

LUANA DE MENDONÇA OLIVEIRA

Efeito da suplementação materna com ácido retinoico durante a amamentação no sistema imunológico da prole de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2018

LUANA DE MENDONÇA OLIVEIRA

Efeito da suplementação materna com ácido retinoico durante a amamentação no sistema imunológico da prole de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof^aDr^a Maria Notomi Sato

Versão original.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Mendonça Oliveira, Luana
Efeito da suplementação materna com ácido
retinoico durante a amamentação no sistema
imunológico da prole de camundongos / Luana de
Mendonça Oliveira; orientadora Maria Notomi Sato. --
São Paulo, 2018.
107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ácido Retinoico. 2. Imunidade neonatal. 3.
Linfócitos T reguladores. 4. Colite. 5. Microbiota
intestinal. I. Notomi Sato, Maria, orientador. II.
Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Luana de Mendonça Oliveira

Titulo da Tese: **Efeito da suplementação materna com ácido retinoico durante a amamentação no sistema imunológico da prole de camundongos**

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeito do ácido retinóico em lactantes na geração de células dendríticas e Th17/T reguladoras da prole de camundongos e na modulação do exsudato inflamatório**", registrado sob o protocolo nº **13/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **19/04/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação. Ressaltamos que este certificado tem validade somente para as pesquisas realizadas a partir desta data e que qualquer pesquisa deste projeto utilizando animal, anterior a esta data, não foi validada pela CEUA-ICB/USP.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Notomi Sato**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Luana de Mendonça Oliveira (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Effects of retinoic acid in lactating in the generation of Th17 / T regulatory cells of the offspring mice and modulation of the inflammatory response**", protocol nº **13/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/19/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

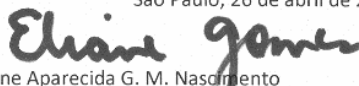
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Notomi Sato**

- Team members: *Luana de Mendonça Oliveira (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>C57bl/6 Foxp3 GFP</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>20-25 g</i>	<i>42</i>
	<i>C57bl/6 Foxp3 GFP</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>20-25 g</i>	<i>42</i>
	<i>C57bl/6 Foxp3 GFP</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>10-12 g</i>	<i>48</i>
	<i>C57bl/6 Foxp3 GFP</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>10-12 g</i>	<i>48</i>
	<i>C57bl/6</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>20-25 g</i>	<i>10</i>
	<i>C57bl/6</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>20-25 g</i>	<i>10</i>
	<i>C57bl/6</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>10-12 g</i>	<i>15</i>
	<i>C57bl/6</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>10-12 g</i>	<i>15</i>
	<i>Balb/c</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>10-15 g</i>	<i>45</i>
	<i>Balb/c</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>10-15 g</i>	<i>45</i>


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

São Paulo, 26 de abril de 2016.

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 26 de Fevereiro de 2014

Ilmo(a)

Dr(a). Maria Notomi Sato

(aos cuidados de Luana de Mendonça Oliveira)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/250 'Efeito do ácido retinóico em lactantes na geração de células dendríticas e Th17/T reguladoras da prole de camundongos e na modulação do exsudato inflamatório'**, sob a sua responsabilidade. Como o projeto envolve a manipulação de animais transgênicos deve ser encaminhado para apreciação da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio do HCFMUSP.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha mãe Evanira, ao meu pai Jodival, à minha irmã Lívia, por todo apoio, amor e confiança, durante a elaboração deste trabalho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Maria Notomi Sato primeiramente pela oportunidade concedida de poder trabalhar e fazer parte do grupo. Pelo carinho, amizade, companheirismo, dedicação (total), orientação e acima de tudo pela paciência (que foi muita) ao longo de todos esses anos. Por ter acreditado e confiado em mim para desenvolver esse trabalho e pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional e, acima de tudo, crescimento pessoal. Com certeza é uma pessoa admirável e um grande exemplo profissional e de orientação, estando sempre, sempre mesmo, a disposição. Obrigada por todas as noites não dormidas que foram dedicadas a me auxiliar. Obrigada por tudo e por me inspirar a ser uma pesquisadora e um ser humano melhor.

Ao Prof^o Dr. Alberto José da Silva Duarte pela infraestrutura e qualidade do laboratório.

À Franciane Mouradian (Fran), pela amizade, carinho, compreensão, conversas no biotério em momentos realmente difíceis para as duas e pelas risadas também, por dividirmos nossos problemas (B.Os) de biotério, experimentais, pessoais... e por toda a ajuda na elaboração desse trabalho, ajuda essa que não foi pouca (não mesmo), sem ela esse trabalho não poderia ser concluído.

À Anna Júlia (Anna Jay) pelo carinho, companheirismo, por nossas conversas laboratoriais noturnas, enquanto eu aguardava incubações de marcação de citometria e ela aguardava a leitura de uma placa de PCR, por ter me adotado como “mãe laboratorial”, apesar da minha relutância em adotá-la como filha.

À Anna Cláudia (Anninha) e a Nátalli Zanete (Nati) por me aguentarem durante todo esse tempo em que estive no laboratório, afinal estamos juntas desde o começo e eu nunca esqueço que foram as primeiras pessoas que conversaram comigo, assim que ingressei no laboratório, e sempre me ajudaram em tudo que podiam.

Ao Fábio Seiti (Fabinho) pela amizade, paciência e por ser sempre, não só a minha, mas a luz do fim do túnel para todos no laboratório. Realmente é uma mente brilhante.

À Luanda Oliveira (a outra Lu), pela amizade, pela calma e por compartilhar seus conhecimentos comigo. É a minha “guru” em análises de citometria de fluxo, Flowjo e afins.

À todos os amigos do grupo Experimental que sempre trouxeram aos meus dias mais alegria: Iara, Augusto, Nilson, Kelly, Marina, Yasmin Elaine, Cyro, Alexia e Danielle.

Ao Jefferson Russo (Jeff) pela oportunidade de ingressar no grupo Experimental como TT3 e assim aprender a gostar da pesquisa.

À toda equipe dos setores técnicos do LIM-56: Noêmia (citometria), Eduardo (carga viral), e Tatiana (cultura celular).

Aos funcionários do LIM-56 que nos oferecem suporte, auxílio e apoio em diversos momentos: Edna, Lúcio, Luiz, Evelyn, Cristina e Celeste (secretaria); Anderson e Marcelo (informática); Adriana (lavagens dos materiais de laboratório); Sílvia (limpeza e lavagem de materiais).

Aos funcionários do biotério pelo cuidado com nossos animais: Andréia, Edilma e Luiz.

Aos amigos e professores do Departamento de Imunologia, pelo apoio e amizade.

À secretária Eni pelo apoio, carinho, paciência e ajuda com as constantes dúvidas.

À Denise da Fonseca por toda a ajuda no momento em que estava meio sem rumo no trabalho.

À Prof^a. Yasmine Belkaid, que abriu as portas do seu laboratório (NIH – Seção de Imunologia de Mucosa - EUA) para que eu pudesse aprender um pouquinho sobre imunidade de mucosa.

Ao CNPq pela concessão de bolsa e a FAPESP pelo suporte financeiro.

Em especial, agradeço à minha mãe Evanira Dantas e meu pai Jodival Carvalho por terem sido a base da minha educação durante toda a minha vida. Por sempre, sempre mesmo, acreditarem em mim, mesmo quando não merecia tanto crédito, por serem meu suporte, minha força, minha esperança, e por nunca me deixarem desanimar nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha irmã Livia Mendonça, por todo o companheirismo e por sempre trazer um pouco de frescor e força quando eu já não conseguia mais enxergar o mundo com otimismo.

À todos meus familiares e amigos por todo apoio e carinho.

E à todos que contribuíram, de alguma forma, para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!!!

“ A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

OLIVEIRA, L. M. **Efeito da suplementação materna com RA durante a amamentação no sistema imunológico da prole de camundongos.** 2018. 107p Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

O ácido retinoico (RA), metabolito ativo da vitamina A, exerce ampla atividade biológica sobretudo na modulação da resposta imunológica. A interação do RA com os seus receptores nucleares induz a transcrição de genes que atuam na homeostase de sítios imunológicos, principalmente no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT). O RA promove a diferenciação de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, a migração de células efetoras para a mucosa intestinal induzindo a expressão de CCR9 e $\alpha 4\beta 7$, além de inibir a diferenciação de linfócitos T *helper* (Th) 17 no intestino, garantindo a homeostase intestinal. Entretanto, eventos mediados pelo RA durante o desenvolvimento do sistema imunológico neonatal ainda não são totalmente conhecidos, principalmente no contexto materno-fetal. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação materna com RA, durante a amamentação, no sistema imunológico da prole. Para tanto, camundongos fêmeas C57BL6 Foxp3-GFP receberam 6 doses de RA (1mg/gavagem), durante o período de amamentação, e o grupo controle recebeu apenas óleo vegetal. Os resultados mostram que a suplementação materna com RA foi capaz modular o sistema imunológico da prole aumentando o percentual de linfócitos T reguladores (Treg) esplênicos nas proles com 6 semanas de idade. Além disso, houve aumento percentual de linfócitos Treg, TCD4⁺ e TCD8⁺ que expressam CCR9, tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos da mães e de suas prole, o que pode proporcionar a migração de células para o intestino. Este efeito foi duradouro nas proles até 6 semanas de idade. A suplementação materna com RA elevou o percentual de linfócitos Treg e linfócitos B IgA⁺ no intestino das proles, e a concentração de imunoglobulina (Ig) A fecal, mas não alterou a composição da microbiota intestinal. Nas mães suplementadas houve redução das concentrações séricas de IgA e IgG. Em contraste com o efeito tolerogênico do RA na lâmina própria do intestino, observamos o aumento sérico de *interferon* (IFN)- γ nas proles de mães suplementadas e aumento na secreção de IFN- γ por esplenócitos induzida por CL097 (agonista de *Toll-like receptor* 7/8), sugerindo que o RA pode ter um impacto importante na deficiente resposta de perfil Th1 nos neonatos. Para averiguar o efeito modulatório *in vivo* da suplementação materna de

RA, foi avaliada a indução de colite por sulfato de sódio dextrano (DSS) nas proles. Não houve perda de peso acentuado nas proles de mães suplementadas com RA quando comparado às proles de mães controles, além de apresentarem a permeabilidade intestinal conservada e aumento do fator de transformação do crescimento (TGF)- β no homogenato intestinal, indicando menor dano no tecido epitelial do intestino. Apesar disto, o RA não foi capaz de inibir totalmente o processo inflamatório na colite. No conjunto, os achados evidenciam que a suplementação materna com RA foi importante no desenvolvimento da imunidade de mucosa e na manutenção da homeostase intestinal, sendo um importante metabólito para atenuar respostas inflamatórias. A indução sérica de IFN- γ e após estímulo com CL097 pode indicar o uso de RA como estratégia para potencializar respostas Th1, crucial contra infecções virais e bacterianas no período neonatal.

Palavras chaves: ácido retinoico, imunidade neonatal, amamentação, linfócitos T reguladores, colite e microbiota intestinal.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. M. **Effect of maternal RA supplementation during breastfeeding on the immune system of the offspring**. 2018. 107p Thesis (Doctor in Immunology) - Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, 2018

Retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A, exerts extensive biological activity mainly in the modulation of the immune response. The interaction of RA with its nuclear receptors induces the transcription of genes that acts on the homeostasis of immunological sites, especially in gut associated lymphoid tissue (GALT). RA promotes the differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, migration of effector cells to the intestinal mucosa through gut-homing receptors CCR9 and α 4 β 7, besides inhibiting the differentiation of T helper (Th) 17 cells in the gut, guaranteeing intestinal homeostasis. However, events mediated by RA during the development of the neonatal immune system are not totally known, especially in the maternal-fetal context. Thus, the aim of the study was to evaluate the effect of maternal RA supplementation during breastfeeding on the immune system of offspring. For this, C57BL/6 Foxp3-GFP female mice with 8-10 weeks-old received 6 doses of RA (1mg / gavage) during the breastfeeding period, and the control group received only vegetable oil. The results show that maternal RA supplementation was able to modulate the offspring immune system by increasing the percentage of splenic regulatory T (Treg) cells in offspring at 6 weeks of age. In addition, there was an enhancement in the CCR9 expression on regulatory T cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in the spleen and in the mesenteric lymph nodes of mothers and their offspring, which can provide migration of cells into the gut. This effect was long-term in offspring up to 6 weeks of age. Maternal RA supplementation also increasing the percentage of regulatory T cells and B IgA⁺ cells in the offspring's gut, beside increasing the fecal immunoglobulin (Ig) A concentration, but did not alter the composition of the intestinal microbiota. In the supplemented mothers, serum concentrations of IgA and IgG were reduced. In contrast to the tolerogenic effect of RA on intestinal lamina propria, we observed a serum increase of interferon (IFN)- γ in offspring and increasing in CL097(Toll-like receptor 7/8 agonist)-induced IFN- γ secretion by splenocytes, suggesting that RA may have a significant impact on the deficient Th1 profile response in neonates. To investigate the modulatory effect in of RA maternal supplementation, was evaluated the induction of colitis by dextran sodium sulfate (DSS) in the offspring. There was no significant weight loss in the offspring from mothers supplemented with RA in

comparison with the offspring from control mothers, as well as having preserved intestinal permeability and increased transforming growth factor (TGF)- β in the intestinal homogenate, indicating less damage to intestinal epithelial tissue. Despite this, RA was not able to totally inhibit the inflammatory process in colitis. Taken together, the findings show that maternal RA supplementation was important in the development of mucosal immunity and maintenance of intestinal homeostasis, being an important metabolite to attenuate inflammatory responses. Induction of serum IFN- γ after TLR7/8 (CL097) stimulation may indicate the use of RA as a strategy to potentiate Th1 responses, crucial against viral and bacterial infections in the neonatal period.

Key words: retinoic acid, neonatal immunity, breastfeeding, regulatory T cells, intestinal colitis and microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolização e sinalização do RA.	27
Figura 2. Papel do RA nas células do sistema imunológico.....	28
Figura 3. Representação esquemática do protocolo de suplementação materna com RA.....	41
Figura 4. Representação esquemática do protocolo de indução de colite com DSS	42
Figura 5. Estratégia de análise de citometria de fluxo para análise da frequência de linfócitos T CCR9+.	52
Figura 6. A suplementação materna com RA não altera o percentual de linfócitos Treg nas mães.....	53
Figura 7. A suplementação materna com RA não altera o percentual dos fenótipos de linfócitos T naïve, de memória efetora e central nas mães.....	55
Figura 8. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos Treg e TCD8+ que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos da mãe.....	57
Figura 9. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos T naïve, de memória central e memória efetora que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos da mãe ao final da lactação.....	59
Figura 10. A suplementação materna com RA aumenta o percentual de linfócitos Treg no baço da prole com 6 semanas de idade.....	61
Figura 11. A suplementação materna com RA não altera o percentual dos fenótipos de linfócitos T naïve, de memória efetora e central nas proles.	62
Figura 12. Suplementação materna de RA eleva o percentual de linfócitos T CD4+ TCD8+ e Treg que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos das proles	64
Figura 13. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos T naïve, de memória central e efetora que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos das proles ..	66
Figura 14. Estratégia de análise para avaliação de linfócitos T e B presentes na lamina própria do intestino delgado.	68
Figura 15. A suplementação materna com RA eleva o percentual de linfócitos Treg e linfócitos B IgA+ na lâmina própria do intestino delgado das proles	69
Figura 16. Estratégia de análise de citometria de fluxo para linfócitos T produtores de citocinas	71
Figura 17. A suplementação materna com RA não influencia na produção <i>in vitro</i> de citocinas por linfócitos T	72
Figura 18. Efeito imunomodulador da suplementação materna com RA nas concentrações de anticorpos e citocinas séricas das proles.....	74
Figura 19. Análise do efeito da suplementação materna com RA nos anticorpos e TGF- β 1 no leite.	75

Figura 20. Efeito imunomodulador da suplementação materna com RA nas concentrações de anticorpos sérico e fecal e citocinas séricas nas mães	77
Figura 21. Efeito modulador da suplementação materna com RA na secreção de IFN- γ induzidas por CL097 em esplenócitos.....	78
Figura 22. A suplementação materna com RA não altera a microbiota intestinal das proles.	79
Figura 23. A suplementação materna com RA atenua a colite induzida por sulfato de sódio dextrano nas proles	82
Figura 24. Concentrações séricas de citocinas nas proles com colite induzida por sulfato de sódio dextrano.....	84
Figura 25. Concentrações de citocinas no homogenato do intestino das proles com colite induzida por sulfato de sódio dextrano.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Painel para marcação de CCR9 em linfócitos T.....	43
Tabela 2 - Painel para marcação de linfócitos T e B na lâmina própria do intestino delgado.	44
Tabela 3 - Painel para marcação de linfócitos T produtores de citocinas da lâmina própria do intestino delgado.....	45
Tabela 4 - Painel com o limite mínimo de detecção dos kits para dosagem de citocinas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH – álcool desidrogenase (do inglês – *alcohol dehydrogenase*)
- AID – enzima deaminase induzida pela ativação (do inglês – *activation induced deaminase*)
- APC – células apresentadoras de antígenos (do inglês – *antigen presenting cells*)
- atRA – forma *all-trans* do ácido retinoico (do inglês – *all-trans retinoic acid*)
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês – *Bovine serum albumin*)
- CCL25 – do inglês - *CC chemokine ligand 25*
- CCR9 – do inglês - *CC chemokine receptor 9*
- CG – centro germinativo
- CYP26 – família 26 do citocromo P450 (do inglês – *cytochrome P450 family 26*)
- DC – células dendríticas (do inglês – *dendritic cells*)
- DSS – sulfato de sódio dextrano (do inglês – *dextran sulfate sodium*)
- FMO – Fluorescência menor uma (do inglês – *Fluorescence Minus One*)
- GALT – tecidos linfoides associados à mucosa intestinal (do inglês – *gut associated lymphoid tissue*)
- GFP – do inglês - *Green fluorescent protein*
- IFN- interferon
- Ig – Imunoglobulina
- IL – interleucina
- ILCs – células linfoides inatas (do inglês – *innate lymphoid cells*)
- IRF4 – fator regulador do interferon 4 (do inglês – *interferon regulatory factor 4*)
- LPS – lipopolissacarídeo
- LRAT – lecitina retinol aciltransferase (do inglês – *lecithin retinol acyltransferase*)
- LTi - células indutoras de tecido linfóide (do inglês - *lymphoid tissue-inducing*)
- MadCAM-1 – do inglês - *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês – *Major Histocompatibility Complex*)

mLN – linfonodos mesentéricos (do inglês – *mesenteric lymph nodes*)

MoDCs – células dendríticas derivadas de monócitos (do inglês – *monocyte-derived dendritic cells*)

NLRs – receptores NOD-like (do inglês – *NOD-like receptors*)

PBS – *phosphate buffered saline*

PP – placa de Peyer

PPAR- β – receptor ativador da proliferação de peroxissomos beta (do inglês, *peroxisome proliferator-activating receptor beta*)

RA – ácido retinoico (do inglês – *retinoic acid*)

RALDH – retinal desidrogenase (do inglês – *retinal dehydrogenase*)

RAR – receptor de ácido retinoico (do inglês – *retinoic acid receptor*)

RAREs – elementos responsivos ao ácido retinoico (do inglês, *retinoic acid-responsive elements*)

RBP – proteína de ligação do retinol (do inglês – *retinol binding protein*)

RIG-I – *Retinoid-induced gene I*

RXR – receptor retinóide X (do inglês – *retinoid X receptor*)

SFB – soro fetal bovino

STRA6 – do inglês, *stimulated by retinoic acid*

T reg – linfócitos T reguladores

T_{FH} - linfócitos T foliculares

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta (do inglês – *transforming growth fator beta*)

Th – T auxiliares (do inglês – *T helpers*)

TLR – receptores *Toll-like* (do inglês – *Toll-like receptors*)

TNF – fator de necrose tumoral (do inglês – *tumor necrosis fator*)

TTR – transtirretina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 A vitamina A	24
1.2 Metabolização do RA e sua via de sinalização.....	26
1.3 Impacto do RA na resposta imunológica.....	28
1.3.1 Efeito do RA em DCs e na indução da migração de células imunes para a mucosa intestinal	29
1.3.2 Efeito do RA nos linfócitos T.....	30
1.3.3 Efeito do RA na diferenciação de linfócitos B e produção de IgA.	33
1.4 O sistema imunológico no período neonatal e o impacto da vitamina A	34
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Animais:	41
3.2 Ácido Retinoico.....	41
3.3 Protocolo de suplementação materna de RA por via oral	41
3.4 Protocolo de indução de colite	41
3.5 Protocolo para obtenção de células do baço e linfonodos mesentéricos	42
3.6 Protocolo para obtenção de células da lamina própria (LP) do intestino	42
3.7 Protocolo para obtenção de leite materno.....	43
3.8 Avaliação da expressão do receptor de quimiocina CCR9 em linfócitos T	43
3.9 Avaliação de linfócitos T e B presentes na lamina própria do intestino delgado.....	44
3.10 Avaliação de linfócitos T produtores de citocinas presentes na lâmina própria do intestino delgado.....	44
3.11 Agonista de TLR utilizado para estímulo de cultura celular	45
3.12 Protocolo de cultura para análise de citocinas secretadas por linfócitos presentes no baço da prole induzidas pelo agonista de TLR7/8.....	45
3.13 Protocolo para obtenção de soro e fezes:.....	46

3.14 Detecção de anticorpos IgA e IgG no leite, soro e fezes por ELISA	46
3.15 Análise da microbiota.....	46
3.16 Análise histológica do intestino.....	47
3.17 Determinação da permeabilidade intestinal.....	47
3.18 Dosagem de citocinas por citometria.....	47
3.19 Detecção de Calprotectina (S100A8/S100A9) fecal:	48
3.20 Análise estatística	49
4. RESULTADOS	51
4.1 Efeito da suplementação materna com o RA no percentual de linfócitos Treg do baço e linfonodos mesentéricos das mães	51
4.2 Efeito da suplementação materna com o RA no percentual das subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos das mães.....	54
4.3 Efeito da suplementação com o RA quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos linfócitos T presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães	56
4.4 Efeito da suplementação materna com o RA na expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos fenótipos de linfócitos T presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães.....	58
4.5 Efeito da suplementação materna com RA na prole quanto ao percentual de linfócitos Treg do baço e linfonodos mesentéricos	60
4.6 Efeito da suplementação materna com o RA na prole quanto o percentual das subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos	61
4.7 Efeito da suplementação materna com o RA nas proles quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos	63
4.8 Efeito da suplementação materna com o RA nas proles quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos fenótipos de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos	65
4.9 Análise das populações de linfócitos T e B presentes na lâmina própria do intestino delgado das proles.	67
4.10 Perfil de citocinas de linfócitos T da lâmina própria do intestino delgado das proles.	70

4.11 Efeito da suplementação materna com RA na concentração de IgA e IgG totais e citocinas séricas pró e anti-inflamatórias	73
4.12 Avaliação dos anticorpos IgA e IgG totais e TGF- β 1 no leite de mães suplementadas com RA.....	75
4.13 Efeito da suplementação com RA na concentração de anticorpos totais de citocinas séricas nas mães.....	76
4.14 Efeito modulador da suplementação materna de RA na resposta ao agonista de TLR 7/8 por linfócitos T presentes no baço da prole.....	78
4.15 Efeito da suplementação materna com RA na microbiota intestinal da prole.....	79
4.16 Efeito da suplementação materna com RA na colite aguda mediada por Sulfato de Sódio Dextrano nas proles de camundongos.....	80
4.17 Efeito da suplementação materna com RA na concentração de citocinas séricas e do homogenato intestinal em proles de camundongo com colite.....	83
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 A vitamina A

As vitaminas são componentes essenciais na dieta e relevantes para a manutenção de diversos processos biológicos. Nesse contexto, a vitamina A atua em várias condições biológicas que envolvem o desenvolvimento embrionário, função hormonal e manutenção/modulação da resposta imunológica, incluindo dos tecidos epiteliais e de mucosa (Mora *et al.*, 2008; Cassani *et al.*, 2012).

A vitamina A é obtida pela dieta tanto em alimentos de origem animal, como fígado, óleo de peixe e ovos, quanto pela ingestão de vegetais ricos em carotenoides, sendo o β -caroteno o mais abundante (Bono *et al.*, 2016). A deficiência da vitamina A, principalmente na infância, está relacionada ao aumento do risco de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas (bacterianas e virais), sendo mais comuns as doenças do trato gastrointestinal e pulmonar. Além disso, pode ocasionar cegueira, anemia, prejuízo em respostas vacinais e complicações durante a gestação (Villamor e Fawzi, 2005; Mora *et al.*, 2008). Sendo assim, uma dieta com quantidades adequadas de vitamina A é vital para um bom desenvolvimento do infante, principalmente no período neonatal, uma vez que recém-natos possuem reservas insuficientes da vitamina e dependem, quase que exclusivamente, do leite materno.

Em países de baixo poder aquisitivo é mais frequente que as crianças recebam quantidades insuficientes de vitamina A durante o aleitamento, tornando esta deficiência um problema de saúde pública. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde recomenda a suplementação com vitamina A para bebês e crianças de 6 a 59 meses de vida nos países em desenvolvimento (Who, 2011). No Brasil, desde 2005, existe o Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, nas regiões Norte e Nordeste do país, e nos municípios das Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste contemplados no Programa Brasil sem Miséria, que recomenda a suplementação para bebês e crianças de 6 a 59 meses de vida (Brasil, 2013), garantido assim, a ingestão adequada da vitamina A nesse período da vida.

A preocupação com relação à deficiência da vitamina A na infância e o aumento do risco de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas pode ser explicado pelo amplo papel que a vitamina A desempenha no sistema imunológico. De maneira bem resumida, pois falaremos com mais detalhes à frente, após a ingestão e absorção da

vitamina A ocorre o processo de metabolização, no qual, o ácido retinoico (RA, *retinoic acid*) é gerado, sendo este o metabólito ativo responsável pelas funções exercidas pela vitamina A. O RA desempenha papel importante na resposta imunológica de mucosa, promovendo a diferenciação de linfócitos T reguladores (Treg) (Sun *et al.*, 2007) e a produção de imunoglobulina (Ig) A (Surman *et al.*, 2014). Além disso, o RA induz a migração de células da imunidade inata (Kim *et al.*, 2015) e linfócitos T e B efetores para o intestino (Von Boehmer, 2007; Hall, Grainger, *et al.*, 2011; Cerovic *et al.*, 2014). Durante infecções, o RA pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas (DC, *dendritic cells*), promovendo a ativação de linfócitos T e assim, a proteção da mucosa intestinal (Hall, Cannons, *et al.*, 2011). Dessa forma o RA é essencial para a manutenção da homeostase e da barreira da mucosa intestinal.

Tendo em vista seu amplo papel na resposta imunológica da mucosa intestinal, estudos já relataram a redução da mortalidade infantil através da suplementação com vitamina A (Imdad *et al.*, 2010). Mais um dado que ressalta a importância da ingestão de vitamina A durante os primeiros anos de vida, no desenvolvimento da resposta imunológica e manutenção da vida.

O RA também atua durante o desenvolvimento embrionário, principalmente na proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas (Kinoshita *et al.*, 2000; Berggren Soderlund *et al.*, 2005; Van De Pavert *et al.*, 2014). Embora haja evidências experimentais de que a suplementação de gestantes com quantidades elevadas de vitamina A pode induzir efeito teratogênico no feto (Balkan *et al.*, 1992; Niederreither *et al.*, 1997), ainda assim, a deficiência de vitamina A durante a gestação causa efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento do sistema imunológico do neonato (Kinoshita *et al.*, 2000; Van De Pavert *et al.*, 2014), tornando essencial uma suplementação com quantidade adequada da vitamina durante esse período.

Além das funções já relatadas, devido sua atividade reguladora, o RA é capaz de atuar no controle de doenças inflamatórias, não somente no intestino (Tejón *et al.*, 2015; Penny *et al.*, 2016), mas em outros tecidos como: mucosa pulmonar (Goswami *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2016), sistema nervoso central (Saboory-Yaraghi *et al.*, 2015; Mohammadzadeh Honarvar *et al.*, 2016; Raverdeau *et al.*, 2016) e pele (Rigopoulos *et al.*, 2004; Khalil *et al.*, 2017).

Contudo, para a atuação do RA, primeiramente a vitamina A precisa ser metabolizada, e esse processo será discutido a seguir.

1.2 Metabolização do RA e sua via de sinalização

A vitamina A pode ser obtida pelo consumo de precursores da vitamina A, ou seja, os carotenoides (principalmente o β -caroteno) quando proveniente de origem vegetal, ou na forma de ésteres de retinil, quando proveniente de origem animal (Bono *et al.*, 2016). Quando os precursores da vitamina A são absorvidos, estes são esterificados em ésteres de retinil pela enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT, *lecithin retinol acyltransferase*), obtendo a mesma forma da vitamina A de origem animal. Após esse processo, os ésteres de retinil são empacotados em quilomícrons e entram na circulação sistêmica (Erkelens e Mebius, 2017) (Figura 1). Na circulação, os quilomícrons sofrem ação da enzima lipase lipoproteica resultando na captura pelos hepatócitos onde sofrem hidrólise gerando o retinol. O retinol é estocado no fígado, principalmente nas células estreladas hepáticas (Mora *et al.*, 2008).

Quando há demanda da vitamina A pelo organismo, o retinol formado é transportado pela circulação sanguínea através de um complexo formado pela proteína de ligação do retinol (RBP, *retinol binding protein*) com a proteína de transporte transtirretina (TTR) (Azais-Braesco e Pascal, 2000). Esse complexo é reconhecido pela proteína transmembrana STRA6 (*stimulated by retinoic acid 6*), que medeia a absorção do retinol extracelular para o citosol (Berry *et al.*, 2012). Ao ser absorvido, o retinol é oxidado em retinal pela enzima álcool desidrogenase (ADH, *alcohol dehydrogenase*). Posteriormente, no epitélio intestinal e nas DCs associadas aos linfonodos mesentéricos (mLN, *mesenteric lymph nodes*) e placa de Peyer (PP), o retinal sofre uma oxidação pela enzima retinal desidrogenase (RALDH, *retinal dehydrogenase*), obtendo-se o RA. (Mora *et al.*, 2008). As células epiteliais do intestino também podem metabolizar a vitamina A, logo após a absorção, em retinal e RA, podendo liberar o RA diretamente na mucosa intestinal (Erkelens e Mebius, 2017).

O RA é gerado em múltiplas formas ativas estereoisoméricas, como a *all-trans*, *9-cis* e *13-cis* (Berggren Soderlund *et al.*, 2005; Campo-Paysaa *et al.*, 2008), sendo a forma *all-trans* (atRA) a mais abundante no organismo (Arnold *et al.*, 2012). O RA sinaliza via receptores nucleares, como o receptor de ácido retinoico (RAR, *retinoic acid receptor*) e o receptor retinoide X (RXR, *retinoid X receptor*) para regular a transcrição de seus genes-alvo (Schuster *et al.*, 2008; Hall, Grainger, *et al.*, 2011). Os receptores formam heterodímeros, sendo o RAR composto por três isoformas principais (α , β e γ)

que interagem com todas as formas do RA, enquanto o RXR, que também possui isoformas α , β e γ , interage, principalmente, com o 9-*cis* RA (Hjertson *et al.*, 2003). O RA também pode sinalizar através do receptor ativador da proliferação de peroxissomos beta (PPAR- β , *peroxisome proliferator-activating receptor beta*), formando um heterodímero com o RXR, importante no metabolismo de lipídeos e na homeostase da glicose (Mora *et al.*, 2008).

O controle da concentração do RA nos tecidos é realizado por um grupo de enzimas pertencentes a família 26 do citocromo P450 (CYP26, *cytochrome P450 family 26*), que catalisa o RA gerando formas oxidadas (5,8-*epoxi* RA, 4-*hidroxi* RA e 18-*hidroxi* RA), evitando seu acúmulo no organismo e controlando suas concentrações fisiológicas (Sakai *et al.*, 2001).

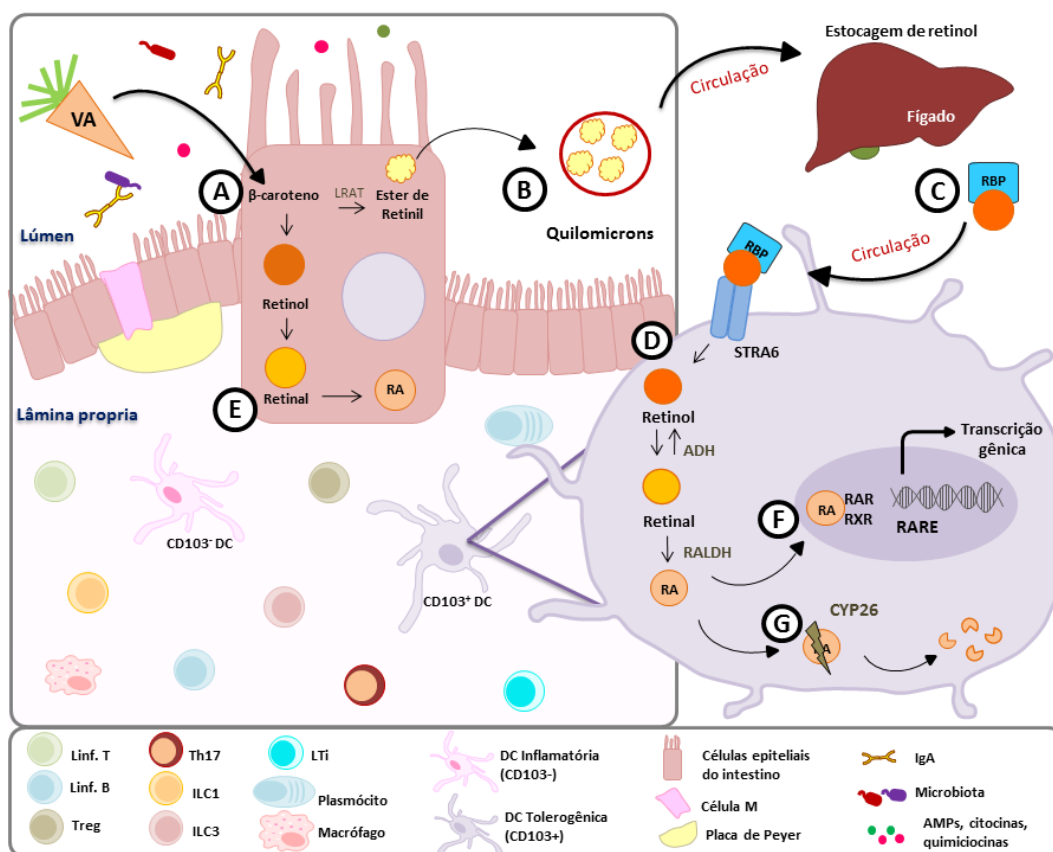


Figura 1. Metabolização e sinalização do RA. (A) A vitamina A e seus precursores (β -caroteno) obtidos da dieta são absorvidos pelas células do epitélio intestinal e esterificados em ésteres de retinil pela enzima LRAT. (B) Os ésteres de retinil são empacotados em quilomícrons e entram em circulação sanguínea onde são capturados pelos hepatócitos e armazenados como retinol. (C) O retinol liga-se à RBP no fígado e é transportado através da corrente sanguínea. Este complexo é reconhecido pelo STRA6, que medeia a absorção do retinol extracelular para o citosol. (D) Após a captação, o retinol é oxidado em retinal pela enzima ADH. Posteriormente, em DCs CD103⁺, o retinal é oxidado pela enzima RALDH para gerar RA. (E) Células do epitélio intestinal também podem metabolizar a vitamina A após absorção do retinal em RA, que pode ser liberado

diretamente na mucosa intestinal. (F) A RA interage com receptores nucleares, como o RAR e o RXR, para regular a transcrição de vários genes-alvo, pela ligação aos elementos responsivos ao ácido retinoico (RAREs, *retinoic acid-responsive elements*) no DNA. (G) O controle da concentração do RA nos tecidos é realizado por um grupo de enzimas pertencentes à família 26 do citocromo P450 (CYP26), que catalisa o RA presente no citosol para gerar as formas oxidadas. (Adaptado, (Oliveira *et al.*, 2018))

1.3 Impacto do RA na resposta imunológica

O RA pode atuar de diferentes formas, tanto nas células envolvidas na imunidade inata, quanto nas células da imunidade adaptativa (Figura 2), e apesar de exercer um papel mais relevante em mucosas, principalmente na mucosa intestinal, também exibe papel sistêmico importante, promovendo a homeostase em diferentes tecidos.

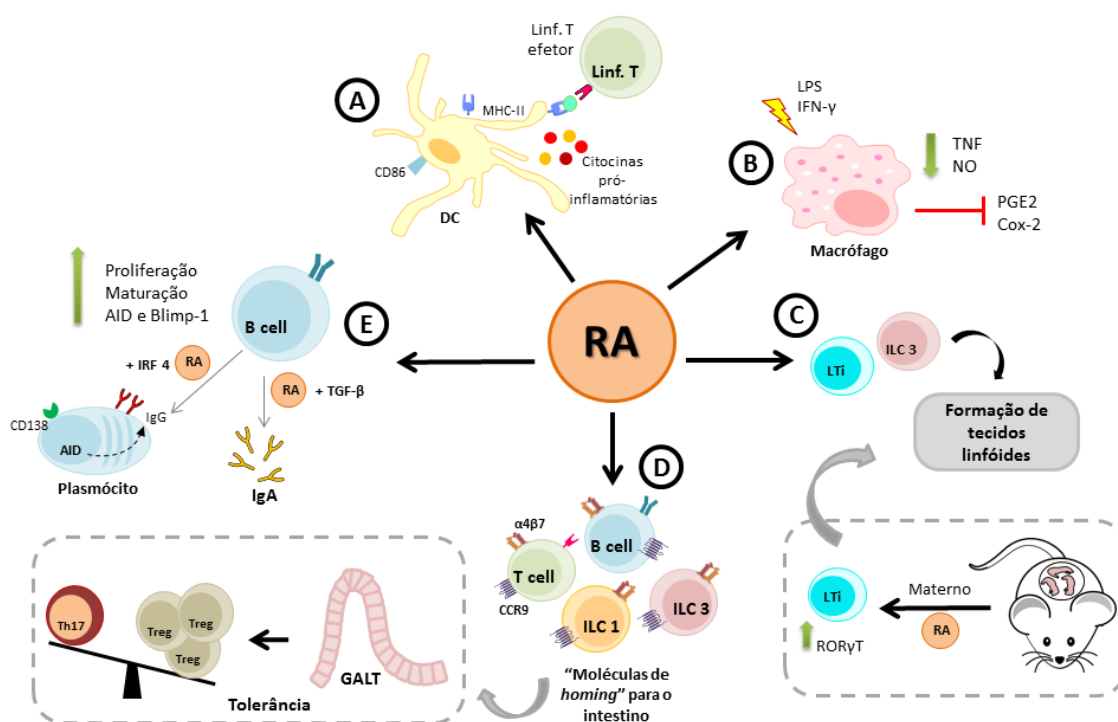


Figura 2. Papel do RA nas células do sistema imunológico. (A) Associado às citocinas pró-inflamatórias, o RA contribui para a ativação das DCs e para a geração de células T efetoras; (B) o RA também promove modulação de macrófagos, inibindo mediadores inflamatórios e liberação de TNF e NO; (C) ativa ILC3, especialmente células LTi, que são necessárias para a formação de tecidos linfóides, inclusive durante o desenvolvimento fetal; (D) induz a expressão das moléculas $\alpha 4\beta 7$ e CCR9 em linfócitos e ILCs e o direcionamento dessas células para o intestino e promove o equilíbrio de células Th17 / Treg no GALT, assegurando tolerância, mas também é capaz de induzir Th17 na presença de infecção e inflamação; e (E) promove a ativação de células B e sua diferenciação em plasmócitos. (Adaptado, (Oliveira *et al.*, 2018))

1.3.1 Efeito do RA em DCs e na indução da migração de células imunes para a mucosa intestinal

A mucosa intestinal é exposta a uma variedade de antígenos e possui um ambiente tolerogênico para suprimir a resposta imunológica aos antígenos ingeridos e à microbiota, prevenindo a exacerbação da resposta inflamatória. Em paralelo, este ambiente também é capaz de gerar resposta imune efetora aos patógenos.

O balanço entre a tolerância e a resposta efetora é direcionado principalmente pelas células apresentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*), especialmente DCs (Siddiqui e Powrie, 2008). Já foi visto em camundongos que o RA é capaz de regular a diferenciação dos precursores das DCs da medula óssea em precursores de DCs de mucosa pela indução da expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$, garantindo a migração dessas células para o trato gastrointestinal, originando assim, as DCs $CD103^+CD11b^+$ da mucosa intestinal (Czarnewski *et al.*, 2017). A população de DCs nos tecidos linfoides associados à mucosa intestinal (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) com fenótipo $CD103^+$ é responsável pela manutenção da homeostase, por ser capaz de promover a indução de linfócitos Treg $Foxp3^+$ e de proporcionar a migração de células reguladoras e efetoras para o GALT (Von Boehmer, 2007; Hall, Grainger, *et al.*, 2011; Cerovic *et al.*, 2014).

A migração das células T mediada pelas DCs no GALT está relacionada com a sua capacidade de sintetizar o RA (Eksteen *et al.*, 2009; Hall, Grainger, *et al.*, 2011), uma vez que essas DCs possuem alta expressão das enzimas RALDH 1 e RALDH 2, responsáveis pela conversão do retinal em RA, tornando-as as principais sintetizadoras deste metabólito (Agace e Persson, 2012). Desta forma, no momento da apresentação do antígeno, as DCs $CD103^+$ liberam o RA capaz de passar livremente pela membrana celular da célula alvo. No núcleo o RA sinaliza via receptor $RAR\alpha$ induzindo a transcrição das regiões promotoras do gene da subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 7$ e do gene para o receptor de quimiocina CCR9 (Hall, Grainger, *et al.*, 2011), proporcionando a expressão de $\alpha 4\beta 7$ e CCR9 na membrana celular. Assim a integrina $\alpha 4\beta 7$ e o CCR9 são capazes de interagirem com a quimiocina CCL25 e a molécula de adesão MadCAM-1, respectivamente (Eksteen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Como o MadCAM-1, está presente nas vênulas do mLN e nas PP, e a CCL25 é produzida pelas células epiteliais do intestino, essa combinação garante a migração não só de linfócitos T, como também de outras células imunes (linfócitos B, células linfoides inatas) para o intestino (Iwata *et al.*,

2004; Eksteen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Hammerschmidt *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015).

Com relação a migração de células linfoides inatas (ILCs – *innate lymphoid cells*) para o intestino, o RA atua principalmente nas ILCs 1 e 3. As ILCs podem ser divididas em três subgrupos principais ILC1, ILC2 e ILC3, baseados na expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA3 e ROR γ t, e perfil de citocinas, como interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*) (ILC1), interleucina (IL)-5 e IL-13 (ILC2) ou IL-17 e IL-22 (ILC3). Nesse contexto, as ILC 1 e 3 são muito importantes contra infecções virais e bacterianas na mucosa intestinal (Kim *et al.*, 2015), o que torna relevante o papel do RA na migração dessas células para o intestino, garantido maior proteção contra doenças infecciosas intestinais.

Outro papel importante das DCs CD103⁺ é promover a indução de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) importantes para a manutenção do ambiente tolerogênico no GALT. Além das DCs CD103⁺, outras DCs RALDH⁺ presentes na lamina própria do intestino delgado, na pele e mucosa pulmonar, também sintetizam RA (Sun *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2010; Ruane *et al.*, 2013) sendo as DCs RALDH⁺ do intestino capazes de induzir Treg na presença do TGF- β (Mucida e Cheroutre, 2007; Sun *et al.*, 2007). Assim, é possível afirmar que as DCs produtoras de RA, ou seja, as DCs RALDH⁺, são DCs de perfil tolerogênico.

Contudo, o RA também pode participar da maturação e ativação de DCs, pois em conjunto com citocinas pró-inflamatórias, o RA induz o aumento na expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*)-II e CD86 em DCs derivadas de monócitos (MoDCs) (Geissmann *et al.*, 2003), e, durante infecções, sinalização pelo RA pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em DCs e, por sua vez, promover a diferenciação de células T efetoras (Hall, Cannons, *et al.*, 2011). Dessa forma, a ação do RA vai depender do contexto imunológico, podendo ativar ou suprimir respostas imunológicas, garantindo a homeostase.

1.3.2 Efeito do RA nos linfócitos T

O RA desempenha papéis distintos nas subpopulações de linfócitos T, dependendo do ambiente em que está inserido e da subpopulação em questão. Sendo assim, o RA pode influenciar no balanço das respostas dos linfócitos TCD4⁺ tendo maior

relevância no balanço da resposta de linfócitos T auxiliares (Th – *T helpers*) Th1 e Th2, além do balanço na diferenciação e na resposta Treg/Th17.

A diferenciação de células T naíve para as diferentes subpopulações depende de fatores do microambiente da resposta inflamatória inicial e das citocinas secretadas pelas populações de células ativadas. Entre as citocinas envolvidas neste processo, a IL-12 é secretada principalmente por APCs e favorece a diferenciação de células Th1 (Coffman *et al.*, 1991), que secretam IL-2 e IFN- γ . Já a IL-4 contribui para a diferenciação de células Th2, caracterizado pela expressão do fator de transcrição GATA3 e secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, favorecendo a produção de anticorpos IgE em humanos e de IgE e IgG1 em camundongos (Coffman *et al.*, 1991).

Os relatos sobre o papel do RA no balanço das respostas de perfil Th1/Th2 são controversos. Alguns estudos indicam que concentrações elevadas de RA podem promover a diferenciação de células T naíve em Th2 pela indução da expressão do gene para IL-4 (Mora *et al.*, 2008), além de modular a produção de IL-12 das APCs, inibindo a diferenciação das células Th1 (Iwata *et al.*, 2003) e induzindo a expressão de fatores de transcrição GATA3 e STAT 6, importantes na manutenção da resposta Th2 (Mora *et al.*, 2008; Siddiqui e Powrie, 2008). O uso *in vitro* de agonistas do receptor RXR também favorece o desenvolvimento das células Th2 (Stephensen *et al.*, 2007). Entretanto, trabalhos mais recentes sugerem que a deficiência de vitamina A está relacionada com aumento da incidência de asma em crianças devido a prejuízos na formação da mucosa pulmonar e manutenção do epitélio das vias aéreas (Marquez e Cardoso, 2016). Já em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina, a deficiência vitamina A induz citocinas do perfil Th2, como IL-5 e IL-13, aumentando assim a inflamação pulmonar (Cui *et al.*, 2016). Contudo, administração oral de RA atenua a inflamação pulmonar em decorrência do aumento da população de células T reguladoras no pulmão (Goswami *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2016).

Em relação a resposta de perfil Th1, apesar do RA inibir a diferenciação desse perfil, é essencial para a estabilidade e manutenção de células Th1 por reprimir o fator de transcrição ROR γ t, importante para indução de células Th17 (Brown *et al.*, 2015). Além disto, apresenta um papel importante na manutenção de respostas antígeno-específicas, visto que camundongos deficientes de vitamina A mostram prejuízo na resposta Th1 após imunização com ovalbumina e toxina colérica (Hall *et al.*, 2011).

Mas é no balanço entre as respostas Treg/Th17 em que o RA tem maior importância, principalmente durante repostas inflamatórias na mucosa intestinal.

Conforme abordado anteriormente, a mucosa intestinal, por ser exposta a diversos antígenos, necessita de um balanço eficiente entre tolerância e a resposta efetora, para que respostas imunológicas não se tornem exacerbadas causando inflamações crônicas e danos teciduais. Nesse contexto, o RA produzido pelas DCs RALDH⁺ presentes na lâmina própria do intestino propicia a geração de Treg, na presença de TGF- β (Mucida e Cheroutre, 2007; Sun *et al.*, 2007). A diferenciação de Treg a partir de células TCD4 naíve se dá por um mecanismo dependente de RA no qual o atRA promove a acetilação das histonas no promotor do gene para Foxp3, fazendo com que a cromatina fique frouxa, o que facilita a transcrição gênica (Coombes *et al.*, 2007; Von Boehmer, 2007; Pino-Lagos *et al.*, 2011).

O RA também controla a diferenciação de células T com perfil inflamatório no GALT, suprimindo a diferenciação de células T naíve em Th17 na mucosa (Wang *et al.*, 2010), principalmente pelo bloqueio da sinalização via IL-23 e IL-6. Por outro lado, a IL-6 é capaz de inibir a geração de Treg, favorecendo a expansão de Th17 em camundongos com colite (Duriancik *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2011).

Os linfócitos Th17 são gerados na presença de IL-6 e IL-21 e de baixas concentrações de TGF- β na mucosa intestinal, principalmente em inflamações crônicas (Collins *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011). São capazes de secretar citocinas como IL-17A, IL-21 e IL-22 e promovem o controle de infecções bacterianas e fúngicas nas mucosas (Hall, Grainger, *et al.*, 2011). O RA possui um papel ambíguo nas Th17, pois, apesar de inibir a geração de linfócitos Th17, durante as infecções na mucosa intestinal, baixas concentrações de RA na presença de IL-6 induz a geração de linfócitos Th17, potencializando a resposta protetora na mucosa (Uematsu *et al.*, 2008).

Além disso, o RA é essencial para a geração *in situ* de linfócitos Th17 na mucosa intestinal durante a infecção causada por *Toxoplasma gondii* (Hall, Cannons, *et al.*, 2011). Desta forma, o RA exerce papel tolerogênico na mucosa saudável e inflamatório em respostas infecciosas, garantindo a proteção.

O RA também induz a migração de células Th17 e outras células efetoras para o GALT. A expressão de CCR9 é importante para a migração de células para o intestino delgado (jejuno e íleo), enquanto que a integrina $\alpha 4\beta 7$ propicia a migração de células por toda extensão do intestino (Wang *et al.*, 2010). Contudo, a suplementação oral com RA em camundongos com inflamação crônica no íleo é capaz de atenuar a inflamação, por restaurar o balanço entre as populações Th17 e T reguladoras, elevando o número de DC

CD103⁺ e a expressão de RALDH 2, por um mecanismo de *feedback* positivo, aumentando, assim a concentração de RA na mucosa (Wang *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2011). Além disso, camundongos submetidos a uma dieta deficiente de vitamina A são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS - *dextran sulfate sodium*) e câncer de colón devido ao agravamento da inflamação crônica no intestino (Okayasu *et al.*, 2016). Dessa forma, o RA faz um balanço entre a geração de células T reguladoras e Th17, mantendo a homeostase da mucosa intestinal.

Nos linfócitos TCD8⁺, o efeito do RA está mais relacionado com indução da migração dessas células para o GALT e mucosas e não em sua diferenciação, sendo importante durante infecções virais. Nesse contexto, foi visto que a administração de RA é capaz de estabelecer uma resposta protetora antiviral em camundongos, por aumentar a migração e a geração de linfócitos T CD8⁺ e células de memória (Tan *et al.*, 2011), capazes de inibir a infecção pelo vírus da gastroenterite na mucosa intestinal (Chen *et al.*, 2016).

1.3.3 Efeito do RA na diferenciação de linfócitos B e produção de IgA.

O RA também exerce papel importante na resposta humoral, sendo essencial para a produção de linfócitos B secretores de anticorpos IgA (Mora *et al.*, 2006; Hall, Grainger, *et al.*, 2011). A administração oral de RA em camundongos deficientes de vitamina A mostrou-se eficiente em reestabelecer a produção de IgA após vacinação contra influenza (Surman *et al.*, 2014). Além disso, a deficiência de vitamina A e zinco leva a diminuição de IgA sérica e uma diminuição acentuada da imunidade humoral de mucosa (Kheirouri e Alizadeh, 2014). Neste sentido, estudos mostraram que o uso do RA como adjuvante vacinal, potencializa a resposta imunológica, tanto em camundongos adultos quanto neonatos, sendo um importante fator para a indução de resposta imunológicas, principalmente em fases precoce da vida (Ma *et al.*, 2005; Ma e Ross, 2005).

Os retinoides também são descritos como cofatores para estimulação e proliferação dos linfócitos B, capazes de acelerar a linfopoiese dessas células e aumentar seu número no baço, decorrentes do aumento de fatores de transcrição EBF1 e Pax-5, essenciais para o desenvolvimento de linfócitos B (Morikawa e Nonaka, 2005). Além disso, também acelera a maturação de linfócitos B humanos e sua diferenciação em células produtoras de anticorpos (Morikawa e Nonaka, 2005).

O RA também induz a diferenciação de linfócitos B esplênicos aumentando a expressão de CD138 e IgG de membrana celular por induzir a expressão da enzima deaminase induzida pela ativação (AID - *activation induced deaminase*), responsável pela indução da troca de classe de anticorpos, e a expressão do fator regulador do interferon 4 (IRF4, *interferon regulatory factor 4*), envolvido na geração de plasmócito e produção de IgG (Chen e Ross, 2007; Indrevær *et al.*, 2015). E, assim como ocorre nas outras células imunológicas, o RA também favorece a migração e sobrevivência de células B na geração preferencial de IgA no intestino.

Portanto, a vitamina A possui um papel multifatorial na modulação da resposta imune, na homeostase e na indução de resposta reguladora e/ou efetora. Entretanto, ainda não está totalmente determinado como a suplementação materna com RA, via amamentação, pode influenciar no desenvolvimento imunológico do neonato, período marcado por uma imaturidade imunológica e dependência de fatores maternos para proteção contra infecções e desenvolvimento do sistema imunológico.

1.4 O sistema imunológico no período neonatal e o impacto da vitamina A

Devido à baixa exposição de antígenos durante o desenvolvimento intrauterino, o período neonatal é caracterizado pela ausência de memória e relativa imaturidade celular, com diminuição numérica e funcional das DCs, dos linfócitos T, B e ILCs em relação aos adultos (Adkins *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2005; Futata *et al.*, 2012). Essas características no período neonatal fazem da imunidade materna uma importante ferramenta para garantir a proteção contra os patógenos e na manutenção da homeostase imunológica.

Contudo, algumas particularidades da resposta imune inata do neonato atuam para compensar o lento desenvolvimento da resposta imune adaptativa, como um aumento da resposta inflamatória aos agonistas de receptores *Toll-like* (TLRs) e *NOD-like* (NLRs) pelos granulócitos. Estes receptores reconhecem padrões moleculares conservados em microrganismos como bactérias, fungos e vírus iniciando vias de sinalização que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias e maturação das células favorecendo o desenvolvimento da resposta adaptativa (Khoo *et al.*, 2011).

As ILCs, além de atuarem na manutenção de barreiras em mucosas e no controle de bactérias comensais, também conferem a proteção contra patógenos, o que as

torna essenciais no período neonatal por participarem do desenvolvimento do GALT. As células indutoras de tecido linfóide (LTi), um dos subtipos de ILC3, promovem a formação de tecidos linfóides, como as PP, essenciais para o estabelecimento de respostas imunológicas eficientes (Bostick e Zhou, 2016).

Já as DCs derivadas de monócitos provenientes de cordão umbilical mostram baixa expressão de moléculas coestimuladoras após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS), quando comparadas às DCs de adultos, resultando em menor capacidade de apresentação de antígenos e polarização para respostas de perfil Th1 (Goriely *et al.*, 2001). Em resposta à maioria dos ligantes de TLRs os monócitos e as DCs plasmocitoides secretam menos IL-12p70 e IFN- α (Hallwirth *et al.*, 2002).

Como as DCs secretaram menos IL-12, há uma diminuição da resposta Th1 e desvio para Th2, em especial em camundongos (Adkins *et al.*, 2004). Além disto, após a ativação de linfócitos T, a secreção preferencial de IL-4 e IL-13 é devida à hipometilação na região reguladora dos genes *IL4* e *IL13*, enquanto há uma regulação epigenética do promotor de IFN- γ inibindo a diferenciação para resposta Th1 (Adkins, 2007; Rose *et al.*, 2007). Dessa forma, existe um desvio para um perfil de resposta Th2 no período neonatal, o que prejudica a formação de respostas às infecções bacterianas e virais, que são recorrentes nesta fase e durante a infância.

Além da diminuição quantitativa e qualitativa das DCs e células T, a falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as DCs e as células T e B, pode gerar diferenças fenotípicas e funcionais das células B, que refletem na baixa produção de anticorpos. Assim, a resposta humoral neonatal é mais tardia, com quantidades menores de anticorpos e de menor duração, pois as poucas células B maduras do neonato expressam menos CD40 que, somado com a diminuída expressão de CD40L nas células T, contribuem para a baixa produção de IgG, IgA e IgE (Bot e Bona, 2002). Outro fator que prejudica a resposta humoral é a formação inadequada dos centros germinativos (CG) em neonatos, regiões presentes nos órgãos linfóides, onde ocorre a interação de linfócitos T auxiliares foliculares (T_{FH}) e linfócitos B, com posterior troca de classe e maturação da afinidade dos anticorpos.

Por esses motivos, o aleitamento é essencial não só para proteção como também para o desenvolvimento do sistema imunológico do neonato (Ma *et al.*, 2008), através da transferência de anticorpos, citocinas e TGF- β , que podem propiciar a formação ou proliferação de populações de linfócitos Treg, além da transferência de células maternas à prole. (Verhasselt *et al.*, 2008). A transmissão de células da mãe para

a prole pode ser evidenciada em camundongos GFP⁺ (*Green fluorescent protein*), por duas vias independentes: placentária e amamentação. A transferência de células maternas por via placentária é evidenciada em 50% da prole e situam-se nos órgãos, como timo, baço e fígado. Após o nascimento, o colostro de camundongos tem uma composição de leucócitos semelhante aos humanos, com 50-70% de granulócitos, 10-20% de monócitos, 3-10% de células T e menos que 2% de células B (Zhou *et al.*, 2000). Contudo, a migração trans-epitelial é feita por 3-4% de células T que migram para as PP, baço e timo, sendo evidenciado o número máximo no período de 3 a 4 semanas após o nascimento (Ma *et al.*, 2008).

A vitamina A é transferida pelo leite materno como retinol (Garcia *et al.*, 2005) e pode influenciar no desenvolvimento da resposta imune do neonato. A suplementação com vitamina A durante o período neonatal confere uma melhor resposta antígeno-dependente em camundongos adultos jovens, mostrando que o impacto pode ocorrer até o estágio adulto (Sankaranarayanan *et al.*, 2007).

Além disso, as concentrações maternas de RA durante o desenvolvimento neonatal têm grande impacto no sistema imunológico do infante. Proles de camundongos deficientes de vitamina A, apresentavam órgãos linfoides secundários menores devido a redução da população de células LTi, responsável pela indução dos tecidos linfoides durante a fase neonatal (Van De Pavert *et al.*, 2014). Isso ocorre devido ao RA materno, durante a gestação, ser essencial para o desenvolvimento de LTi fetal, pois aumenta o fator de transcrição ROR γ t nos precursores de ILCs. Com isso, a resistência às infecções é prejudicada, pois não há a formação adequada de estruturas imunológicas necessárias para a resposta aos patógenos. Da mesma forma, o RA é necessário na fase pós-natal para a geração de células ILC3 e LTi intestinais em animais adultos, uma vez que sua deficiência ou o bloqueio da sinalização RA-RAR reduz o desenvolvimento de tecido linfoide entérico (Goverse *et al.*, 2016).

Tendo em vista que o sistema imunológico da prole ainda está em desenvolvimento e a relação entre a redução da mortalidade infantil e suplementação com vitamina A (Imdad *et al.*, 2010), acreditamos que a suplementação materna com RA durante o período de amamentação possa modular o sistema imunológico da prole trazendo benefícios para a mesma.

Desta forma, a hipótese do trabalho é que a suplementação materna com o RA pode modular a resposta imune da prole, aumentando a migração de linfócitos T para o intestino, contribuindo, dessa forma, com o desenvolvimento da imunidade da mucosa

intestinal no período neonatal, além de atuar reduzindo inflamações agudas na mucosa intestinal devido a seu papel tolerogênico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação materna com o ácido retinoico (forma *all-trans*), durante o período de amamentação, no sistema imunológico da prole de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação materna com ácido retinoico durante a amamentação quanto a:

- Indução de linfócitos T reguladores em diferentes compartimentos imunológicos;
- Expressão de moléculas de *homing* para o intestino em linfócitos T efetores presentes no baço e linfonodos mesentéricos e consequente promoção do desenvolvimento de imunidade de mucosa;
- Modulação da homeostase intestinal, no que diz respeito a indução de respostas anti-inflamatórias e migração de células com perfil tolerogênico para o intestino;
- Efeito sistêmico referente a produção de anticorpos e citocinas séricas, nas proles.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais: Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 Foxp3-GFP (*green fluorescent protein*), de ambos os sexos com 7-10 semanas de idade, procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF – *specific pathogen free*). As proles, de ambos os sexos, foram obtidas dos acasalamentos realizados e utilizadas em idade variável.

3.2 Ácido Retinoico: Para administração por via oral (gavagem) ou nos ensaios *in vitro* foi utilizado o ácido retinoico na forma *all-trans* (Sigma, St Louis, MO, EUA).

3.3 Protocolo de suplementação materna de RA por via oral: Camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP com 7 a 10 semanas receberam por via oral (gavagem com agulha para administração oral) 6 doses de *all-trans* RA (1mg/gavagem - 200 μ L) em óleo vegetal, durante o período de amamentação. O grupo controle recebeu gavagem apenas com óleo vegetal. A gavagem foi realizada a cada 3 dias, iniciada após 3 dias do nascimento da prole, correspondendo aos 3 dias de idade (d.i.) da prole até seu 18 d.i.. O desmame foi realizado no 21^o d.i.. Abaixo o esquema do protocolo de administração por via oral:

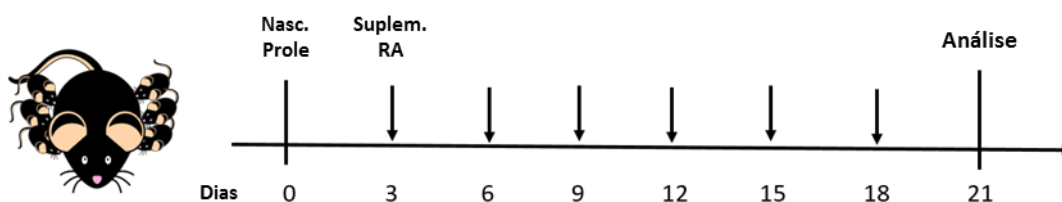


Figura 3. Representação esquemática do protocolo de suplementação materna com RA.

3.4 Protocolo de indução de colite: Proles de camundongos com 25 d.i. de mães suplementadas ou não com RA, receberam sulfato de sódio dextrano (DSS) a 3% eluído em água por 7 dias (ingestão voluntária). Após esse período, o DSS foi substituído apenas por água com o consumo por mais 3 dias. Os grupos controles beberem apenas água durante todo o período do experimento. Após esse período (10

dias), o intestino, soro e fezes foram coletados para análises. Abaixo, esquema do protocolo de indução de colite:

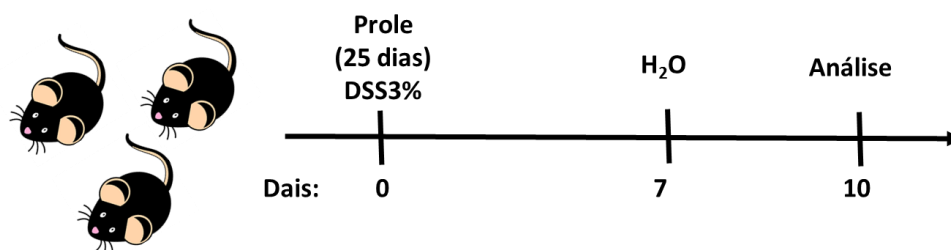


Figura 4. Representação esquemática do protocolo de indução de colite com DSS

3.5 Protocolo para obtenção de células do baço e linfonodos mesentéricos: Os baços e linfonodos mesentéricos (mLN) de camundongos foram obtidos assepticamente, de camundongos eutanasiados, e macerados separadamente em peneiras de nylon de 40 μ m (Cell strainer, BD, San Diego, CA, EUA) sob uma placa de petri contendo meio RPMI 1640 (GIBCO). A suspensão esplênica foi tratada com solução de lise de eritrócitos (*ACK Lysing Buffer* – GIBCO) antes das lavagens seguintes. As células de todos os compartimentos foram lavadas por duas vezes e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO). A concentração celular foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado.

3.6 Protocolo para obtenção de células da lamina própria (LP) do intestino: Intestinos das proles de mães suplementadas ou não com RA foram obtidos no 21^o dia de vida da prole. Após a eutanásia do animal, as placas de Peyer e as fezes foram retiradas e o intestino foi cortado em fragmentos de 2-3cm. Os fragmentos foram incubados com meio RPMI com 3% de SFB, 5mM de EDTA e 0,145mg de DTT (DL-ditiotreitol 99% Sigma-Aldrich), a 37^o por 25 minutos sob agitação. Em seguida, os fragmentos em meio RPMI- 2mM EDTA foram agitados, por 30 segundos, e filtrados, sendo esse processo repetido por mais 2 vezes. Após isso, os fragmentos foram cortados em pedaços menores e incubados com 0,5mg/mL de Colagenase IV (Sigma-Aldrich) em RPMI, a 37^o por 25 minutos sob agitação. Posteriormente os fragmentos foram macerados em peneiras de nylon de 70 μ m com meio RPMI 3% SFB, lavados e separados por gradiente de Percoll PLUS (GE – Healthcare) a 37,5%. A concentração celular foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado.

3.7 Protocolo para obtenção de leite materno: O leite foi retirado de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP em amamentação, no período correspondente ao último dia de amamentação (21º dia de vida da prole). Essas fêmeas foram sedadas com Quetamina/Xilazina (5µg/grama de peso) por via intraperitoneal (ip). Em seguida, receberam via ip 100µl de solução de ocitocina (Sigma), equivalente a 2UI. O leite foi coletado e processado, e o volume obtido foi diluído em uma proporção de 1:3 em PBS/5M EDTA pH8, centrifugado e o sobrenadante armazenado à -80°C para posterior dosagem de anticorpos e citocinas.

3.8 Avaliação da expressão do receptor de quimiocina CCR9 em linfócitos T: Células (1×10^6) do baço e mLN foram transferidas para tubo de ensaio de 5mL, centrifugadas e lavadas com tampão fosfato (PBS – *phosphate buffered saline*) 1x. Após duas lavagens foram adicionados os anticorpos de superfície (Tabela 1) e incubados a 4°C por 30 minutos. Após a incubação as células foram lavadas novamente e fixadas com formaldeído a 1%. Em seguida, procedeu-se com a leitura em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD). Os dados foram analisados no programa FlowJo X 10.0.6. A aquisição das amostras foi de 300.000 eventos. A estratégia de análise para expressão de CCR9 foi definida a partir de análise por FMO (*Fluorescence Minus One*) e uso de anticorpo isotipo controle.

Tabela 1 - Painel para marcação de CCR9 em linfócitos T

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD3	PerCP-Cy5.5	17A2	BD Bioscience
CD4	V500	RM4-5	BD Bioscience
CD8	APC-Cy7	53-6.7	BD Bioscience
CD25	APC	PC-61	BD Bioscience
CD44	V450	IM7	BD Bioscience
CD62L	Alexa Fluor 700	MEL-14	BD Bioscience
CCR9	PE-Cy7	eBioCW 1.2	eBioscience
Isotipo Controle	PE-Cy7	eBM2a	eBioscience

3.9 Avaliação de linfócitos T e B presentes na lâmina própria do intestino delgado:

Células (2×10^6) da lâmina própria do intestino delgado foram transferidas para tubo de ensaio de 5mL, centrifugadas e lavadas com tampão fosfato (PBS) 1x. Após duas lavagens as células foram incubadas por 30 minutos com o marcador de viabilidade *LIVE/DEAD* (Invitrogen). Após mais uma lavagem as células foram incubadas por 10 minutos com anticorpo CD16/CD32 (*Fc block*). Em seguida foram adicionados os anticorpos de superfície (Tabela 2) incubados a 4°C por mais 30 minutos. Após a incubação as células foram lavadas novamente e fixadas com formaldeído a 1%. Em seguida, procedeu-se com a leitura em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD). Os dados foram analisados no programa FlowJo X 10.0.6. A aquisição das amostras foi de 300.000 eventos.

Tabela 2 - Painel para marcação de linfócitos T e B na lâmina própria do intestino delgado

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
LIVE/DEAD	Texas Red	-	Invitrogen
CD16/CD32	-	2.4G2	BD Bioscience
CD3	PerCP-Cy5.5	17A2	BD Bioscience
CD4	V500	RM4-5	BD Bioscience
CD8	APC-Cy7	53-6.7	BD Bioscience
CD19	APC	1D3	BD Bioscience
CD25	BV605	PC-61	BD Bioscience
CD45	Alexa-Fluor 700	30-F11	BD Bioscience
IgA	PE	-	BD Bioscience

3.10 Avaliação de linfócitos T produtores de citocinas presentes na lâmina

própria do intestino delgado: Células (2×10^6) em meio de cultura RPMI suplementada com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 48 orifícios com 50ng/ml de PMA e 1µg/ml de Ionomicina e o inibidor de secreção (brefeldina A, Sigma) por 4 horas. Após esse período, as células foram transferidas para tubo de ensaio de 5mL, centrifugadas e lavadas com tampão fosfato (PBS) 1x. Após duas lavagens as células foram incubadas por 30 minutos com o marcador de viabilidade *LIVE/DEAD* (Invitrogen). Após mais uma lavagem as células foram incubadas por 10

minutos com anticorpo CD16/CD32 (*Fc block*). Em seguida foram adicionados os anticorpos de superfície (Tabela 3) incubados a 4°C por mais 30 minutos. Após a incubação as células foram lavadas novamente e fixadas com formaldeído a 1% e incubadas por 18 horas à 4°C. Após esse tempo, as células foram permeabilizadas com 100 µL de solução saponina 0,05% e marcadas intracelularmente para as citocinas (Tabela 3) por 30 minutos à 4°C. Em seguida, procedeu-se com a leitura em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD). Os dados foram analisados no programa FlowJo X 10.0.6. A aquisição das amostras foi de 300.000 eventos. A estratégia de análise das citocinas foi definida a partir de análise por FMO (*Fluorescence Minus One*).

Tabela 3 - Pannel para marcação de linfócitos T produtores de citocinas da lâmina própria do intestino delgado

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
LIVE/DEAD	Texas Red	-	Invitrogen
CD16/CD32	-	2.4G2	BD Bioscience
CD3	PerCP-Cy5.5	17A2	BD Bioscience
CD4	V500	RM4-5	BD Bioscience
CD8	APC-Cy7	53-6.7	BD Bioscience
CD19	APC	1D3	BD Bioscience
CD45	Alexa-Fluor 700	30-F11	BD Bioscience
IFN- γ	PE	XMG1.2	BD Bioscience
IL-10	BV421	JES5-16E2	BD Bioscience
IL-17	BV605	TC11-18H10	BD Bioscience

3.11 Agonista de TLR utilizado para estímulo de cultura celular: O agonista de TLR7/TLR8 (composto CL097) foi procedente da Invivogen (San Diego, CA, USA).

3.12 Protocolo de cultura para análise de citocinas secretadas por linfócitos presentes no baço da prole induzidas pelo agonista de TLR7/8: Para avaliar o efeito da suplementação materna com RA na secreção de citocinas induzidas por CL097, uma suspensão de esplenócitos ($0,5 \times 10^6 / 250 \mu\text{l}$) em meio de cultura RPMI suplementada com 10% de SFB foram incubadas, em placas de 96 orifícios, com RA

(20nM) e CL097 (2,5µg/ml), por 72 horas a 37°C. (Collins *et al.*, 2011) Após esse período, o sobrenadante foi coletado e acondicionado a -80°C para as dosagens de citocinas.

3.13 Protocolo para obtenção de soro e fezes: Foram coletados o soro e fezes de mães suplementadas ou não com RA e suas proles, em diferentes períodos, para dosagens de anticorpos IgA, IgG e citocinas. Para tanto, o sangue de camundongos foi coletado pelo plexo orbital para obtenção de soro. As fezes foram coletadas individualmente (1-3 *pellets*/animal), pesadas e adicionado 1mL de PBS para cada 100mg de fezes. A amostra foi homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para tubo contendo inibidor de protease (Sigma- Aldrich) e mantido a -20°C até a análise. O soro coletado também foi mantido a -20°C até a análise.

3.14 Detecção de anticorpos IgA e IgG no leite, soro e fezes por ELISA: Microplaca de 96 orifícios (A2, Corning-Costar) foram sensibilizadas com 2,5µg/mL de anticorpos anti-IgA ou anti-IgG (PharMingen, San Diego, CA, EUA), em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M por 18 horas à 4°C. O bloqueio foi realizado com a solução de PBS /1% de albumina sérica bovina (BSA - Sigma) por 1 hora à 37°C. As amostras e curva padrão do kit foram diluídas em solução de PBS/0,5%BSA e incubadas por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C. Posteriormente, anticorpos biotinizados anti-IgA ou anti-IgG (PharMingen) e a enzima estreptoavidina peroxidase (Sigma) foram utilizados. Em seguida, o substrato tetrametilbenzidina (Invitrogen, Massachusetts, USA) foi utilizado e a reação neutralizada com ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450nm em leitor de ELISA ELx800 (BioTek, Winooski, VT, USA) e a análise realizada no Microsoft Excel.

3.15 Análise da microbiota: Foram coletadas fezes das proles com 11, 21 e 31 dias de idade, e imediatamente armazenadas em tubos contendo solução aquosa de tiocianato de guanidina e beads (PowerBeads tubes - PowerSoil® DNA Isolation Kit – MO BIO Laboratories) a -80°C até o momento da extração de DNA. Após esse período, o DNA genômico das bactérias presente nas fezes foi extraído, conforme indicação do fabricante (MO BIO Laboratories) e após uma pré-amplificação do 16S rRNA, esse conteúdo foi sequenciado utilizando a plataforma MiSeq Illumina (MiSeq Reagent Kit v3 com 600 ciclos). O sequenciamento foi realizado no setor multiusuário

da rede Premium da FMUSP. A análise final foi efetuada pela empresa de bioinformática Tau GC Bioinformática.

3.16 Análise histológica do intestino: Fragmentos da região proximal do cólon de camundongos submetidos ao protocolo de indução de colite foram coletados e fixados em tampão com 60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial (solução de Carnoy) por 24hs. Após esse período foi realizado a montagem em blocos de parafina com posterior confecção de lâminas coradas com eosina-hematoxilina para a análise histológica do tecido. Na análise histológica foram considerados os seguintes parâmetros:

- Epitélio: Presença de hiperplasia e/ou depleção de células caliciformes (Score 0-3)
- Inflamação da lâmina própria: análise do tamanho do infiltrado de leucócitos (Score 0-3)
- Área do corte afetada pelos parâmetros acima (Score 0-3)
- Marcadores de severidade da inflamação: Inflamação na submucosa e presença de abscesso (somar mais 1 ponto para cada achado, podendo chegar a 3 pontos caso esses marcadores sejam encontrados em vários pontos)
- Score total: 12 pontos

3.17 Determinação da permeabilidade intestinal: No último dia do protocolo da indução de colite por DSS 3% foi avaliada a permeabilidade intestinal pela administração por gavagem de FITC-dextran (DX-4000 Da – FITC, Sigma), uma macromolécula não metabolizada utilizada como sonda de permeabilidade. Para tanto, o FITC-dextran (44mg/100g de massa corporal) foi administrado nas proles de mães suplementadas ou não com RA, precedidas de 4 horas de jejum de água e comida. Após 4 horas, o sangue foi coletado, e a fluorescência foi mensurada em um fluorímetro com excitação a 485nm e a leitura em 535nm. Como curva padrão foram utilizadas diluições do FITC-dextran.

3.18 Dosagem de citocinas por citometria: A determinação das citocinas pró e anti-inflamatórias foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o TGF- β 1, TNF, IL-2, IL-4, IL-6 *Single Flex Set*, e IL-10, IL-12p70, IL-17A e IFN- γ *Enhanced Sensitivity*

Flex Set (BD) de acordo com as instruções do fabricante. Abaixo a Tabela 4 com o limite mínimo de detecção dos kits.

Tabela 4 - Pannel com o limite mínimo de detecção dos kits para dosagem de citocinas

Citocina	Limite de detecção	Marca
TGF- β 1	Texas Red	BD Bioscience
TNF	2,8 pg/mL	BD Bioscience
IL-2	0,1 pg/mL	BD Bioscience
IL-4	0,03 pg/mL	BD Bioscience
IL-6	1,4 pg/mL	BD Bioscience
IL-10	62,1 fg/mL	BD Bioscience
IL-12p70	89,7 fg/mL	BD Bioscience
IL-17A	20,5 fg/mL	BD Bioscience
IFN- γ	24,8 fg/mL	BD Bioscience

3.19 Detecção de Calprotectina (S100A8/S100A9) fecal: Microplaca de 96 orifícios (A2, Corning-Costar) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura conforme instruções do fabricante (R&D Systems, Duoset Elisa – Catálogo: Dy-8506-05), por 18 horas à temperatura ambiente. O bloqueio foi realizado com a solução de PBS /1% de BSA por 2 horas. As amostras (fezes coletadas no último dia do protocolo de colite) e curva padrão do kit foram diluídas no tampão de diluição indicado pelo fabricante e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a incubação com o anticorpo de detecção por mais 2 horas. Em seguida procedeu-se com a incubação de 20 min com a enzima estreptoavidina peroxidase do kit, e depois, com o substrato tetrametilbenzidina (Invitrogen, Massachusetts, USA). A reação foi neutralizada com ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450nm em leitor de ELISA *ELx800* (BioTek, Winooski, VT, USA) e a análise realizada no Microsoft Excel.

3.20 Análise estatística: A comparação entre os grupos será realizada utilizando o teste estatístico não paramétrico, *Mann-Whitney* (dados não pareados), *Wilcoxon* (dados pareados) e *Kruskal-Wallis* (dados não pareados com mais de um grupo). O nível de significância será considerado quando $P \leq 0,05$. Para cada análise foram realizado uma média de 3-4 experimentos.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da suplementação materna com o RA no percentual de linfócitos Treg do baço e linfonodos mesentéricos das mães

O RA possui papel importante na diferenciação e manutenção dos linfócitos Treg Foxp3⁺, visto que as DCs, na presença de RA e TGF- β , são capazes de gerar linfócitos Treg. Considerando que o número absoluto dos linfócitos dos órgãos linfoides não foi alterado pela suplementação com RA, avaliamos a frequência das populações de linfócitos T nas mães suplementadas com RA.

Para tanto, camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP foram suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) e o baço e linfonodos mesentéricos foram retirados em dois períodos diferentes: ao final da lactação (período correspondente ao 21^o dia de idade da prole), e três semanas após o final da lactação (período correspondentes a 6 semanas de idade da prole), pois assim poderíamos destacar um efeito de longa duração, visto que as mães só receberam o RA até o 18^o dia da lactação. Já a escolha de avaliar os linfócitos nos linfonodos mesentéricos ocorreu por ser o órgão linfoide mais próximo da via de administração do RA e no baço para ilustrar um efeito sistêmico.

Inicialmente, avaliamos o efeito da suplementação materna com RA quanto o percentual de linfócitos Treg Foxp3⁺ no baço e linfonodos mesentéricos das mães. O percentual de linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) foi avaliado por citometria de fluxo e a estratégia de análise está ilustrada na Figura 5B.

Como resultado observamos que a suplementação com o RA não interferiu no percentual de linfócitos Treg nas mães em nenhum dos períodos avaliados, tanto no baço (Figura 6A), quanto nos linfonodos mesentéricos (Figura 6B).

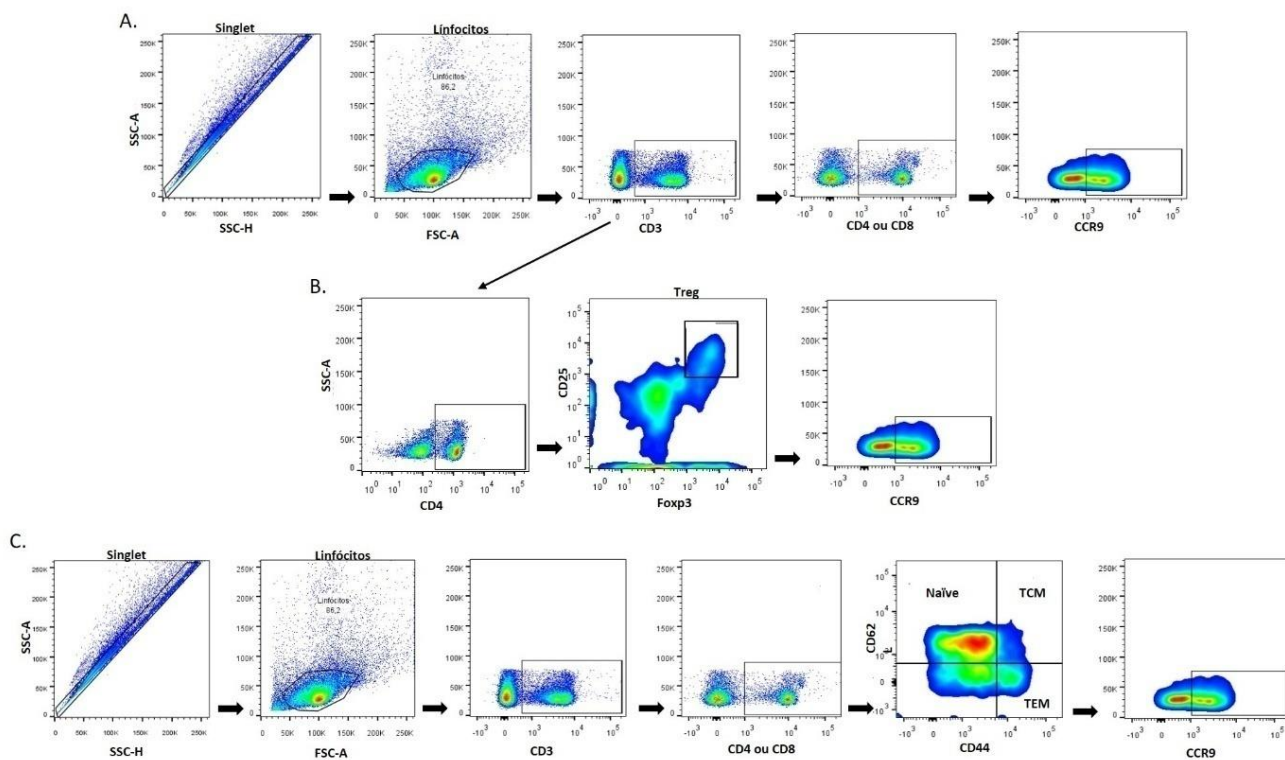


Figura 5. Estratégia de análise de citometria de fluxo para análise da frequência de linfócitos T CCR9⁺. Estratégia para análise da frequência de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ (A) e linfócitos Treg (TCD3⁺TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (B) que expressam o receptor de quimiocina CCR9. Estratégia para análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), memória efetora (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (CD44⁺CD62L^{high}) e a expressão de CCR9 nestas populações (C).

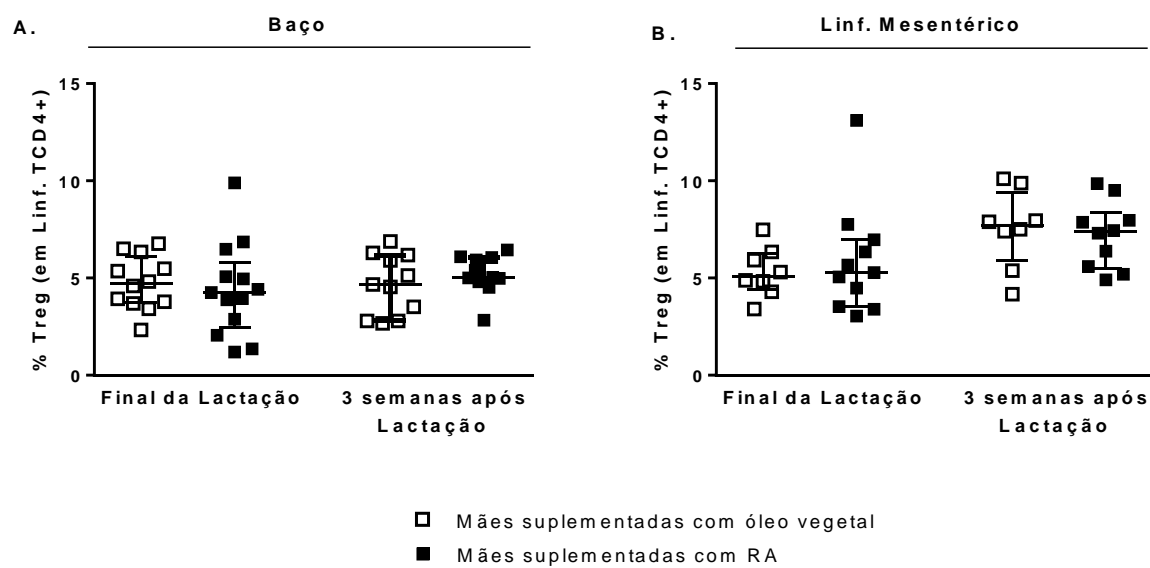


Figura 6. A suplementação materna com RA não altera o percentual de linfócitos Treg nas mães. Percentual de linfócitos Treg (TCD3⁺TCD4⁺CD25⁺Foxp3) presentes no baço (A) (n=11-13 camundongos) e linfonodos mesentéricos (B) (n=8-11 camundongos) foram analisados em camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole) e 3 semanas após o final da lactação, por citometria de fluxo. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil.

4.2 Efeito da suplementação materna com o RA no percentual das subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos das mães

Além da avaliação percentual de linfócitos Treg, avaliamos o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ de fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (TMC) (CD44⁺CD62L^{high}) presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães suplementadas com RA ou não. O percentual desses fenótipos foram avaliados por citometria de fluxo conforme estratégia de análise ilustrada na Figura 5C.

Nossos dados mostram que a suplementação materna com RA não alterou os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (naïve, TCM e TEC) do baço (Figura 7A) ou linfonodos mesentéricos (Figura 7B), tanto no período correspondente ao final do protocolo de suplementação, como três semanas após o final da suplementação com RA. Pode-se observar que há uma alteração no perfil de linfócitos TCD4⁺, de ambas mães, no final do protocolo onde o percentual de células naïve reduz e elevam-se as TCM. Já quanto ao perfil de linfócitos TCD8⁺, observa-se um incremento de linfócitos CD8⁺ TCM. Este achado chama atenção de que a amamentação, ou até um período pós-gestacional pode modificar o perfil de maturação dos linfócitos maternos, seja sistêmico ou relacionado ao GALT.

Sendo assim, a suplementação com RA durante a amamentação não induz populações de linfócitos T com fenótipos efetores, assim como não altera o percentual de células naïve.

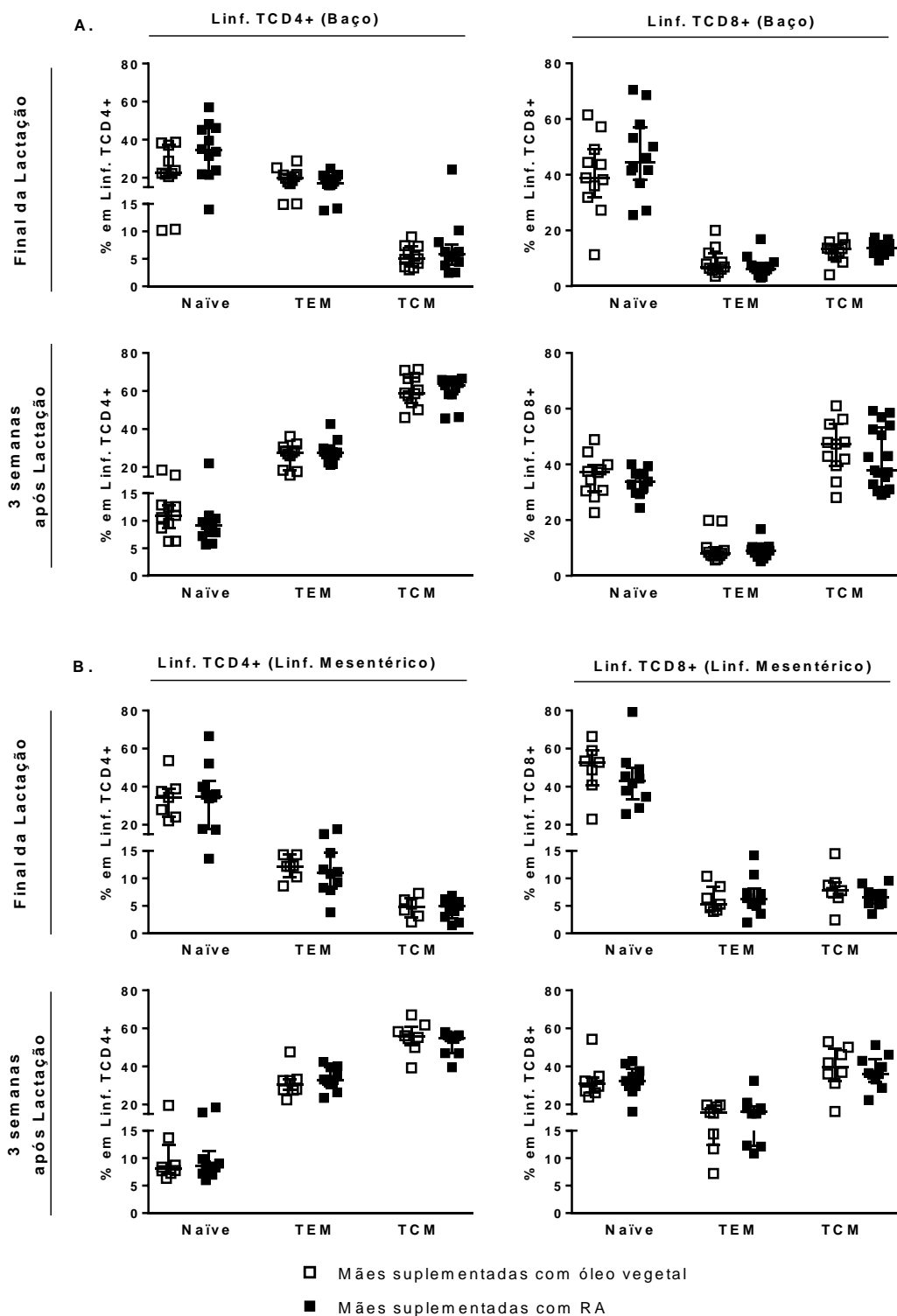


Figura 7. A suplementação materna com RA não altera o percentual dos fenótipos de linfócitos T naïve, de memória efetora e central nas mães. Percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), de memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e de memória central (TCM) (CD44⁺CD62L^{high}) presentes no baço (A) e linfonodos mesentéricos (B) foram analisados em camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole) e 3 semanas após o final da lactação, por citometria de fluxo. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. Baço (n=11-12) e linfonodos mesentéricos (n=7-10).

4.3 Efeito da suplementação com o RA quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos linfócitos T presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães

O RA produzido pelas DCs promove a migração de linfócitos para a mucosa intestinal por induzir a expressão do receptor de quimiocina CCR9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$, que interage com a quimiocina CCL25 e a molécula de adesão MadCAM-1, presentes na mucosa intestinal (Kim *et al.*, 2015). Dessa forma, os linfócitos podem migrar para o intestino e promover a homeostase desse sítio. Ainda que a suplementação materna não tenha alterado o percentual de linfócitos Treg e dos fenótipos de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ analisados, avaliamos se haveria aumento no percentual de linfócitos que expressam o receptor de quimiocina CCR9, efeito importante para a manutenção da homeostase intestinal.

A análise foi realizada por método de citometria de fluxo, conforme estratégia mostrada na Figura 5. Além disso foi utilizado um anticorpo isotipo controle, como mais um controle, além do FMO, para determinarmos adequadamente a população positiva para a expressão de CCR9.

Os resultados mostram que a suplementação materna com RA foi capaz de aumentar o percentual de linfócitos TCD8⁺ (Figura 8B) e Treg (Figura 8C) que expressam o receptor de quimiocina CCR9, tanto no baço e nos linfonodos mesentéricos. Esse efeito foi evidenciado somente no período correspondente ao final da lactação que coincidente ao período em que a mãe foi suplementada com RA. Quanto aos linfócitos TCD4⁺ (Figura 8A), assim como nos períodos mais tardios, não foi possível evidenciarmos alteração da expressão de CCR9.

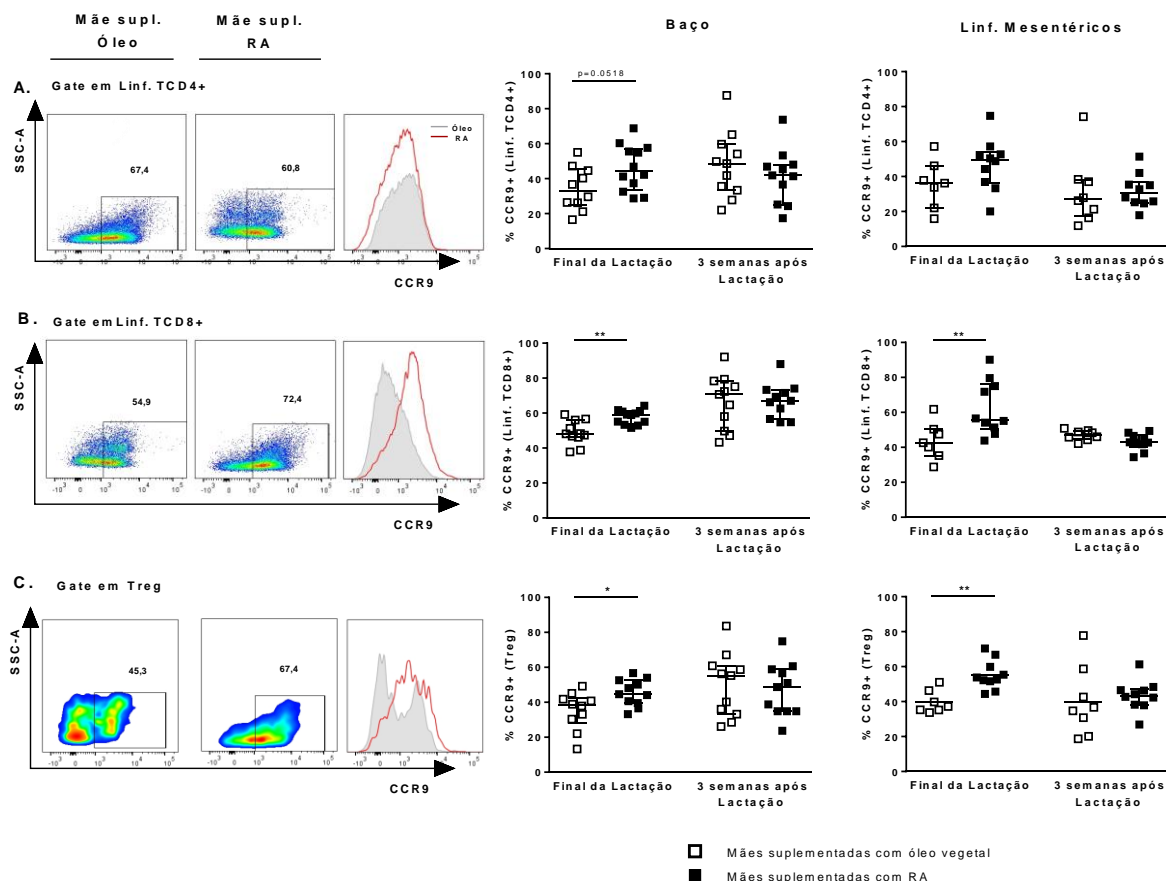


Figura 8. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos Treg e TCD8+ que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos da mãe. Dot-plot e histograma de linfócitos presentes no baço ao final da lactação e percentual de linfócitos TCD4⁺ (A), TCD8⁺ (B) e Treg CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (C) que expressam CCR9 em camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliados no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole) e 3 semanas após o final da lactação por citometria de fluxo. Baço (n=11-12) e linfonodos mesentéricos (n=7-10). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.4 Efeito da suplementação materna com o RA na expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos fenótipos de linfócitos T presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães

Apesar da suplementação com RA não influenciar no percentual das subpopulações de linfócitos T com fenótipo naïve, de memória efetora e memória central, foi avaliado se o aumento de linfócitos que expressam CCR9 poderia estar relacionado a algum fenótipo. Sendo assim, a expressão de CCR9 foi avaliada nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), memória efetora (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (CD44⁺CD62L^{high}) por citometria de fluxo, conforme estratégia mostrada na Figura 5C.

Os resultados mostram que a suplementação com RA é capaz de aumentar o percentual de linfócitos T que expressam CCR9 em todos os fenótipos de linfócitos TCD4⁺ e dos linfócitos TCD8⁺ de memória central nos linfonodos mesentéricos das mães (Figura 9C). Além de aumentar o percentual de linfócitos TCD4⁺ naïve que expressam CCR9 no baço (Figura 9B). Vale ressaltar que, apesar de não termos encontrado o mesmo efeito em linfócitos TCD4⁺ totais (Figura 8A), a avaliação das subpopulações indica que o efeito do RA quanto à expressão de CCR9 também é encontrado em linfócitos TCD4⁺, assim como foi demonstrado nos resultados anteriores dos linfócitos TCD8⁺ e Treg (Figura 8B-C).

Outro ponto interessante é que aumento da expressão de CCR9 é mais robusto em linfócitos T dos linfonodos mesentéricos do que no baço, o que evidencia que o efeito no GALT é mais expressivo que o sistêmico.

Além disso, também podemos destacar que, conforme resultados observados na figura anterior (Figura 8), a suplementação com RA não possui efeito tardio, considerando que o aumento da expressão de CCR9 é observado apenas no período correspondente ao final da lactação, e não posteriormente (Figura 9 B-C).

Os dados evidenciam que a suplementação com RA das mães durante o período de amamentação induz a expressão de CCR9 nos linfócitos T, aumentando o potencial migratório dessas células para a mucosa intestinal.

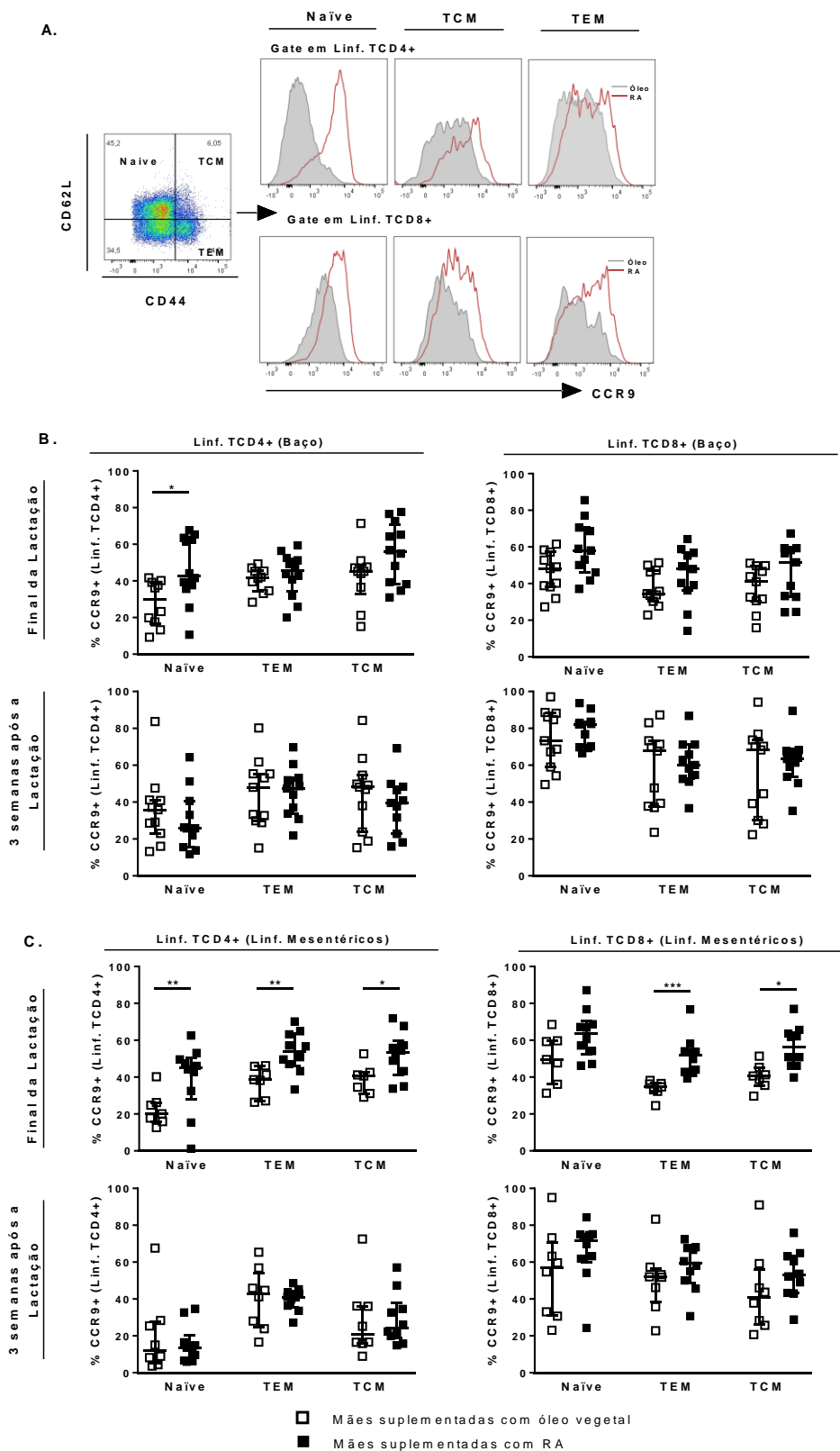


Figura 9. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos T naíve, de memória central e memória efetora que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos da mãe ao final da lactação. Dot-plot e histograma da expressão de CCR9 em linfócitos T presentes no baço ao final da lactação (A) e percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naíve (CD44⁺CD62L⁺), de memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e de memória central (TCM)

(CD44⁺CD62L^{high}) presentes no baço (B) e linfonodos mesentéricos (C) que expressam CCR9 em camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliados no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole) e 3 semanas após o final da lactação por citometria de fluxo. Baço (n=11-12) e linfonodos mesentéricos (n=7-10). Os dados foram expressos por mediana e intervalo. *p ≤0.05 **p ≤0.01, ***p ≤0.001.

4.5 Efeito da suplementação materna com RA na prole quanto ao percentual de linfócitos Treg do baço e linfonodos mesentéricos

Após avaliarmos o efeito da suplementação materna com RA nos linfócitos T presentes no baço e linfonodos mesentéricos das mães e constatarmos o aumento da expressão de CCR9, passamos a analisar o efeito nas proles, visto que a suplementação materna com RA ocorreu durante o período de lactação/amamentação.

Para tanto, proles de ambos os sexos provenientes de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), foram avaliadas em dois períodos: com 3 semanas de idade (período correspondente ao 21º dia de idade da prole, ou seja, ao final da lactação), e 6 semanas de idade (período correspondentes a três semanas após o final da lactação).

Da mesma forma como ocorreu nas mães, a suplementação materna com RA não causou alterações nos números totais das células presentes nos órgãos avaliados (dados não mostrados), assim passamos a analisar os valores percentuais das populações celulares.

Inicialmente, vimos que proles com 6 semanas de idade provenientes de mães suplementadas com RA mostraram um aumento no percentual de linfócitos Treg Foxp3⁺ no baço (Figura 10A), mas sem alteração nos linfonodos mesentéricos (Figura 10B).

Vale ressaltar que para a análise do período mais tardio, ou seja, 6 semanas de idade da prole, nós trabalhamos com um número amostral maior, pois inicialmente, dividimos os grupos de prole entre machos e fêmeas, para descartarmos algum efeito proveniente da maturidade sexual. Contudo, como não encontramos diferenças entre os parâmetros avaliados, optamos por apresentar os dados sem a distinção sexual.

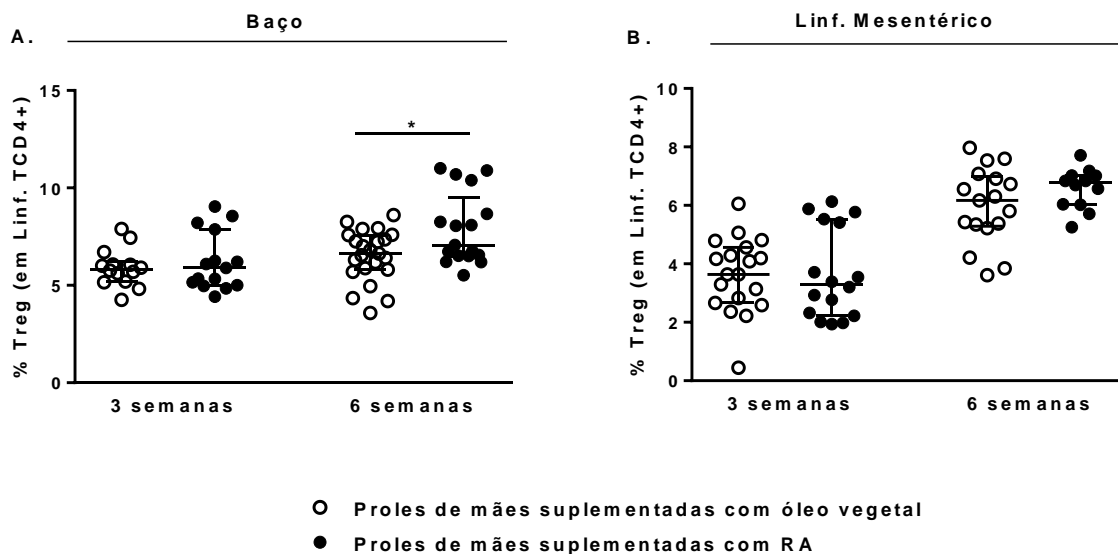


Figura 10. A suplementação materna com RA aumenta o percentual e linfócitos Treg no baço da prole com 6 semanas de idade. Percentual de linfócitos Treg (TCD3⁺TCD4⁺CD25⁺Foxp3) presentes no baço (A) (n=14-23) e linfonodos mesentéricos (B) (n=12-16) foram analisados nas proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) e 6 semanas de idade da prole (3 semanas após o final da lactação), por citometria de fluxo. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. *p ≤ 0.05

4.6 Efeito da suplementação materna com o RA na prole quanto o percentual das subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos

Nós também verificamos se a suplementação materna com RA teria algum efeito quanto ao percentual das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ de fenótipo naíve (CD44⁻CD62L⁺), memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (TMC) (CD44⁺CD62L^{high}) no baço e linfonodos mesentéricos das proles.

Os dados mostram que a suplementação materna com RA não exerceu nenhuma influência quanto aos percentuais dos fenótipos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (naíve, TCM e TEC) no baço (Figura 11A) ou linfonodos mesentéricos (Figura 11B), em ambos os períodos analisados, com exceção dos percentual dos linfócitos TCD8⁺ TEM nos linfonodos mesentéricos das proles com 3 semanas (Figura 11B), onde vimos uma queda percentual em relação as proles controles.

Sendo assim, apenas a suplementação com RA não induz populações de linfócitos T com fenótipos efetores, assim como não altera o percentual de células naíve nas proles.

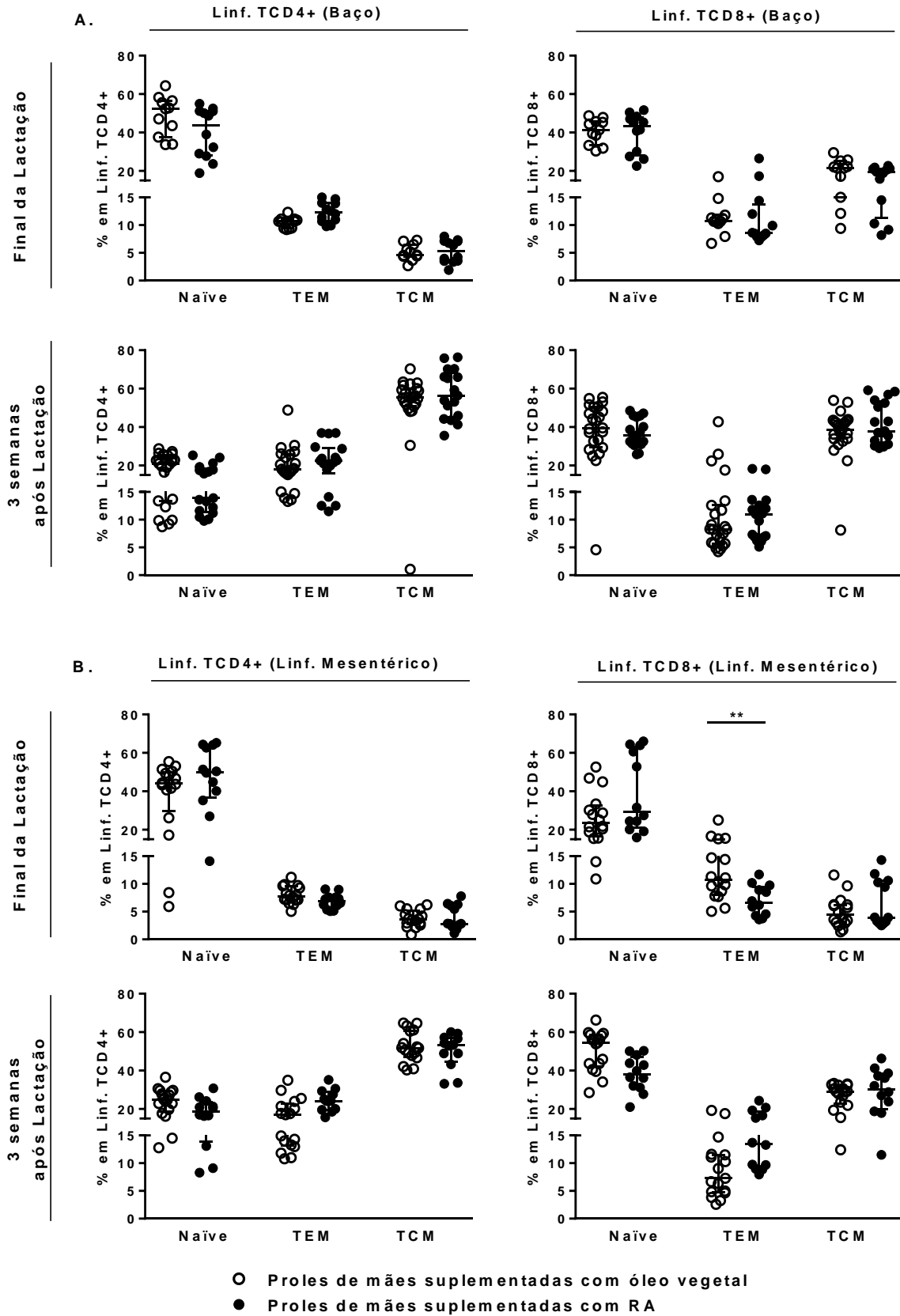


Figura 11. A suplementação materna com RA não altera o percentual dos fenótipos de linfócitos T naïve, de memória efetora e central nas proles. Percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), de memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e de

memória central (TCM) ($CD44^+CD62L^{high}$) presentes no baço (A) e linfonodos mesentéricos (B) foram analisados em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) e 6 semanas de idade da prole (3 semanas após o final da lactação), por citometria de fluxo. Baço (n=14-23) e linfonodos mesentéricos (n=12-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0.05$

4.7 Efeito da suplementação materna com o RA nas proles quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos

O próximo passo vou verificar a expressão de CCR9 nos linfócitos $TCD4^+$, $TCD8^+$, e Treg no baço e linfonodos mesentéricos das proles com 3 e 6 semanas de idade, de mães suplementadas com RA ou não.

Os dados mostram que a suplementação materna com RA durante o período de amamentação teve um efeito ainda mais pronunciado nas proles, sendo capaz de induzir a expressão de CCR9 tanto nos linfócitos $TCD4^+$ (Figura 12A), quanto nos $TCD8^+$ (Figura 12B) e também nos linfócitos Treg (Figura 12C).

Além disso, o percentual de linfócitos T que expressam CCR9 permaneceu elevado nas proles com 6 semanas, no baço e linfonodos mesentéricos. Este dado mostra que nas proles o efeito do RA via amamentação é local e sistêmico, gerando um efeito duradouro.

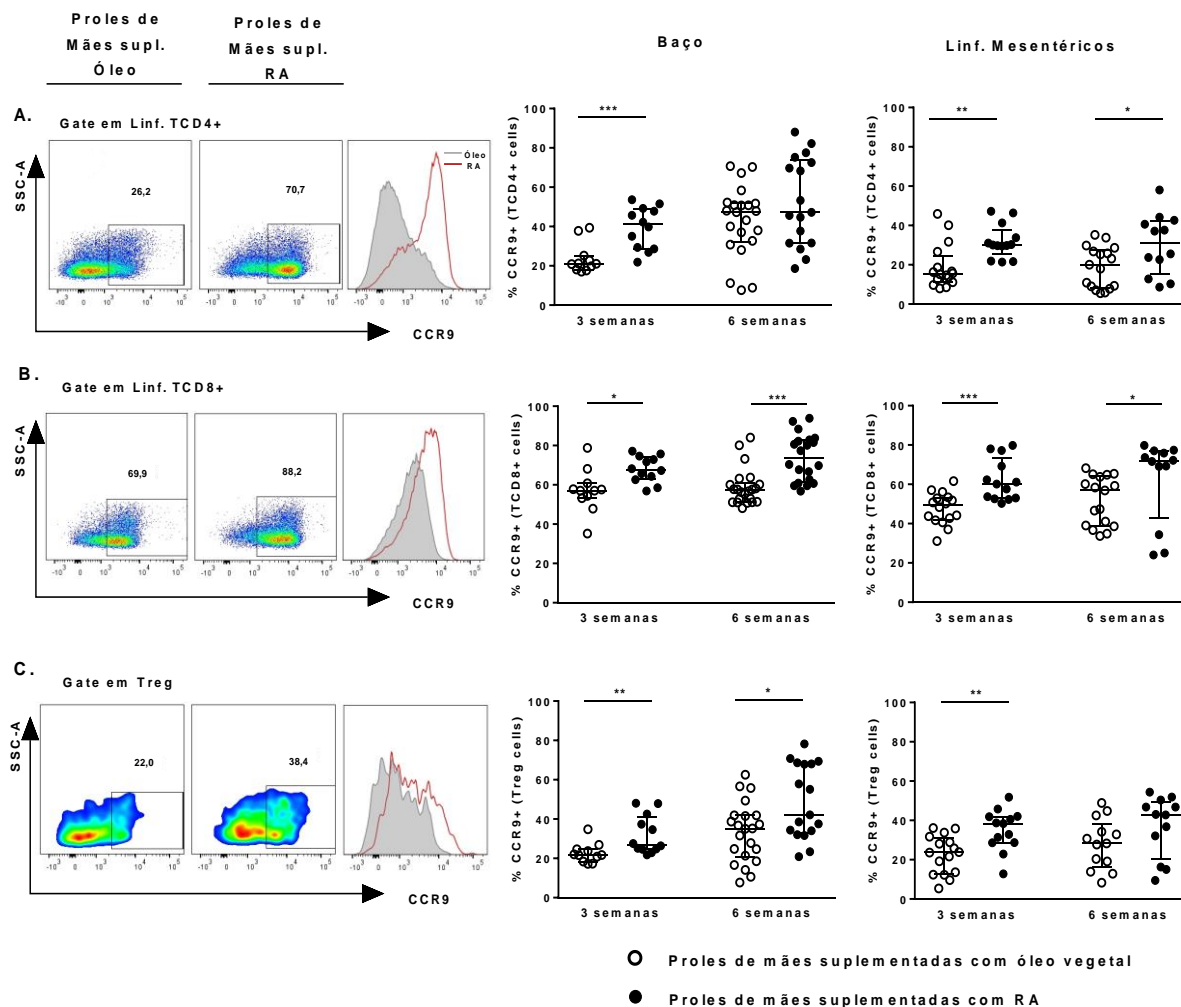


Figura 12. Suplementação materna de RA eleva o percentual de linfócitos T CD4+ TCD8+ e Treg que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos das proles. Dot-plot e histograma de linfócitos presentes no baço ao final da lactação e percentual de linfócitos TCD4⁺ (A), TCD8⁺ (B) e Treg CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (C) que expressam CCR9 em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliados no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) e 6 semanas de idade da prole (3 semanas após o final da lactação), por citometria de fluxo. Baço (n=14-23) e linfonodos mesentéricos (n=12-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

4.8 Efeito da suplementação materna com o RA nas proles quanto à expressão do receptor de quimiocina CCR9 nos fenótipos de linfócitos T do baço e linfonodos mesentéricos

Como o aumento da expressão de CCR9 foi mais pronunciado nas proles, mesmo com 6 semanas de idade, período no qual já não tinham influência da amamentação por 3 semanas, averiguamos a expressão de CCR9 nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁻CD62L⁺), memória efetora (CD44⁺CD62L^{low}) e memória central (CD44⁺CD62L^{high}) presentes no baço e linfonodos mesentéricos das proles.

Com a análise das subpopulações no baço observamos que a suplementação materna com o RA elevou o percentual de linfócitos TCD4⁺ naïves CCR9⁺ nas proles com 3 semanas (Figura 13B). Além disto, induziu aumento da expressão de CCR9 em todas as populações de TCD8⁺ e TCD4⁺ TEM, nas proles com 6 semanas de idade.

Já nos linfonodos mesentéricos o aumento no percentual de linfócitos que expressam CCR9 ocorreu na população de linfócitos TCD4⁺ TEM e TCM e linfócitos TCD8⁺ naïves nas proles com 3 semanas (Figura 13C) e em todas as populações de TCD8⁺ nas proles com 6 semanas de idade.

Dessa forma podemos afirmar que, nas proles com 3 semanas de idade aumento de CCR9 é mais pronunciado nos linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos. Chama atenção que nas proles com 6 semanas o aumento de CCR9 nos linfócitos TCD8⁺ é mais pronunciado, em ambos os sítios analisados e em todos os subtipos avaliados.

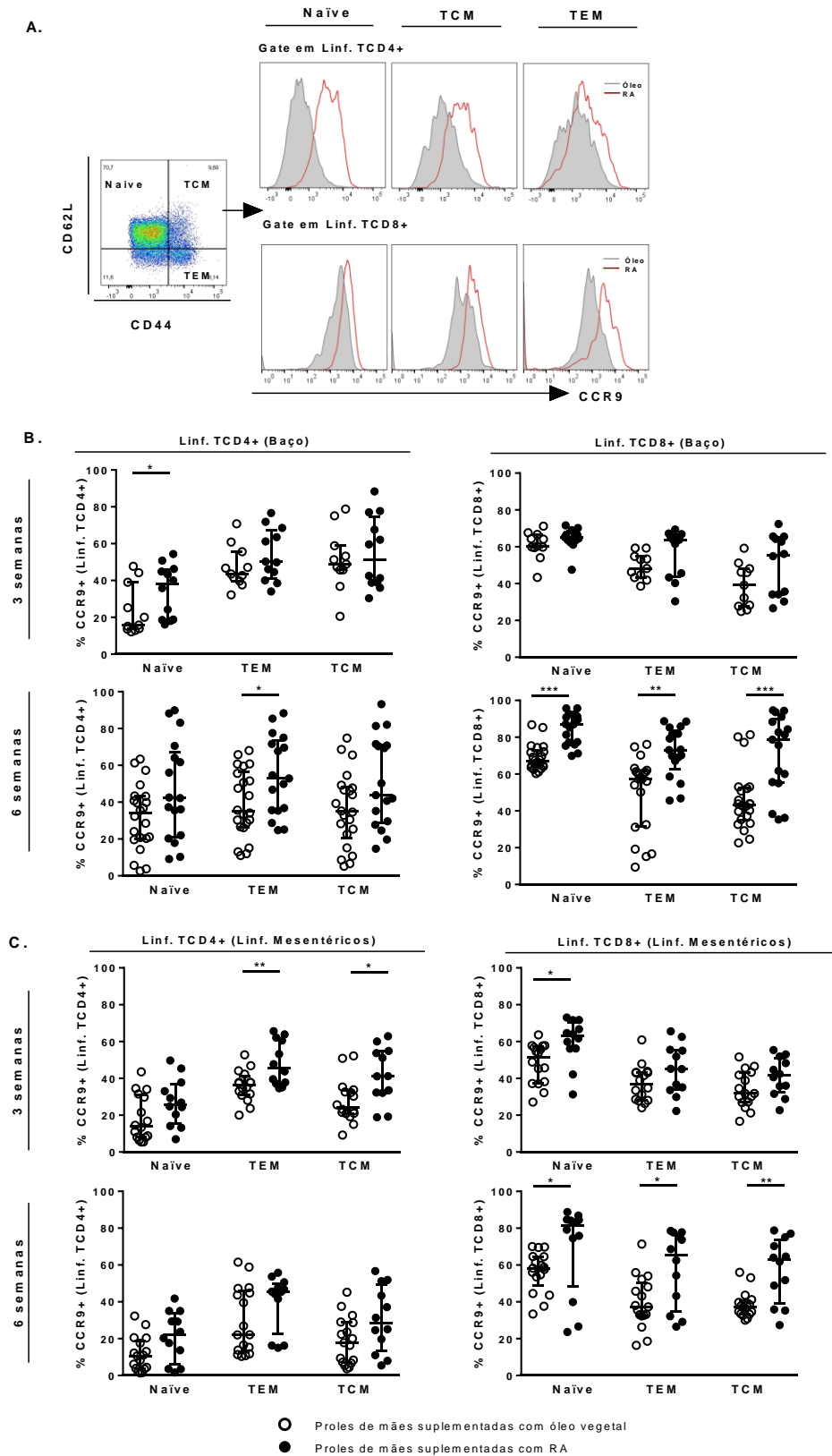


Figura 13. Suplementação com RA eleva o percentual de linfócitos T naïve, de memória central e efetora que expressam CCR9 no baço e linfonodos mesentéricos das proles. Dot-plot e histograma de linfócitos presentes no baço ao final da lactação e percentual de linfócitos

Percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com fenótipo naïve (CD44⁺CD62L⁺), de memória efetora (TEM) (CD44⁺CD62L^{low}) e de memória central (TCM) (CD44⁺CD62L^{high}) presentes no baço (A) e linfonodos mesentéricos (B) que expressam CCR9 em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliados no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) e 6 semanas de idade da prole (3 semanas após o final da lactação), por citometria de fluxo. Baço (n=14-23) e linfonodos mesentéricos (n=12-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. *p ≤0.05, **p ≤0.01, ***p ≤0.001.

4.9 Análise das populações de linfócitos T e B presentes na lâmina própria do intestino delgado das proles.

Constatamos que a suplementação materna com RA induzia um aumento no percentual de linfócitos T CCR9⁺ contudo, a expressão do CCR9 não garante a migração dessas células para a mucosa intestinal. Sendo assim, averiguamos se havia alguma diferença quanto às populações de linfócitos presentes na mucosa intestinal.

Para tanto, proles com 3 semanas de idade de ambos os sexos provenientes de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), foram analisados quanto a presença de linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺ e Treg na lâmina própria do intestino delgado. Verificamos, também o percentual de linfócitos B IgA⁺, dado a importância do RA para o aumento dessas células e secreção de IgA no intestino. A análise dessas populações celulares foi realizada por citometria de fluxo conforme ilustra a estratégia de análise na Figura 14.

Quanto à análise de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺, não foi evidenciada nenhuma diferença nos percentuais dessas populações (dados não mostrados). Todavia, encontramos um aumento percentual de linfócitos Treg (Figura 15A) e de linfócitos B IgA⁺ (Figura 15B) nas proles de mães suplementadas com RA, que em conjunto, pode proporcionar um ambiente mais tolerogênico na mucosa intestinal.

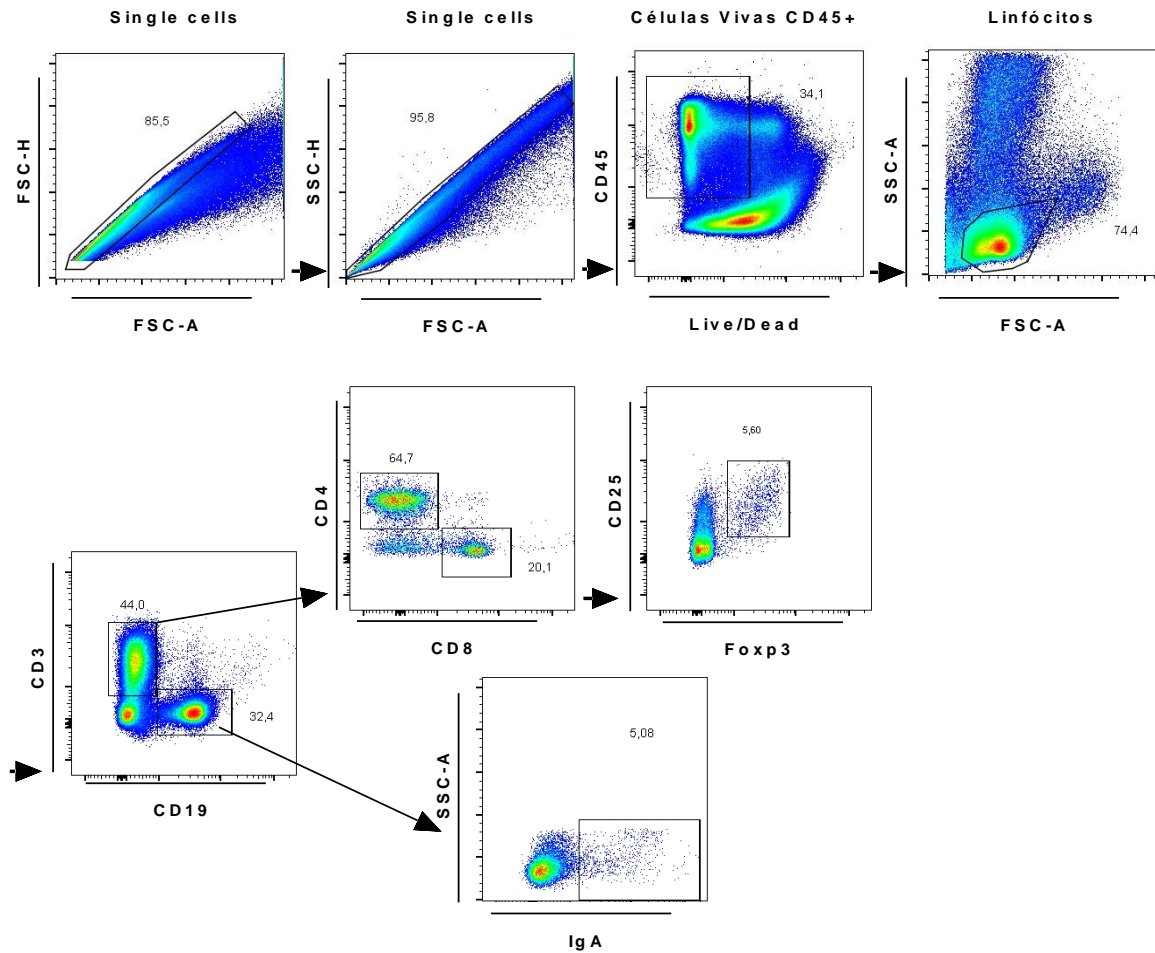


Figura 14. Estratégia de análise para avaliação de linfócitos T e B presentes na lamina própria do intestino delgado. Estratégia para análise da frequência de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, linfócitos Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) e linfócitos B IgA⁺ (CD19⁺IgA⁺) presentes na lâmina própria do intestino delgado.

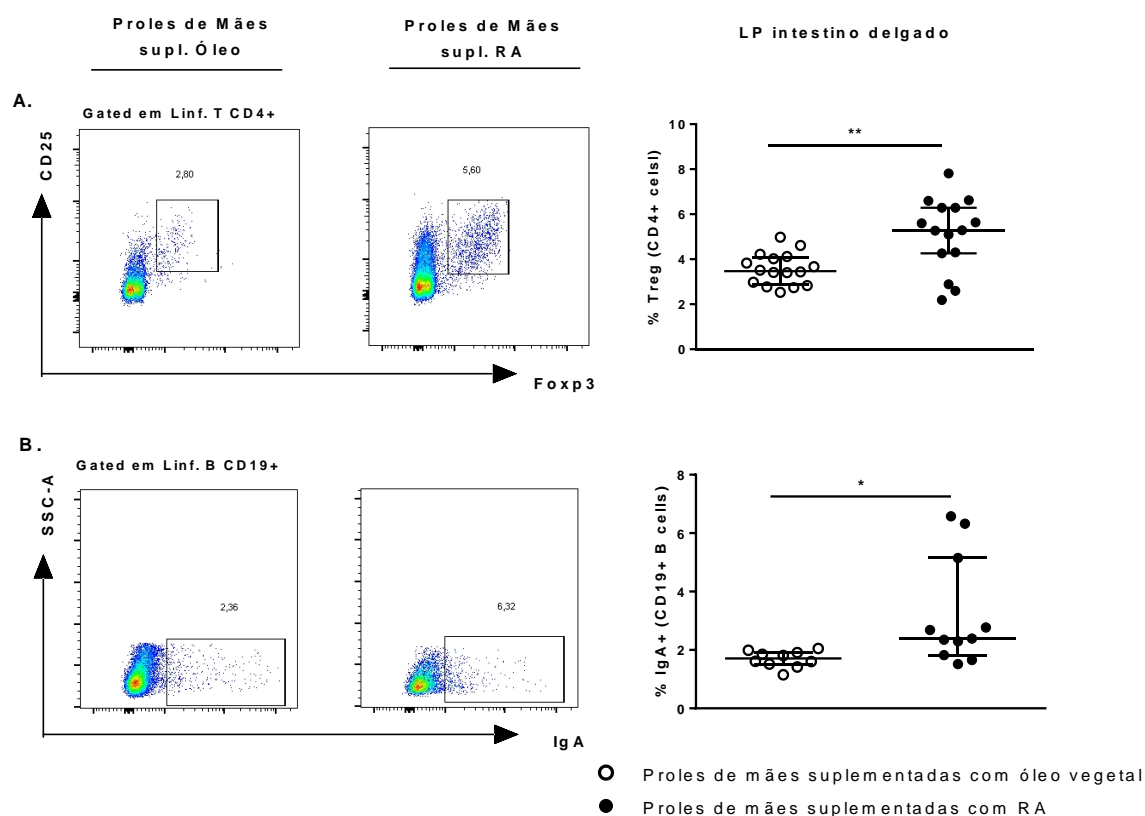


Figura 15. A suplementação materna com RA eleva o percentual de linfócitos Treg e linfócitos B IgA+ na lâmina própria do intestino delgado das proles. Percentual de linfócitos Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Fop3⁺) (A) e linfócitos B IgA⁺ (CD19⁺IgA⁺) (B) presentes na lâmina própria do intestido delgado de proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliadas no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) por citometria de fluxo (n=11-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01.

4.10 Perfil de citocinas de linfócitos T da lâmina própria do intestino delgado das proles.

Em decorrência do efeito tolerogênico do RA avaliamos a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, na lâmina própria do intestino delgado das proles. Após coleta e digestão do tecido, a suspensão de células foi estimulada por 4 horas com 50ng/ml de PMA e 1µg/ml de Ionomicina e a produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. A estratégia está ilustrada na Figura 16.

Já na condição sem estímulo, foi detectado um maior percentual de linfócitos IL-17A⁺ em TCD4⁺ (Figura 17A), quanto nos linfócitos TCD8⁺ (Figura 17B), enquanto que o percentual de linfócitos T produtores de IL-10, IFN-γ e linfócitos produtores tanto de IL-17A quanto IFN-γ (IL-17/ IFN-γ) foram menos expressivos. Em resposta ao estímulo houve a produção de todas as citocinas analisadas nos linfócitos T, mas em quantidade similar entre as proles.

Dessa forma, evidenciamos que na lâmina própria do intestino das proles de mães suplementadas com RA, há aumento de linfócitos Treg, mas não altera o perfil de citocinas produzidas pelos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺.

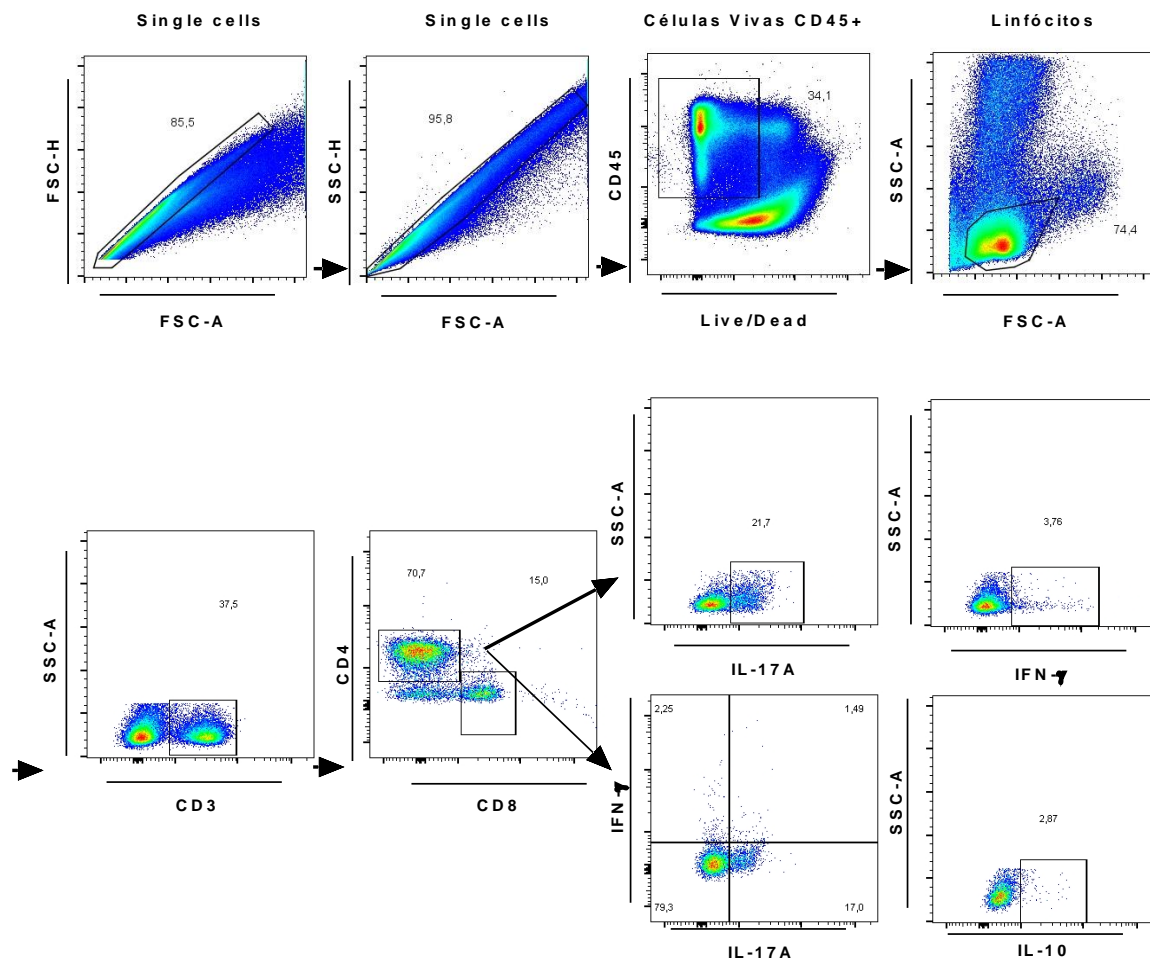


Figura 16. Estratégia de análise de citometria de fluxo para linfócitos T produtores de citocinas. Estratégia para análise da frequência de linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺ produtores de IL-10, IL-17A e IFN- γ .

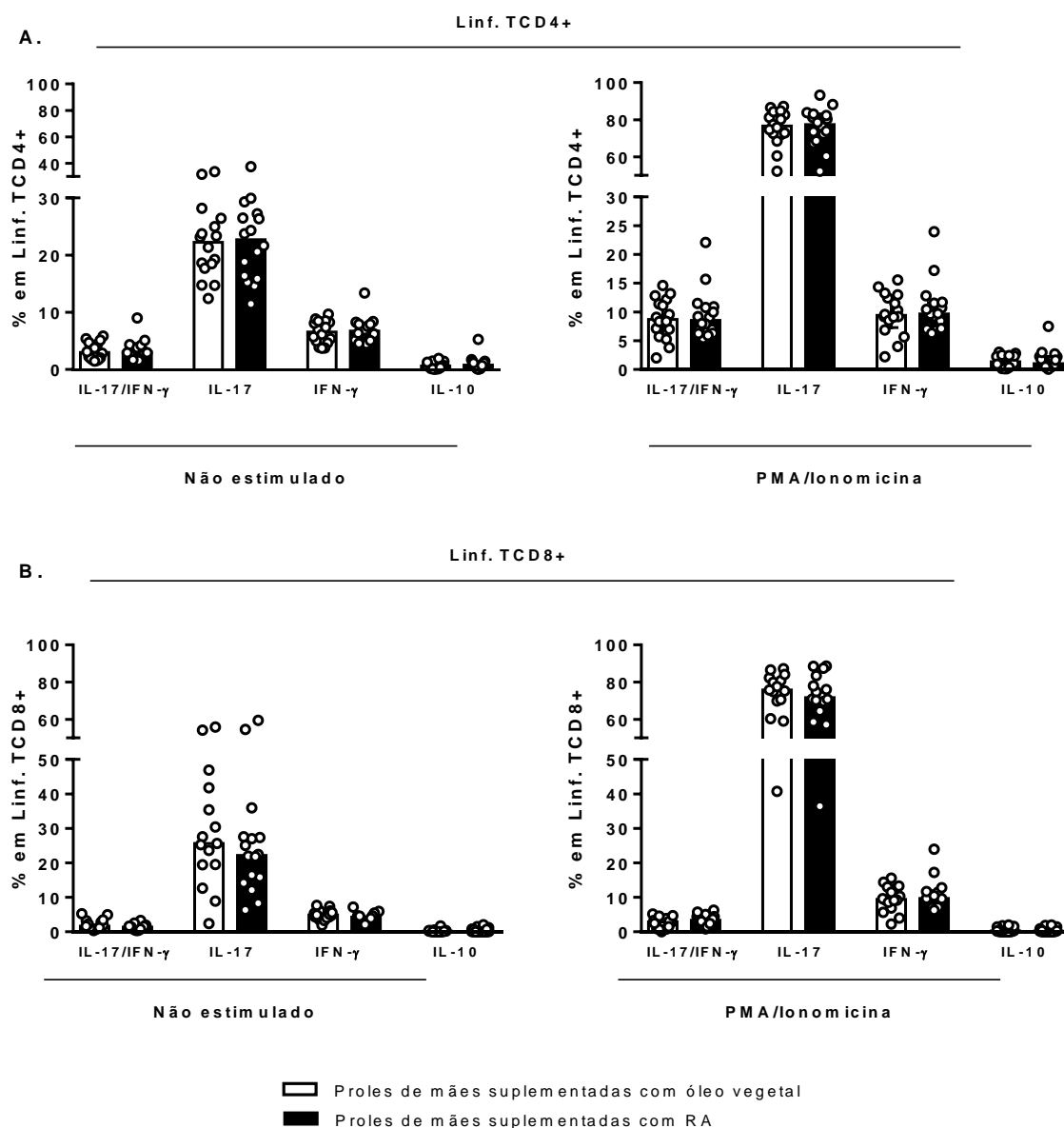


Figura 17. A suplementação materna com RA não influencia na produção *in vitro* de citocinas por linfócitos T. Percentual de linfócitos TCD4+ (A) e TCD8+ (B) produtores das citocinas de IL17A, IL-10, IFN- γ e linfócitos produtores tanto de IL-17A quanto IFN- γ (IL-17/IFN- γ) presentes na lâmina própria do intestino delgado de proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliadas no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) por citometria de fluxo nas condições sem estímulo e 4 horas após estímulo com PMA/Ionomicina (n=11-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil

4.11 Efeito da suplementação materna com RA na concentração de IgA e IgG totais e citocinas séricas pró e anti-inflamatórias

Além do amplo efeito do RA na tolerância e homeostase intestinal, o RA exerce um papel importante nos mecanismos efetores, como na produção de anticorpos IgA (Hall, Grainger, *et al.*, 2011) e indução da produção de citocinas de perfil regulador (Duriancik *et al.*, 2010). Desta forma, analisamos se a suplementação materna com RA poderia influenciar na produção de IgA sérica e fecal e também na produção de IgG sérica nas proles.

Para tanto, realizamos a coleta de soro e fezes das proles de ambos os sexos provenientes de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem), em dois períodos: com 3 semanas de idade (período correspondente ao 21º dia de idade da prole, ou seja, ao final da lactação), e 6 semanas de idade (período correspondentes a três semanas após o final da lactação). Os anticorpos foram mensurados por ELISA.

Os achados mostram um aumento na concentração de IgA fecal (Figura 18A) nas proles com 3 semanas de idade enquanto a concentração sérica de IgA permaneceu similar ao grupo controle. Em relação a concentração sérica de IgG a prole de mães suplementadas com RA mostrou-se equivalente ao grupo controle nos dois períodos avaliados. Esses dados sugerem que possa existir maior transferência de IgA do leite materno com a suplementação ou que há maior produção local da prole em efeito da suplementação, contudo, diferente da expressão de CCR9 nos linfócitos T, o aumento de IgA fecal não perdurou na ausência da amamentação.

O RA é descrito ser um metabólito capaz de promover a tolerância na mucosa intestinal por aumentar a secreção de IL-10 e TGF- β no GALT (Duriancik *et al.*, 2010). Além disto, concentrações menores de RA e TGF- β 1 na presença de IL-6 pode favorecer a diferenciação de linfócitos Th17 na mucosa intestinal (Collins *et al.*, 2011). Contudo, ainda não é conhecido se a suplementação das mães durante a amamentação pode influenciar os níveis de citocinas séricas, nas proles.

Prosseguimos avaliação do efeito da suplementação materna com RA nas citocinas pró e anti-inflamatórias séricas das proles, mensuradas por citometria de fluxo (CBA). As proles de mães suplementadas com RA mostraram concentrações menores de TGF- β 1 com 3 semanas de idade, o que foi mantido com 6 semanas de idade (Figura 18B). Em contraste, houve aumento de IFN- γ sérico nas proles com 3 semanas de idade.

Não encontramos diferença para a concentração de IL-17A e TNF nos períodos avaliados. Também foram feitas dosagens para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12p70, mas os valores séricos encontrados estavam abaixo do limite de detecção.

Os dados mostram um efeito sistêmico mediado pela suplementação de RA durante a amamentação na prole, contudo se isso gera uma consequente regulação negativa pelo IFN- γ na secreção de TGF- β ainda precisa ser determinado.

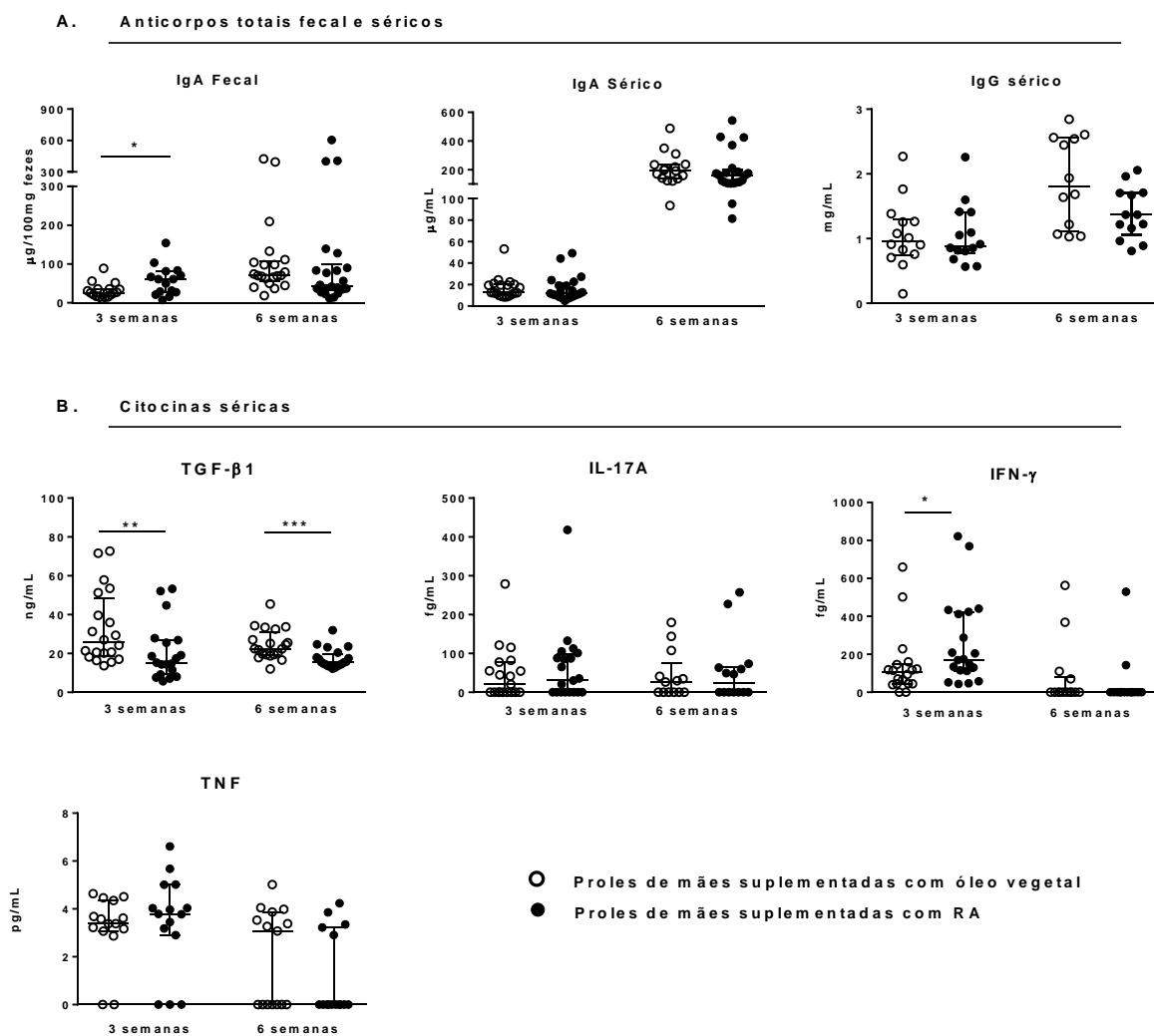


Figura 18. Efeito imunomodulador da suplementação materna com RA nas concentrações de anticorpos e citocinas séricas das proles. Concentrações séricas e fecal dos anticorpos IgA e IgG totais (A) avaliadas por ELISA e concentrações séricas de citocinas pró e anti-inflamatórias (B) TGF- β 1, IL-17A, IFN- γ e TNF avaliadas por citometria de fluxo, de proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) analisadas no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) e 6 semanas de idade da prole (3 semanas após o final da lactação). Fezes (n=15-20) e soro (n=14-20). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.12 Avaliação dos anticorpos IgA e IgG totais e TGF- β 1 no leite de mães suplementadas com RA

Como detectamos um aumento de IgA fecal nas proles com 3 semanas de idade, verificamos se há uma relação com a quantidade de anticorpos IgA do leite das mães suplementadas com RA. Sendo assim, avaliamos a quantidade de IgA, assim como as quantidades IgG e TGF- β presentes no leite, visto que o leite é um importante veículo para componentes imunológicos que protegem a prole e auxiliam o desenvolvimento de seu sistema imunológico.

Para tanto, o leite materno foi coletado de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) ao final do período da lactação (período correspondente ao 21º dia de idade da prole). Para a coleta do leite, foi administrado ocitocina para as mães após o uso de anestésico.

A suplementação com RA durante a amamentação não estimulou a produção de anticorpos IgA total no leite (Figura 19A), em contraste, os anticorpos IgG totais diminuíram em relação ao grupo controle (Figura 19B). A concentração de TGF- β 1 (Figura 19C), foi similar entre os grupos avaliados. Esses dados sugerem que o aumento de IgA fecal da prole não deve ser proveniente de uma maior transferência de anticorpos materno.

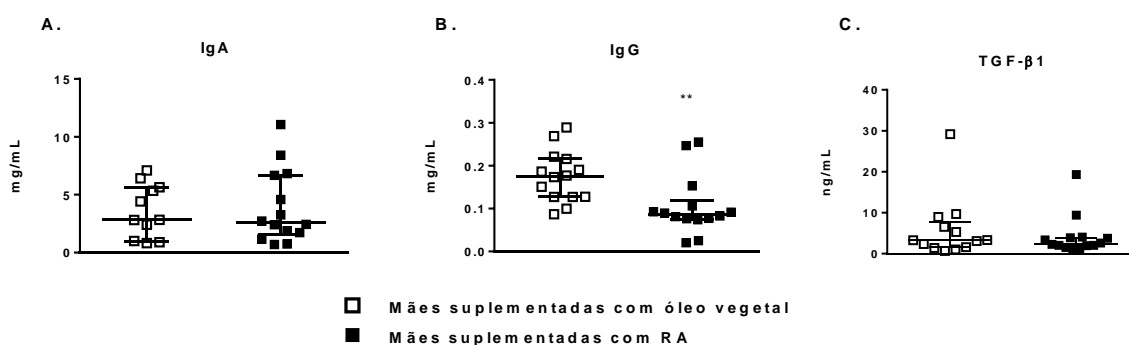


Figura 19. Análise do efeito da suplementação materna com RA nos anticorpos e TGF- β 1 no leite. Anticorpos IgA (A) e IgG (B) totais e TGF- β 1(C) presentes no leite de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) avaliados no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole). Os anticorpos foram mensurados por ELISA e o TGF- β 1 por citometria de fluxo (n=11-14). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. **p \leq 0.01.

4.13 Efeito da suplementação com RA na concentração de anticorpos totais de citocinas séricas nas mães

Avaliamos também se a suplementação com RA durante a amamentação poderia alterar as concentrações de anticorpos IgA e IgG e de citocinas séricas pró e anti-inflamatórias nas mães.

Sendo assim, para determinamos as concentrações de IgA e IgG total e de citocinas, realizamos coletas de soro e fezes de mães, suplementadas ou não com RA no final da lactação e 3 semanas após o final da lactação. Os anticorpos foram mensurados por ELISA e a citocinas por citometria de fluxo (CBA).

O RA não alterou a concentração de IgA fecal nas mães, contudo, houve no final da lactação uma diminuição dos níveis séricos de IgA e IgG (Figura 20A). A diminuição de IgG sérica corrobora com os achados do leite (Figura 19B), mas não influenciou a IgG sérica da prole (Figura 18A). A diminuição de IgA e IgG sérica não permanece nas mães após 3 semanas do fim da lactação, mostrando mais uma vez que a influência da suplementação com RA não possui efeito tardio nas mães.

Quanto às concentrações de citocinas séricas, o RA mostrou-se capaz de elevar IL-17A apenas no período correspondente ao final da lactação (Figura 20B), não demonstrando qualquer efeito nas outras citocinas avaliadas.

As concentrações séricas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12p70, foram encontrados abaixo do limite de detecção.

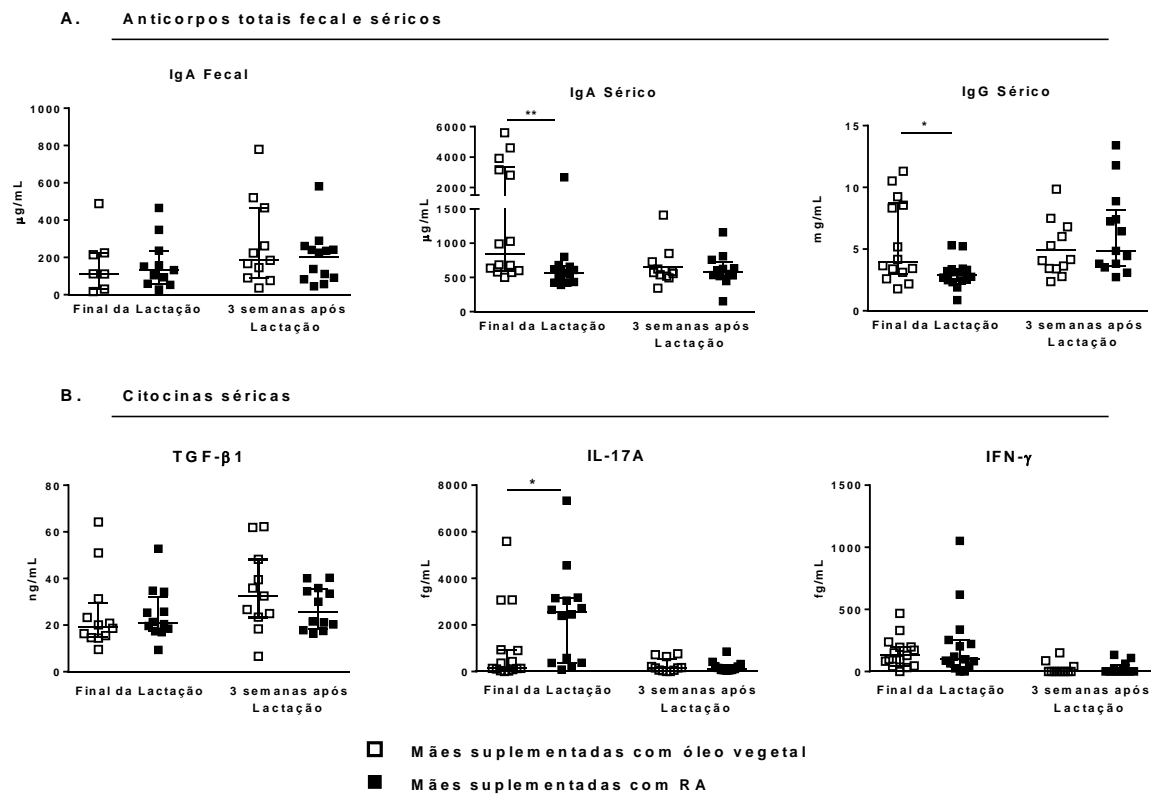


Figura 20. Efeito imunomodulador da suplementação materna com RA nas concentrações de anticorpos sérico e fecal e citocinas séricas nas mães. Concentrações séricas e fecal dos anticorpos IgA e IgG totais (A) avaliadas por ELISA e concentrações séricas de citocinas pró e anti-inflamatórias (B) TGF- β 1, IL-17A, IFN- γ e TNF avaliadas por citometria de fluxo, em camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) analisadas no período correspondente ao final da lactação (21 dias após o nascimento da prole) e 3 semanas após o final da lactação. Fezes (n=7-13) e soro (n=11-14). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.14 Efeito modulador da suplementação materna de RA na resposta ao agonista de TLR 7/8 por linfócitos T presentes no baço da prole

O período neonatal em murinos destaca-se por uma clara deficiência na geração de uma resposta Th1 eficiente, tendo um desvio para respostas de perfil Th2 (Adkins, 2007; Rose *et al.*, 2007). Sendo assim, a elevação sérica de IFN- γ observada nas proles com 3 semanas foi um dado que nos chamou atenção, sendo importante frente a infecções bacterianas e virais. Já é descrito que RA possui papel importante na resposta antiviral por induzir a expressão de RIG-I (*Retinoid-induced gene I*), receptor citosólico de RNA dupla fita, contribuindo com aumento da produção de IFN do tipo 1 (Soye *et al.*, 2011). Contudo, ainda não é conhecido se a suplementação materna com RA durante a amamentação pode influenciar na resposta imune da prole associada a outros receptores de RNA como TLR 7 e 8.

Desta forma, para avaliar o efeito suplementação materna na resposta ao agonista de TLR7/8 (CL097 2,5 μ g/mL) e o efeito *in vitro* do RA (20nM/mL) esplenócitos das proles com 3 semanas foram cultivados por 72hs na presença de RA ou CL097. Nossos resultados mostraram que proles de mães suplementadas com RA responderam melhor ao agonista CL097 quanto à secreção de IFN- γ (Figura 21) corroborando com o resultado encontrado no soro (Figura 18B). Também dosamos TNF, IL-6 e IL-10, mas sem diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados).

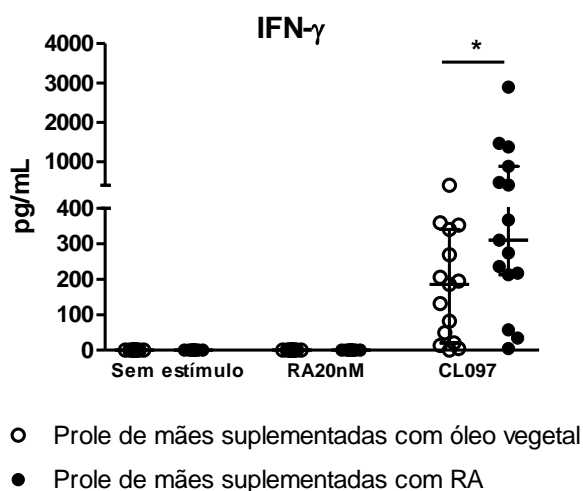


Figura 21. Efeito modulador da suplementação materna com RA na secreção de IFN- γ induzidas por CL097 em esplenócitos. Secreção IFN- γ no sobrenadante de cultura (72hs) de esplenócitos, avaliadas por citometria de fluxo, de proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) analisadas no período correspondente a 3 semanas de idade da prole (final da lactação) (n=15). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. *p \leq 0.05.

4.15 Efeito da suplementação materna com RA na microbiota intestinal da prole

Como a microbiota pode ser influenciada pela dieta e causar impactos na resposta imunológica (Brown *et al.*, 2015), avaliamos nas proles o efeito da suplementação materna com RA na composição da microbiota.

Para tanto, foi realizada a coleta de fezes nas proles com 11, 21 e 31 dias de idade, e após sequenciamento e análise do DNA ribossomal 16S, verificamos que a suplementação materna com RA não modificou a microbiota da prole (Figura 22 A-B). Contudo, nas proles com 11 dias, chama atenção o fato da microbiota não formar grupamentos coesos (Figura 22A). Possivelmente isso ocorre porque nessa idade precoce a microbiota ainda não está em equilíbrio e sofre muita influência materna. Na análise filogenética, nas proles com 11 dias existe uma predominância de Firmicutes, já nos outros períodos há predominância de Bacteroidetes (Figura 22B).

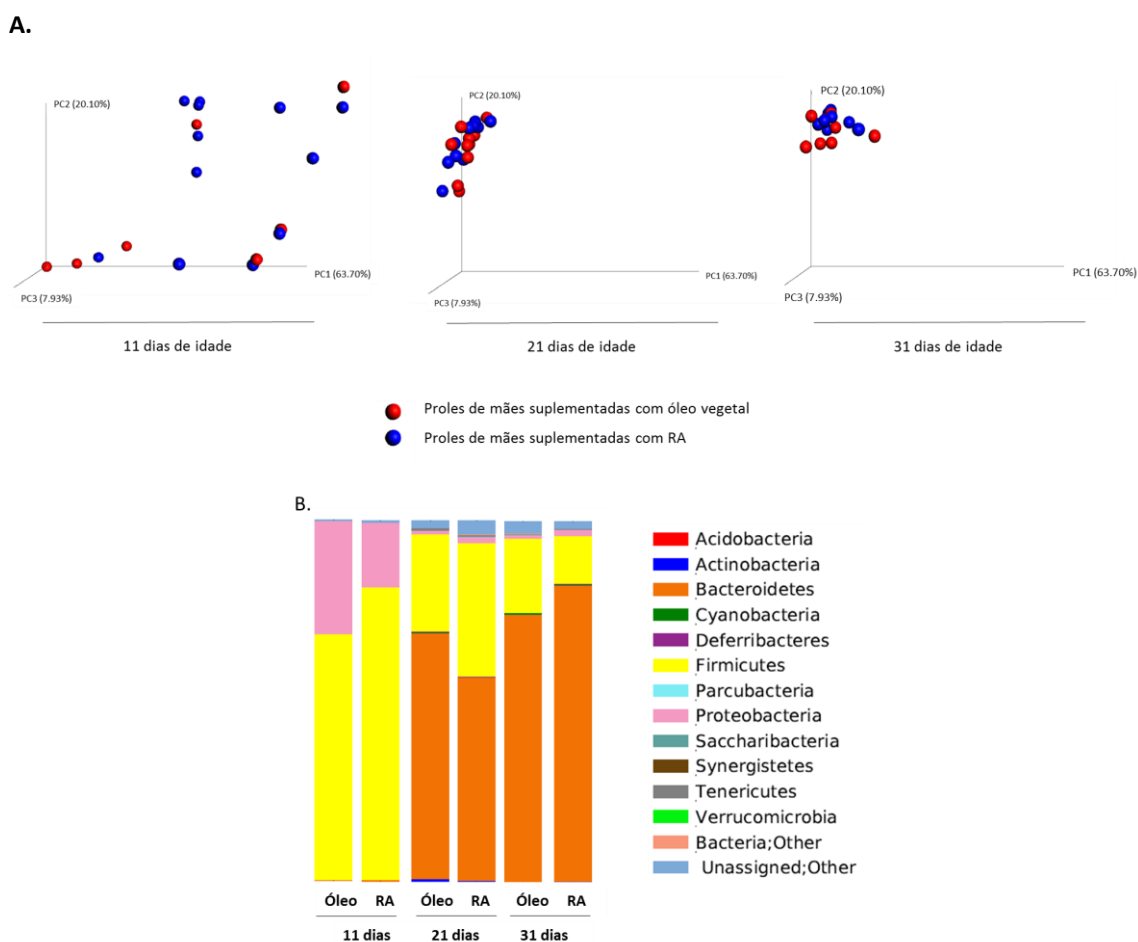


Figura 22. A suplementação materna com RA não altera a microbiota intestinal das proles. Análise de componentes principais da microbiota intestinal das proles (A). Análise dos filos das bacterianos na microbiota intestinal das proles (B).

4.16 Efeito da suplementação materna com RA na colite aguda mediada por Sulfato de Sódio Dextrano nas proles de camundongos

Dando continuidade ao estudo da influência da suplementação materna com RA, durante a amamentação, no sistema imunológico da prole, constatamos que a composição da microbiota intestinal não se altera, mas há aumento de linfócitos T reg e linfócitos B IgA⁺ na lâmina própria do intestino, e de anticorpos IgA fecal, assim fomos avaliar se esses achados poderiam influenciar na indução de resposta inflamatória intestinal da prole.

Escolhemos induzir uma inflamação com uso DSS, baseado no papel regulador do RA nas inflamações no intestino, por induzir células de perfil regulador e diminuir respostas de perfil Th1 e Th17, implicados no desenvolvimento da colite (Okayasu *et al.*, 2016).

Sendo assim, proles de ambos os sexos provenientes de camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) com 25 dias de idade, foram submetidas ao protocolo de indução de colite por DSS, com ingestão voluntária de 3% de DSS eluído em água, por 7 dias. Ao final desse período, o DSS foi substituído por água, e a prole ingeriu água por mais 3 dias. O grupo controle ingeriu apenas água durante todo o protocolo. No final do protocolo, foram coletados soro, fezes e o intestino grosso para as análises.

Previamente à indução de colite todos os camundongos foram pesados para avaliar o percentual de ganho de peso até o final do experimento, visto que a perda de peso é um parâmetro de agravo na colite. Notamos que, apesar da suplementação materna com RA não ser capaz de inibir totalmente a perda de peso, as proles de mães suplementadas com RA perderam menos peso durante a colite quando comparada com o grupo colite de mães não suplementadas, sendo a diferença observada a partir do 6º dia do protocolo (Figura 23A).

Um outro parâmetro que pode indicar o agravo da colite é o encurtamento do cólon. Avaliando macroscopicamente o cólon, foi evidenciado um encurtamento do cólon em ambos os grupos com colite (Figura 23B) sendo a diarreia presente em ambos também. Quanto à avaliação histológica do cólon, foi observado nas proles de mães suplementadas com RA um *score* histológico discretamente menor que o outro grupo com colite, porém sem diferença estatística (Figura 23C e D).

Em decorrência da menor perda de peso pelas proles de mães suplementadas com RA, os grupos também foram avaliados por outros parâmetros que podem indicar a gravidade da colite: a permeabilidade intestinal e a concentração de calprotectina.

Para análise da permeabilidade intestinal, foi utilizado o FITC-Dextran como marcador positivo da permeabilidade, considerando que quanto maior a permeabilidade, maior é o dano do epitélio intestinal causado pela colite. Sendo assim, no 10º dia de experimento, os camundongos foram submetidos a 4 horas de jejum com posterior gavagem do FITC-Dextran eluído em água, de acordo com o peso de cada animal. Após 4 horas, o soro desses animais foi coletado e o FITC-Dextran foi dosado por espectrofluorímetro.

Os achados mostraram que as proles com colite de mães suplementadas com RA concentração de FITC-Dextran sérico quando comparada somente com o grupo colite das proles de mães controles (Figura 23E). Este achado indica que a suplementação materna com RA reduz o dano epitelial causado pelo DSS no intestino das proles. Além disso, é possível notar que as proles com colite de mães controles possui concentrações elevadas de FITC-Dextran em comparação com o grupo sem colite.

Contudo, a concentração fecal de calprotectina, parâmetro utilizado para avaliação da inflamação intestinal, mostra-se elevada em ambos os grupos com colite (Figura 23F).

Os resultados indicam que, apesar da resposta inflamatória em ambos os grupos, a suplementação materna com RA é capaz de atenuar a colite proporcionando menor perda de peso e permeabilidade intestinal, podendo ser indicador de menor dano tecidual.

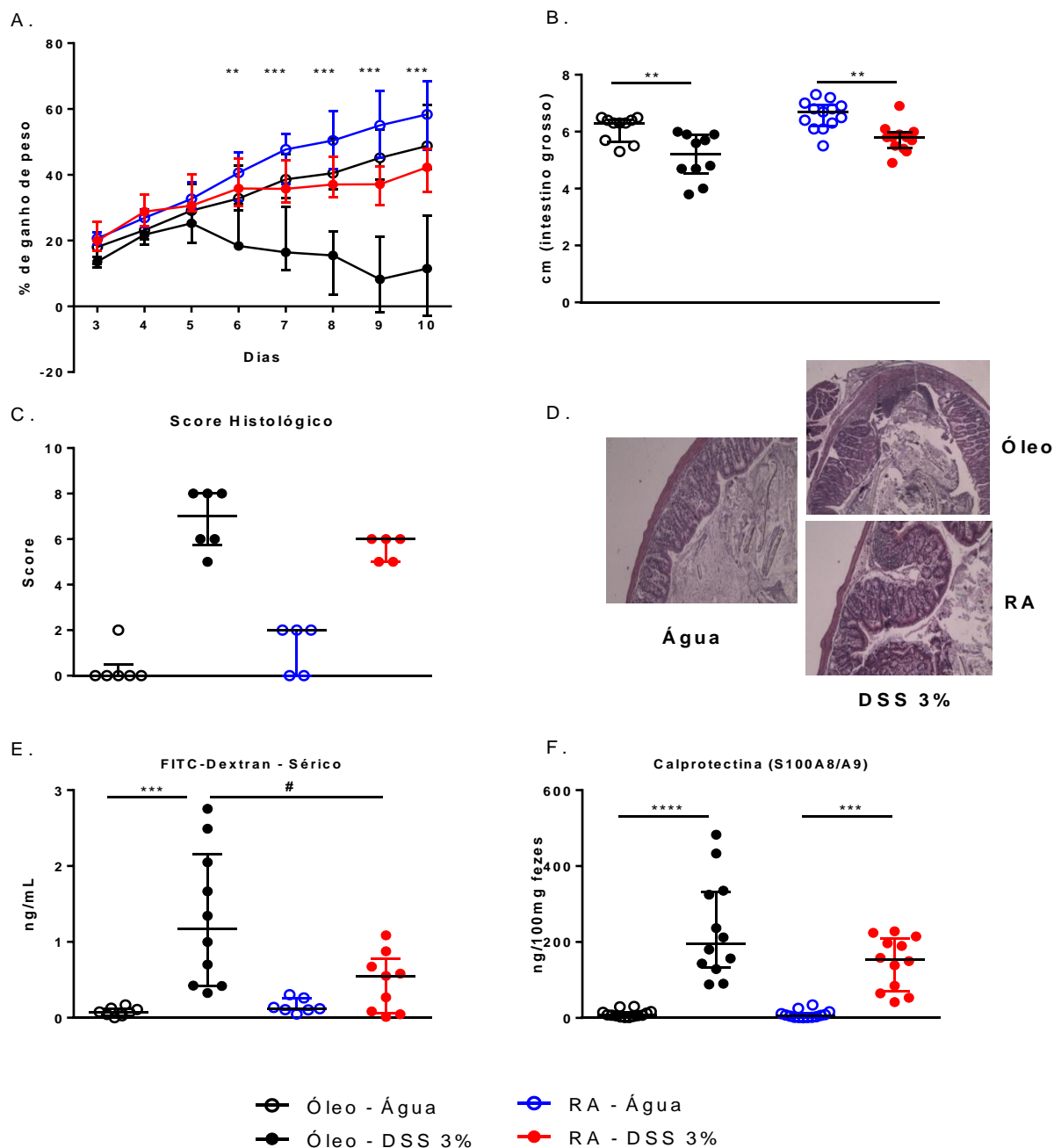


Figura 23. A suplementação materna com RA atenua a colite induzida por sulfato de sódio dextrano nas proles. Percentual de ganho de peso corporal (A), comprimento do intestino grosso (B), *score* histológico e imagens de corte histológicos do intestino (C-D) (n=5-6), concentração sérica de FITC-Dextran (E) e fecal de calprotectina (S100A8/A9), em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) analisadas no final do protocolo de colite induzida por sulfato de sódio dextrano. Fezes (n=15-20 camundongos) e soro (n=14-20 camundongos). As concentrações de FITC-Dextran e Calprotectina foram mensuradas por ELISA e espectrofluorometria, respectivamente. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil com teste estatístico não pareado e não paramétrico Kruskal-Wallis (**p ≤0.01, ***p ≤0.001) e Mann-Whitney (#p ≤0.05).

4.17 Efeito da suplementação materna com RA na concentração de citocinas séricas e do homogenato intestinal em proles de camundongo com colite

Além dos marcadores convencionais para a avaliação da colite (perda de peso, *score* histológico, permeabilidade intestinal e calprotectina), avaliamos o perfil sérico de citocinas pró e anti-inflamatórias na inflamação intestinal, e, *in situ* no homogenato intestinal. Para tanto, o soro e o intestino foram coletados ao final do protocolo de colite e após a obtenção do sobrenadante do homogenato do intestino, as citocinas foram dosadas por citometria de fluxo (CBA).

Inicialmente, vimos que as concentrações séricas de TGF- β 1, IL-6 e IL-17A estavam elevadas em ambos os grupos de colite (Figura 24A e 24C-D). Todavia apenas o grupo colite provenientes de mães controles apresentavam concentrações elevadas de IL-10 (Figura 24B), além do aumento de TNF (Figura 24G) quando comparado apenas com o grupo sem colite. Outras citocinas de perfil pró-inflamatório como IL-12p70 e IFN- γ (Figura 24E-F) não apresentaram diferença entre os grupos.

Contudo, ao avaliarmos a citocinas no homogenato do intestino, observamos que a concentração de TGF- β 1 (Figura 25A) estava elevada apenas no grupo de colite de mães suplementadas com RA, quando comparadas apenas com o seu grupo controle. Já a IL-12p70 (Figura 25E) estava elevada apenas no intestino do grupo colite de mães controles, enquanto a IL-6 (Figura 25C) estava elevada em ambos os grupos com colite. As citocinas IL-10 (Figura 25B,) IL-17A (Figura 25D) e IFN- γ (Figura 25F), não se alteraram entre os grupos.

Esses dados indicam um dos possíveis mecanismos de controle da inflamação mediada pelo TGF- β 1 no intestino em resposta ao processo inflamatório induzido pelo DSS nas proles de mães suplementadas com RA.

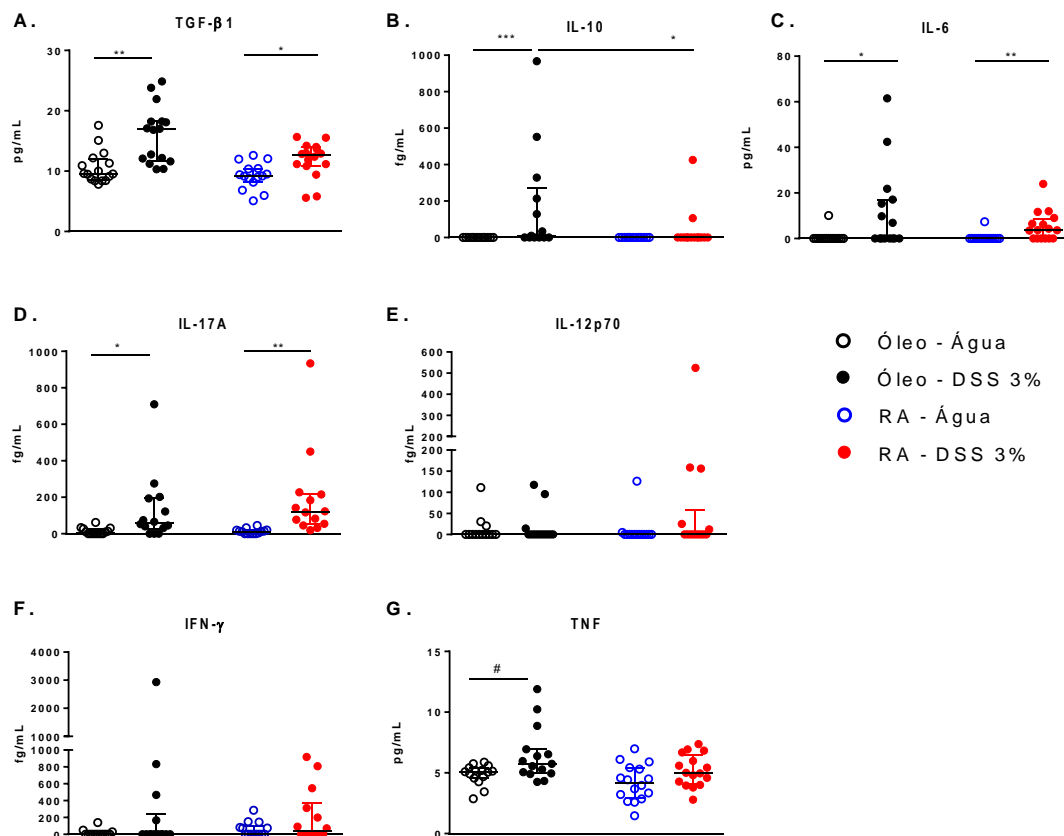


Figura 24. Concentrações séricas de citocinas nas proles com colite induzida por sulfato de sódio dextrano. Concentrações séricas de TGF- β 1 (A), IL-10 (B), IL-6 (C), IL-17A (D), IL12-p70 (E), IFN- γ (F) e TNF (G) em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) foram analisadas no final do protocolo de colite induzida por sulfato de sódio dextrano, por citometria de fluxo (n=14-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil com teste estatístico não pareado e não paramétrico Kruskal-Wallis (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001) e teste Mann-Whitney (#p \leq 0.05).

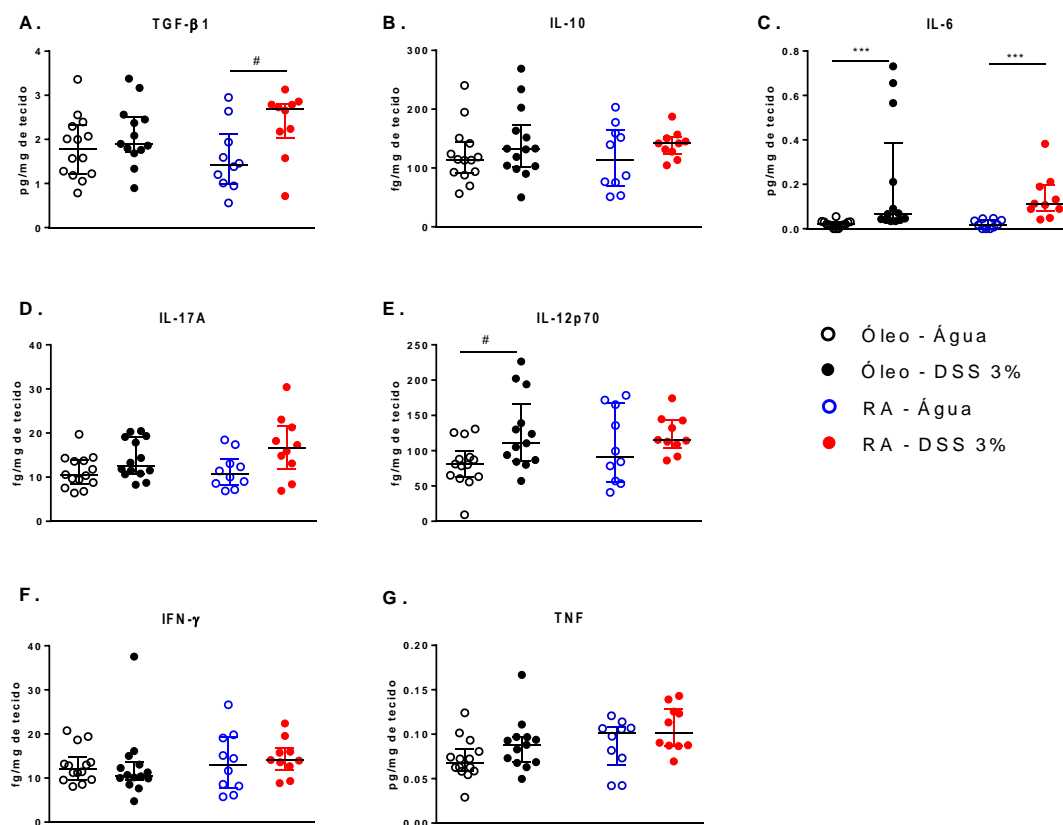


Figura 25. Concentrações de citocinas no homogenato do intestino das proles com colite induzida por sulfato de sódio dextrano. Concentrações de TGF- β 1 (A), IL-10 (B), IL-6 (C), IL-17A (D), IL-12-p70 (E), IFN- γ (F) e TNF (G) em proles de camundongos fêmeas suplementadas ou não com RA (6 doses de 1mg/gavagem) foram analisadas no final do protocolo de colite induzida por sulfato de sódio dextrano, por citometria de fluxo (n=14-16). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil com teste estatístico não pareado e não paramétrico Kruskal-Wallis (***) e teste Mann-Whitney (#) ($p \leq 0.05$).

Díscussão

5. DISCUSSÃO

A deficiência de vitamina A é uma preocupação de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, visto que a suplementação de vitamina A em crianças é altamente eficaz na redução da mortalidade por doenças infecciosas. Em contrapartida, o uso de suplementação vitamínica, mesmo em condições em que não haja deficiência, é cada vez mais comum em adultos, o que torna interessante o estudo dos efeitos da suplementação vitamínica no organismo. Os resultados mostraram que a suplementação materna com RA foi capaz de modular o sistema imunológico das mães e, principalmente, das proles.

A principal influência da suplementação com RA nas mães é na expressão de CCR9, pois, aumenta percentual de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e Treg CCR9⁺. Nas proles, além do aumento a expressão de CCR9 em linfócitos T, houve indução de linfócitos Treg no baço em proles com 6 semanas de idade. O aumento da expressão de CCR9 e $\alpha 4\beta 7$ induzido por RA em células imunes já é descrito e esse mecanismo garante a migração não só de linfócitos T, como também de macrófagos, ILCs, DCs e linfócitos B para o intestino (Iwata *et al.*, 2004; Eksteen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Hammerschmidt *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015). Já o aumento de linfócitos Treg, apesar de ser esperado devido ao papel que o RA desempenha na indução dessas células (Sun *et al.*, 2007), o fato de ocorrer nas proles com 6 semanas mostra que o aleitamento materno possui um efeito duradouro, considerando que a amamentação ocorreu até 3 semanas de idade da prole. Possivelmente, como o sistema imunológico da prole ainda está em desenvolvimento durante a oferta de RA, isso pode favorecer o *imprint* materno de maior duração. Todavia, avaliações em períodos mais tardios seriam necessárias para constatar se essas alterações permaneceriam na fase adulta das proles.

Em relação aos fenótipos de linfócitos T, vimos tanto nas mães quanto nas proles que a expressão de CCR9⁺ foi mais pronunciada em linfócitos T naïve no baço. Já nos linfonodos mesentéricos o aumento da expressão de CCR9 ocorreu em todos fenótipos avaliados, com destaque para os linfócitos TCD8⁺ evidenciando um efeito pronunciado do RA no GALT. O aumento de linfócitos TCD8⁺CCR9⁺ pode ser interessante, principalmente no contexto de infecções virais. Estudos já mostraram que o RA é capaz de inibir a infecção pelo vírus da gastroenterite por aumentar a migração de linfócitos TCD8⁺ para a mucosa intestinal (Chen *et al.*, 2016), mostrando a importância do RA na proteção das mucosas.

Apenas a expressão de CCR9 não garante a migração para o intestino, mas a evidência do aumento de linfócitos Treg na lâmina própria do intestino delgado das proles de mães suplementadas com RA, mostra uma dinâmica migração ao sítio de mucosa das proles. Esse dado pode explicar o motivo de não evidenciarmos alteração na frequência de Treg nos linfonodos mesentéricos da prole, pois, sendo os linfonodos drenantes do intestino, o local preferencial de migração das Treg seria para a mucosa intestinal. Entretanto, também não podemos descartar a possibilidade do RA ter promovido a indução de Treg *in situ*, no intestino.

Quando avaliamos o perfil de citocinas dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ da lamina própria, vimos que a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias eram similares entre os grupos, sendo a produção de IL-17A bastante expressiva. Embora, diversos estudos tenham mostrado o efeito do RA em suprimir a diferenciação de células Th17 (Wang *et al.*, 2010) e a produção de IL-17 em doenças inflamatórias, nossos dados sugerem que a suplementação materna com RA não afetou a produção de IL-17A induzida *in vitro*, mesmo com o aumento de Treg na mucosa intestinal. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de um efeito potencial anti-inflamatório do RA e das Treg mediante inflamações intestinas, nas quais outros fatores, como a microbiota, células epiteliais e outras células imunes estão envolvidas. Por outro lado, o fato do RA não alterar a produção de IL-17A, pode ser favorável considerando o papel essencial das células Th17 na imunidade intestinal a patógenos (Iwakura *et al.*, 2008). Além disso, outros fatores como componentes da microbiota, em especial as bactérias filamentosas segmentadas, também promovem a geração dos linfócitos Th17 na mucosa intestinal (Lécuyer *et al.*, 2014). E mesmo o RA, em baixas concentrações favorece a diferenciação de Th17 na presença de TGF- β e IL-6 (Collins *et al.*, 2011).

Outro fator importante para a proteção e homeostase intestinal, é aumento na frequência de linfócitos B IgA⁺ na lamina própria induzido pela suplementação materna com RA. Estudos *in vitro* mostram que o RA induz a troca de classe para IgA, em linfócitos B, com maior efeito na presença de TGF- β , mesmo em humanos (Seo *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2014). O RA também promove a troca de classe para IgA em células B1 (Kang *et al.*, 2015). Além disso, o fato de que RA induz a secreção de IgA na mucosa (Mora *et al.*, 2006; Hall, Grainger, *et al.*, 2011), corrobora com o aumento de IgA fecal que observamos nas proles de mães suplementadas com RA. Entretanto não evidenciamos efeitos do RA em relação as concentrações séricas de IgA e IgG. Nesse contexto, estudos em humanos com uso de RA como adjuvante de vacina oral contra *Salmonella paratyphi*,

mostraram aumento de IgA e IgG no trato gastrointestinal, porém as concentrações séricas permaneceram inalteradas (Lisulo *et al.*, 2014). Esses dados, sugerem que a modulação do RA para IgA é restrita ao GALT. Sendo assim, as concentrações elevadas de IgA fecal nas proles de mães suplementadas com RA pode estar relacionada à maior produção de IgA pelos linfócitos B IgA⁺ na mucosa intestinal da prole, tendo em vista que a suplementação não aumentou a quantidade de IgA no leite materno. Contudo, devemos mensurar a quantidade de IgA no leite em períodos anteriores para constatarmos, de fato, que não houve aumento de IgA no leite das mães suplementadas com RA.

É descrito que a microbiota também pode influenciar na produção de anticorpos IgA, considerando que animais *germ-free* mostram produção deficiente de IgA, que se normaliza com a transferência de microbiota (Ruane *et al.*, 2016). A presença de bactérias filamentosas segmentadas, no intestino delgado, é essencial para o desenvolvimento de placa de Peyer, como também na produção de IgA na mucosa intestinal (Lécuyer *et al.*, 2014). Além disto, a microbiota pode ser influenciada pela dieta e causar impactos na resposta imunológica (Brown *et al.*, 2015). Contudo, a suplementação com RA materno, não influenciou na microbiota intestinal da prole analisada em diferentes períodos, sendo assim, parece improvável que a microbiota tenha participado do aumento de IgA fecal das proles de mães suplementadas com RA. Ainda neste contexto, é importante ressaltar que ambas as proles a partir de 3 semanas de idade apresentaram predominância de Bacteroidetes na composição microbiana. Esse filo, em especial as bactérias *Bacteroides fragilis*, está relacionada à diferenciação e manutenção de linfócitos Treg (Telesford *et al.*, 2015), sendo assim, possivelmente o aumento de Treg na lâmina própria do intestino das proles de mães suplementadas não deve ter relação com a microbiota.

Por outro lado, vimos que a suplementação com RA diminuiu a concentrações séricas de IgA e IgG maternas, assim como a quantidade de IgG no leite. Em contraste há descrições de aumento da produção de anticorpos induzidos por RA (Eriksen *et al.*, 2015), principalmente em respostas imunológicas específicas (Tan *et al.*, 2011; Lisulo *et al.*, 2014). Este contraste com a literatura, pode ser decorrente do período pós-gestacional, ou da quantidade de RA administrada, pois é uma suplementação com RA em mães que não são deficientes de vitamina A. Sendo assim, as concentrações elevadas de RA podem causar efeitos indesejados, como observado com a queda das concentrações séricas dos anticorpos. Além disso, o período de aleitamento materno pode exibir determinadas

características imunológicas em reflexo do período pós-gestacional. Contudo não avaliamos o efeito de RA em camundongos fêmeas que não engravidaram.

Outro achado interessante, é que as mães suplementadas com RA mostraram aumento de IL-17A sérico. Apesar do RA induzir diferenciação de células Th17 em concentrações mais baixas, (Collins *et al.*, 2011), é possível que o aumento sérico de IL-17A seja reflexo de secreção de outros tipos celulares como Tc17, T gama/delta, NKT, ILCs, etc.

Um dado que nos chamou atenção foi o aumento nas concentrações séricas de IFN- γ e a redução de TGF- β nas proles de mães suplementadas. Em neonatos murinos, há uma clara deficiência na geração de uma resposta Th1 eficiente (Adkins, 2007; Rose *et al.*, 2007). Assim a elevação sérica de IFN- γ observada na prole pode atuar como adjuvante nas respostas imunológicas às infecções bacterianas e virais, recorrentes na fase neonatal e pós desmame. De fato, o RA aumenta a expressão de RIG-1 e inibe a replicação viral de *Morbillivirus*, devido a indução da produção de IFNs do tipo I (Soye *et al.*, 2011). Além disso, a administração oral de RA em camundongos deficientes de vitamina A aumenta a produção de IgA em resposta a vacinação contra influenza (Surman *et al.*, 2014). Desta forma, o RA está envolvido tanto no aumento de componentes antivirais, quanto na indução de anticorpos. Também vimos que o sobrenadante de esplenócitos das proles de mães suplementadas com RA apresentaram concentrações elevadas IFN- γ após estímulo, *in vitro*, com CL097, o que pode indicar um papel importante do RA no desenvolvimento de respostas de perfil Th1 em neonatos.

Considerando o amplo papel regulador do RA visto nas proles, avaliamos o efeito da suplementação materna com RA na colite aguda induzida por DSS das proles. Observamos que durante a indução da colite, as proles de mães suplementadas com RA perderam menos peso quando comparada com o grupo colite de mães não suplementadas e que a permeabilidade da mucosa intestinal foi conservada, indicando que o dano epitelial possivelmente foi menor. Apesar da discreta diminuição do *score* histológico referente ao dano epitelial causado pelo DSS, não houve alteração no encurtamento do cólon e concentrações fecais de marcadores inflamatórios, entre os grupos com colite. Com relação ao perfil sérico de citocinas, foi detectado aumento de TGF- β e IL-6 e IL-17A em ambos os grupos com colite, contudo, somente nas proles de mães controles foi evidenciado o aumento de TNF, e apesar do aumento da IL-10, esse dado sugere um processo inflamatório mais intenso. Nas proles de mães suplementadas com RA houve

aumento de TGF- β no homogenato do intestino, enquanto o aumento de IL-12p70 foi evidenciado no intestino do grupo colite de mães não suplementadas.

Os dados sugerem que a suplementação materna com RA foi capaz de atenuar, parcialmente, os danos causados pela colite induzida por DSS. Este modelo de colite conduz lesões na mucosa intestinal e desarranjo das criptas gerando respostas inflamatórias com perfil Th1/Th17, com intenso infiltrado celular (Laroui *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2013). Sendo assim, a menor perda de peso e manutenção da permeabilidade tecidual indica que a colite não foi tão agressiva no grupo de proles de mães não suplementadas. Além disso, o aumento de TGF- β no homogenato apenas nas proles de mães suplementadas com RA indica uma resposta reguladora no intestino na tentativa do controle da inflamação. Contudo, avaliações do infiltrado celular presente no cólon durante a colite precisam ser realizadas para entendermos melhor a participação das células imunológicas na atenuação da colite, uma vez que o RA pode inibir a atividade inflamatória de diversas populações durante a colite, como ILCs e T $\gamma\delta$, entre outras (Mielke *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2014; Bernink *et al.*, 2015), e não apenas atuar no balanço Treg/Th17. Além disso, a suplementação materna com RA, também pode estar induzindo de uma resposta mais eficaz contra as bactérias e vírus comensais. É descrito que camundongos deficientes de TLR3 e 7 são mais suscetíveis à indução de colite por DSS, devido a deficiente produção de IFN- β após reconhecimento de partículas virais de vírus residentes, sendo assim, o RA também poderia induzir uma resposta antiviral via RIG-1, tornando a prole resistente ao desenvolvimento de colite (Yang *et al.*, 2016).

De fato, a importância do RA no controle de doenças inflamatórias intestinais já é bem estabelecida. Estudos mostram que o RA é capaz de atenuar a colite induzida por DSS e bactérias patogênicas induzindo o aumento da produção de IL-22 pelas células ILC3 e T $\gamma\delta$ (Mielke *et al.*, 2013), ou diminuindo as concentrações de TNF e ativação de NF- κ B (Hong *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento com atRA *in vitro* em células de biópsias da mucosa intestinal de pacientes com colite ulcerativa e câncer modula a via de sinalização LPS/TLR4/NF- κ B e diminui a expressão de óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e TNF (Rafa *et al.*, 2017). Outros estudos relatam que camundongos deficientes de vitamina A são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colite induzida por DSS e câncer de cólon devido ao agravamento da inflamação crônica no intestino (Okayasu *et al.*, 2016).

Contudo, os trabalhos sempre avaliam a importância do RA durante o processo inflamatório, ou seja, utilizam o RA como tratamento e não como agente

profilático na indução da colite. Desta forma, a suplementação materna com RA possui potencial em atenuar uma resposta inflamatória na prole, em períodos pós amamentação, indicando que a uma dieta materna rica em vitamina A é importante no desenvolvimento do sistema imunológico da prole.

Em conjunto, nos resultados mostraram que a suplementação materna com RA foi capaz de aumentar o percentual de células T com potencial de migração para mucosa intestinal e de linfócitos Treg na lamina própria do intestino. Elevou o percentual de células B IgA⁺ e a concentração de IgA fecal, contribuindo para o desenvolvimento da imunidade de mucosa das proles. O efeito tolerogênico e anti-inflamatório do RA evidenciado no GALT e na colite induzida por DSS, mostram seu papel na homeostase intestinal. Além disso, o aumento de IFN- γ sérico no período neonatal e o aumento da secreção de IFN- γ por esplenócitos após estimulação *in vitro*, podem indicar um possível uso do RA como adjuvante vacinal potencializado resposta de perfil Th1.

Os dados sugerem que a suplementação RA materna, na amamentação, induz importante impacto na maturação e homeostase das mucosas intestinais das proles.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que:

- A suplementação materna com RA durante a amamentação possui um importante impacto na maturação e homeostase da mucosa intestinal das proles, induzindo a migrações de linfócitos Treg e aumento de linfócitos B IgA⁺ e IgA fecal;
- A homeostase intestinal favorecendo um ambiente mais tolerogênico foi evidenciada pelo processo inflamatório mais tênue na colite induzida por DSS das proles de mães suplementadas com RA;
- Apesar do efeito tolerogênico, a suplementação materna com RA pode potencializar o desenvolvimento de resposta Th1, que pode sobrepor a diminuição de IFN- γ presente no período neonatal.

Referências

REFERÊNCIAS

ADKINS, B. Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness. **Curr Immunol Rev**, v. 3, n. 3, p. 151-159, Aug 2007. ISSN 1573-3955 (Electronic) 1573-3955 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19122799 >.

ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 553-64, Jul 2004. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15229474 >.

AGACE, W. W.; PERSSON, E. K. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. **Trends Immunol**, v. 33, n. 1, p. 42-8, Jan 2012. ISSN 1471-4981 (Electronic) 1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079120> >.

ARNOLD, S. L. et al. A sensitive and specific method for measurement of multiple retinoids in human serum with UHPLC-MS/MS. **J Lipid Res**, v. 53, n. 3, p. 587-98, Mar 2012. ISSN 1539-7262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192917> >.

AZAIS-BRAESCO, V.; PASCAL, G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1325S-33S, May 2000. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799410> >.

BALKAN, W. et al. Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 8, p. 3347-51, Apr 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314386> >.

BERGGREN SODERLUND, M.; FEX, G. A.; NILSSON-EHLE, P. Concentrations of retinoids in early pregnancy and in newborns and their mothers. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 3, p. 633-6, Mar 2005. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755833> >.

BERNINK, J. H. et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 146-60, Jul 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187413> >.

BERRY, D. C. et al. Transthyretin Blocks Retinol Uptake and Cell Signaling by the Holo-Retinol-Binding Protein Receptor STRA6. **Mol Cell Biol**, v. 32, n. 19, p. 3851-9, Oct 2012. ISSN 1098-5549 (Electronic) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826435> >.

BONO, M. R. et al. Retinoic Acid as a Modulator of T Cell Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 6, Jun 2016. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27304965> >.

BOSTICK, J. W.; ZHOU, L. Innate lymphoid cells in intestinal immunity and inflammation. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 2, p. 237-52, Jan 2016. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459449> >.

BOT, A.; BONA, C. Genetic immunization of neonates. **Microbes Infect**, v. 4, n. 4, p. 511-20, Apr 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932202> >.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de condutas gerais do Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.**

BROWN, C. C. et al. Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 499-511, Mar 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769610> >.

CAMPO-PAYSAA, F. et al. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. **Genesis**, v. 46, n. 11, p. 640-56, Nov 2008. ISSN 1526-968X (Electronic) 1526-954X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003929> >.

CASSANI, B. et al. Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 1, p. 63-76, Feb 2012. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120429> >.

CEROVIC, V. et al. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? **Trends Immunol**, v. 35, n. 6, p. 270-7, Jun 2014. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24794393> >.

CHEN, Q.; ROSS, A. C. Retinoic acid promotes mouse splenic B cell surface IgG expression and maturation stimulated by CD40 and IL-4. **Cell Immunol**, v. 249, n. 1, p. 37-45, Sep 2007. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082674> >.

CHEN, X. et al. Retinoic acid facilitates inactivated transmissible gastroenteritis virus induction of CD8(+) T-cell migration to the porcine gut. **Sci Rep**, v. 6, p. 24152, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27080036> >.

COFFMAN, R. L. et al. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo. **Immunol Rev**, v. 123, p. 189-207, Oct 1991. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684779> >.

COLLINS, C. B. et al. Retinoic acid attenuates ileitis by restoring the balance between T-helper 17 and T regulatory cells. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1821-31, Nov 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22027263> >.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1757-64, Aug 6 2007. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620361> >.

CUI, W. et al. Vitamin A Deficiency Promotes Inflammation by Induction of Type 2 Cytokines in Experimental Ovalbumin-Induced Asthma Murine Model. **Inflammation**, Aug 2016. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525423> >.

CZARNEWSKI, P. et al. Retinoic Acid and Its Role in Modulating Intestinal Innate Immunity. **Nutrients**, v. 9, n. 1, Jan 2017. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098786> >.

DURIANCIK, D. M.; LACKEY, D. E.; HOAG, K. A. Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells. **J Nutr**, v. 140, n. 8, p. 1395-9, Aug 2010. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554902> >.

EKSTEEN, B. et al. Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 320-9, Jul 2009. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233184> >.

ERIKSEN, A. B. et al. Retinoic acid-induced IgG production in TLR-activated human primary B cells involves ULK1-mediated autophagy. **Autophagy**, v. 11, n. 3, p. 460-71, 2015. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749095> >.

ERKELENS, M. N.; MEBIUS, R. E. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. **Trends Immunol**, v. 38, n. 3, p. 168-180, 03 2017. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28094101> >.

FUTATA, E. A. et al. The neonatal immune system: immunomodulation of infections in early life. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 3, p. 289-98, Mar 2012. ISSN 1744-8336 (Electronic) 1478-7210 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397563> >.

GARCIA, A. L.; RUHL, R.; SCHWEIGERT, F. J. Retinoid concentrations in the mouse during postnatal development and after maternal vitamin A supplementation. **Ann Nutr Metab**, v. 49, n. 5, p. 333-41, Sep-Oct 2005. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113519> >.

GEISSMANN, F. et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. **J Exp Med**, v. 198, n. 4, p. 623-34, Aug 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925678> >.

GORIELY, S. et al. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 2141-6, Feb 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160266 >.

GOSWAMI, S. et al. Divergent functions for airway epithelial matrix metalloproteinase 7 and retinoic acid in experimental asthma. **Nat Immunol**, v. 10, n. 5, p. 496-503, May 2009. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329997> >.

GOVERSE, G. et al. Vitamin A Controls the Presence of ROR γ + Innate Lymphoid Cells and Lymphoid Tissue in the Small Intestine. **J Immunol**, v. 196, n. 12, p. 5148-55, 06 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27183576> >.

GUILLIAMS, M. et al. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. **Blood**, v. 115, n. 10, p. 1958-68, Mar 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068222> >.

HALL, J. A. et al. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. **Immunity**, v. 34, n. 3, p. 435-47, Mar 2011. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419664> >.

_____. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. **Immunity**, v. 35, n. 1, p. 13-22, Jul 22 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777796> >.

HALLWIRTH, U. et al. Monocyte phagocytosis as a reliable parameter for predicting early-onset sepsis in very low birthweight infants. **Early Hum Dev**, v. 67, n. 1-2, p. 1-9, Apr 2002. ISSN 0378-3782 (Print) 0378-3782 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893430 >.

HAMMERSCHMIDT, S. I. et al. Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut after subcutaneous immunization in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 8, p. 3051-61, Aug 2011. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737878> >.

HJERTSON, M. et al. Retinoic acid inhibits in vitro development of mast cells but has no marked effect on mature human skin tryptase- and chymase-positive mast cells. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 2, p. 239-45, Feb 2003. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542529> >.

HONG, K. et al. All-trans retinoic acid attenuates experimental colitis through inhibition of NF- κ B signaling. **Immunol Lett**, v. 162, n. 1 Pt A, p. 34-40, Nov 2014. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25004394> >.

IMDAD, A. et al. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. CD008524, Dec 2010. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154399> >.

INDREVÆR, R. L. et al. IRF4 Is a Critical Gene in Retinoic Acid-Mediated Plasma Cell Formation and Is Deregulated in Common Variable Immunodeficiency-Derived B Cells. **J Immunol**, v. 195, n. 6, p. 2601-11, Sep 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276871> >.

IWAKURA, Y. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunol Rev**, v. 226, p. 57-79, Dec 2008. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161416> >.

IWATA, M.; ESHIMA, Y.; KAGECHIKA, H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. **Int Immunol**, v. 15, n. 8, p. 1017-25, Aug 2003. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882839> >.

IWATA, M. et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527-38, Oct 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485630> >.

KANG, S. H. et al. Lactoferrin Combined with Retinoic Acid Stimulates B1 Cells to Express IgA Isotype and Gut-homing Molecules. **Immune Netw**, v. 15, n. 1, p. 37-43, Feb 2015. ISSN 1598-2629. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713507> >.

KHALIL, S. et al. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. **J Dermatolog Treat**, v. 28, n. 8, p. 684-696, Dec 2017. ISSN 1471-1753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28318351> >.

KHEIROURI, S.; ALIZADEH, M. Decreased serum and mucosa immunoglobulin A levels in vitamin A and zinc-deficient mice. **Cent Eur J Immunol**, v. 39, n. 2, p. 165-9, 2014. ISSN 1426-3912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26155118> >.

KHOO, J. J.; FORSTER, S.; MANSELL, A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 1, p. 13-25, Jan 2011. ISSN 1557-7465 (Electronic) 1079-9907 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198355> >.

KIM, M. H.; TAPAROWSKY, E. J.; KIM, C. H. Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 107-19, Jul 2015. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26141583> >.

KINOSHITA, T. et al. Retinoic acid is a negative regulator for the differentiation of cord blood-derived human mast cell progenitors. **Blood**, v. 95, n. 9, p. 2821-8, May 1 2000. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10779427> >.

LAROUI, H. et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32084, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427817> >.

LISULO, M. M. et al. Adjuvant potential of low dose all-trans retinoic acid during oral typhoid vaccination in Zambian men. **Clin Exp Immunol**, v. 175, n. 3, p. 468-75, Mar 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237035> >.

LÉCUYER, E. et al. Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 608-20, Apr 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745335> >.

MA, L. J. et al. Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3562, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958163> >.

MA, Y.; CHEN, Q.; ROSS, A. C. Retinoic acid and polyribinosinic:polyribocytidylic acid stimulate robust anti-tetanus antibody production while differentially regulating type 1/type 2 cytokines and lymphocyte populations. **J Immunol**, v. 174, n. 12, p. 7961-9, Jun 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944302> >.

MA, Y.; ROSS, A. C. The anti-tetanus immune response of neonatal mice is augmented by retinoic acid combined with polyribinosinic:polyribocytidylic acid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 38, p. 13556-61, Sep 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157890> >.

MARQUEZ, H. A.; CARDOSO, W. V. Vitamin A-retinoid signaling in pulmonary development and disease. **Mol Cell Pediatr**, v. 3, n. 1, p. 28, Dec 2016. ISSN 2194-7791. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27480876> >.

MIELKE, L. A. et al. Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. **J Exp Med**, v. 210, n. 6, p. 1117-24, Jun 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690441> >.

MOHAMMADZADEH HONARVAR, N. et al. Retinyl Palmitate Supplementation Modulates T-bet and Interferon Gamma Gene Expression in Multiple Sclerosis Patients. **J Mol Neurosci**, v. 59, n. 3, p. 360-5, Jul 2016. ISSN 1559-1166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27122150> >.

MOORE, C. et al. Retinoic acid generates regulatory T cells in experimental transplantation. **Transplant Proc**, v. 43, n. 6, p. 2334-7, Jul-Aug 2011. ISSN 1873-2623 (Electronic) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839265> >.

MORA, J. R. et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. **Science**, v. 314, n. 5802, p. 1157-60, Nov 17 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110582> >.

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 685-98, Sep 2008. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172691> >.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M. All-trans-retinoic acid accelerates the differentiation of human B lymphocytes maturing into plasma cells. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 13-14, p. 1830-8, Dec 2005. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275619> >.

MUCIDA, D.; CHEROUTRE, H. TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. **Cell Adh Migr**, v. 1, n. 3, p. 142-4, 2007 Jul-Sep 2007. ISSN 1933-6926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262136> >.

NIEDERREITHER, K. et al. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. **Mech Dev**, v. 62, n. 1, p. 67-78, Feb 1997. ISSN 0925-4773 (Print) 0925-4773 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106168> >.

NIU, C. et al. Vitamin A maintains the airway epithelium in a murine model of asthma by suppressing glucocorticoid-induced leucine zipper. **Clin Exp Allergy**, v. 46, n. 6, p. 848-60, Jun 2016. ISSN 1365-2222. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26399569> >.

OKAYASU, I. et al. Vitamin A Inhibits Development of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Colon Cancer in a Mouse Model. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 4874809, 2016. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298823> >.

OLIVEIRA, L. M.; TEIXEIRA, F. M. E.; SATO, M. N. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2018, p. 3067126, 2018. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30158832> >.

PENNY, H. L. et al. Restoring Retinoic Acid Attenuates Intestinal Inflammation and Tumorigenesis in APCMin/+ Mice. **Cancer Immunol Res**, v. 4, n. 11, p. 917-926, Nov 2016. ISSN 2326-6074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638841> >.

PINO-LAGOS, K. et al. A retinoic acid-dependent checkpoint in the development of CD4+ T cell-mediated immunity. **J Exp Med**, v. 208, n. 9, p. 1767-75, Aug 29 2011. ISSN 1540-9538 (Electronic)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859847> >.

RAFA, H. et al. All-Trans Retinoic Acid Modulates TLR4/NF-. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 7353252, 2017. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408791> >.

RAVERDEAU, M. et al. Retinoic acid suppresses IL-17 production and pathogenic activity of $\gamma\delta$ T cells in CNS autoimmunity. **Immunol Cell Biol**, v. 94, n. 8, p. 763-73, 09 2016. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27089940> >.

RIGOPOULOS, D. et al. Comparison of topical retinoids in the treatment of acne. **Clin Dermatol**, v. 22, n. 5, p. 408-11, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556727> >.

ROSE, S. et al. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2667-78, Mar 1 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17312108 >.

RUANE, D. et al. Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 210, n. 9, p. 1871-88, Aug 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23960190> >.

_____. Microbiota regulate the ability of lung dendritic cells to induce IgA class-switch recombination and generate protective gastrointestinal immune responses. **J Exp Med**, v. 213, n. 1, p. 53-73, Jan 2016. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712806> >.

SABOOR-YARAGHI, A. A. et al. The Effect of Vitamin A Supplementation on FoxP3 and TGF- β Gene Expression in Avonex-Treated Multiple Sclerosis Patients. **J Mol Neurosci**, v. 56, n. 3, p. 608-12, Jul 2015. ISSN 1559-1166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985851> >.

SAKAI, Y. et al. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. **Genes Dev**, v. 15, n. 2, p. 213-25, Jan 15 2001. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157777> >.

SANKARANARAYANAN, S. et al. Neonatal-age treatment with vitamin A delays postweaning vitamin A deficiency and increases the antibody response to T-cell dependent antigens in young adult rats fed a vitamin A-deficient diet. **J Nutr**, v. 137, n. 5, p. 1229-35, May 2007. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449586> >.

SCHUSTER, G. U.; KENYON, N. J.; STEPHENSEN, C. B. Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. **J Immunol**, v. 180, n. 3, p. 1834-42, Feb 1 2008. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209081> >.

SEO, G. Y. et al. Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF- β 1 to enhance the overall IgA response. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 2, p. 325-35, Aug 2013. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744644> >.

_____. Retinoic acid acts as a selective human IgA switch factor. **Hum Immunol**, v. 75, n. 8, p. 923-9, Aug 2014. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994461> >.

SIDDIQUI, K. R.; POWRIE, F. CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. **Mucosal Immunol**, v. 1 Suppl 1, p. S34-8, Nov 2008. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079226> >.

SOYE, K. J. et al. RIG-I is required for the inhibition of measles virus by retinoids. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22323, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811588> >.

STEPHENSEN, C. B.; BOROWSKY, A. D.; LLOYD, K. C. Disruption of Rxra gene in thymocytes and T lymphocytes modestly alters lymphocyte frequencies, proliferation, survival and T helper type 1/type 2 balance. **Immunology**, v. 121, n. 4, p. 484-98, Aug 2007. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433077> >.

SUN, C. M. et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1775-85, Aug 6 2007. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620362> >.

SURMAN, S. L. et al. Oral retinyl palmitate or retinoic acid corrects mucosal IgA responses toward an intranasal influenza virus vaccine in vitamin A deficient mice. **Vaccine**, v. 32, n. 22, p. 2521-4, May 2014. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657715> >.

TAKEDA, K. et al. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2082-9, Mar 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15536146> >.

TAN, X. et al. Retinoic acid as a vaccine adjuvant enhances CD8+ T cell response and mucosal protection from viral challenge. **J Virol**, v. 85, n. 16, p. 8316-27, Aug 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653670> >.

TEJÓN, G. et al. Vitamin A Impairs the Reprogramming of Tregs into IL-17-Producing Cells during Intestinal Inflammation. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 137893, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26583087> >.

TELESFORD, K. M. et al. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. **Gut Microbes**, v. 6, n. 4, p. 234-42, Jul 2015. ISSN 1949-0984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26230152> >.

UEMATSU, S. et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat Immunol**, v. 9, n. 7, p. 769-76, Jul 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18516037> >.

VAN DE PAVERT, S. A. et al. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 123-7, Apr 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670648> >.

VERHASSELT, V. et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. **Nat Med**, v. 14, n. 2, p. 170-5, Feb 2008. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223654> >.

VILLAMOR, E.; FAWZI, W. W. Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 446-64, Jul 2005. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020684> >.

VON BOEHMER, H. Oral tolerance: is it all retinoic acid? **J Exp Med**, v. 204, n. 8, p. 1737-9, Aug 6 2007. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620364> >.

WAGNER, A. E. et al. DSS-induced acute colitis in C57BL/6 mice is mitigated by sulforaphane pre-treatment. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 12, p. 2085-91, Dec 2013. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231100> >.

WANG, C. et al. Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5519-26, May 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400707> >.

WHO. *Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age*. Geneva, World Health Organization 2011.

YANG, J. Y. et al. Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon- β Production. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 889-900, Apr 2016. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084119> >.

ZHOU, L. et al. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. **Immunology**, v. 101, n. 4, p. 570-80, Dec 2000. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122462> >.