN *et al.*, 2011). O muco é necessariamente poroso para permitir a difusão de macromoléculas necessárias para as secreções gástricas e absorção de nutrientes, mas ainda assim é uma eficaz barreira biofísica para partículas e micro-organismos (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

As mucinas secretadas são grandes glicoproteínas altamente O-glicosiladas que se ligam formando homo-oligômeros em um complexo macromolecular, gerando as propriedades viscosas do muco. Existem cinco tipos de mucina que formam oligômeros (Mucina 2, 5AC, 5B, 6 e 19), sendo a mucina-2 a responsável pela formação do muco no intestino delgado (THORNTON *et al.*, 2008) (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

A mucina é modificada pelo complexo de Golgi da célula e armazenada em forma de grânulos, formando as estruturas características dessas células. Estes grânulos são secretados de maneira constitutiva ou como resposta a estímulos extracelulares em um processo envolvendo remodelação de actina e exocitose (DAVIS & DICKEY, 2008) (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

A **figura 7** ilustra as três camadas produzidas pelas células caliciformes no intestino delgado, a camada externa de muco, colonizada por micro-organismos, a camada interna, estéril, e a mucina ligada às células.

Figura 7. Células caliciformes, camada de muco e mucina não secretada no intestino delgado.



Fonte: (MCGUCKIN *et al.*, 2011).

Legenda: As células roxas representam células caliciformes. Small intestine = intestino delgado, Inner mucus layer = camada interna de muco, Outer mucus layer = Camada externa de muco, microvillus = microvilosidade, mucus layer = camada de muco, cell membrane = membrana celular, Mucin = mucina.

1.2.3 Células enteroendócrinas

São as mais raras células do epitélio intestinal, representando cerca de 1% do total das células (HOWELL & WELLS, 2011). As células enteroendócrinas apresentam aproximadamente 10 subtipos diferentes, secretando uma variedade de hormônios com diversas funções, como peptídeo insulino-trópico da glicose e peptídeo glucagon-like tipo 1 (ambos participando na homeostase da glicose), grelina (saciedade), secretina (balanço de pH), colecistoquinina (contrações da vesícula biliar), neurotensina e motilina (contração e motilidade intestinal) e somatostatina (secreção dos hormônios pituitários) (RINDI *et al.*, 2004) (VILSBØLL & HOLST, 2004). A **tabela 1** apresenta de forma resumida os diferentes tipos de células enteroendócrinas, seus principais produtos e suas funções.

Tabela 1. Resumo dos diferentes tipos de células enteroendócrinas, sua localização, produto e função

Célula	Localização	Peptídeo	Função
G	Parte do Píloro antral	Gastrina	Regulação da secreção de ácido
X ou A	Estômago	Grelina	Estimulação da fome
K	Intestino proximal	GIP	Aumento da secreção da insulina e ácido estomacal e redução da atividade do LPL no tecido adiposo
I	Intestino proximal	Colecistoquinina	Contração da vesícula biliar, estimulação da secreção de enzimas pancreáticas, inibição da fome
S	Intestino proximal	Secretina	Estimulação da secreção de bicarbonato e inibição da secreção de ácido estomacal, contração do colon e motilidade
M	Intestino proximal	Motilina	Motilidade intestinal
N	Intestino distal	Neurotensina	Secreção de ácido estomacal, secreção biliar e crescimento da mucosa intestinal
L	Intestino distal e cólon	PYY, GLP-1, GLP-2 e Glicetina	Inibição da secreção de ácido estomacal, esvaziamento gástrico e aumento da secreção de insulina

Fonte: MORAN-RAMOS *et al.*, 2012

1.3 Reconhecimento de patógenos pelo epitélio intestinal

O sistema imune desempenha um papel importante na defesa do organismo contra patógenos, com os elementos da imunidade inata sendo a primeira linha de defesa. São eles que reconhecem, processam e respondem a agressão inicial, além de sinalizar para as células do sistema imune adaptativo para que estas possam desenvolver ações específicas.

É abaixo do epitélio, na lâmina própria, onde células responsáveis pela imunidade inata, macrófagos e células dendríticas, são encontradas. As células dendríticas possuem projeções citoplasmáticas que se entrelaçam com as células epiteliais, colhendo amostras de antígenos lá presentes e apresentando-os aos linfócitos T presentes nos folículos linfoides (RESCIGNO, 2006)(NIESS *et al.*, 2005)(SANTAOLALLA *et al.*, 2011) e linfócitos B presentes nas placas de Peyer, elementos da resposta imune adaptativa. (SANTAOLALLA *et al.*, 2011).

A resposta imune é iniciada pelo reconhecimento de moléculas com padrões associados a patógenos (PAMPs), feito principalmente por receptores de patógenos, onde os mais estudados são os TLR (SANTAOLALLA *et al.*, 2011). Um total de dez tipos já foram clonados e são caracterizados por ter uma porção extracelular rica em leucinas e domínio intracelular similar ao receptor da IL-1 (SCHUSTER & NELSON, 2000)(CHUANG & ULEVITCH, 2000). Apenas três receptores foram funcionalmente caracterizados com seus respectivos ligantes: TLR2, TLR4 e TLR9 (ADEREM & ULEVITCH, 2000)(BEUTLER, 2000).

TLR são proteínas transmembranares que reconhecem padrões evolutivamente bem conservados em micro-organismos (SANTAOLALLA *et al.*, 2011), e no intestino estão expressos nas células epiteliais, na sua membrana ou na forma de endossomas, bem como em células imunocompetentes da lâmina própria (SANTAOLALLA *et al.*, 2011).

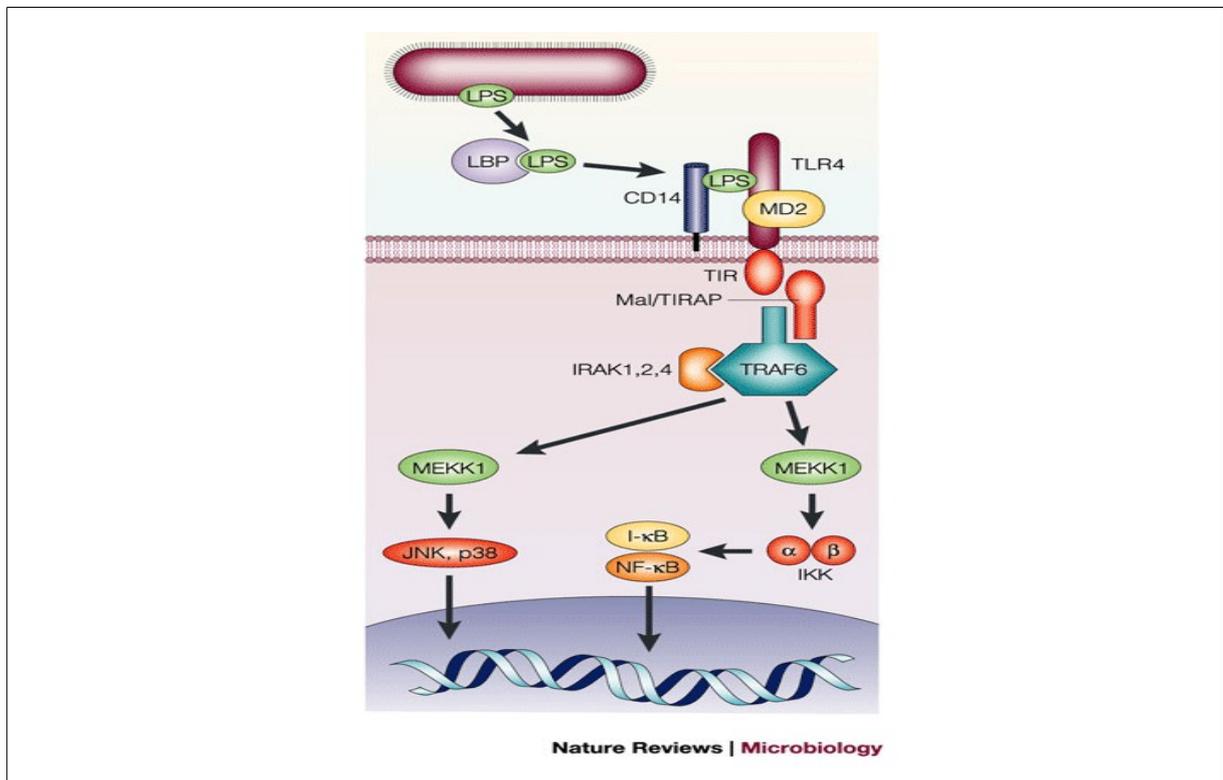
O TLR4 é o responsável pelo reconhecimento do LPS, ativando a transcrição de NF- κ B e produção de citocinas inflamatórias (CHOW, 1999). Para uma resposta efetiva, o TLR4 precisa de uma proteína acessória que aumenta a sua sensibilidade ao LPS, a MD2, uma proteína secretada principalmente pelas células de Paneth, que se liga à porção extracelular do receptor e facilita o seu reconhecimento. A ativação de NF- κ B mediada por LPS é necessária para a ativação de MAP kinase dependente de LPS (SHIMAZU *et al.*, 1999) (AKASHI *et al.*, 2001).

A **figura 8** ilustra o reconhecimento de LPS por uma célula através da ligação com TLR4 levando a ativação de NF κ B.

As células de Paneth expressam TLR 2, 4, 5 e 9 (AYABE *et al.*, 2000) (KINNEBREW & UBEDA, 2010) (RUMIO *et al.*, 2004) e sua ativação pode levar a secreção de proteínas antimicrobianas, como a lisozima e lectinas, como RegIII γ . (WEHKAMP *et al.*, 2004); (CASH *et al.*, 2006)) (SANTAOLALLA *et al.*, 2011)

Enquanto o TLR4 parece ser o único ligante para LPS (BEUTLER, 2000), o TLR2 está envolvido no reconhecimento de peptidoglicanos e lipoproteínas presentes em micobactérias e bactérias gram-positivas (GENE *et al.*, 2013) .

Figura 8. Reconhecimento de LPS através de ligação a TLR4 com participação de MD-2.



Fonte: (FINLAY & HANCOCK, 2004)

Legenda: O LPS forma um complexo com LBP, que se liga ao CD14 na superfície celular. Isto então forma um complexo com TLR4 e MD2. No citoplasma da célula, TLR4 interage com MyD88 e Mal/Tirap que ativa a cascata envolvendo IRAK, TRAF6 e eventualmente NF κ B que leva a ativação transcricional de genes inflamatórios: IKK, JNK e MKK.

1.4 Modelo de cultivo de organoides intestinais

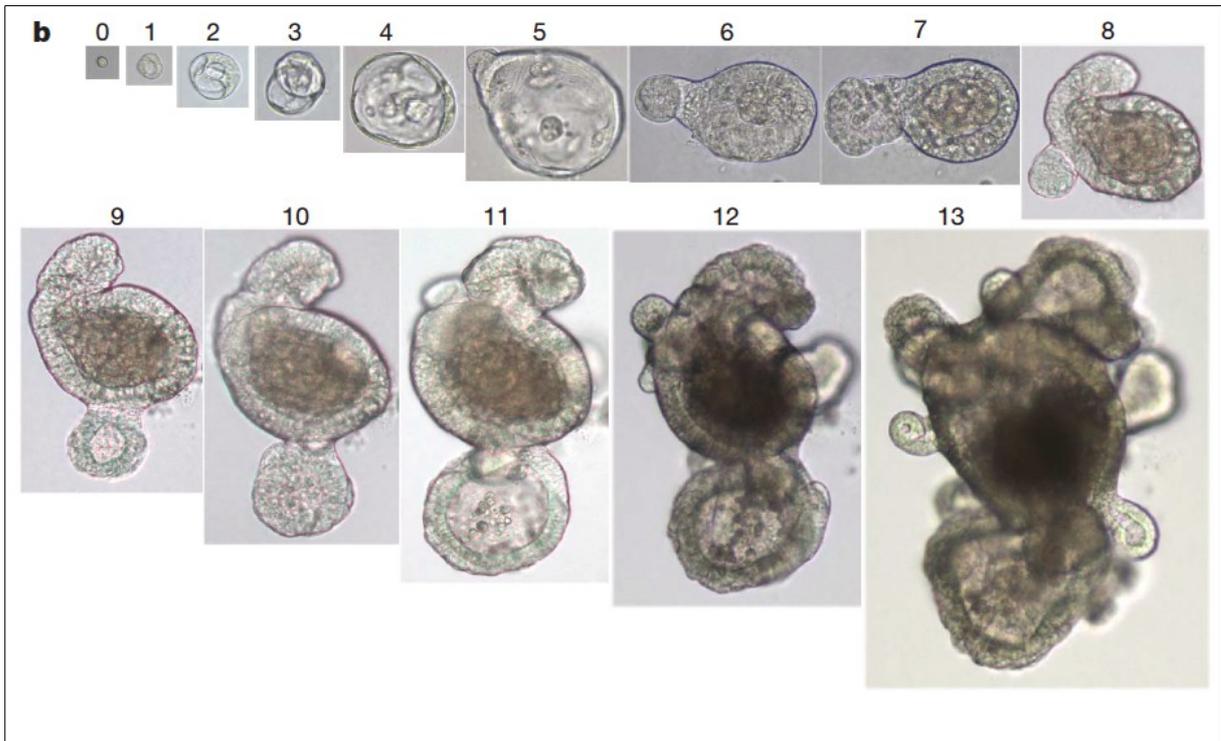
Embora um grande número de sistemas de cultivo de células tenha sido descrito (EVANS *et al.*, 1992) (PERREAULT & BEAULIEU, 1996), nenhum deles conseguia obter e manter durante muito tempo uma estrutura com as características de vilo-cripta. Sato e colaboradores, utilizando os conhecimentos acumulados sobre o crescimento e manutenção do epitélio intestinal, como, incluindo a sinalização da via Wnt para a proliferação na cripta (KORINEK *et al.*, 1998) (PINTO *et al.*, 2003) (KUHNERT *et al.*, 2004), o papel do EGF na proliferação celular (DIGNASS & STURM, 2001), a expressão transiente de Noggin na expansão do número de criptas (HARAMIS *et al.*, 2004b) e levando em conta que células intestinais sofrem *anoikis*, quando perdem o contato com o contexto celular normal, estes autores desenvolveram um modelo de cultura, onde células-tronco cultivadas no interior de uma matriz rica em laminina são capazes de gerar uma estrutura com características de vilo-cripta, contendo as principais linhagens celulares do epitélio intestinal.

As criptas colocadas em matrigel com fatores de crescimento rapidamente fechavam sua abertura superior, formando uma esfera, enquanto o lúmen se enchia de células apoptóticas. As criptas sofriam constantemente eventos de “brotamento”, com novas criptas surgindo devido ao fenômeno de fissão, com células de Paneth sempre presentes nessas criptas. Marcação para E-caderina revelou uma única camada de células e sinalização Wnt, medida através da translocação de β -catenina no núcleo, estava restrita a região de cripta. (SATO *et al.*, 2009)

Os enteroides apresentam células de Paneth (lisozima positivas) na base das criptas, enterócitos completamente polarizados (com borda em escova, marcação vilina positiva e fosfatase alcalina apical recobrando o lúmen central) e células caliciformes (positivas para mucina 2 e coradas pelo ácido periódico de Schiff) e células enteroendócrinas (positivas para cromogranina A e sinaptofisina) espalhados pela estrutura. Essas quatro tipos celulares foram identificados por microscopia eletrônica (SATO *et al.*, 2009)

A **Figura 9** exemplifica a formação de um enteroide a partir de uma cripta isolada de intestino de camundongo e a **figura 10** mostra uma representação esquemática de um enteroide se formando, mostrando as regiões de cripta, vilo e o lúmen.

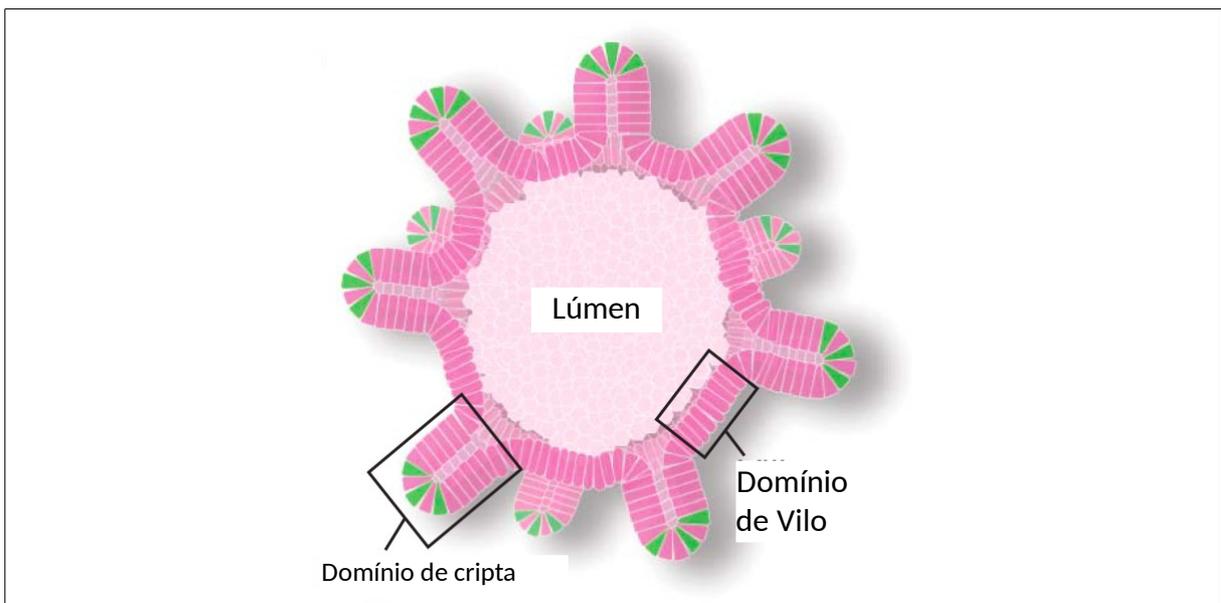
Figura 9. Formação de um enteroide a partir de uma única célula-tronco.



Fonte: (SATO *et al.*, 2009)

Crescimento de um enteroide a partir de uma única célula Lgr5 (+), os números indicam os dias de cultivo.

Figura 10. Figura esquemática de um enteroide.



Fonte: (SATO *et al.*, 2009). Células verdes indicam células com marcação Lgr5 (+).

1.5 Efeitos da Glutamina

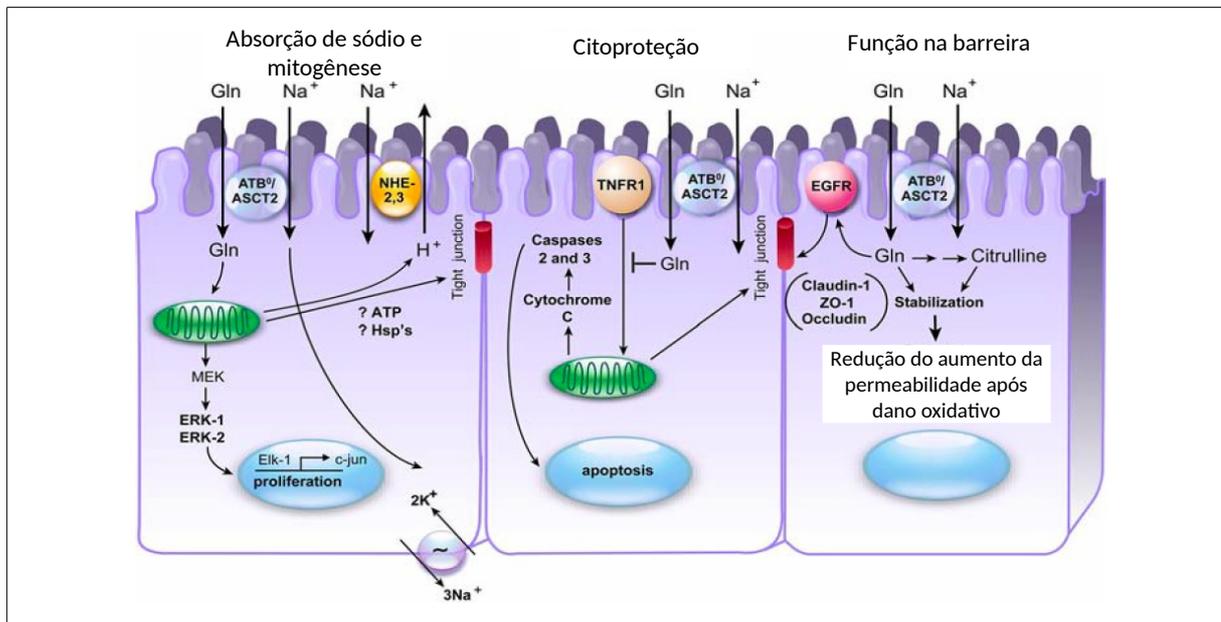
Aminoácidos não são apenas substratos para a síntese de proteínas e compostos nitrogenados, mas também são reguladores chaves de várias vias metabólicas (JOBGEN 2006)(MEIJER 2003)(WANG *et al.*, 2009).

A glutamina é um dos mais abundantes aminoácidos e é considerado condicionalmente essencial em condições de estresse, como infecção, trauma e desnutrição (LI, *et al* 2007) (WANG *et al*, 2008) (WANG *et al.*, 2009).

Além de ter um papel importante como combustível para enterócitos e leucócitos do intestino delgado, a glutamina participa em vários processos metabólicos, tais como síntese de proteína, gluconeogênese, transferência de nitrogênio, biossíntese de ácidos nucleicos, regulação da resposta imune e regulação do estado de oxidação celular (WU *et al*, 2007) (WANG *et al.*, 2009).

Os mecanismos melhores estudados para os efeitos da glutamina são: proliferação das células intestinais (mitogênese), sinalização para melhorar a sobrevivência celular e para bloquear a apoptose de enterócitos (citoproteção) e estabilização das *tight junction* (função na barreira). Esses mecanismos estão exemplificados na **figura 11**.

Figura 11. Mecanismos propostos para as funções da glutamina nas células intestinais.



Fonte: (MARC RHOADS & WU, 2009)

Vários estudos têm mostrado que a glutamina aumenta a proliferação de células intestinais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Rhoads e colaboradores (1997 e 2000) relataram que o aumento da proliferação celular de uma linhagem de células não transformadas de jejuno (IPEC-J2), medida pela incorporação de timidina ao DNA, estava associado com a ativação de quinases relacionadas a sinais extracelulares (ERKs) 1 e 2 pela via quinase MAPK (MEK) e fosforilação dos fatores de transcrição elk-1 e c-Jun e da proteína ativadora dependente de AP-1.

A sinalização da glutamina na proliferação não parece ser redundante a sinalização com fatores de crescimento, já que estudos *in vitro* com células de cripta de ratos demonstraram que efeitos são aditivos aos do fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e aos do fator de crescimento epidérmico (EGF), indicando um efeito modulatório e não somente nutricional (RHOADS *et al.*, 1997).

A glutamina também parece ter uma função de sinalização que melhora a sobrevivência das células epiteliais do intestino. Whichmeyer e colaboradores (1997), utilizando doses de glutamina equivalentes a encontradas em períodos pós-prandiais no lúmen intestinal (1-5mM), demonstraram um aumento da resistência à morte causada por estresse em células previamente privadas de glutamina e essa citoproteção estava associada a um aumento da proteína HSP70.

Mais tarde, esse mesmo grupo mostrou que esse efeito não se limitava aos modelos *in vitro* quando a glutamina (3-5mM) em ratos observou-se um aumento de HSP25 em múltiplos órgãos, incluindo pulmões, coração, fígado e cólon com efeito protetor desses animais para endotoxemia que era letal aos ratos controles (WHCHMEYER, *et al.*, 2001).

Um estudo sobre o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral -alfa (TRAIL) em células colônicas HT-29, a apoptose foi caracterizada pela condensação nuclear e ativação de caspase-3 e 8, evento que foi completamente abolido com a pré-administração de glutamina, mas não com o uso de outros aminoácidos, incluindo os constituintes da glutathiona (glutamato, cisteína e cistina), sugerindo então que a glutamina protege a célula por um mecanismo distinto da proteção contra o estresse oxidativo mediado pela glutathiona celular (EVANS *et al.*, 2003).

Estudos em monocamadas de células intestinais têm contribuído para o entendimento dos mecanismos nos quais a glutamina atua na estabilização das *tight junctions*. Li e colaboradores (2004) utilizaram monocamada de células Caco-2 e um inibidor da glutamina sintetase (*methionine sulfoxime*) e constataram a dissolução de componentes ligados à membrana relacionados às *tight junctions* (claudina-1 e zonulae occludens-1) e que esse efeito poderia ser recuperado com a adição de 0,6 mM de glutamina ao meio.

Seth e colaboradores (2004), utilizando uma monocamada de enterócitos, observaram que 2mM de glutamina adicionado ao meio era suficiente para recuperar danos causados pelo acetaldeído, que causa a dissolução de E-caderina, β -catenina e zonulae occludens-1. Este efeito não era abolido quando o metabolismo da glutamina era inibido, eliminando a possibilidade de que o ATP proveniente de seu metabolismo fosse o responsável por esse efeito protetor já que o ATP é uma substância conhecida por afetar a estabilidade das *tight junctions* (HAYASHI *et al.*, 1999).

A glutamina pode também ter um papel imunodulatório, reduzindo a proliferação de leucócitos e alterando a expressão de marcadores de superfície de linfócitos e monócitos, afetando a produção de citocinas (ROTH, 2008) (PÉREZ-BÁRCENA *et al.*, 2010).

Ainda existem controvérsias se pacientes com trauma e/ou infecção ou sepse podem se beneficiar da suplementação com glutamina ou mesmo em quais situações esses receptores podem estar alterados. Alguns estudos apontam para uma redução dos níveis de TLR2 e 4 em leucócitos de pacientes com trauma que desenvolveram infecção (LAUDANSKI *et al.*, 2004), enquanto outros demonstram uma redução apenas da expressão de TLR2 (LENDEMANS *et al.*, 2007) ou TLR4 (ADIB-CONQUY *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Embora existam vários estudos sobre a função da glutamina no intestino delgado, principalmente sua importância como combustível de enterócitos, pouco foi estudado a respeito do efeito da glutamina sobre as células de linhagens secretoras. Embora o estudo dessas células de maneira isolada, *in vitro*, fosse possível, esses modelos necessitavam de estímulos exógenos específicos para a formação de cada tipo celular e não contemplam o complexo fenótipo vilo-cripta. O modelo de organóides intestinais é capaz de gerar células das principais linhagens epiteliais, sem a necessidade de estímulos específicos para cada tipo celular, gerando um epitélio com células diferenciadas e funcionais num padrão vilo-cripta, que se assemelha ao encontrado *in vivo*. Então, esse estudo teve como objetivo avaliar pela primeira vez o efeito da deprivação da glutamina sobre células secretoras do epitélio intestinal em um modelo de enteroide, avaliando parâmetros de viabilidade celular. Dessa forma, contribuindo para entender os mecanismos envolvidos nos processos de catabolismo intestinal e potenciais alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as possíveis alterações que a privação de glutamina pode ocasionar nas células secretoras do epitélio intestinal, usando o modelo de enteroide.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da privação da glutamina na proliferação e apoptose das células da região da cripta de um epitélio intestinal utilizando o modelo de enteroide.
- Avaliar o efeito da privação da glutamina nas células secretoras intestinais: células de Paneth, células caliciformes e células enteroendócrinas, seu número e a síntese de seus principais produtos, lisozima, RegIII γ (Paneth), mucina-2 (caliciforme) e cromogranina A (células enteroendócrinas).
- Avaliar os efeitos da privação de glutamina no epitélio intestinal em relação ao reconhecimento de produtos bacterianos através da expressão de TLR2 e TLR4 e de sua proteína acessória, MD-2.
- Avaliar o efeito da privação de glutamina na transcrição de citocinas, TNF- α , IL-1 β e CXCL-1(a equivalente a IL-8 em camundongos) em enteroides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a parte experimental foi realizada no laboratório do Dr. Noah Shroyer do hospital Pediátrico de Cincinnati (Cincinnati Children's Hospital Medical Center) sob sua supervisão.

4.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do biotério do Cincinnati Children's Hospital Medical Center, mantidos com ração e água *ad libitum* em ciclo de claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos com animais foram aprovados previamente pelo comitê de ética do Hospital Pediátrico de Cincinnati.

4.2 Reagentes e Soluções

PBS (Life Technologies)

Tampão de Quelação (2 mM EDTA em PBS)

EDTA (Sigma-Aldrich)

Tampão de Agitação (Sacarose, Sorbitol)

Matrigel (BD Biosciences)

EGF (BD Biosciences)

Spondin (BD Biosciences)

Noggin (BD Biosciences)

Advanced DMEM/F12

L-Glutamine (Invitrogen)

Pen/Strep (Invitrogen)

Hepes 10 μ M (Invitrogen)

N2 supplement (R&D System)

B27 supplement (Invitrogen)

Paraformaldeído (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Albumina de soro bovino (Invitrogen)

anticorpo primário coelho anti-Lyzosime (Life technologies)

Anticorpo primário coelho anti-Mucina2 (Life technologies)

Anticorpo primário coelho anti-Cromogranina A (Life technologies)

Anticorpo primário Coelho anti caspase-clivada-3 Life technologies)

Anticorpo Secundário carneiro anti-coelho Alexa flúor 594 Life technologies)

Hoeschst 33342 (Life technologies)

Kit Klik-it EdU (Life technologies)

Trizol (Life technologies)

Clorofórmio (Sigma-Aldrich)

Kit RNase-free DNase set (Life technologies)

Kit SuperScript Vilo cDNA Synthesis kit (Life technologies)

Kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Life technologies)

Primers (descritos na seqüência 5' → 3') (Life technologies)

Mucina2 (F: TTCGGCACGAGCAACTTTG, R: GGCAGGACACCTTGTCATTG)

Lyzosima2 (F: ATGGAATGGCTGGCTACTATGG, R: ACCAGTATCGGCTATTGATCTGA)

TLR2 (F: GCAAACGCTGTTCTGCTCAG, R: AGGCGTCTCCCTCTATTGTATT)

TLR4 (F: ATGGCATGGCTTACACCACC, R: GAGGCCAATTTTGTCTCCACA)

Ly96 (F: CGCTGCTTTCTCCCATATTGA, R: CCTCAGTCTTATGCAGGGTTCA)

RegIII- γ (F: ATGCTTCCCCGTATAACCATCA, R: GGCCATATCTGCATCATACCAG)

IL-1 β (F: GCAACTGTTTCCTGAACTCAACT, R: ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT)

TNF- α (F: GGAACACGTCGTGGGATAATG, R: GGCAGACTTTGGATGCTTCTT)

Sacarose (Sigma-Aldrich)

Sorbitol (Sigma-Aldrich)

Meio Mini Gut (Advanced DMEM/F12 suplementado com L-Glutamine na concentração de 2mM, Pen/Strep 1:100, Hepes 10 μ M 1:100, N2 supplement 1:100, B27 supplement.

4.3 Equipamentos e Insumos

Fluxo laminar

Tubo Falcon 15 mL

Peneira celular de 70 μ m

Tubo de fundo redondo

Centrifuga refrigerada

Placa de cultivo celular de 12 poços

Estufa de CO₂

Chamber slides de 8 poços

Seringa de insulina

Vortexador

Termociclador (Eppendorf - Master Clycler Pernsonal)

Termociclador (Stratagene Mx 3000P)

Agitador Orbital

Microscópio confocal invertido (Zeiss LSM 710)

4.4 Extração e cultivo de células-tronco (modelo enteroide)

As células-tronco, presentes nas criptas intestinais de camundongos C57BL/6, foram extraídas conforme a metodologia apresentada por Sato et al., (2009). O animal foi asfixiado com o uso de CO₂, e depois foi feito o deslocamento cervical para assegurar a eutanásia. Foi realizado um corte na posição ventral para exposição das vísceras e um fragmento de 5 cm foi coletado da porção média do intestino delgado (Jejuno). O fragmento teve seu interior lavado com PBS gelado com um auxílio de uma seringa, o fragmento foi então aberto longitudinalmente e em seguida cortado transversalmente em fragmentos de 0,3-0,5cm. Estes fragmentos foram colocados em tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo PBS gelado para transporte ao laboratório onde o PBS foi removido e substituído por tampão de quelação e agitado levemente em 4°C por 30 minutos em agitador orbital. Após agitação, o tampão de quelação foi removido e substituído por tampão de agitação e agitado por 2 minutos a mão e o desprendimento de criptas foi observado retirando-se uma gota e colocando em lâmina sob microscópio óptico. O material foi filtrado, utilizando-se filtro celular de 70µm. Uma concentração de 500 criptas por poço foi transferida para um tubo de fundo redondo, onde foram então peletizadas com uma centrifugação de 10 minutos a 150G a 4°C e ressuspensas em 50 µL de matrigel acrescido dos fatores de crescimento, EGF (50ng/mL), Spondin (500ng/mL) e Noggin (100ng/mL) e semeados em placa de cultivo celular de 12 poços.

O matrigel foi colocado em estufa de CO₂ para a polimerização a 37°C por 30 minutos e depois coberto com meio de cultura “Mini Gut” acrescido dos fatores de crescimento, EGF (50ng/mL) Spondin (500ng/mL) e Noggin (100ng/mL) e incubado a 37°C com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada dois dias, utilizando-se meio “Mini Gut” fresco acrescido de fatores de crescimento e as passagens realizadas a cada 7-10 dias. Para a realização das passagens, o meio era completamente removido, em seguida 1mL de PBS era adicionado e o matrigel dissociado com o auxílio de uma pipeta e o material, contendo as criptas, então transferido para um tubo de fundo redondo, onde foi centrifugado e novamente ressuspensas em matrigel acrescido de fatores de crescimento e semeado em placa de cultivo celular. Após polimerização, o matrigel foi coberto com meio “mini gut” fresco. Para os experimentos de privação de glutamina, os meios experimentais utilizados foram: o meio “mini gut” completo, contendo 2mM de glutamina, referido como meio padrão, e o meio “mini gut” modificado, onde não ocorre a adição de glutamina, referido como meio privado de glutamina.

4.5 Imunomarcção de enteroide para contagem de linhagens celulares em microscopia confocal

Os enteroides foram cultivados nas condições descritas acima. No momento da passagem os enteroides foram ressuspensos em 20 μ L de matrigel, contendo fatores de crescimento por poço e semeados em *chamber slides* de oito poços e após polimerização cobertos com 350 μ L de meio “mini gut”. Os enteroides foram cultivados por quatro dias, com troca de meio no segundo dia, antes da adição de meio com as condições experimentais por 24 horas. Após esse período, o meio era retirado, o matrigel contendo os enteroides era lavado com PBS e fixado com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, permeabilizado com Triton X-100 0,5%, bloqueado com BSA 5% e em seguida incubado com o anticorpo primário de coelho anti-lisozima 2 na concentração de 1:300, anti-mucina2 ou anti-cromogranina A por 2 horas, lavado novamente com PBS e então incubados com o anticorpo secundário de carneiro anti-coelho, conjugado com Alexa Flúor 594 na concentração de 1:500 por duas horas, sendo mais uma vez lavado e contra-corados com Hoechst 33342, na concentração de 5 μ g/mL por 20 minutos e deixado imerso em PBS até o momento da análise.

4.6 Ensaio de proliferação celular em enteroide

Para o ensaio de proliferação foi utilizado o kit Clik-it EdU de acordo com as recomendações do fabricante. Os enteroides foram cultivados como descrito na seção 4.4 e uma hora antes da fixação. EdU foi adicionado ao meio, de ambas as condições experimentais, a uma concentração final de 10 μ M. Após uma hora, o meio foi removido, o matrigel lavado com PBS e os enteroides em seu interior fixados com PFA 4% por 15 minutos, lavados 3 vezes com BSA 3% e 5 minutos cada, permeabilizados com Triton X-100 0,5%, lavados novamente 3 vezes com BSA 3%, e incubados por 30 minutos com o “cocktail de reação”, que utiliza o Alexa Flúor 594 para marcar células EdU positivas, preparado como descrito no kit. Posteriormente foram realizadas mais três lavagens com BSA a 3% de 5 minutos cada e as células então contra-coradas com Hoechst 33342 (5 μ g/mL) por 20 minutos. O material foi deixado imerso em PBS e acondicionado a 4°C até o momento da análise.

4.7 Ensaio de apoptose celular

Para o ensaio de apoptose celular, os enteroides foram cultivados como descrito na seção 4.4. No momento da passagem os enteroides foram ressuspensos em 20 μ L de matrigel, contendo fatores de crescimento por poço e semeados em *chamber slides* de oito poços e após polimerização cobertos com 350 μ L de meio “mini gut”. Os enteroides foram cultivados por quatro dias, com troca de meio no segundo dia, antes da adição de meio com as condições

experimentais por 24 horas. Após esse período, o meio era retirado, o matrigel, contendo os enteroides era lavado com PBS e fixados com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, permeabilizados com Triton X-100 0,5%, bloqueados com BSA 5% e em seguida incubados com o anticorpo primário de coelho anti-caspase-clivada-3 na concentração de 1:300 por 2 horas, lavados novamente com PBS e então incubados com o anticorpo secundário de carneiro anti-coelho conjugado com Alexa Flúor 594 na concentração de 1:500 por duas horas, sendo mais uma vez lavados e contra corados com Hoechst 33342, na concentração de 5µg/mL por 20 minutos e deixados imerso em PBS até o momento da análise.

4.7 Aquisição de imagens por microscopia confocal

Os enteroides imunomarcados foram observados em microscópio confocal invertido com aumento de 400x e as imagens adquiridas. Foram fotografadas 2-3 criptas por enteroide, dando preferência para cortes longitudinais e que atravessassem o centro da cripta e em média 3 enteroides por poço de *chamber slide*, foram feitos 3 experimentos em dias diferentes com 4 poços para cada condição por *chamber*. Os comprimentos de onda utilizados para excitação dos fluorocromos foram de 594nm para o anticorpo secundário de carneiro anti-coelho Alexa flúor 594 e 350nm para o Hoescht 33342. A quantificação das células marcadas foi feita utilizando-se o programa Fiji e a razão células com dupla marcação positiva para anticorpo secundário e Hoescht / células Hoeschst positivas foi calculada.

4.8 Extração e purificação de RNA

Os enteroides foram cultivados como descrito na seção 4.4 “modelo enteroide”. Após o período de 24 horas com os meios de cultura experimentais, o RNA total foi extraído através da utilização do protocolo do Trizol. O meio de cultura foi removido e os poços, contendo o matrigel com enteroides no seu interior, lavados com 1mL de PBS, este foi retirado completamente e 300µL de Trizol foram adicionados a cada poço. Foi feita a homogeneização com o auxílio de uma pipeta e então a transferência para um tubo Eppendorf. As células foram lisadas com o auxílio de uma seringa de insulina e ao tubo foram adicionado 30µL de clorofórmio. O tubo foi vortexado por 15 segundos e deixado a temperatura ambiente por 3 minutos e depois centrifugado a 12.000G por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo, onde foram adicionados 150µL de isopropanol para a precipitação do RNA em seguida deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação de 10 minutos a 12.000G, o sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado, adicionando-se 300µL de etanol a 75%, vortexando e então centrifugando a 7.500G por 5 minutos a 4°C. Quando não foi possível realizar o próximo passo imediatamente após a extração, o pellet foi

estocado a -80°C .

Para purificação do RNA mensageiro foi utilizado o kit RNAeasy. O pellet contendo RNA foi ressuspensão em $100\mu\text{L}$ de água livre de RNase, adicionado $350\mu\text{L}$ do tampão RLT e homogeneizado, em seguida $250\mu\text{L}$ de etanol foram adicionado à solução e o volume total transferido para uma coluna RNAeasy acoplada sobre um tubo coletor de 2 mL . Após centrifugação de 15 segundos a 15.000G o filtrado foi descartado e a coluna novamente acoplada sobre o tubo.

Foi realizada então a digestão do DNA antes de se continuar a purificação do RNA, utilizando-se o kit RNase-free DNase set. A coluna foi lavada com $350\mu\text{L}$ de tampão RW1 e centrifugação a 8.000G por 15 segundos sendo o filtrado descartado. $80\mu\text{L}$ da solução de DNase (feita com $10\mu\text{L}$ de DNase I e $70\mu\text{L}$ de tampão RDD) foram adicionados à membrana da coluna e deixada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, $350\mu\text{L}$ de tampão RW1 foram adicionados à coluna, esta foi centrifugada por 15 segundos a 8.000G e o filtrado descartado.

A purificação do RNAm foi então reiniciada, com a adição de $500\mu\text{L}$ de tampão RPE seguida por centrifugação de 2 minutos a 8.000G . O tubo coletor com o filtrado foi então descartado e substituído por um novo com volume de 1.5mL . $30\mu\text{L}$ de água livre de RNase foram adicionados na coluna e esta centrifugada por 1 minuto a 8.000G . A coluna foi desprezada e o filtrado, contendo o RNA purificado, foi então armazenado a -80°C até ser necessário.

Três poços, de uma placa de 12 poços, foram utilizados para se obter material necessário para uma amostra, sendo então utilizados 18 poços em cada condição (com ou sem glutamina no meio) para gerar o material necessário para os ensaios de qPCR, com um N total de 6.

4.9 Ensaio de PCR em tempo real com transcriptase reversa

Para o ensaio de PCR em tempo real era necessária a síntese do cDNA a partir do RNAm extraído, para isso foi utilizado o kit SuperScript Vilo cDNA Synthesis kit e termociclador.

Para cada reação de transcriptase reversa foram adicionados 4 μ L do mix de reação Vilo 5X, 2 μ L do mix SuperScript enzime 10X, 200ng de RNA purificado, e água livre de RNase suficiente para se conseguir um volume de 20 μ L, o conteúdo foi gentilmente misturado e incubado a 25°C por 10 minutos, a 42°C por 60 minutos e a 85°C a 5 minutos.

Para o ensaio de PCR em tempo real o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix e termociclador e software RT² Profiller.

Para cada gene de interesse foi utilizado 10 μ L de SBYR Green QPCR Master Mix 2x, 1 μ L de Primer foward na concentração de 10 μ M, 1 μ L de Primer Reverso na concentração de 10 μ M, Volume necessário para 100ng de cDNA e água livre de DNase para completar o volume de 20 μ L

Os primers utilizados foram: Mucina2, Lyzosima2, TLR2, TLR4, MD-2, RegIII- γ , IL-1 β , TNF- α e o gene de referencia utilizado foi o GAPDH.

A reação de qPCR foi realizada com um ciclo de 3 minutos com temperatura de 95°C, 40 ciclos de 5 segundos de temperatura de 95°C seguido de 20 segundos de temperatura de 60°C e um ciclo com 1 minuto a 95°C, seguido por 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 95°C.

As curvas de amplificação foram analisadas no Programa RT² Profiller e o *cycle threshold* (Ct) calculado.

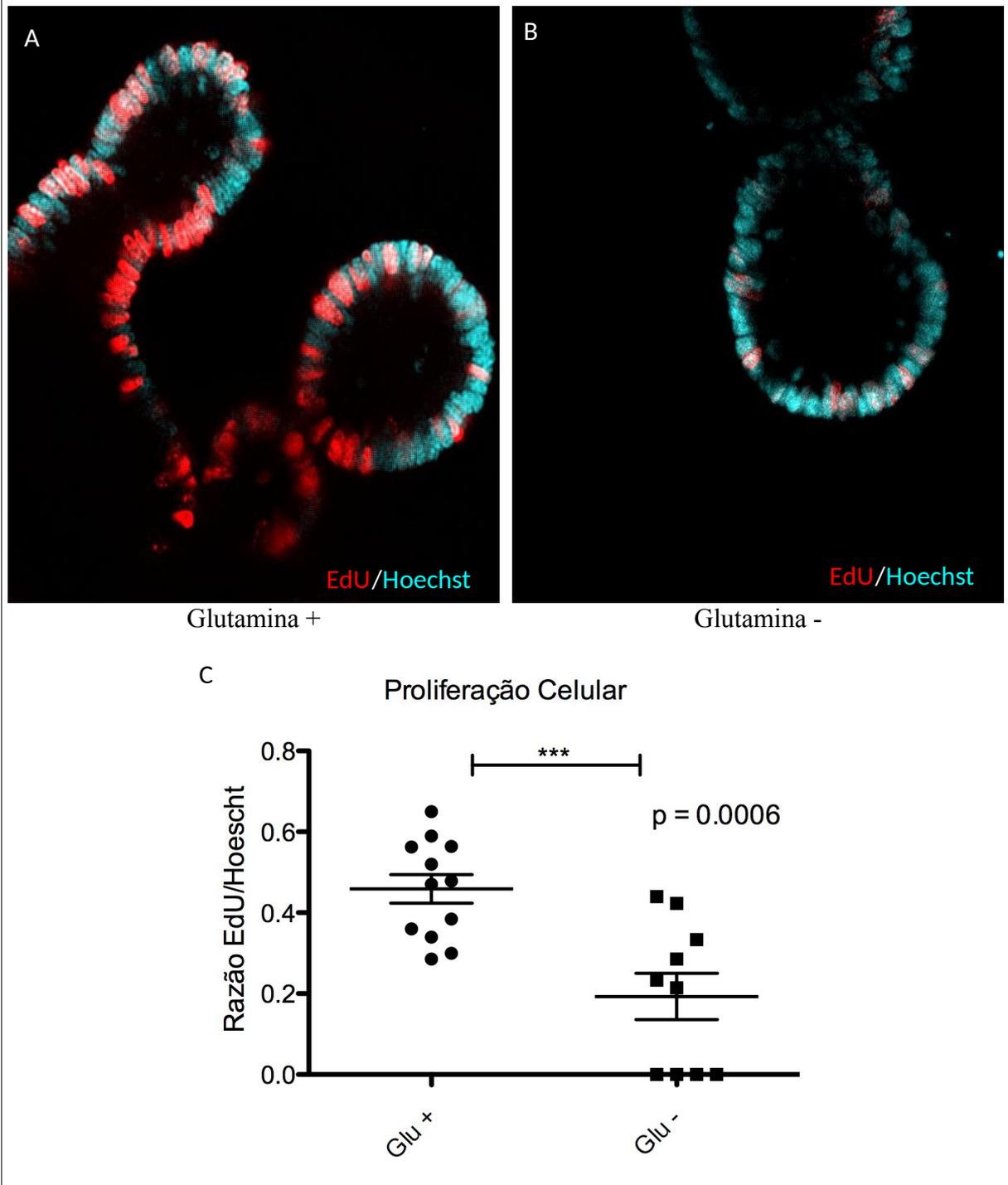
4.10 Análise estatística

Os resultados foram mostrados como média \pm desvio padrão e foi realizado teste de T *student* não pareado para comparação entre dois grupos e um valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças significativas. Todos os testes foram realizados e gráficos construídos com o uso do programa GraphPad Prisma (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Proliferação celular

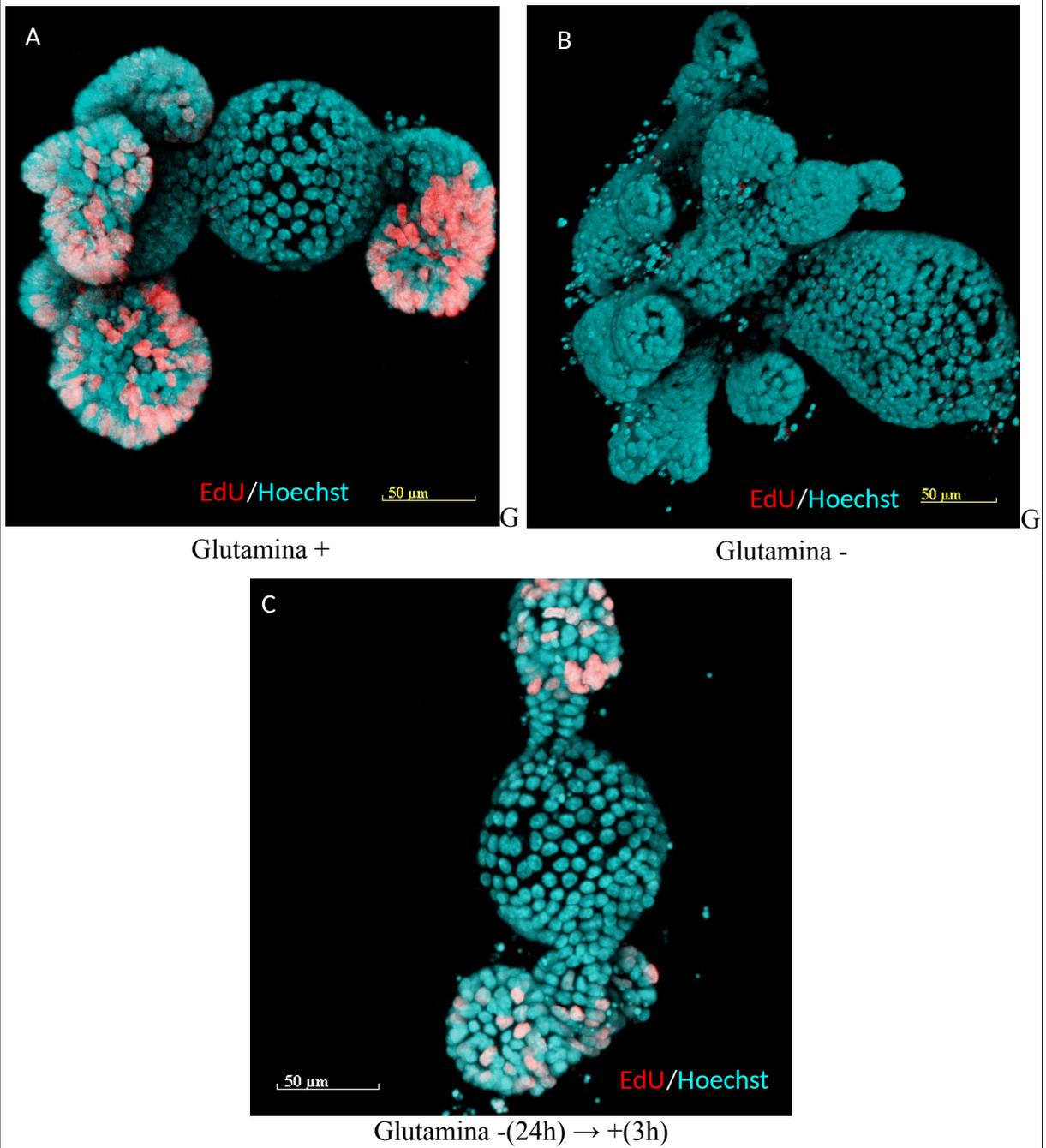
A ausência de glutamina no meio por 24 horas reduziu significativamente ($p=0,0006$) a proliferação de células nas criptas dos enteroides, analisada pela incorporação de EdU por células em divisão, comparado-se o meio sem glutamina ($0,193 \pm 0,057$. N=10) com o meio com glutamina ($0,4588 \pm 0,035$. N=12). **A figura 12** mostra imagens de criptas de enteroides com aumento de 400X cultivadas em meio com glutamina (**A**) e sem glutamina (**B**), as células marcadas em vermelho possuem marcação positiva para EdU, todas as células estão contra-coradas com Hoescht, identificadas nas imagens com a coloração ciano. O gráfico (**figura 12C**) apresenta a razão células EdU +/células Hoechst + com média \pm desvio padrão.

Figura 12. Ensaio de proliferação celular.

5.2 Resgate da Glutamina

Foi feita a re-introdução de glutamina (2mM) ao meio privado de glutamina por 24 horas e após 3 horas realizada imunomarcção para EdU, a administração de glutamina ao meio privado desse aminoácido promoveu uma divisão celular que pode ser observada pela incorporação de EdU. **A figura 13** mostra imagens de um enteroide, com aumento de 100X, cultivado em meio com glutamina (**A**), sem glutamina (**B**) e privado de glutamina por 24 horas e então exposto a ela por 3 horas (**C**). As células marcadas em vermelho são positivas para EdU e todas as células estão contra-coradas com Hoechst, identificadas nas imagens com a coloração ciano.

Figura 13. Ensaio de resgate de glutamina em enteroides deprivados por 24 horas.



5.3 Apoptose por Caspase-clivada-3

Não foi possível quantificar a apoptose por imunomarcção de caspase-clivada-3 nas células presentes no epitélio das criptas do enteroide. Todas as células positivas para caspase-clivada-3 se encontravam no interior do “lúmen” dos enteroides, e era possível visualizar células marcadas em ambas as condições, impedindo a contagem dessas células utilizando a metodologia anteriormente descrita e normalização dos dados.

5.4 Número de células secretoras (Paneth, Caliciforme e Enteroendócrina) no epitélio da cripta do enteroide

Não houve diferença estatística ($p=0,07$) entre a razão do número de células lisozima+ / total de células presente na cripta nas duas condições observadas, meio padrão ($0,1001 \pm 0,008$. N=15) contra meio privado (média $0,1283 \pm 0,012$. N=11) e nem de células Mucina2+/total de células presentes na cripta ($p=0,67$), meio padrão ($0,1414 \pm 0,02$. N=15) e meio privado ($0,1294 \pm 0,016$. N=10). Foram encontradas poucas células marcadas por chromogranina A no epitélio dos enteroides, tornando impossível uma quantificação confiável pela metodologia adotada.

A **figura 14** mostra imagens de criptas com aumento de 400X de criptas de enteroides cultivados em meio com glutamina (**A**) e sem glutamina (**B**). As células marcadas em vermelho possuem marcação positiva para lisozima-2, todas as células estão contra-coradas com Hoechst, identificadas nas imagens com a coloração ciano. O gráfico (**figura 14C**) apresenta a razão células lisozima +/células totais na cripta com média \pm desvio padrão.

A **figura 15** mostra imagens de criptas com aumento de 400X de criptas de enteroides cultivados em meio com glutamina (**A**) e sem glutamina (**B**), as células marcadas em vermelho possuem marcação positiva para mucina-2, todas as células estão contra-coradas com Hoechst, identificadas nas imagens com a coloração ciano. O gráfico (**figura 15C**) apresenta a razão células mucina2+/células totais na cripta com média \pm desvio padrão.

Figura 14. Células de Paneth (marcadas em vermelho) em criptas de enteroides cultivados em meio padrão e privado de Glutamina por 24 horas.

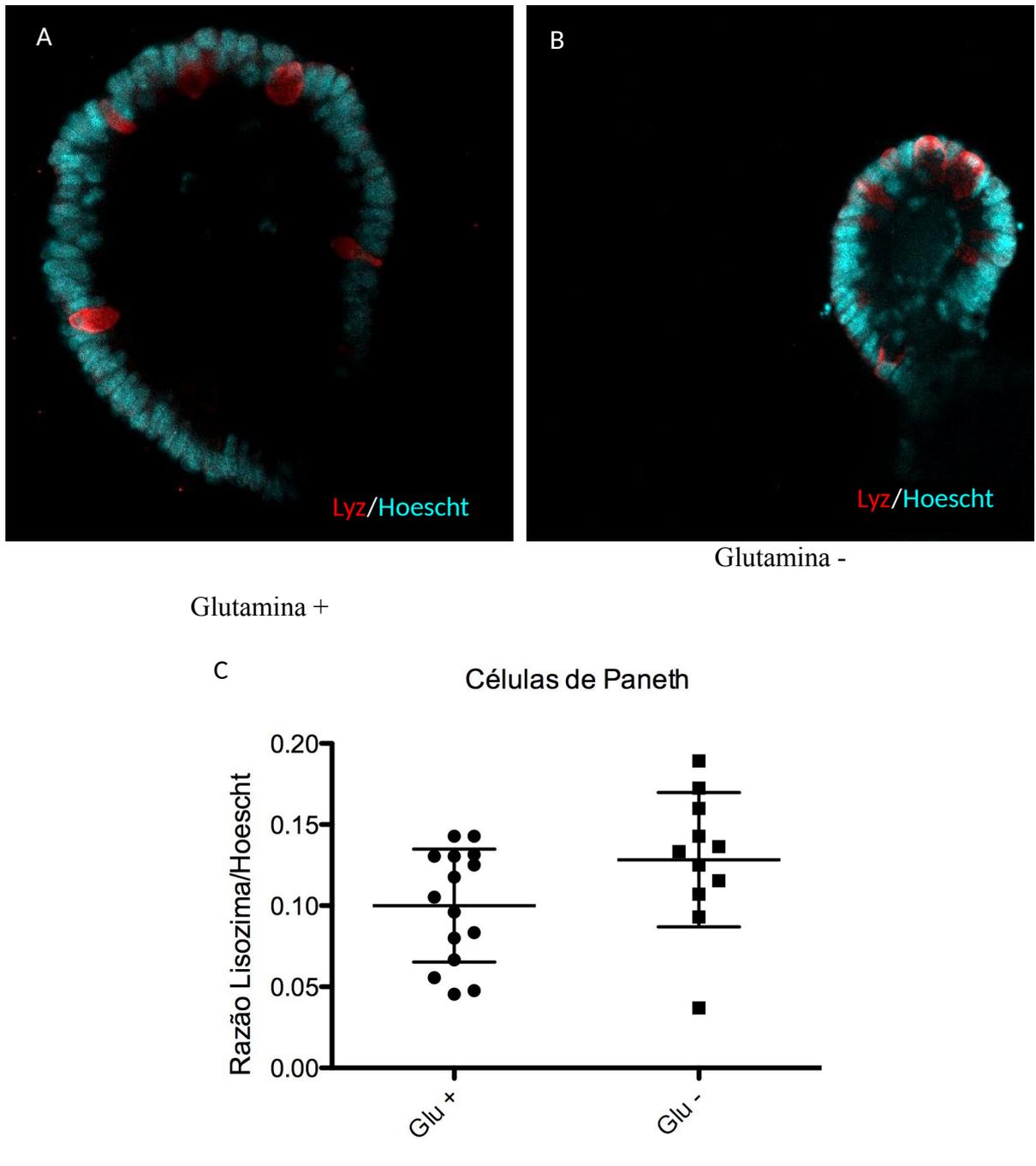
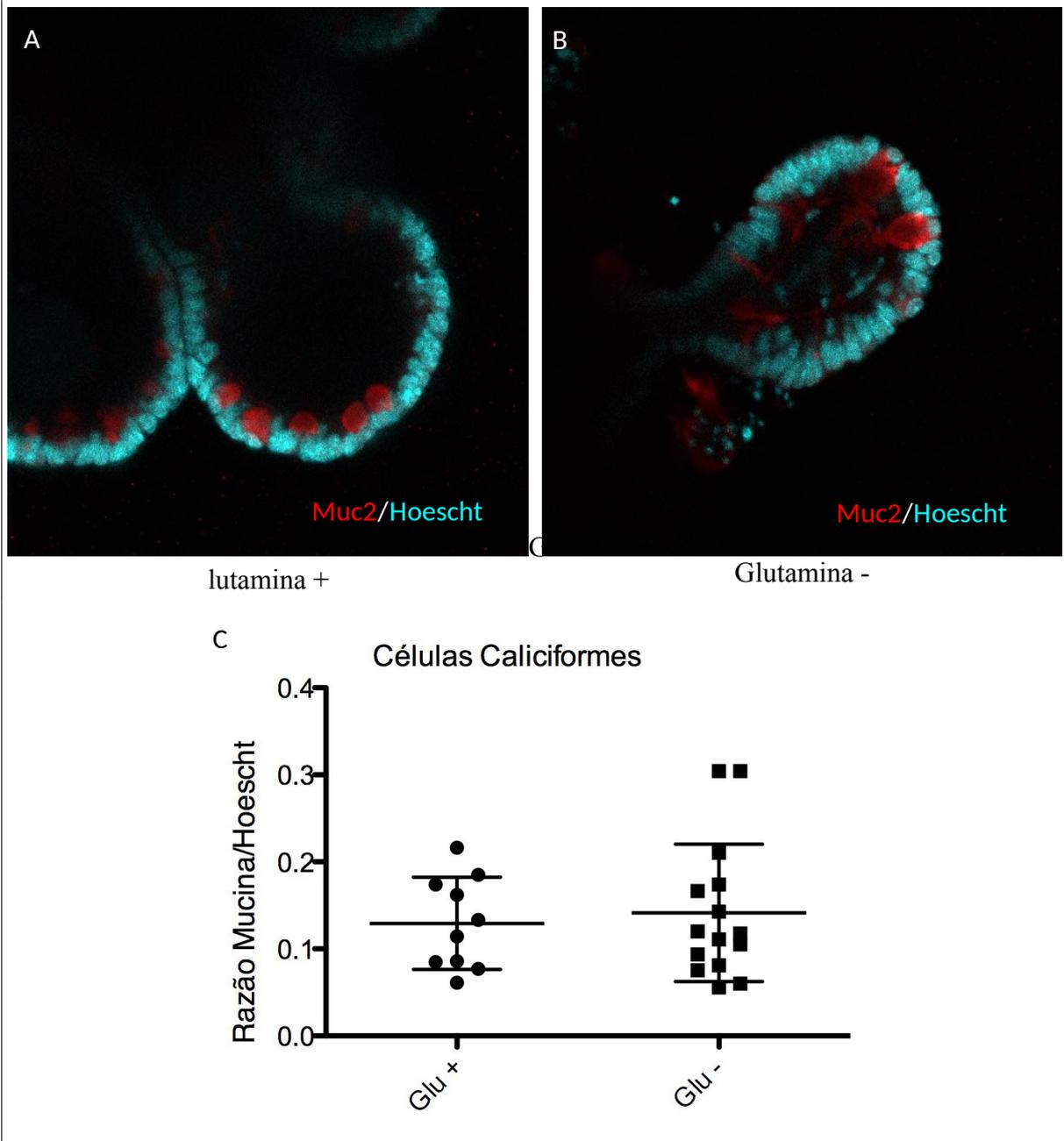


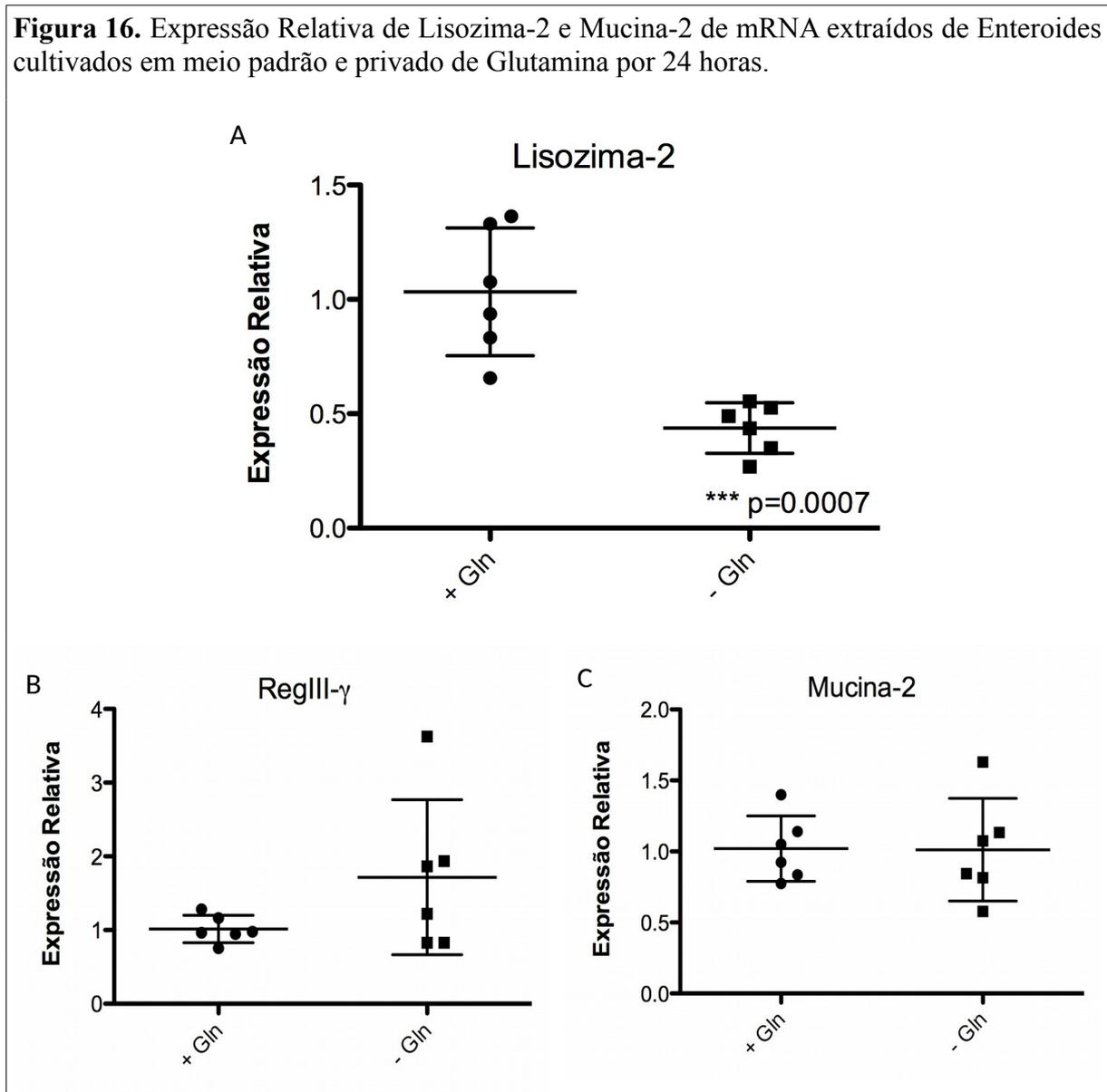
Figura 15. Células Mucina-2 positivas (marcadas em vermelho) em criptas de enteroides cultivados em meio padrão e privado de Glutamina por 24 horas.



5.5 Análise da transcrição de produtos celulares das células de Paneth e caliciformes

Houve diferença estatística ($p=0,0007$) na produção de RNAm para lisozima entre os grupos experimentais quando comparados ao gene de referência, com o grupo que sofreu privação de Glutamina apresentando uma menor expressão (**figura 16A**). Não houve diferença estatística entre a expressão relativa de RegIII- γ ($p=0,1382$, **figura 16B**) ou de Mucina 2 ($p=0,9645$, **figura 16C**) quando comparadas ao gene de referência.

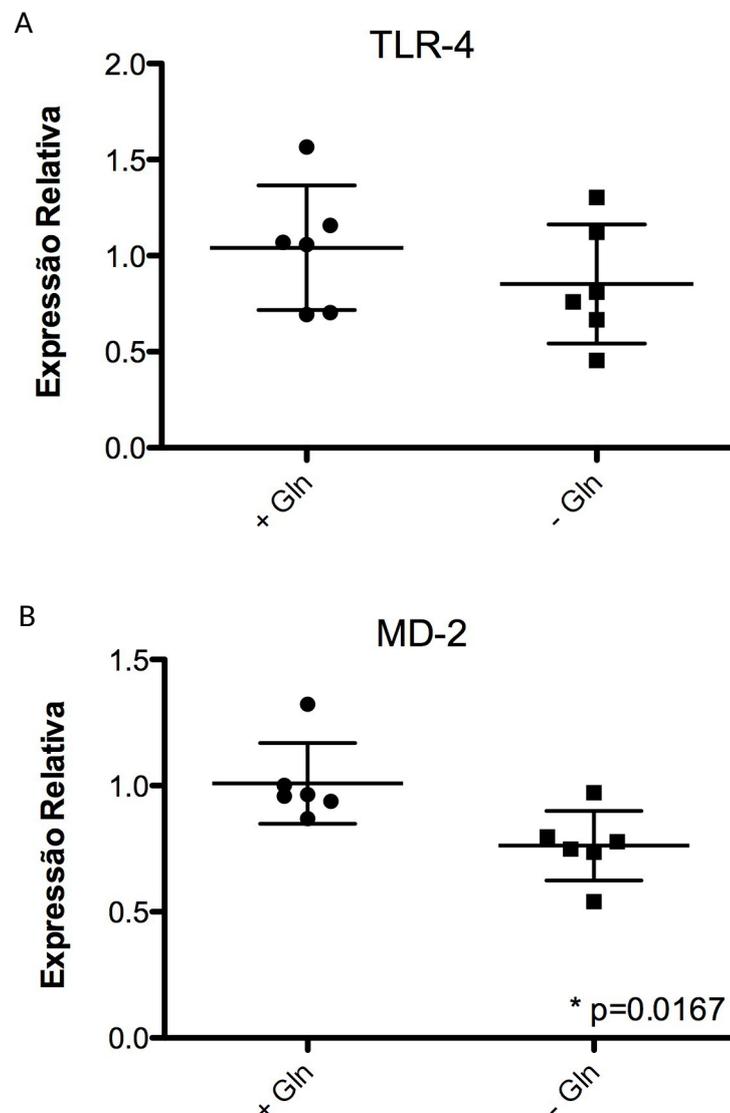
Figura 16. Expressão Relativa de Lisozima-2 e Mucina-2 de mRNA extraídos de Enteroides cultivados em meio padrão e privado de Glutamina por 24 horas.



5.6 Expressão de RNAm para TLR e MD-2

Não houve diferença estatística entre a expressão dos transcritos para TLR4 entre as duas condições experimentais ($p=0,326$) e não houve expressão detectável de RNAm para TLR2 em nenhuma das condições. Em relação à MD-2, houve diferença estatística ($p=0,0167$) entre os grupos experimentais, com o meio que sofreu privação de glutamina apresentando uma menor expressão de RNA mensageiro. A **figura 17** mostra os gráficos de expressão relativa para receptor Toll-like-4 (A) e MD-2 (B) quando comparados com o gene de referência.

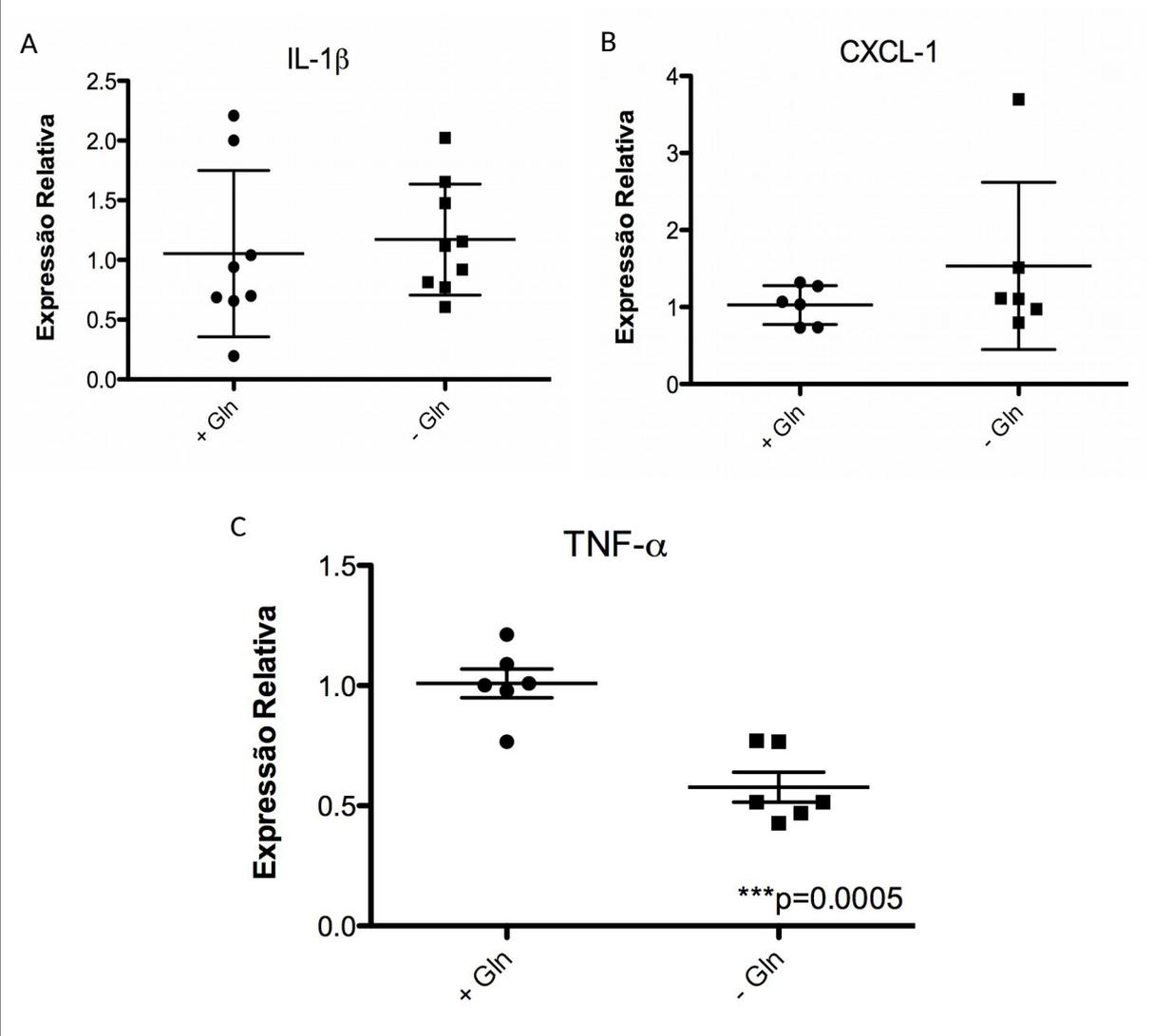
Figura 17. Expressão Relativa de RNAm para TLR-4 e MD-2 extraídos de enteroides cultivados em meio padrão e privado de glutamina por 24 horas.



5.7 Expressão de RNAm para citocinas, IL1- β , CXCL1 e TNF- α

Em relação às citocinas, houve diferença estatística ($p=0,0005$) somente para o RNAm de TNF-alfa, onde o grupo privado de glutamina apresentou uma menor expressão. Não houve diferença entre a expressão de transcritos para IL-1 β e CXCL-1 ($p=0,488$ e $p=0,2920$ respectivamente). A **figura 18** mostra os gráficos de expressão relativa para IL-1 β (A), TNF- α (B) e CXCL-1 (C).

Figura 18. Expressão Relativa de RNAm para IL-1- β , CXCL-1 e TNF- α extraídos de enteroides cultivados em meio padrão e privado de glutamina por 24 horas.



6 DISCUSSÃO

6.1 Glutamina é necessária para proliferação do epitélio intestinal

A necessidade de glutamina para a proliferação de enterócitos já é bem conhecida (RHOADS & WU, 2009), mas a glutamina parece ser essencial para a proliferação de outras linhagens celulares do epitélio. Até mesmo as células-tronco, que estão na base da cripta, deixam de proliferar na ausência de glutamina como visto na **figura 12**, ou pelo menos têm o ciclo retardado, não sendo observado células com incorporação de EdU.

Desde o princípio dos estudos com cultura de células, é fato conhecido que uma alta concentração de glutamina ($\geq 2\text{mM}$) é necessária em meios de cultivo para que ocorra proliferação celular (MARC RHOADS & WU, 2009), porém a glutamina parece ter um efeito mais importante em células intestinais. Rhoad e colaboradores (1997 e 2000) estudaram o que aconteceria se células intestinais cultivadas *in vitro* com concentrações fisiológicas de glutamina (0,7 mM) fossem expostas às concentrações mais altas (2,5 mM), simulando uma solução de reidratação oral, e observaram um aumento de 50% na incorporação de timidina ao DNA, representando uma resposta proliferativa. Quando as células era privadas de glutamina e posteriormente expostas a esse mesmo nível, a incorporação de timidina aumentava 20 vezes.

Moore e colaboradores (dados ainda não publicados) utilizando o modelo de enteroide e suplementando o meio com diferentes aminoácidos, observaram que a glutamina e alanil-glutamina eram os únicos capazes de induzir a expansão do número de criptas. Este mesmo estudo mostrou que 3 horas depois de se re-introduzir a glutamina em um meio privado por 24 horas, a taxa de proliferação celular, medida pela incorporação de EdU, aumentou significativamente.

O fato de que, no modelo de enteroide, todas as células estão em contato com o agonista da via Wnt R-spondin, mas apenas as células na região da cripta entram em proliferação, e que a glutamina possui um efeito nessa proliferação, sugere o envolvimento da glutamina na via Wnt/ β -catenina.

6.2 Apoptose Celular

Não foi possível quantificar a morte celular no epitélio devido à rápida expulsão das células para o interior do enteroide. A ausência de células marcadas para caspase-clivada-3 pode indicar a descamação de células apoptóticas para o lúmen de forma rápida, dessa forma não sendo encontrada marcação no epitélio. Que o epitélio consegue preservar a viabilidade celular, o quanto disso pode ser atribuído ao matrigel é incerto, mas a reposição de glutamina após 24 horas de deprivação causa a proliferação na base das criptas, indicando que algumas dessas células ainda estavam viáveis.

Estudos têm mostrado que a presença de glutamina, em níveis fisiológicos (1-4mM) é efetiva em prevenir apoptose de células intestinais (RHOADS & WU, 2009)

Moore e colaboradores (dados ainda não publicados) utilizaram um luminômetro para quantificar células Caspase-3/7 ativadas positivas (caspases 3/7 ativados são marcadores de apoptose) marcadas por imunofluorescência presentes em todo o enteroide e eles observaram que privação de glutamina durante um período de 40 horas causou um aumento significativo no número de células apoptóticas, aumento que já é significativo a partir de 24 horas.

6.3 Progênie de Células de Paneth e Células Caliciformes

Observando os resultados anteriores, onde as células sofrem redução da divisão celular após a retirada da glutamina do meio, o efeito da glutamina na progênie de células secretoras (Paneth e Caliciformes) não pode ser bem definido.

O tempo para a renovação completa do epitélio intestinal *in vivo* é de 3-5 dias, e o tempo de renovação do epitélio do modelo enteroide ainda não foi definido. Especificamente, as células caliciformes apresentam um *turnover* mais acelerado, em torno de 3 dias, já as células de Paneth apresentam um bem maior, em torno de 20 dias (SANTA BARBARA, DE *et al.*, 2003). A taxa de crescimento do sistema *in vitro* não pode ser relacionada diretamente com *in vivo*, já que existe um fonte de fatores de crescimentos exógena que estimula uma rápida proliferação celular, mas a fisiologia *in vivo* deve ser considerada. A glutamina pode possuir um efeito sobre a progênie das células do epitélio, mas as condições e o tempo necessário para essa mudança não pode ser observado nesse estudado.

É importante salientar que a diferenciação celular é direcionada principalmente pela via Notch com algum envolvimento da via Wnt e até o momento não há evidências de que a glutamina possa atuar nessas vias no que diz respeito à diferenciação celular no epitélio intestinal.

6.4 Conteúdo das células secretoras

Houve uma redução da expressão relativa de lisozima privado de glutamina, o que pode indicar que a glutamina tem algum papel na regulação da síntese de lisozima ou é importante para o metabolismo da célula de Paneth em geral.

Outra possibilidade pode ser devido à metodologia escolhida para a quantificação das células. Devido ao crescimento em três dimensões dos enteroides, a escolha do local onde se realiza a contagem das células pode ter interferido. A técnica de citometria de fluxo poderia ser utilizada para se obter uma contagem mais precisa do número de células de cada linhagem em relação ao número total de células do enteroide, o que pode levar há um número maior de células de Paneth no meio padrão, explicando o aumento da quantidade de RNAm para lisozima.

6.5 Reconhecimentos de patógenos pelo epitélio intestinal (TLR e MD-2)

Não foi detectada a transcrição do receptor do tipo Toll-like 2 (A sequência do primer foi analisada na plataforma BLAST do NCBI e confirmada como correta) e não houve diferença na transcrição do tipo Toll-like 4, mas houve diferença na transcrição da proteína acessória do receptor Toll-like 4, MD-2, onde os enteroides obtidos do meio privado de glutamina apresentaram uma menor transcrição relativa quando comparada ao gene de referência que quando comparado aos enteroides obtidos de meio contendo glutamina. Esta proteína é importante na responsividade ao LPS.

Wolfs e colaboradores (2010) mostraram que a expressão de RNAm e a da proteína MD-2 em células epiteliais de íleo humano é co-localizada com a expressão de lisozima, indicando que as células de Paneth possam ser sua fonte e que o RNAm para TLR4 estava restrito as células da criptas, uma região povoada principalmente por estas células e células-tronco.

Gong e colaboradores (2010) observaram que camundongos com sinalização MyD88 (ativa após a ativação de TLR) bloqueada no epitélio intestinal apresentavam inflamações espontâneas no intestino delgado devido a um decréscimo de α -defensinas e RegIII γ derivados da células de Paneth, indicando um papel modulador da sinalização de TLR no intestino.

Estudos mostraram que quando camundongos knockout para TLR2 ou TLR4 eram expostos às bactérias presentes no lúmen, através da administração oral de dextran sódio sulfato (DSS - um composto capaz de danificar o epitélio intestinal e expor a lâmina própria), estes apresentavam uma taxa de mortalidade maior do que quando comparada com animais do tipo selvagem. Um efeito semelhante era observado quando animais selvagens recebiam antibióticos de amplo espectro antes do agente agressor, sugerindo que a interação entre a microbiota normal e os receptores protege de alguma forma o epitélio. (SANTAOLALLA *et al.*, 2011)

Se por um lado a não responsividade dos TLR não é apreciada, a sua ativação constante pode levar a patologias. Em um estudo com camundongos que expressavam TLR4 constitutivamente ativos no epitélio intestinal o DSS causou uma potente resposta inflamatória, com grande produção de TNF- α e COX-2, que podia ser fatal (FUKATA & HERNANDEZ, 2009)(SANTAOLALLA *et al.*, 2011).

6.6 Expressão de citocinas

As células de Paneth expressam de maneira constitutiva o gene para TNF-alfa, e embora o RNA fosse facilmente encontrado, a proteína não era expressa devido a um mecanismo regulatório pós-transcricional (KESHAV *et al.*, 1990) (CHEN; SHYU, 1995)(Keshav, 2006)). Se essa produção de TNF-alfa é em resposta a agressão ainda não está perfeitamente esclarecido.

Liboni e colaboradores (2005), em um trabalho utilizando células de linhagens H4 (que simulam enterócitos imaturos) e células Caco-2 (que simulam enterócitos maduros) mostram que a produção de IL-8 estava aumentada quando estas células eram privadas de glutamina por 24 horas e que estas reagiam de maneira exacerbada quando expostas ao LPS e quando comparadas com os controles com glutamina. Outra informação interessante era que os enterócitos imaturos eram mais sensíveis a esta estimulação que os mais diferenciados.

Coëffier e colaboradores (2001), em trabalho utilizando biópsia de jejuno de voluntários saudáveis, constataram que a concentração de IL-8 era menor naqueles que recebiam uma solução com glutamina e tinha seus fragmentos cultivados em meio com glutamina do que aqueles fragmentos provenientes de voluntários que recebiam salina e tinham seus fragmentos cultivados em meio sem glutamina. Essa diferença também foi observada em amostras de voluntários que receberam salina e tiveram seus fragmentos cultivados em meio com glutamina quando comparadas com aqueles cultivados em meio sem glutamina. O estudo não detectou IL-1 β e TNF- α em níveis suficientes para realizar análises estatísticas, mas não detectou alterações nos níveis de mRNA para IL-1 β , TNF- α e IL-8 nos fragmentos de biópsia de voluntários que receberam ou não glutamina, sugerindo um provável mecanismo regulatório pós-transcrição para pelo menos IL-8.

Coëffier e colaboradores (2003), em um outro trabalho utilizando biópsia de duodeno de voluntários saudáveis cultivados em cultura, observaram que IL-1 β (dose de 2ng/mL) estimulava a produção de IL-6 e IL-8, mas não afetava a produção de IL-4 e 10 e que em concentrações crescentes de glutamina (0,5-10mM) reduzia a produção de IL-6 e 8, enquanto aumentava a produção de IL-10 (doses mais altas de glutamina aumentavam a expressão de RNAm para IL-10, mas o aumento da proteína só foi detectado após estimulação com IL-1 β). Novamente não houve diferenças nos transcritos para IL-8 e TNF- α não foi detectado nas amostras

7 CONCLUSÃO

A importância da glutamina como combustível para os enterócitos já é conhecida, mas o seu papel sobre as outras linhagens do epitélio intestinal ainda não foi bem estudado. Parte disso se deve ao fato de que, isoladamente, o epitélio intestinal não havia sido bem reproduzido *in vitro*. O cultivo de células diferenciadas requeria a administração exógena de fatores de crescimento específico para cada tipo de linhagem celular que se desejasse estudar.

O modelo de organoide intestinal é capaz de gerar um epitélio intestinal contendo as principais linhagens celulares (células de Paneth, caliciformes, enteroendócrinas e enterócitos) de maneira em que estas mantêm a produção de seus produtos específicos e posição relativa à estrutura vilo-cripta de maneira semelhante a observada *in vivo*, possuindo inclusive alguns elementos do sistema imune inato responsáveis pela responsividade ao LPS (TLR4 e MD-2), algo que outros modelos *in vitro* não possuem de maneira completa.

Quanto ao efeito da privação de glutamina sobre as células secretoras do epitélio, aquela parece possuir ação regulatória sobre as células de Paneth, visto que as maiores diferenças observadas são em produtos dessa linhagem celular em meio privado de glutamina, tais como:

- Redução da transcrição de lisozima.
- Redução da transcrição de MD-2, a proteína acessória do TLR4.
- Redução da transcrição de TNF- α , encontrada constitutivamente nessas células.

Mais estudos são necessários para o melhor entendimento do papel da glutamina nessas células e o modelo de enteroides parece ser o ideal para esses estudos, pois apresenta um epitélio diferenciado e consegue prover uma arquitetura vilo-cripta semelhante a observada *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. August, p. 782–787, 2000.
- ADIB-CONQUY, M.; MOINE, P.; ASEHNOUNE, K.; *et al.* Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 168, n. 2, p. 158–64, 15 jul 2003.
- AKASHI, S.; NAGAI, Y.; OGATA, H.; *et al.* Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. **International immunology**, v. 13, n. 12, p. 1595–9, dez 2001.
- ANDREU, P.; COLNOT, S.; GODARD, C.; *et al.* Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 6, p. 1443–51, mar 2005.
- ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A.; HOLM, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. 922–929, 2001.
- AYABE, T.; SATCHELL, D. P.; WILSON, C. L.; *et al.* Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature immunology**, v. 1, n. 2, p. 113–8, ago 2000.
- BARKER, N.; CLEVERS, H. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. 1681–96, maio 2010.
- BEUTLER, B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 1, p. 20–6, fev 2000.
- BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 356–68, maio 2011.
- BRANDL, K.; PLITAS, G.; MIHU, C. N.; *et al.* Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 804–7, 9 out 2008.
- BRANDL, K.; PLITAS, G.; SCHNABL, B.; DEMATTEO, R. P.; PAMER, E. G. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 204,

n. 8, p. 1891–900, 6 ago 2007.

BURGER-VAN PAASSEN, N.; LOONEN, L. M. P.; WITTE-BOUMA, J.; *et al.* Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 β , Reg3 γ and angiogenin-4. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38798, jan 2012.

CASH, H. L.; WHITHAM, C. V; BEHRENDT, C. L.; HOOPER, L. V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5790, p. 1126–30, 25 ago 2006.

CHEN, C.; SHYU, A. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, p. 465–470, 1995.

CHOW, J. C. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689–10692, 16 abr 1999.

CHUANG, T. H.; ULEVITCH, R. J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **European cytokine network**, v. 11, n. 3, p. 372–8, set 2000.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469–80, 3 nov 2006.

COËFFIER, M. Modulating effect of glutamine on IL-1 β -induced cytokine production by human gut. **Clinical Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 407–413, ago 2003.

COËFFIER, M.; MIRALLES-BARRACHINA, O.; PESSOT, F. LE; *et al.* Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 148–54, 7 fev 2001.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 5, p. 349–59, maio 2006.

CROSNIER, C.; VARGESSON, N.; GSCHMEISSNER, S.; *et al.* Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 5, p. 1093–104, mar 2005.

DAVIS, C. W.; DICKEY, B. F. Regulated airway goblet cell mucin secretion. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 487–512, jan 2008.

DIGNASS, A U.; STURM, A. Peptide growth factors in the intestine. **European journal of**

gastroenterology & hepatology, v. 13, n. 7, p. 763–70, jul 2001.

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 5, p. 585–590, out 1999.

ES, J. H. VAN; GIJN, M. E. VAN; RICCIO, O.; *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature**, v. 435, n. 7044, p. 959–63, 16 jun 2005.

ES, J. H. VAN; JAY, P.; GREGORIEFF, A.; *et al.* Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. **Nature cell biology**, v. 7, n. 4, p. 381–6, abr 2005.

ES, J. VAN; CLEVERS, H. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 11, p. 496–502, 2005.

EVANS, G. S.; FLINT, N.; SOMERS, A S.; EYDEN, B.; POTTEN, C. S. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. **Journal of cell science**, v. 101 (Pt 1, p. 219–31, jan 1992.

FEVR, T.; ROBINE, S.; LOUVARD, D.; HUELSKEN, J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 21, p. 7551–9, nov 2007.

FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 497–504, jun 2004.

FODDE, R.; BRABLETZ, T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 150–8, abr 2007.

FRE, S.; HUYGHE, M.; MOURIKIS, P.; *et al.* Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. **Nature**, v. 435, n. 7044, p. 964–8, 16 jun 2005.

FUKATA, M.; HERNANDEZ, Y. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 7, p. 997–1006, 2009.

GENE, D. P.; ABREU, M. T.; VORA, P.; *et al.* Decreased Expression of Toll-Like Receptor-4 and MD-2 Correlates with Intestinal Epithelial Cell Protection Against Dysregulated Proinflammatory Gene Expression in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. 2013.

GONG, J.; XU, J.; ZHU, W.; *et al.* Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v.

136, n. 2, p. 245–56, ago 2010.

HARAMIS, A.-P. G.; BEGTHEL, H.; BORN, M. VAN DEN; *et al.* De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5664, p. 1684–6, 12 mar 2004a.

HARAMIS, A.-P. G.; BEGTHEL, H.; BORN, M. VAN DEN; *et al.* De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5664, p. 1684–6, 12 mar 2004b.

HAYASHI, M.; SAKAI, T.; HASEGAWA, Y.; *et al.* Physiological mechanism for enhancement of paracellular drug transport. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 62, n. 1-2, p. 141–8, 1 nov 1999.

HE, X. C.; ZHANG, J.; TONG, W.-G.; *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. **Nature genetics**, v. 36, n. 10, p. 1117–21, out 2004.

HEATH, J. P. Epithelial cell migration in the intestine. **Cell biology international**, v. 20, n. 2, p. 139–46, fev 1996.

HOWELL, J. C.; WELLS, J. M. Generating intestinal tissue from stem cells: potential for research and therapy. **Regenerative medicine**, v. 6, n. 6, p. 743–55, nov 2011.

ISHIZUYA-OKA, A.; HASEBE, T. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. **Digestion**, v. 77 Suppl 1, n. suppl 1, p. 42–7, jan 2008.

ISHIZUYA-OKA, A.; HASEBE, T.; SHIMIZU, K.; SUZUKI, K.; UEDA, S. Shh/BMP-4 signaling pathway is essential for intestinal epithelial development during *Xenopus* larval-to-adult remodeling. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 235, n. 12, p. 3240–9, dez 2006.

JENSEN, J.; PEDERSEN, E. E.; GALANTE, P.; *et al.* Control of endodermal endocrine development by Hes-1. **Nature genetics**, v. 24, n. 1, p. 36–44, jan 2000.

JOHANSSON, M. E. V.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J.; *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 15064–15069, 19 set 2008.

KESHAV, B. Y. S.; LAWSON, L.; CHUNG, I. L. P.; *et al.* Brief Definitive Report tumor

necrosis factor mRNA localized to Paneth cells of normal murine intestinal epithelium by *in situ* hybridization. *v.* 171, *n.* January, p. 0–5, 1990.

KESHAV, S. Paneth cells : leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. 2006.

KINNEBREW, M.; UBEDA, C. Bacterial flagellin stimulates TLR5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. **Journal of Infectious Diseases**, *v.* 201, *n.* 4, p. 534–543, 2010.

KODACH, L. L.; WIERCINSKA, E.; MIRANDA, N. F. C. C. DE; *et al.* The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. **Gastroenterology**, *v.* 134, *n.* 5, p. 1332–41, maio 2008.

KORINEK, V.; BARKER, N.; MOERER, P.; *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nature genetics**, *v.* 19, *n.* august, p. 379–383, 1998.

KÜHL, S. J.; KÜHL, M. On the role of Wnt/ β -catenin signaling in stem cells. **Biochimica et biophysica acta**, *v.* 1830, *n.* 2, p. 2297–306, fev 2013.

KUHNERT, F.; DAVIS, C. R.; WANG, H.-T.; *et al.* Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *v.* 101, *n.* 1, p. 266–71, 6 jan 2004.

LAUDANSKI, K.; DE, A.; BROUXHON, S.; KYRKANIDES, S.; MILLER-GRAZIANO, C. Abnormal Pge2 Regulation of Monocyte Tnf-?? Levels in Trauma Patients Parallels Development of a More Macrophage-Like Phenotype. **Shock**, *v.* 22, *n.* 3, p. 204–212, set 2004.

LENDEMANS, S.; KREUZFELDER, E.; RANI, M.; *et al.* Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. **The Journal of trauma**, *v.* 63, *n.* 4, p. 740–6, out 2007.

LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science (New York, N.Y.)**, *v.* 327, *n.* 5965, p. 542–5, 29 jan 2010.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual review of cell and developmental biology**, *v.* 21, p. 605–31, jan 2005.

LI, N.; LEWIS, P.; SAMUELSON, D.; LIBONI, K.; NEU, J. Glutamine regulates Caco-2 cell

tight junction proteins. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 287, n. 3, p. G726–33, set 2004.

LIBONI, K. C.; LI, N.; SCUMPIA, P. O.; NEU, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 2, p. 245–51, fev 2005.

MARC RHOADS, J.; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 111–22, maio 2009.

MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. The intestinal epithelial stem cell. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 24, n. 1, p. 91–8, jan 2002.

MCGUCKIN, M. A.; LINDÉN, S. K.; SUTTON, P.; FLORIN, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 265–78, abr 2011.

MEDEMA, J. P.; VERMEULEN, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 318–326, 15 jun 2011.

MOLOFSKY, A. V.; PARDAL, R.; MORRISON, S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 6, p. 700–7, dez 2004.

MORAN-RAMOS, S.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. Diet : Friend or Foe of Enteroendocrine Cells : How It Interacts with Enteroendocrine Cells 1 , 2. p. 8–20, 2012.

MUKHERJEE, S.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L. V. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 19, p. 3019–27, out 2008.

MUNCAN, V.; SANSOM, O. J.; TERTOOLEN, L.; *et al.* Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 22, p. 8418–26, nov 2006.

NAKAMURA, T.; TSUCHIYA, K.; WATANABE, M. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. **Journal of gastroenterology**, v. 42, n. 9, p. 705–10, set 2007.

NIESS, J. H.; BRAND, S.; GU, X.; *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5707, p. 254–8, 14 jan 2005.

NUSSE, R.; FUERER, C.; CHING, W.; *et al.* Wnt signaling and stem cell control. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 73, p. 59–66, jan 2008.

OHLSTEIN, B.; KAI, T.; DECOTTO, E.; SPRADLING, A. The stem cell niche: theme and variations. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 6, p. 693–9, dez 2004.

PÉREZ-BÁRCENA, J.; CRESPI, C.; REGUEIRO, V.; *et al.* Lack of effect of glutamine administration to boost the innate immune system response in trauma patients in the intensive care unit. **Critical care (London, England)**, v. 14, n. 6, p. R233, jan 2010.

PERREAULT, N.; BEAULIEU, J. F. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. **Experimental cell research**, v. 224, n. 2, p. 354–64, 1 maio 1996.

PINTO, D.; CLEVERS, H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 3, p. 185–196, 9 mar 2005.

PINTO, D.; GREGORIEFF, A.; BEGTHEL, H.; CLEVERS, H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. **Genes & Development**, v. 17, p. 1709–1713, 2003.

PORTER, E.; BEVINS, C.; GHOSH, D.; GANZ, T. The multifaceted Paneth cell. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 59, p. 156–170, 2002.

RESCIGNO, M. CCR6(+) dendritic cells: the gut tactical-response unit. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 508–10, maio 2006.

RICHMOND, C. A.; BREAU, D. T. Regulation of gene expression in the Intestinal Epithelium. **Prog Mol Bio Transl Sci**, v. 96, p. 207–229, 2010.

RINDI, G.; LEITER, A. B.; KOPIN, A. S.; BORDI, C.; SOLCIA, E. The “Normal” Endocrine Cell of the Gut: Changing Concepts and New Evidences. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1014, n. 1, p. 1–12, abr 2004.

ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S–2031S, out 2008.

RUMIO, C.; BESUSSO, D.; PALAZZO, M.; *et al.* Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 2, p. 373–81, ago 2004.

SANGIORGI, E.; CAPECCHI, M. R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. **Nature genetics**, v. 40, n. 7, p. 915–20, jul 2008.

SANSOM, O.; REED, K.; HAYES, A. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. **Genes & development**, v. 18, p. 1385–1390, 2004.

SANTA BARBARA, P. DE; BRINK, G. R. VAN DEN; ROBERTS, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 7, p. 1322–32, jul 2003.

SANTAOLALLA, R.; FUKATA, M.; ABREU, M. Innate immunity in the small intestine. **Current opinion in gastroenterology**, v. 27, n. 2, p. 125–131, 2011.

SATO, T.; ES, J. H. VAN; SNIPPERT, H. J.; *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 415–8, 20 jan 2011.

SATO, T.; VRIES, R. G.; SNIPPERT, H. J.; *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 262–5, 14 maio 2009.

SAWADA, M.; TAKAHASHI, K.; SAWADA, S.; MIDORIKAWA, O. Selective killing of Paneth cells by intravenous administration of dithizone in rats. **Int. J. Exp. Path**, v. 72, p. 407–421, 1991.

SCHRÖDER, N.; GOSSLER, A. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. **Gene expression patterns**, v. 2, p. 247–250, 2002.

SCHUSTER, J. M.; NELSON, P. S. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 67, n. 6, p. 767–73, jun 2000.

SCOVILLE, D. H.; SATO, T.; HE, X. C.; LI, L. Current view: intestinal stem cells and signaling. **Gastroenterology**, v. 134, n. 3, p. 849–64, mar 2008.

SÉMONT, A.; MOUSEDINE, M.; FRANÇOIS, A.; *et al.* Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 6, p. 952–61, jun 2010.

SHAKER, A.; RUBIN, D. C. Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 156, n. 3, p. 180–7, set 2010.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; *et al.* MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–82, 7 jun 1999.

TESORI, V.; PUGLISI, M. A.; LATTANZI, W.; GASBARRINI, G. B.; GASBARRINI, A. Update on small intestinal stem cells. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 29, p. 4671–8, 7 ago 2013.

THORNTON, D. J.; ROUSSEAU, K.; MCGUCKIN, M. A. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 459–86, jan 2008.

VAISHNAVA, S.; BEHRENDT, C. L.; ISMAIL, A. S.; ECKMANN, L.; HOOPER, L. V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20858–63, 30 dez 2008.

VAISHNAVA, S.; YAMAMOTO, M.; SEVERSON, K. M.; *et al.* The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6053, p. 255–8, 14 out 2011.

VILSBØLL, T.; HOLST, J. J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 357–66, mar 2004.

WANG, W. W.; QIAO, S. Y.; LI, D. F. Amino acids and gut function. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 105–10, maio 2009.

WEHKAMP, J.; HARDER, J.; WEICHENTHAL, M.; *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1658–64, nov 2004.

WISCHMEYER, P. E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; *et al.* Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 90, n. 6, p. 2403–10, jun 2001.

WOLFS, T. G. A M.; DERIKX, J. P. M.; HODIN, C. M. I. M.; *et al.* Localization of the lipopolysaccharide recognition complex in the human healthy and inflamed premature and adult gut. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 68–75, jan 2010.

WONG, M. H.; SAAM, J. R.; STAPPENBECK, T. S.; REXER, C. H.; GORDON, J. I. Genetic mosaic analysis based on Cre recombinase and navigated laser capture microdissection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12601–6, 7 nov 2000.

YEN, T.-H.; WRIGHT, N. A. The gastrointestinal tract stem cell niche. **Stem cell reviews**, v.

2, n. 3, p. 203–12, jan 2006.

YEUNG, T. M.; CHIA, L. A.; KOSINSKI, C. M.; KUO, C. J. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 15, p. 2513–23, ago 2011.

ZECCHINI, V.; DOMASCHENZ, R.; WINTON, D.; JONES, P. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. **Genes & develop**, v. 19, p. 1686–1691, 2005.