

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito do colesterol sobre o metabolismo de enterócitos

Jussara Gazzola

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Rui Curi

São Paulo
2001

J7023

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004431

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gazzola, Jussara

G289e Efeito do colesterol sobre o metabolismo de enterócitos / Jussara Gazzola. -- São Paulo, 2001.
106p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Curi, Rui

I. Colesterol : Intestino : Fisiologia humana I. T. II.
Curi, Rui, orientador.

612.42 CDD

Jussara Gazzola

Efeito do colesterol sobre o metabolismo de enterócitos

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof. Dr. Rui Curi
orientador/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____

ABREVIATURAS

ACAT = acil-CoA colesterol acil transferase

ACN = acetonitrila

ACTH = hormônio adrecorticotrópico

AGM = ácidos graxos monoinsaturados

AGPI = ácidos graxos poliinsaturados

AGS = ácidos graxos saturados

ApoB-48 = apolipoproteína B-48

Apo-E = apolipoproteína-E

ATCC = *American Type Cell Culture Collection* – Coleção Americana de Tipos Celulares em Cultura

BAX = proteína pró-apoptótica

BrMMC = bromometilmetóxi-cumarina

CoA = Coenzima A

CS = citrato sintase

DEPC = dietil pirocarbonato

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – meio de cultura

DMSO = dimetilsulfóxido

dNTP = dinucleotídios

DTNB = ácido 5,5' - ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

DTT = ditioneitol

FAAR = receptor ativado por ácidos graxos

FACS = *Fluorescence – activated cell sorter* – análise de células ativadas por fluorescência

HBSS = *Hanks Balanced Salt Solution* - solução salina balanceada de Hanks

HDL = lipoproteína de alta densidade

HF12 = *Nutrient mixture F-12 HAM* - mistura nutritiva

HMG-CoA redutase e sintase = 3-Hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A

HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência

ILBP = proteína de ligação de lipídeos do íleo
LCAT = lecitina colesterol acil transferase
LDL = lipoproteína de baixa densidade
LDL-C = lipoproteína de baixa densidade - colesterol
L-FABP = proteína de ligação de ácidos graxos do fígado
M-ACAT = monoacilglicerol actiltransferase
MOPS = ácido (3-[Morfolino] propanosulfônico
NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP = nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida
NCBI = *National Center for Biotechnology Information* - Centro Nacional de
Informações para Biotecnologia
OAA = Oxaloacetato
ODC = ornitina descarboxilase
PBS = *phosphate buffer saline* - solução fosfato salina
PPARs = receptores ativados por proliferadores de peroxissomas
RT-PCR = transcrição reversa – reação em cadeia pela polimerase
SFB = soro fetal bovino
SRE = elemento responsivo ao esterol
SREBPs = proteínas ligantes do elemento responsivo ao esterol
TG = triacilgliceróis
VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	pag.
Abreviaturas	
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4. RESULTADOS.....	40
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
Resumo.....	105
Abstract.....	106

*A Deus, pelos meus pais, Augusto e Maria
que iluminam meu bem viver e por
terem me presenteado com
o melhor de suas vidas:
meus irmãos e irmãs.*

*Ao meu filho Arthur, meu
grande e essencial
amor por tudo
que és.*

*Ao Carlos, pelo seu amor
e compreensão
sempre.*

*À Clarisse, pelos cuidados com o Arthur,
pelas marmitas deliciosas e as
novidades televisivas.*

Minha gratidão.

*Ao meu orientador Prof.Dr. Rui Curi, por me
oferecer essa oportunidade única na
minha formação profissional
como na convivência com
pessoas especiais.*

Muito Obrigada

Ao Professor Augusto Guimarães pelo seu exemplo
e empenho na realização desse trabalho.

Às professoras Marilene Vecchia e Adrienne Palanch
pelo constante entusiasmo, dedicação e valiosa
contribuição na área de cultivo celular.

Aos Professores Úrsula Marquez, Édson Liberti e
Célio Miysaka, pelas excelentes sugestões
ao meu trabalho.

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Sou Grata,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pelo significativo apoio a minha formação;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo, pelo incentivo durante o Curso de Pós-Graduação;

À professora Patrícia Gama, pela disposição e solicitude com que colocou o uso de seu laboratório;

Ao pessoal das Bibliotecas dos Institutos de Ciências Biomédicas e de Química da USP, pela atenção em todas as circunstâncias;

Às secretárias do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB e Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da USP, pela constante gentileza;

Aos amigos do laboratório: Abel, Adriana, Alcione, Anita, Anna Karenina, Bia, Carla, Carol, Carmen, Cláudia, Celine, Célio, Débora, Edgair, Érica, Fernanda, Henriette, Jofre, Kátia, Lígia, Manuela, Marina, Marian, Paulo, Raquel, Renata, Renato, Rolando, Rosana, Rose, Rozangela, Sandra, Sandro, Sueli, Tania, Thais, Valdemir e Willam, pela colaboração e momentos de muita alegria;

Ao Robertinho, pela sua competência e especialmente por ter tornado os almoços do laboratório num grande banquete de felicidade;

À Geraldina, pela atenção e por todos os serviços prestados;

Ao Robertão, pela hospitaleira oficina-café;

Ao pessoal de xerox, pela eficiência, rapidez e por todas as caixas que guardam as boas lembranças desse tempo aqui vivido;

À Unijuí, através do Departamento de Ciências da Saúde e em especial aos professores do Curso de Nutrição pelo apoio recebido.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Características gerais da mucosa intestinal

A mucosa intestinal é formada externamente pelo epitélio colunar simples que repousa sobre uma lâmina de tecido conjuntivo frouxo (Wright & Alison, 1984; Ogra *et al.* 1994). Esta estrutura constitui uma barreira contra a entrada de diversos antígenos provenientes da ingestão de alimentos e microrganismos (Mowat, 1987; Weiner, 1997; MacDonald *et al.* 1999). O revestimento intestinal é caracterizado por invaginações e evaginações denominadas respectivamente de criptas e vilosidades intestinais (Wright & Alison, 1984; Ogra *et al.* 1994).

O epitélio intestinal é caracterizado por intensa proliferação celular, com a duração do ciclo celular ao redor de 11 horas (Al-Dewachi *et al.* 1974, Hermiston & Gordon, 1995, Palanch & Alves, 1998, Martin *et al.* 1998, Booth *et al.* 1999). Este tecido é constituído por vários tipos celulares, sendo os principais: 1) enterócitos, 2) células caliciformes, 3) células de Paneth e 4) células enteroendócrinas. No segmento da cripta intestinal encontram-se as células progenitoras, tipo celular responsável pela renovação celular rápida e intermitente. Nesta população progenitora encontram-se as células tronco, que são multipotentes e responsáveis pelo suprimento de células epiteliais (Wright & Alison, 1984; Potten & Morris, 1988; Hermiston & Gordon, 1995, Martin *et al.* 1998, Booth *et al.* 1999).

Epitélio cilíndrico
Vilosidades
Lâmina própria
Criptas
Muscular da mucosa
Glândulas de Brunner na submucosa



Figura 01. Corte transversal do intestino delgado (duodeno) mostrando os principais constituintes desse tecido (Cormack, 1996).

Além desses tipos celulares, também são observados linfócitos intraepiteliais, principalmente linfócitos do tipo T (Poussier & Julius, 1994; Lundqvist *et al.* 1996; Fiocchi, 1997; MacDonald *et al.* 1999), que estão em íntima associação com as células epiteliais, separados destas por uma membrana basal delgada.

Os enterócitos diferenciam-se durante o processo de migração, que inicia-se na cripta e termina no topo da vilosidade intestinal (Hermiston & Gordon, 1995). A diferenciação dos enterócitos é caracterizada por vários parâmetros funcionais, como a atividade de enzimas digestivas (maltase, aminopeptidase, fosfatase alcalina, sacarase, isomaltase e outras) (Henning, 1981) e a expressão de alguns genes tais como: L-FABP e ILBP (Roth *et al.* 1990; Hermiston & Gordon, 1995).

1.2 Metabolismo do enterócito

O trato gastrointestinal é o principal órgão de utilização de glutamina da dieta e a sua captação ocorre fundamentalmente nas células epiteliais dos vilos do intestino delgado. Porções intestinais incubadas produzem grandes quantidades de CO₂ provenientes da glutamina (Neptume, 1965). O intestino delgado é o sítio mais importante de metabolização da glutamina (Windmueller & Spaeth, 1975; Souba, 1993), sendo esta o substrato energético mais importante para os enterócitos (Windmueller & Spaeth, 1978; Okine *et al.* 1995), mesmo em animais recém-nascidos (Wu *et al.* 1995), apesar da sua taxa de captação ser similar a da glicose (Souba, 1993).

No interior da célula epitelial intestinal a glutamina, oriunda do lúmen ou da circulação e a glicose são ativamente metabolizadas da mesma forma (Souba *et al.* 1990). Quando totalmente oxidada, os cinco carbonos do esqueleto de glutamina podem gerar aproximadamente 30 mols de ATPs pelo ciclo Krebs e fosforilação oxidativa (Souba *et al.* 1990) Além da captação elevada, os enterócitos do intestino delgado também apresentam alto metabolismo de

glutamina. Após vinte segundos, 80% dos carbonos da glutamina já estão na forma de produtos metabólicos.

O ciclo de Krebs é uma via importante do metabolismo de glicose e glutamina (Curi *et al.* 1989; 1999). Esta via é responsável pela produção de ATP e precursores para a síntese de macromoléculas. A citrato sintase é uma enzima importante dessa via e catalisa a conversão de acetil-CoA e oxaloacetato em citrato.

1.3 Metabolismo do colesterol no intestino

O intestino delgado é um importante local de manutenção e homeostase do colesterol do organismo (Field *et al.* 2001). Além do fígado, somente o intestino é capaz de síntese *de novo* de colesterol em quantidade significantes (Field *et al.* 1990; Dietschy & Siperstein, 1967; Spady & Dietschy, 1983). De fato, o colesterol sintetizado pelo intestino delgado contribui de modo marcante para o *pool* de colesterol plasmático, e mudanças da síntese de colesterol no intestino podem alterar os valores plasmáticos deste (Lindsey & Wilson, 1965). Além disso, este órgão é também responsável por absorver o colesterol da dieta e da bile (Field *et al.* 2001).

O colesterol e as vitaminas lipossolúveis são absorvidos nas regiões superiores do intestino delgado. Moléculas relacionadas estruturalmente, tais como os sais biliares, são absorvidas no íleo distal (Sylvén & Nordstrom, 1970). O influxo de ácidos graxos e a secreção de lipoproteínas, os quais são afetados pelo metabolismo do colesterol, ocorrem predominantemente, na região central do intestino. Diferenças funcionais também existem ao longo do eixo dos vilos. Muitos nutrientes, incluindo o colesterol, são absorvidos nas regiões centrais e superiores dos vilos. Nas regiões inferiores dos vilos e criptas, as células dividem-se rapidamente para suprir imediatamente a perda das que descamam nas regiões superiores dos vilos. As células das criptas não são expostas ao conteúdo luminal e assim não absorvem colesterol ativamente. Essas células,

entretanto, captam colesterol em quantidade suficiente para as demandas aumentadas na síntese de membranas (Field *et al.* 2001).

O ponto inicial de contato entre as micelas de sais biliares contendo colesterol e as células intestinais que absorvem-no ocorre na superfície do enterócito na borda em escova do jejuno. Neste sítio, o colesterol é seletivamente removido das micelas (Wilson & Rudel, 1994).

Os sais biliares são subsequentemente absorvidos via transportador específico expresso mais ativamente no íleo (Wang *et al.* 1994). Embora o processo passivo de absorção do colesterol seja amplamente aceito (Grundy, 1983), em estudos recentes foi evidenciada a presença de um transportador específico para o colesterol (Hernandez *et al.* 2000; Detmers *et al.* 2000).

O colesterol migra inicialmente das micelas, contendo sais biliares, para dentro da membrana da borda em escova. É então transportado desta para o retículo endoplasmático por uma série de etapas, nas quais o colesterol pode ser esterificado pela ACAT (Chang *et al.* 1987). Do retículo endoplasmático, o colesterol é "empacotado" nos quilomicrons e finalmente secretado do lado basolateral do enterócito para dentro da lâmina própria.

A absorção intestinal do colesterol é o principal regulador dos valores séricos e da homeostase do colesterol no organismo. Sob condições normais, de 50% a 70% do colesterol é absorvido pelo intestino delgado (Kramer, *et al.* 2000). Além da absorção e síntese de colesterol, a mucosa intestinal também está envolvida em outros aspectos do metabolismo deste esterol. Por exemplo, a esterificação do colesterol ocorre via ACAT (Helgerud *et al.* 1981).

Apoproteínas são sintetizadas nas células epiteliais intestinais, apo B, A-I e A-II foram identificadas (Glickman & Green, 1977; Green *et al.* 1979; Rachmilewitz *et al.* 1978). A organização intracelular e liberação de quilomicrons, HDL nascente e uma forma intestinal de LDL, ocorrem na mucosa intestinal (Green *et al.* 1979; Ockner *et al.* 1969).

Em ratos e hamsters, o intestino é o segundo órgão, após o fígado, na captação e degradação de LDL circulantes. Os fatores potenciais que, como é

sabido, regulam o metabolismo do colesterol no fígado, não foram ainda claramente definidos no intestino por ser este um órgão bastante complexo (Spady *et al.* 1983). Conforme pode ser verificado na **Figura 02**, é provável que pelo menos 3 *pools* distintos de colesterol existam dentro da célula, esses incluem o *pool A* que é derivado do colesterol absorvido do lúmen intestinal (fluxo 1) e serve principalmente como substrato para ACAT (fluxo 2) enquanto que no *pool B* este é suprido primariamente pela síntese *de novo* do Acetil-CoA (fluxo 4). O *pool C* presumivelmente recebe uma contribuição maior de esterol do *pool B* (fluxo 5) e uma menor contribuição do *pool A* (fluxo 3). O colesterol livre nesse *pool* metabolicamente ativo é usado para síntese de membranas celulares (fluxo 6) e para camada de superfície dos quilomícrons nascentes (fluxo 7). Triacilgliceróis também são absorvidos (fluxo 8) e secretados em quilomícrons (fluxo 9) para dentro da linfa. As LDL são captadas do plasma e contribuem para o *pool* metabolicamente ativo do colesterol (fluxo 10).

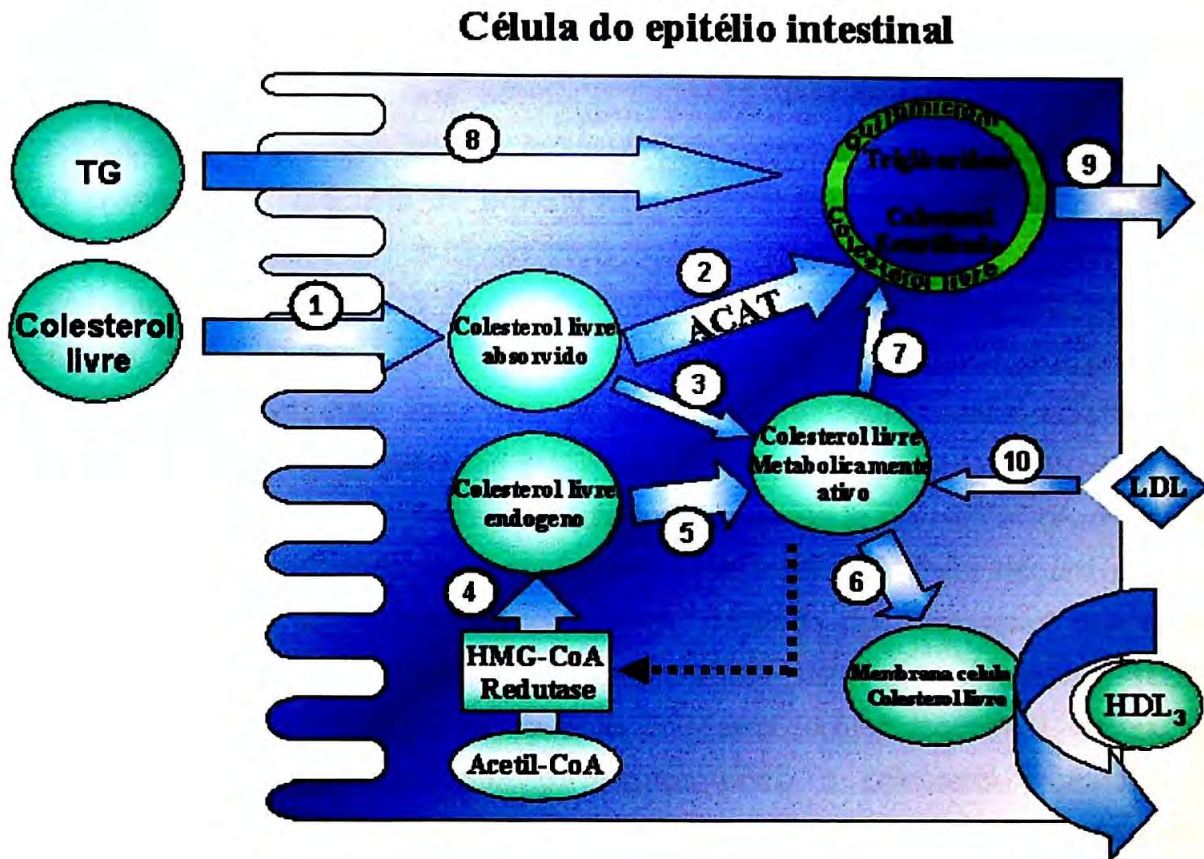


Figura 02. Representação de um modelo de compartimentalização do colesterol nas células da mucosa intestinal (Stange *et al.* 1988). ACAT= acil-CoA: colesterol acil transferase; HDL= lipoproteína de alta densidade; HMG-CoA redutase= 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; LDL= lipoproteína de baixa densidade.

1.4 HMG-CoA redutase

A HMG-CoA redutase [E.C. 1.1.1.34, (S)-mevalonato: NADP⁺ oxirredutase], enzima-chave do metabolismo do colesterol, que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, é o passo limitante da síntese de colesterol nas células dos mamíferos (Goldstein & Brown, 1990).

Esta redutase é uma das enzimas mais finamente moduladas da natureza (Goldstein & Brown, 1990). Apresenta múltiplas vias de regulação, no nível

gênico, de substrato, pelos produtos e por enzimas relacionadas à vias metabólicas paralelas. Sua atividade depende basicamente de dois fatores principais: a quantidade total de moléculas da enzima e seu estado de ativação. O número de moléculas da enzima está submetido a uma precisa e potente regulação multivalente nos níveis transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional (Brown & Goldstein, 1980; Proksch *et al.* 1990; Goldstein & Brown, 1990). O estado de ativação da enzima, por sua vez, é modulado pelo balanço reversível entre as formas desfosforilada (redutase a, ativa) e fosforilada (redutase b, inativa) (Ingebritsen & Gibson, 1981).

Em células de mamíferos em cultura, a atividade da HMG-CoA redutase e, portanto, a formação de mevalonato, é controlada através de um preciso mecanismo de retro-alimentação negativa, mediado pelo colesterol que entra nas células por endocitose das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) plasmáticas e pela síntese *de novo* de colesterol (colesterogênese). Assim, as células eucarióticas controlam o balanço entre o colesterol externo e o endógeno. Esse balanço é alcançado, não só pela regulação gênica da atividade da HMG-CoA redutase como pela regulação da expressão de receptores para LDL e da HMG-CoA sintase (Goldstein & Brown, 1990).

Então, para garantir a produção constante dos múltiplos intermediários isoprenóides (dolicol, Haem A, ubiquinona, proteínas farnelizadas) em todos os estágios do crescimento celular, as células lançam mão de uma fina regulação da síntese de mevalonato, o que também impede o acúmulo de produtos potencialmente tóxicos. A **Figura 03** apresenta o mecanismo regulatório de obtenção de colesterol pelas células animais através do metabolismo do mevalonato.

A administração de mevalonato a ratos leva a uma diminuição de cerca de 80% na transcrição da HMG-CoA redutase em apenas 1 hora (Clarke *et al.* 1985). Aparentemente, o primeiro dentre os muitos passos regulatórios da atividade da redutase, parece ser a repressão da transcrição gênica da enzima, como a efetuada por oxisteróides, como o 25-hidróxi-colesterol e o próprio

colesterol. A presença destes esteróides em culturas celulares reduz sensivelmente a quantidade de mRNA para três proteínas diretamente implicadas no controle do fluxo de metabólitos pela colesterogênese: HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase e receptor para LDL (Brown & Goldstein, 1980). Goldstein & Brown (1990) demonstraram que o principal sítio regulatório em cada um dos três genes está relacionado com a presença de um curto segmento que se liga a proteínas de ligação do elemento regulatório do esterol (SREBPs). Evidências acumuladas levam a crer que a sequência SREBP-1 no promotor da HMG-CoA redutase reprime ativamente a transcrição na presença de esteróides (Goldstein & Brown, 1990; Field *et al.* 2001).

Alguns estudos demonstraram que metabólitos esteróides e não-esteróides podem agir em diferentes níveis regulando a atividade da HMG-CoA redutase. Certos esteróides parecem reprimir a transcrição no nível de SREBP-1. Entretanto, mesmo na presença de concentrações saturantes de esteróides em cultura, continua havendo transcrição para mRNA da redutase a uma taxa de aproximadamente 1/8 da máxima. Além disso, a taxa de tradução desse mRNA parece ser determinada pela disponibilidade intracelular de isoprenóides não-esteróides e/ou pela demanda de mevalonato (Goldstein & Brown, 1990).

É possível, ainda, a existência de regulação da tradução de mRNA para a redutase, mediada por outros derivados do mevalonato. Esse tipo de regulação pode ocorrer por proteínas farnesiladas (Goldstein & Brown, 1990). Outro sítio de controle da colesterogênese é aquele mediado por LDL. A ligação de LDL aos receptores de membrana leva à captação da lipoproteína pelas células-alvo por endocitose adsortiva, com subsequente liberação nos lisossomos. O colesterol liberado a partir da hidrólise lisossomal de LDL preenche as necessidades celulares de esteróide para a membranogênese. Por outro lado, isso leva a uma redução da atividade da HMG-CoA redutase pela supressão da síntese de novas moléculas da enzima (Carr *et al.* 1980; Brown & Goldstein, 1999).

A regulação do fluxo pela colesterogênese parece ser ainda mais elaborada dependendo do tipo celular e das necessidades metabólicas em estudo. Por exemplo, na adrenal fetal humana, cuja síntese de esteróides é cerca de 4 a 10 vezes maior que em adultos (~100-200 mg/dia) e onde as LDL são a principal fonte de colesterol para a esteroidogênese, o ACTH estimula drasticamente a atividade da HMG-CoA redutase, mesmo na presença de LDL (Carr *et al.* 1980; Brown & Goldstein, 1997). A clonagem dos genes para HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase e para o receptor de LDL, permitiu o estudo de mecanismos pelos quais estes genes são regulados durante a modulação do metabolismo do colesterol (Wang *et al.* 1994; Brown & Goldstein, 1999).

A participação do colesterol no processo proliferativo de células eucarióticas é evidente. Antes mesmo de entrar na fase S do ciclo celular, uma grande variedade de linhagens celulares testadas exibe atividade elevada da HMG-CoA redutase (Siperstein, 1984). Além disso, a perda desta múltipla regulação por retro-alimentação negativa apresentada por células transformadas (malignas) levou a uma série de estudos visando a esclarecer o papel da colesterogênese no processo de divisão celular (Siperstein, 1984). Assim, em muitos trabalhos (Kaneko *et al.* 1978; Goldstein *et al.* 1979) foi demonstrada a inibição da proliferação de muitas linhagens celulares normais e tumorais pelo uso de inibidores da HMG-CoA redutase *in vivo* e *in vitro*. Essa inibição pode ser revertida em cerca de 5 minutos pela reposição de mevalonato, mas não de colesterol, restaurando a síntese de DNA e do processo proliferativo (Cornell & Horwitz 1980; Siperstein, 1984; Maltese *et al.* 1985).

Em hepatectomias parciais, verificou-se um aumento na atividade da HMG-CoA redutase entre 8 e 12 horas após a cirurgia. Entretanto, nestes casos, a síntese de colesterol só se apresentam aumentada depois de 32 horas (Trentalance *et al.* 1984; Field *et al.* 1985). Além disso, já a partir dos estudos iniciais sobre a colesterogênese na proliferação celular e regeneração hepática, observou-se que, na realidade, a síntese de colesterol nas primeiras horas após a cirurgia, chega a diminuir significativamente, enquanto que outros metabólitos

do mevalonato são produzidos em grande quantidade, sugerindo a existência de um importante papel para os isoprenóides no processo de divisão celular (Bruscalupi *et al.* 1985).

Em outros modelos experimentais, o papel da colesterogênese na proliferação celular também foi avaliado. Em células do epitélio luminal do miométrio de ratas, a estimulação por estradiol induz grande aumento na atividade da HMG-CoA redutase muito antes da síntese de DNA e posterior proliferação celular (Khan & Moulton, 1990).

A regulação da colesterogênese e, em particular, da atividade da HMG-CoA redutase, está claramente relacionada com a entrada da célula eucariótica em competência para o processo proliferativo (Wilkin *et al.* 1990). O crescimento celular e replicação do DNA estão intimamente relacionados com a colesterogênese, que deve ser entendida não apenas como fornecedora de elementos necessários para a membranogênese, mas também como geradora de isoprenóides essenciais na iniciação do processo de competência celular e síntese de DNA (Brown & Goldstein, 1997).

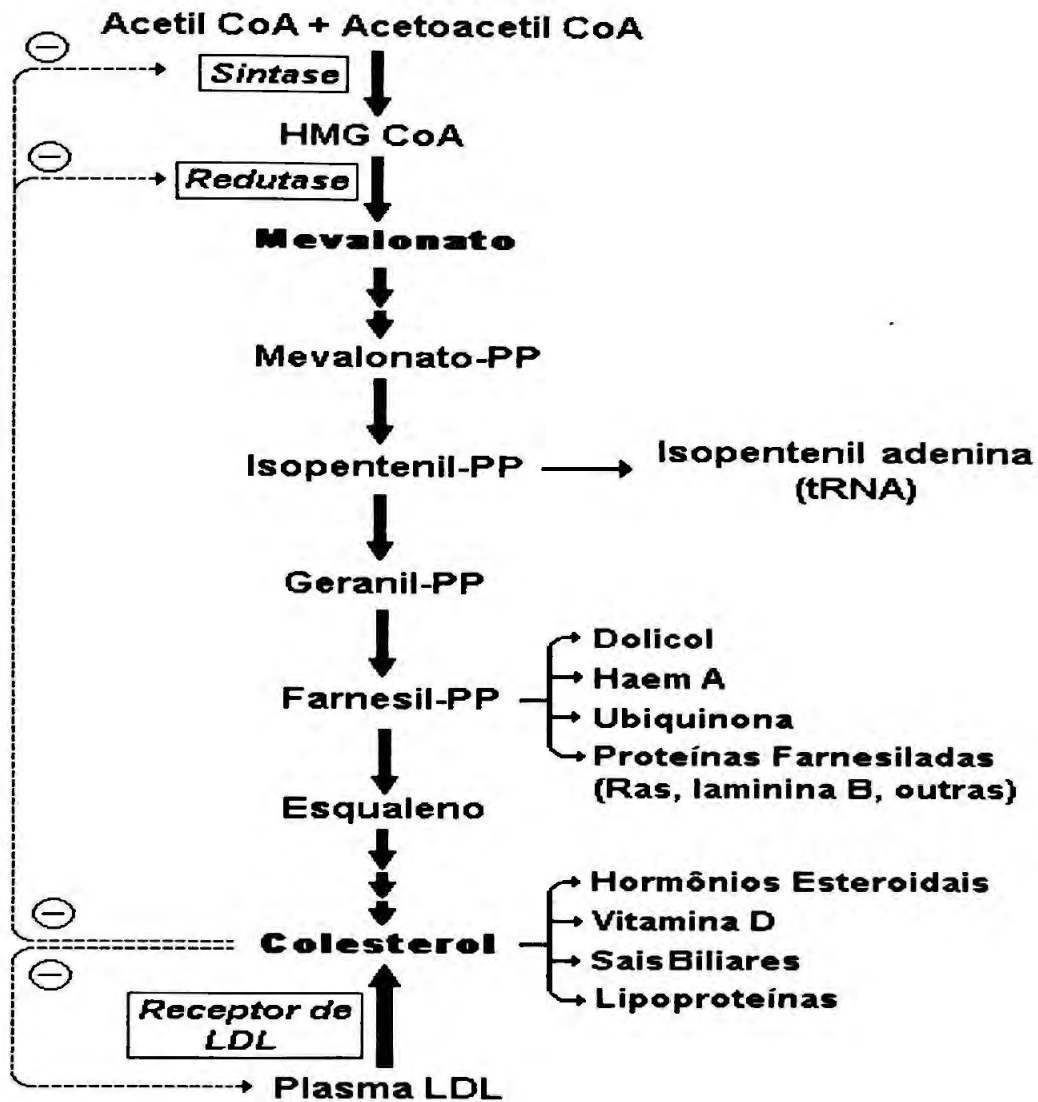


Figura 03. O produto final do metabolismo do mevalonato é o colesterol, obtido de duas fontes: 1) endógena; pela síntese do acetil-CoA a partir do mevalonato. 2) exógena; através do receptor de LDL do plasma. O mevalonato também é incorporado por produtos isoprenóides não esteroidais. A homeostase do mevalonato é realizada através da: a) repressão dos genes da HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase e receptor de LDL que realizam retroalimentação negativa mediada pelo esterol, b) regulação pós-transcricional da HMG-CoA redutase por um isoprenóide não esteróide (Goldstein & Brown, 1990). LDL = lipoproteína de baixa densidade, PP= difosfato.

1.5 HMG-CoA redutase no Intestino

Entre as enzimas que regulam a síntese lipídica intracelular estão a 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, a monoacilglicerol aciltransferase (MCAT) e a acil-CoA: colesterol acil transferase (ACAT) (Loirdighi *et al.* 1997).

A presença de atividade da enzima HMG-CoA redutase capacita o intestino a sintetizar o colesterol necessário para o crescimento e diferenciação celular (Stange *et al.* 1988). A HMG-CoA redutase é a enzima limitante da taxa de síntese intracelular do colesterol (Dietschy, 1968; Levy & Ménard, 2000). No desenvolvimento do intestino, este exhibe atividade elevada da HMG-CoA redutase. Correlações positivas significativas foram encontradas entre a idade fetal de 8-22 semanas e as atividades da HMG-CoA redutase está nos segmentos médio e proximal, da ACAT no distal e da MGAT no proximal. Estes autores concluíram que o intestino delgado fetal humano possui atividade substancial da HMG-CoA redutase, ACAT e MGAT, demonstrando padrões específicos entre a 10^a e 20^a semanas de gestação (Levy & Ménard, 2000).

Na via de biossíntese de colesterol no intestino, a HMG-CoA redutase regula a seqüência de reações como no fígado (Rodwell *et al.* 1976). Embora o fígado represente a fonte predominante de colesterol plasmático na maioria dos animais, provavelmente incluindo o homem, o intestino contribui com uma proporção significativa da síntese total corpórea de colesterol e do total de colesterol secretado para o plasma (Lutton, 1976; Beaumier-Gallon *et al.* 2001). Além disso, existe a possibilidade de que em algumas circunstâncias, a contribuição intestinal poderá ser significativamente maior do que a do fígado, já que a síntese de colesterol pelo intestino tem vários mecanismos regulatórios que diferem daqueles do fígado (Rodwell *et al.* 1976; Field *et al.* 2001).

A distribuição microsomal da HMG-CoA redutase no intestino delgado de ratos é modificada pelo tipo de dieta (Sugano *et al.* 1980). A atividade da redutase nos ratos alimentados com dietas comerciais não purificadas foi mais

elevada no íleo do que no jejuno, enquanto que este padrão foi inverso em animais alimentados com dietas purificadas.

1.6 Colesterol e Proliferação Celular

O colesterol em mamíferos é um componente estrutural importante das membranas celulares (Goldstein & Brown, 1990). Existe estreita relação entre os processos de crescimento celular e a via de biossíntese do colesterol. Este é necessário para a formação de novas membranas e pode ser derivado da síntese *de novo* ou de fontes extracelulares principalmente da LDL. Ambas as vias são ativadas em células de crescimento rápido (Brown & Goldstein 1997).

Reciprocamente, se a síntese é inibida e não há colesterol disponível, o crescimento celular é bloqueado. O mevalonato tem um papel importante na proliferação celular. As células necessitam de produtos sintetizados a partir do mevalonato para se proliferarem, um desses produtos é o colesterol. Outros produtos necessários ao ciclo celular e que garantem a sobrevivência das células, incluem as cadeias laterais de dolicol, ubiquinona e derivados de isopentenil adenosina (Goldstein & Brown, 1990).

A integridade das membranas celulares é mantida entre a quantidade de colesterol, de ácidos graxos saturados e insaturados e fosfolipídios. Este balanço é mantido pelos fatores de transcrição SREBPs (SREBP-1 e 2), que ativam genes que codificam enzimas da biossíntese do colesterol e de ácidos graxos (Brown & Goldstein, 1997; 1999; Field *et al.* 2001). Preferencialmente, SREBP-2 ativa vários genes da biossíntese do colesterol (Sheng *et al.* 1995; Horton *et al.* 1998). SREBPs são ligadas à membrana do retículo endoplasmático do envelope nuclear. Sob condições de deficiência de colesterol, um processo proteolítico libera da membrana a proteína precursora na sua forma "madura" (Osborne, 1995). Nessa forma ativa, a proteína entra no núcleo e liga-se a 10 pares de base do SRE (elemento responsivo aos esteróides) que aumenta a transcrição dos genes-alvo que codificam enzimas regulatórias da síntese de colesterol e de ácidos graxos (Magana & Osborne,

1996). SREBP-1 e 2 são derivados de dois genes distintos. Há duas isoformas do SREBP-1, 1a e 1c (Hua *et al.* 1995). O SREBP-1a parece ser o fator de transcrição mais potente regulando as vias de síntese dos ácidos graxos e do colesterol (Shimano *et al.* 1997; Field *et al.* 2001). Em contraste, o SREBP-1c tende ser mais ativo na regulação dos genes da biossíntese de ácidos graxos (Shimano *et al.* 1997; Field *et al.* 2001). O SREBP-2 aumenta, preferencialmente, vários genes da via de biossíntese do colesterol (Sheng *et al.* 1995; Horton *et al.* 1998; Field *et al.* 2001).

1.7 Apoptose das células intestinais

O termo "apoptose", que é de origem grega significa "folhas caindo das árvores" ou "pétalas caindo das flores", foi inicialmente utilizado em biologia celular por Kerr, Wyllie & Currie, em 1972. Estes autores perceberam que as células morriam em condições fisiológicas e patológicas, sendo que, o padrão de cada tipo de morte, quando analisado nas circunstâncias mais diversas, era semelhante. Assim, foi observado que tecidos em desenvolvimento ou em adaptação, como ao longo da embriogênese, durante o amadurecimento do sistema nervoso central, no processo de seleção de linfócitos, na reabsorção do tecido mamário após o período de lactação, ao longo do ciclo menstrual, bem como nos epitélios das criptas intestinais, apresentam uma morte celular pronunciada, mas que ocorre de forma organizada, disparada em períodos determinados, que não gera reação inflamatória e parece desempenhar um papel importante no organismo.

Este tipo de morte celular foi denominada de "morte celular programada" (auto-destruição controlada geneticamente ou suicídio celular). Esse processo é central para a morfogênese do tecido de animais em desenvolvimento e a homeostase do tecido adulto. As células que morrem "fisiologicamente" tendem a ter um volume reduzido, a cromatina intensamente condensada, núcleo pinocítico e uma concentração de organelas (devido à diminuição do volume

celular). Tais células fragmentam-se no final do processo, quando então são fagocitadas por células vizinhas ou macrófagos.

Em tecidos de proliferação rápida, como no intestino, o controle rígido da proliferação e da morte celular por apoptose é central para a manutenção da homeostase do tecido. No trato gastrointestinal, a apoptose é um mecanismo importante para eliminar o excesso de células normais e aquelas danificadas (Potten, 1997).

No intestino delgado de adulto normal, uma frequência menos persistente de apoptose pode ser vista nas criptas de animais e homens saudáveis. As células apoptóticas são facilmente identificáveis embora ocasionalmente possam ser difíceis de serem distinguidas de células mitóticas, que também são arredondadas contendo cromatina condensada. Tem sido demonstrado que cerca de uma célula apoptótica é vista em cada 1/5 de secções histológicas de criptas longitudinais (equivalente a menos de 1% do número de células da cripta), embora esse número varie levemente ao longo do dia (Potten, 1992).

A apoptose espontânea ocorre predominantemente nas regiões inferiores da cripta. Quando avaliadas numa base posicional, essas células parecem ser restritas à região células tronco (posição 4-5) e podem refletir uma incidência de até 10% dessas células. Resultados semelhantes são vistos em camundongos, nos quais o gene responsável pelo dano do *p53* é anulado. Isto sugere que a apoptose pode ser parte inerente do mecanismo regulatório que determina o número de células tronco em tecidos adultos normais (Potten & Loeffler, 1990; Potten, 1992). Este controle rígido do número de células tronco na origem da célula epitelial é fundamental na manutenção de uma proporção constante de células viáveis da cripta para dentro dos vilos, mantendo um tamanho estável de criptas.

Uma única célula tronco produzida por uma divisão simétrica ocasional, em virtude de divisões subseqüentes das células filhas, tem o potencial de seriamente perturbar a cripta e dramaticamente aumentar a produção celular. Uma célula tronco adicional produz de 60-120 células extras por cripta.

Evidências circunstanciais para o controle apoptótico do excesso do número de células tronco também vêm de observações do intestino delgado de camundongos depois da irradiação (Potten & Loeffler, 1990). Após o dano inicial ocorre uma regeneração rápida da proliferação, reparando a mucosa e aumentando o número de células nas criptas, isto é, o tamanho da cripta (Potten *et al.* 2001).

A maturação, diferenciação e senescência de enterócitos nos vilos são eventos programados geneticamente (Hall *et al.* 1994; Shibahara *et al.* 1995).

Técnicas marcadoras de DNA *in situ* (tecido seccionado) revela aproximadamente uma célula apoptótica por vilos. A frequência e a incidência aumentam com o tamanho da cripta proliferativa (Hall *et al.* 1994). Há altos níveis de expressão da proteína pró-apoptótica BAX nessas células terminalmente diferenciadas. Por sua vez a expressão de uma possível endonuclease apoptótica (DNase I) aumenta em direção ao topo dos vilos (Polzar *et al.* 1994; Potten, 1997).

A presença de um grande número de macrófagos e linfócitos no topo dos vilos é consistente com apoptose de células terminalmente diferenciadas (Shibahara *et al.* 1995). Assim, células no final de sua vida funcional passam a ativar o processo apoptótico (Raff *et al.* 1993).

A perda de células dos vilos ocorre por redução de adesão que pode, por sua vez, induzir a apoptose. Sinais alterados de adesão têm sido mostrados como iniciadores da apoptose em tecidos epiteliais (Boudreau *et al.* 1995; Ruoslahti & Reed, 1994; Probstmeier *et al.* 1990). A molécula de adesão epitelial E-caderina, que está presente na membrana basal do enterócito, participa da morte celular (Hermiston & Gordon, 1995).

Diferente do intestino delgado, no qual ocorre apoptose espontânea, na região proliferativa do intestino grosso, é um evento raro (incidência 10 vezes menor). Além disso, ao invés de ser mais prevalente na região de células tronco, células apoptóticas são observadas espalhadas nas criptas. Assim, no intestino grosso, a apoptose espontânea é improvável de ser um meio efetivo de regular o

número de células tronco. Isto é diferente do intestino delgado, neste, a apoptose é um meio efetivo de remoção de células senescentes do topo e das criptas (região de platô) da face luminal da mucosa (Hall *et al.* 1994).

Determinações da cinética de proliferação revelam poucas diferenças importantes na organização entre os intestinos delgado e grosso, o que pode indicar que a proliferação é menos relevante para a incidência de câncer do que a apoptose (embora o ciclo celular no intestino grosso seja em torno de 2 a 4 vezes maior que esta) (Potten *et al.* 1995). As diferenças observadas na ocorrência de apoptose nos intestinos delgado e grosso têm implicações diretas na incidência de câncer. Se o intestino delgado é capaz de remover o excesso de células tronco, enquanto o intestino grosso não o é, o aumento do número de células tronco pode resultar em criptas hiperplásicas susceptíveis à transformação (o excesso de células tronco é alvo de células carcinogênicas). Este fato pode explicar parcialmente o fato de que em humanos o câncer de cólon é muito mais comum que a neoplasia de intestino delgado (Potten *et al.* 2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- ◆ Estudar o efeito do colesterol em enterócitos e intestinos fetais de ratos e na linhagem IEC-6;
 - ✓ proliferação de enterócitos fetais;
 - ✓ atividade da enzima citrato sintase
 - ✓ a composição de ácidos graxos;
 - ◆ Determinar o conteúdo de colesterol de segmentos intestinais de ratos adultos;
 - ◆ Estudar a expressão da HMG CoA redutase nos intestinos fetais, IEC-6 e em quatro segmentos intestinais de ratos adultos;
 - ✓ PPAR γ ;
 - ✓ Drogas antidiabéticas (ciglitazona) e hipolipidemiantes (WY 14643), ativadoras de PPAR γ e α , respectivamente;
 - ◆ Verificar a citotoxicidade do colesterol na linhagem IEC-6.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* (Linhagem Wistar), com média de peso de 250 ± 50 g, correspondendo a 3-4 meses de vida fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Para obtenção das fêmeas prenhes, os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (3 fêmeas e 1 macho) sob o ciclo claro/escuro de 12/12h, durante uma semana de acasalamento. Após o acasalamento, os machos foram retirados e as fêmeas mantidas em gaiolas individuais onde receberam ração animal (52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios) e água sem restrições. No 20º dia de gestação, as fêmeas foram sacrificadas por decapitação, e tiveram a parede abdominal anterior aberta, para a retirada dos fetos. Após serem sacrificados por decapitação, os intestinos dos fetos foram retirados, através de uma incisão na parede abdominal anterior, e submetidos as diferentes técnicas.

Este protocolo (nº 053/2000) está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB I –USP, em 03 de agosto de 2000.

3.2 Cultura primária de enterócitos e intestinos fetais

O intestino delgado dos fetos foi lavado em HBSS (solução salina balanceada de Hanks) com DEPC (dietil pirocarbonato), contendo (mM) : 136,9 NaCl; 5,4 KCl; 0,4 KH_2PO_4 ; 0,4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,5 glicose; 4,2 NaHCO_3 e água desmineralizada, pH 7,4. Em seguida, após abertos lateralmente com o auxílio de uma lupa, os intestinos foram digeridos em solução de colagenase tipo IA 0,1% e hialuronidase 0,1% diluídas em HBSS, durante 60 minutos, sob agitação constante (90 ciclos/min.), à 37° C. Após a incubação, a atividade das

enzimas foi bloqueada com meio HF12 suplementado com 10% de SFB (v/v) (Fukamachi,1992). O material foi centrifugado à 259 x g por 5 min. à 4° C e o precipitado ressuspenso em meio HF12. O sedimento celular foi agitado com pipeta Pasteur (100 vezes). O material foi ressuspenso novamente em meio HF12. Os restos celulares foram retirados após 5 minutos de decantação. Coletou-se uma alíquota de 10 µL que foi diluída em 90 µL de HBSS e corada com 100 µL de solução de Azul de Tripán a 1% para a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.

Para extração do RNA total as amostras de intestinos fetais foram pesadas (50-100 mg) e cultivadas em meio HF12 contendo 20 µM, 40 µM ou 80 µM de colesterol em meio sem e com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina), L-glutamina (2 mM) e bicarbonato de sódio (44 mM), em pH 7,4 por períodos de 4, 6 e 8 horas. Manteve-se a cultura em incubadora com temperatura controlada a 37° C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em Trizol[®] (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina capaz de manter a integridade do RNA enquanto ocorre a lise das células) e procedeu-se a extração de RNA.

3.3 Linhagem celular permanente

3.3.1 IEC-6 e condições de cultivo

As células da linhagem IEC-6 (Quaroni,1979) foram adquiridas da ATCC. Este tipo celular é originário do intestino delgado de *Rattus norvegicus* normais. Estas células foram cultivadas em meio DMEM tamponado com bicarbonato de sódio (44 mM), contendo 10% de soro fetal bovino, antibióticos (10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina), piruvato de sódio (1 mM) L-glutamina (4 mM), glicose (25 mM) e insulina 0,1 U/mL em pH 7,4. As células foram mantidas em incubadora nas mesmas condições descritas acima para os enterócitos. O repique das células foi realizado semanalmente, sendo que o número permaneceu entre 1 x 10⁵ e 1 x10⁶ células/mL. As células, crescendo em

forma exponencial, foram coletadas através da adição de solução de tripsina 0,2% em versene 0,02% (linhagem aderida), cuja ação foi bloqueada com meio DMEM acrescido de 10% de SFB. Os experimentos foram sempre iniciados com o número de células de 1×10^5 por mL. As células foram coletadas e colocadas em Trizol[®] procedendo-se a extração de RNA (Chomczynski & Sacchi, 1987).

3.4 Reagentes e fornecedores

American Type Culture Collections; Rockville, MD, USA

Amersham Pharmacia. Uppsala, Suécia: Taq DNA polimerase, solução de brometo de etídio

Corning. New York, EUA: frascos plásticos de cultura e tubos de centrífuga.

Gibco BRL - Life Technologies. New York, EUA: D-glicose, L-glutamina, meio DMEM e HF12, penicilina-estreptomicina liofilizados, soro fetal bovino, transcriptase reversa (SuperScript II).

Instituto Adolfo Lutz – São Paulo-Brasil: tripsina

LabSynth Produtos para Laboratório Ltda. Diadema, Brasil: álcool etílico (PA), bicarbonato de sódio, cloreto de magnésio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico.

Nuvilab CR1, Nuvital nutrientes LTDA. Curitiba-PR: ração animal

Sigma Chemical Company. St. Louis, EUA: colesterol, Azul de Tripan, Trizol[®], dimetilsulfóxido (DMSO), agarose, Triton - X - 100, ácido dodecanóico (láurico, C12:0), ácido tetradecanóico (mirístico, C14:0), ácido hexadecanóico (palmítico, C16:0), ácido 9-hexadecanóico (palmitoléico, C16:1), ácido heptadecanóico (margárico, C17:0), ácido octadecanóico (esteárico, C18:0), ácido 9-octadecenóico (oléico, C18:1), ácido 9,12-octadecadienóico (linoléico, C18:2), ácido 9,12,15-octadecatrienóico (linolênico, C18:3), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (araquidônico, C20:4), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentenóico (C20:5), ácido 4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenóico (C22:6).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/NM/013134> e

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>: sequências e homologia dos *primers*

3.5 Lista de equipamentos

Aparelho Kodak® Digital Science DC120 Zoom Digital Camera 1D Image Analysis (Gibco-BRL).

Centrífuga refrigerada Harrier 18/80-MSE -Sanyo, Japão.

Espectrofotômetro -Pharmacia Biotech- Ultrospec 3000, Cambridge, Inglaterra

FACS Calibur - Becton Dickinson, Califórnia, USA.

HPLC - Shimadzu, Japão.

Incubadora - Sanyo, Japão.

Microscópio de fluorescência MC 80DX - Axiovert 100 M (Zeiss - Alemanha)

Sonicador ultrassônico - Vibra Cells™ - Sonics & Materials Inc., Danbury, Connecticut, USA.

SpeedVac – Savant Instruments, Inc., Farmingdale, NY.

Termociclador - Techne Genius - Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil.

Transluminador - Pharmacia Biotech., Inc., Uppsala, Suécia.

3.6 Congelamento das células

Utilizou-se o procedimento de congelamento em nitrogênio líquido para reposição do banco de células IEC-6 mantido no laboratório. Para isso, separou-se o volume contendo a concentração final de células (2×10^6 células/mL) em tubos estéreis e centrifugou-se a $259 \times g$ por 5 minutos em centrífuga refrigerada. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1,0 mL de soro fetal bovino (SFB), com 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Manteve-se as células por 30 minutos em geladeira a 4°C e, posteriormente, 24 horas em congelador a -70°C. Finalmente, transferiu-se as células para o tanque contendo nitrogênio líquido (Freshney, 1994). Os "criovials" foram identificados (nome do manipulador, data de congelamento, quantidade, linhagem e origem) e registrados no arquivo do banco de células.

3.7 Contagem e teste de viabilidade das células

Para verificação do número e viabilidade, as células foram coletadas através da adição de tripsina (0,2% em versene 0,02%) deixando-se agir por 5 minutos em incubadora a 37° C. A ação da tripsina foi bloqueada com meio DMEM acrescido de 10% de SFB. Coletou-se uma alíquota de 100 µL do meio de cultura contendo as células e a análise foi realizada em câmara de Neubauer. Células com membrana íntegra não permitem a penetração do Azul de Tripán. O percentual de células viáveis foi calculado através da divisão do número de células não marcadas (exclusão do Azul de Tripán) pelo número total de células.

3.8 Curva de crescimento

Para se determinar a curva de crescimento, as células foram contadas em câmara de Neubauer em intervalos de 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas para os enterócitos fetais e por 24, 48 e 72 horas para a IEC - 6. O número inicial de células foi de 1×10^5 por mL.

3.9 Efeito do colesterol sobre a proliferação celular

Para estudar o efeito do colesterol na proliferação dos enterócitos fetais, esses foram cultivados por 24 horas na presença das seguintes concentrações de colesterol: 10 µM, 20 µM, 40 µM e 80 µM.

3.10 Tratamento com colesterol

Tratou-se as células da linhagem IEC- 6 e os intestinos fetais com 20 µM, 40 µM e 80 µM de colesterol diluído em etanol, não ultrapassando 0,5% do volume final da suspensão. Os tratamentos foram realizados em períodos de 4, 6 e 8 horas para os intestinos fetais e em 48 horas para a linhagem IEC-6. Como controle, foram utilizadas células tratadas com etanol na concentração final de 0,5% (v/v).

3.11 Determinação da atividade máxima da citrato sintase [E.C. 4.1.3.7]

A citrato sintase catalisa a entrada de carbono no Ciclo de Krebs, segundo a reação:

CS

oxaloacetato+ acetil-CoA+ Água \rightarrow citrato+ CoA + H⁺

A atividade da enzima foi determinada segundo Alp *et al.* (1976), a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DNTB [5'-5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico)] do meio.

Os enterócitos fetais tratados e cultivados por 24 horas foram mantidos em nitrogênio líquido até o ensaio da enzima. As células foram então res-suspensas no tampão de extração com Tris-HCl (50 mM), EDTA (1 mM) em água desmineralizada pH de 7,4 e homogeneizadas sob gelo em sonicador (20 watts) por 3 vezes e durante 5 segundos. O homogeneizado foi então utilizado para a determinação da atividade máxima da enzima, através da cinética em espectrofotômetro, a 25°C.

O tampão de ensaio, com pH 8,1, foi constituído de Tris-base (100 mM), DNTB (0,2 mM) em água desmineralizada, contendo 0,05% (v/v) de Triton-X-100, 15 mM de acetil CoA e como substrato 0,5 mM de ácido oxaloacético. O volume final na cubeta de ensaio foi de 1mL. A absorvância da citrato sintase foi determinada a 412 nm sendo sua atividade expressa em nmol/min por mg de proteína.

3.12 Quantificação de proteína

A quantificação das proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Neste ensaio, as proteínas da amostra são complexadas com o corante azul de Coomassie (G-250). A reação é colorimétrica e a absorvância determinada a 595 nm. Os resultados de absorvância obtidos são lançados na equação da reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina (100 a 1000 µg/mL). A concentração da solução padrão de albumina é aferida antes da

preparação de cada curva, dividindo-se o valor de absorbância obtido em 280 nm por 0,66 (resultado em mg/mL).

Para quantificação das proteínas foram utilizadas alíquotas das mesmas amostras usadas para a determinação da atividade da enzima.

3.13 Determinação da composição de ácidos graxos de enterócitos fetais e células IEC-6 por HPLC

3.13.1 Extração dos lipídios totais

Após o cultivo das células por 24 horas, realizou-se a extração dos lipídios totais. O método foi descrito por Folch *et al.* (1957). O princípio desta metodologia está nas diferenças de solubilidade dos lipídios nos solventes utilizados (água e metanol - fase aquosa; clorofórmio - fase orgânica). Os lipídios por apresentarem coeficiente de partição mais elevada são mais solúveis no clorofórmio (fase orgânica).

3.13.2 Saponificação dos lipídios totais

Utilizou-se a metodologia descrita por Hamilton & Hamilton (1992) e Beyer & Jensen (1989). Este método consiste na saponificação das amostras com NaOH em metanol para promover hidrólise alcalina. Em seguida procedeu-se a acidificação com HCl (1M) deixando o ácido graxo na forma protonada e a extração com hexano (Nishiyama-Naruke *et al.* 1998).

3.13.3 Descrição do equipamento para cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Utilizou-se um sistema de HPLC com duas bombas, auto-injetor e detector de fluorescência. A coluna analítica utilizada para a separação dos ácidos graxos derivatizados é a de fase reversa: coluna Supelcosil LC-8 com 25 cm x 4,6 mm x 5 µm (cód. 5-8297), precedida de uma pré-coluna Supelguard Supelcosil LC-8 com 2 cm x 4,6 mm x 5 µm (cód. 5-9552) (Supelco, Bellefonte,

EUA). Utilizou-se também um software de integração para registro dos dados (Class LC-10).

3.13.4 Derivatização

A determinação dos ácidos graxos derivatizados tem por base o método descrito por Abushufa *et al.* (1994). Os ácidos graxos foram colocados em reação com o BrMMC utilizando-se dois reagentes. O reagente 1 continha 10 mg de BrMMC dissolvidos em 10 mL de ACN enquanto que o reagente 2 foi composto de 26,5 mg de 18-crown-6-éter (catalisador) e 100 mg de carbonato de potássio dissolvido em 10 mL de ACN. A amostra foi reconstituída em 100 µL de ACN e homogeneizada. Em tubos de vidro com redutores de volume, foram adicionados 50 µL do reagente 1 e 50 µL do reagente 2 a 50 µL da amostra. Essas amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas a 60°C por 15 minutos, para melhor eficiência da conjugação. Em seguida, as amostras foram mantidas a 10° C até o momento da injeção.

3.13.5 Condições cromatográficas

Para a cromatografia dos ácidos graxos derivatizados foram injetados volumes de 10 µL de amostras diluídos em ACN (acetonitrila). O fluxo foi de 1,2 mL/min. à temperatura ambiente. Os compostos foram detectados fluorimetricamente, com excitação a 325 nm e emissão a 398 nm. Quanto à fase móvel, foi realizado um gradiente binário com ACN e água desmineralizada. O gradiente linear consistiu de 77 a 90% de ACN até 40 min, que foram constantemente desgaseificados com gás hélio.

3.13.6 Padrões de ácidos graxos

Utilizou-se os seguintes padrões de ácidos graxos: (**Figura 04**): ácido dodecanóico (láurico, C12:0), ácido tetradecaenóico (mirístico, C14:0), ácido hexadecanóico (palmítico, C16:0), ácido 9-hexadecaenóico (palmitoléico, C16:1), ácido heptadecanóico (margárico, C17:0), ácido octadecanóico

(esteárico, C18:0), ácido 9-octadecenóico (oléico, C18:1), ácido 9,12-octadecadienóico (linoléico, C18:2), ácido 9,12,15-octadecatrienóico (linolênico, C18:3), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (araquidônico, C20:4), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5), ácido 4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenóico (C22:6).

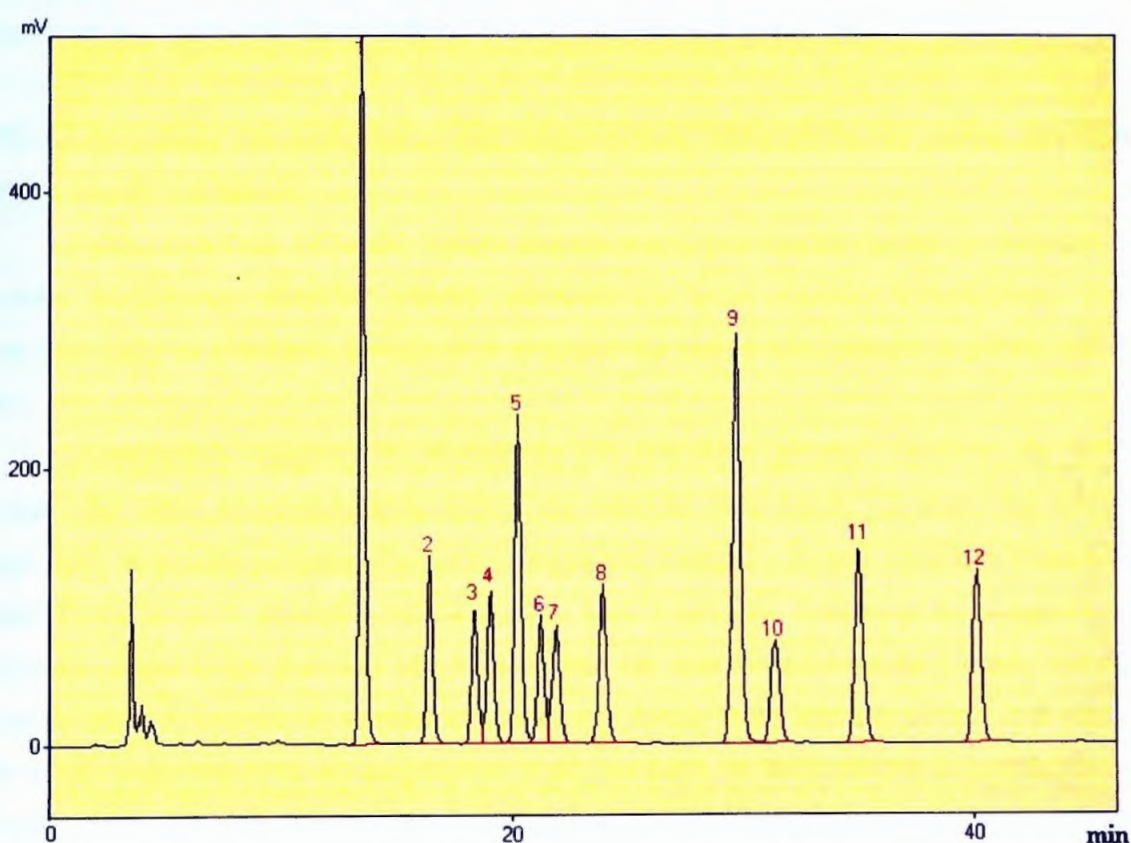


Figura 04 – Cromatograma obtido por HPLC mostrando os padrões de ácidos graxos. 1- láurico; 2- eicosapentaenóico; 3- linolênico; 4- docosa-hexaenóico; 5- mirístico; 6- araquidônico; 7- palmitoléico; 8- linoleico; 9- palmítico; 10- oléico; 11- margárico; 12- esteárico.

3.14 Efeito do colesterol na proporção de ácido graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) e poliinsaturados (AGP); razão insaturados e saturados (I/S) e índice de insaturação dos enterócitos fetais e da linhagem IEC-6.

A porcentagem de cada ácido graxo foi multiplicada pelo número de duplas ligações presentes na molécula e posteriormente somadas. O total de ácidos graxos insaturados dividido pelo total de ácido graxos saturados foi o resultado da razão I/S (Guimarães, 1995), conforme Tabela 01.

3.15 Quantidade de colesterol em segmentos intestinais de ratos adultos determinada no HPLC

Ratos machos (Wistar) foram sacrificados por decapitação, e tiveram a parede abdominal anterior aberta, através de uma incisão longitudinal. Em seguida, todo o intestino (delgado e grosso) foi removido, desde o piloro até o reto.

O intestino delgado foi separado do intestino grosso, através de uma incisão do íleo, imediatamente antes da válvula íleo cecal. O ceco foi então removido, e o colo juntamente com o intestino delgado, foram lavados interna e externamente com solução salina (0,9% NaCl) gelada. Posterior a lavagem, o intestino delgado foi dividido em três partes de aproximadamente 15 cm, sendo a parte oral, o segmento correspondente ao início, logo após o piloro, e a parte aboral, correspondente ao segmento final, ou seja, anteriormente à junção íleo-cecal. O segmento da parte média foi obtida determinando-se o ponto equidistante às extremidades oral e aboral. As células foram removidas por raspagem. Uma lâmina fazendo um ângulo de 45° sobre uma placa de vidro, que permaneceu sobre gelo durante todo o experimento, foi utilizada para remover as células.

A quantificação de colesterol por HPLC dos segmentos: duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso foi feita segundo Sewell (1982). A detecção foi realizada

em detector UV a 205 nm. Utilizou-se coluna C18 com fase móvel constituída por 75% de acetonitrila e 25% de isopropanol. O preparo da amostra foi feito a partir de extração lipídica dos segmentos, que consiste na adição de 1 mL da solução de clorofórmio/metanol (2:1 v/v). Essa mistura foi homogeneizada, agitada e centrifugada para posterior separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo onde foi feita a re-extração com 1 mL de clorofórmio. Novamente a mistura foi agitada e centrifugada. A fase aquosa foi desprezada e as duas fases orgânicas foram secas em SpeedVac. As amostras foram diluídas em 0,2 mL de etanol (grau HPLC) e filtradas (0,5 µm) para posterior determinação de colesterol livre por HPLC (Tabela 02).

3.16 Avaliação da expressão da HMG-CoA redutase [E.C.1.1.1.34]

Todas as etapas empregadas na análise da expressão da HMG-CoA redutase estão apresentadas no fluxograma da Figura 05.

3.16.1. Obtenção do RNA total

O RNA total das células controle, tratadas e segmentos intestinais, foi extraído utilizando-se a metodologia do tiocionato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987), empregando-se o reagente Trizol[®]. Resumidamente, as células ou segmentos intestinais foram lisadas utilizando-se 1 mL do reagente e, após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente (T.A), o RNA total foi isolado a partir das proteínas e restos celulares, acrescentando-se 200 µL de clorofórmio seguido de centrifugação (12000 x g; 15 min. 4°C). A precipitação do RNA total foi realizada através do acréscimo de etanol absoluto gelado e centrifugação (12000 x g; 10 min. 4° C). Em seguida, o sedimento foi lavado em etanol a 70% e, após secagem à T.A., ressuspenso em água DEPC. O volume de água DEPC utilizado variou de acordo com o tamanho do sedimento obtido, não ultrapassando 30 µL.

3.16.2 Quantificação e avaliação da integridade do RNA total

O RNA total isolado foi quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) a 260 nm e sua pureza (relação A_{260}/A_{280}) foi determinada (Sambrook *et al.* 1989).

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2% desnaturante (formaldeído 37%), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão MOPS (1,1M). A separação eletroforética foi realizada a 100 V durante 1 hora. A visualização das bandas foi feita por luz ultravioleta em transiluminador (Sambrook *et al.* 1989). Os resultados e as imagens processados e analisados por meio do aparelho e software da Kodak®.

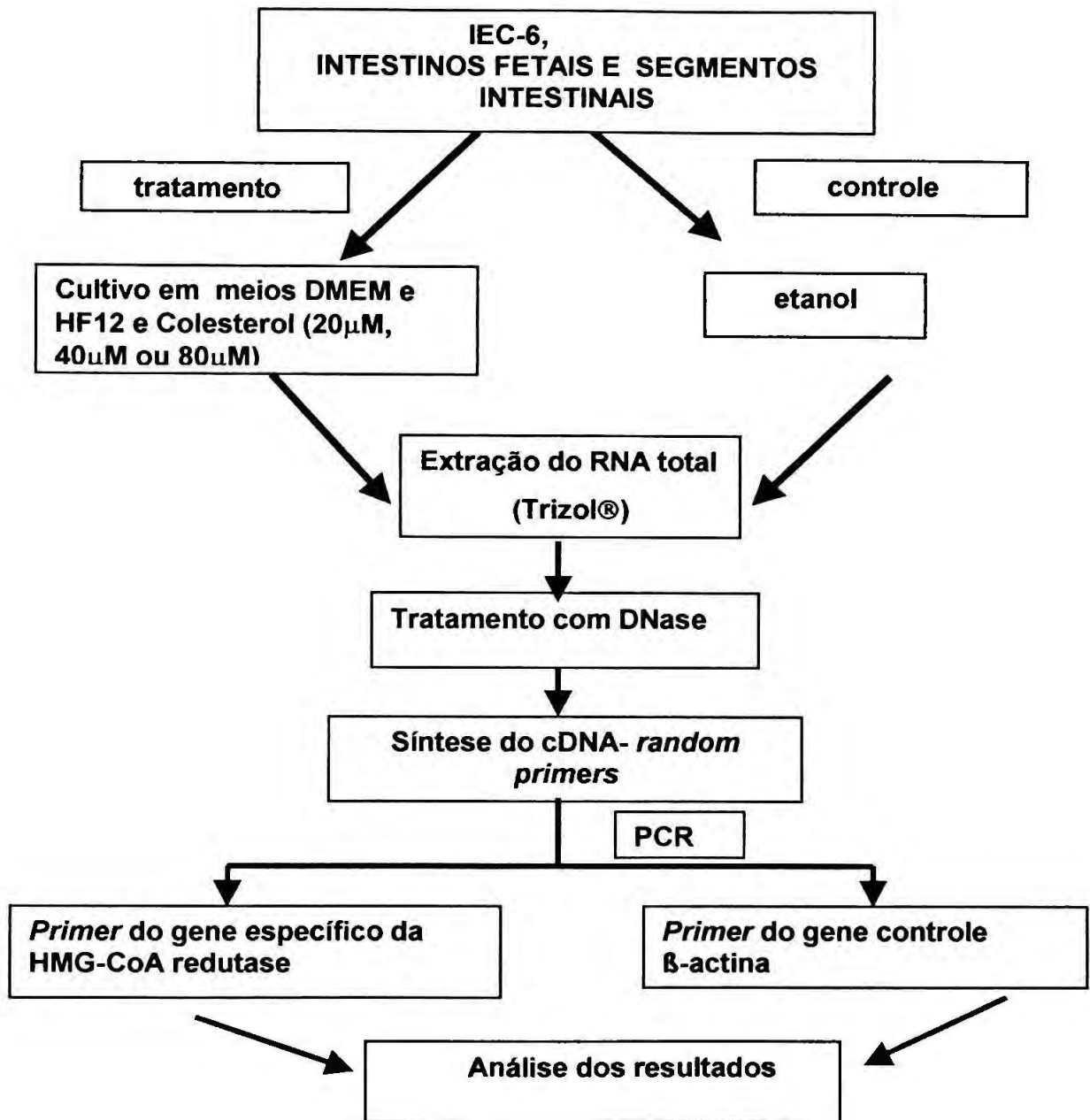


Figura 05 - Fluxograma representativo das etapas experimentais que foram empregadas para a obtenção e quantificação do RNA. Células da linhagem IEC-6 e intestinos fetais foram submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de colesterol (20 µM, 40 µM e 80 µM) em cultura. Posteriormente, foi realizada a extração do RNA total. Procedeu-se então a síntese do cDNA e a RT-PCR.

3.16.3 Desenho das seqüências dos *primers*

As seqüências dos *primers* foram desenhadas utilizando o programa "Gene Runner" versão 3.0, a partir das seqüências dos genes. Tais seqüências e homologia dessas e constituintes dos *primers* com o genoma da HMG-CoA redutase de *Rattus norvegicus*, foram obtidas por meio das informações contidas no banco gênico do NCBI.

3.16.4 *Primers* da HMG-CoA redutase

Adicionou-se ao tubo de reação de RT, 5 μ L de tampão PCR 10X, 1 μ L de dNTP, 38 μ L de água DEPC, 1,0 μ L de *primer* sense e 1,0 μ L de *primer* anti-sense ambos a 10 μ M para o gene da HMG-CoA redutase e 1,0 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L). Realizou-se a amplificação utilizando um termociclador com a seguinte programação: 94°C durante 1 min (desnaturação), 60°C durante 1 min (anelamento) e 72°C durante 1 min (extensão). As seqüências dos *primers* utilizados foram as seguintes: sense (5'TCGGGCAGAGCTACGTTTGTG3') e anti-sense (3CAGCAAGCTCCCATC ACCAAGG5'). Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, confirmou-se a amplificação de fragmentos com 350 pb (HMG-CoA redutase). Utilizou-se como controle interno da reação de amplificação um fragmento de 539 pb do gene β -actina, expresso abundantemente nas células.

3.16.5 Reação de Transcrição Reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 2 μ g de RNA total, extraídos conforme descrito no item 3.15.1. Para isso, foi utilizada a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de *random primers* e 200 U da enzima transcriptase reversa (tampão da enzima (Tris-HCl a 50 mM pH 8.0, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), DTT a 5 mM, dNTP a 500 μ M em um volume final de reação de 20 μ L. Esta mistura final foi incubada por 2 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídios randômicos ao RNA, seguida de aquecimento a 42°C por 50 min. O cDNA, assim obtido, foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

3.16.6 Avaliação dos parâmetros da reação em cadeia pela polimerase - PCR

A temperatura de hibridação dos *primers*, concentração de cloreto de magnésio, quantidade de amostra (cDNA) e número de ciclos foram avaliados para padronização das condições ideais para o ensaio da PCR. Concentrações constantes dos reagentes foram utilizadas: 200 nM de cada *primer*, 200 μ M de cada desoxirribunucleotídio, 2 U de Taq DNA polimerase; tampão da PCR: Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), KCl a 50 mM e gelatina a 0.01% e 1,5 mM de cloreto de magnésio). Quando a concentração de cloreto de magnésio estava sendo avaliada, foram realizados testes acrescentando cloreto até a concentração de 3,0 mM. A reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L. As reações foram processadas no termociclador. Esses parâmetros foram baseados na descrição de Innis & Gelfand (1990). Uma vez determinadas as condições da PCR, as amostras foram amplificadas num volume final de 50 μ L, em programa específico para cada gene.

3.16.7 Análise do Produto da PCR

Os produtos amplificados foram acrescidos de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%) e avaliados por meio da separação eletroforética em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio a 0,5 μ g/mL. As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta no transluminador. A foto documentação dos produtos amplificados foram processadas e analisadas através do aparelho Kodak[®]. A análise da expressão do RNAm do gene investigado foi realizada em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do gene de interesse e a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação da β -actina (gene de interesse/ β -actina) para cada amostra.

3.17 Análise de viabilidade das células e fragmentação de DNA por FACS (“fluorescence-activated cell sorter”)

Os ensaios de viabilidade e apoptose foram realizados em citômetro de fluxo (FACS) com software CellQuest, conforme protocolo descrito por Amarante-Mendes (1997), baseado na técnica de Nicoletti *et al* (1991).

As células IEC-6 (5×10^5 por/mL) foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 2 mL de PBS. Aliquotou-se 0,5 mL de células em PBS, adicionou-se 50 μ L de iodeto de propídio e 50 μ L/mL em PBS para análise de viabilidade. Os 1,5 mL restantes foram centrifugados em Spin. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células precipitadas em 300 μ L de tampão citrato iodeto de propídio – 50 μ L/mL + Triton - X -100 - 0.1% e citrato de sódio - 0,1%. As amostras permaneceram protegidas da luz, na geladeira durante 24 horas, para posterior análise da fragmentação de DNA. A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo com tripla análise: para iodeto de propídio, avaliação do volume e granulosidade celulares. Os resultados foram apresentados como histogramas, indicando a fluorescência do iodeto de propídio por célula (absorção a 488 nm e emissão maior do que 620 nm). Com base nestes gráficos, foram selecionadas, manualmente, regiões correspondentes às células apoptóticas (M1), G0-G1 (M2), tendo o programa de análise dado a porcentagem de células em apoptose (M1). Também foram obtidos gráficos tridimensionais de frequência, por volume e granulosidade celulares de 10.000 eventos.

3.18 Ensaio de condensação de cromatina

A técnica da microscopia de fluorescência utilizando o fluoróforo Hoescht 33342 pode ser empregada para detecção de fragmentação de DNA (indicativo de apoptose) em linhagens celulares cultivadas em suspensão ou aderidas em frascos de cultura. O Hoescht 33342 é um corante fluorescente azul, para DNA, que pode ser utilizado em células vivas. Células normais têm cromatina frouxa e coram-se pouco com Hoescht. Já células apoptóticas têm cromatina

condensada e coram-se intensamente com este corante. Além disso, nas etapas finais da apoptose há intensa fragmentação do núcleo. As células da linhagem IEC-6 (1×10^5 por/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços. Em cada poço havia uma lamínula estéril para permitir a aderência das células. As células foram tratadas com 20 μ M, 40 μ M e 80 μ M de colesterol pelo período de 48 h. Após este período, o meio foi retirado, lavou-se as células com salina para remover o meio residual e colocou-se 200 μ L de solução de Hoescht a 0,01 mg/mL em salina a 0,9%. Após 10 minutos, a lamínula foi sobreposta à lâmina de vidro e visualizou-se as células em microscópio de fluorescência, sob excitação ultravioleta, com uso de filtro 365/80. Foi utilizado como programa de análise o Axio Vision.

3.19 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey - Kramer (GraphPad Software), comparando-se os valores do controle com aqueles das células tratadas com colesterol. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $P < 0,05$ (Zar, 1984).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento dos enterócitos fetais

A curva de crescimento, iniciada com 1×10^5 células/mL, mostrou que a taxa de crescimento das culturas celulares não é necessariamente sempre a mesma, variando de acordo com o número de células em cultura (densidade celular) ou com as condições do ambiente (pH, temperatura e pressão osmótica) (Pelczar *et al.* 1997).

Ao se analisar o efeito da adição de SFB ao meio sobre as curvas de crescimento dos enterócitos fetais, verificou-se que o número aumentou significativamente após 3 horas de cultivo no meio sem SFB como naquele com 10% de SFB.

Comparando-se as curvas dos enterócitos fetais cultivados em meio com e sem 10% de SFB, nota-se que as células cultivadas em meio com SFB atingiram a fase estacionária de crescimento com um menor número de células que aquelas cultivadas sem SFB. Entretanto, com relação ao tempo de dobramento, tanto células cultivadas sem e com SFB apresentaram similares valores correspondendo a 9 e 8,8 horas, respectivamente (**Figura 06**).

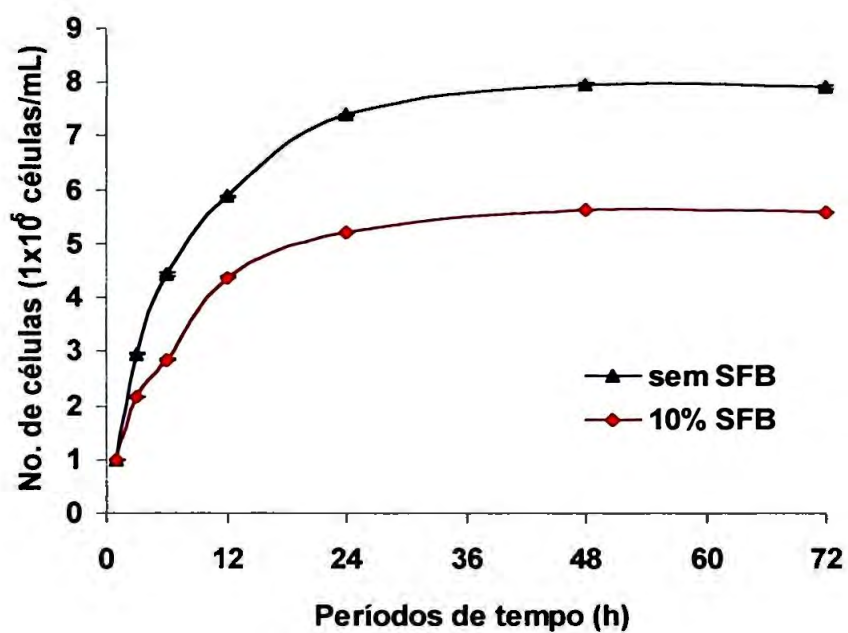


Figura 06. Curvas de crescimento dos enterócitos fetais de ratos, em meio HF12 com e sem 10% de SFB. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM de 9 determinações a partir de 3 preparações celulares.

4.2 Curva de crescimento da Linhagem IEC-6

A curva de crescimento das células da linhagem IEC-6 apresentou duplicação no número de células após 14 horas de cultura, em meio DMEM contendo 10% de SFB (Figura 07). Nessa fase, as células estão em crescimento logarítmico. Na ausência de soro fetal bovino, esse tipo celular não se prolifera, por ser uma linhagem imortalizada que cresce aderida em monocamada, assim dependente de fatores de crescimento.

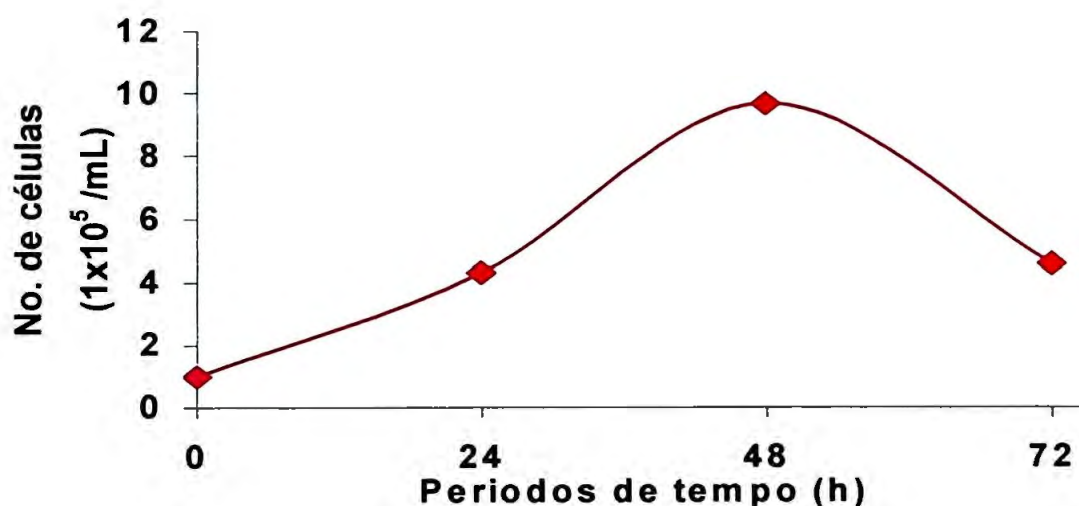


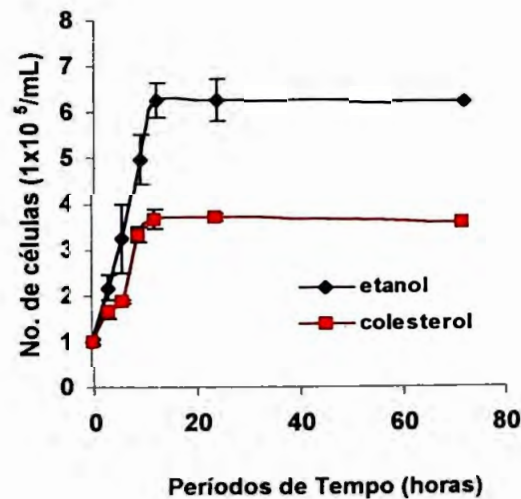
Figura 07. Curva de crescimento das células da linhagem IEC-6, cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SFB. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 9 determinações a partir de 3 preparações celulares.

4.3 Efeito do colesterol sobre a curva de crescimento do enterócito

4.3.1 Curvas de crescimento de enterócitos fetais na presença e na ausência de soro fetal bovino (SFB)

A adição de colesterol ao meio de cultura ($20 \mu\text{M}$) causou redução significativa no número de células em meio contendo ou não SFB (Figura 08). Contudo, esse efeito foi mais pronunciado em meio sem SFB. A redução média do número de células no período de 24 horas foi de 28% no meio com SFB e de 41% sem SFB, comparando-se os tratamentos com colesterol. Contudo, o efeito do colesterol foi observado já no período de 3 horas na presença de soro e somente após 9 horas na ausência deste. Este fato pode estar relacionado com a adaptação das células às condições do meio.

A)



B)

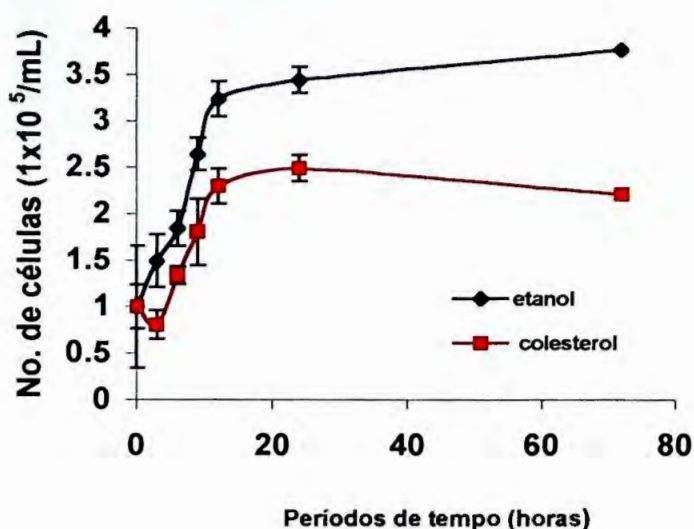


Figura 08. Curvas de crescimento de enterócitos fetais, cultivados na presença de colesterol (20 μM) ou etanol (utilizado para dissolução do colesterol) em meio sem (A) ou com (B) 10% de SFB. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM de 9 determinações a partir de 3 preparações celulares.

4.4 Efeito do colesterol sobre aspectos morfológicos gerais dos enterócitos

Os enterócitos fetais foram cultivados por 24 horas em meio HF12, na ausência (**Figura 09-A**) ou na presença (**Figura 09-B**) de 10% de SFB em diferentes concentrações de colesterol: 10 μM , 20 μM , 40 μM e 80 μM . Após esse período, verificou-se que o tratamento dos enterócitos fetais com diferentes concentrações de colesterol na ausência de SFB provocou uma diminuição no número de células principalmente quando essas foram tratadas com 80 μM de colesterol não causando grandes alterações na sua morfologia. Por sua vez, o tratamento dos enterócitos com 20 μM , 40 μM e 80 μM de colesterol na presença de SFB fez com que as células perdessem seu aspecto normalmente globoso, adquirindo uma forma irregular. As alterações se tornaram mais evidentes a partir de 40 μM de colesterol quando comparados aos enterócitos cultivados com etanol (controle) (**Figura B-09**).

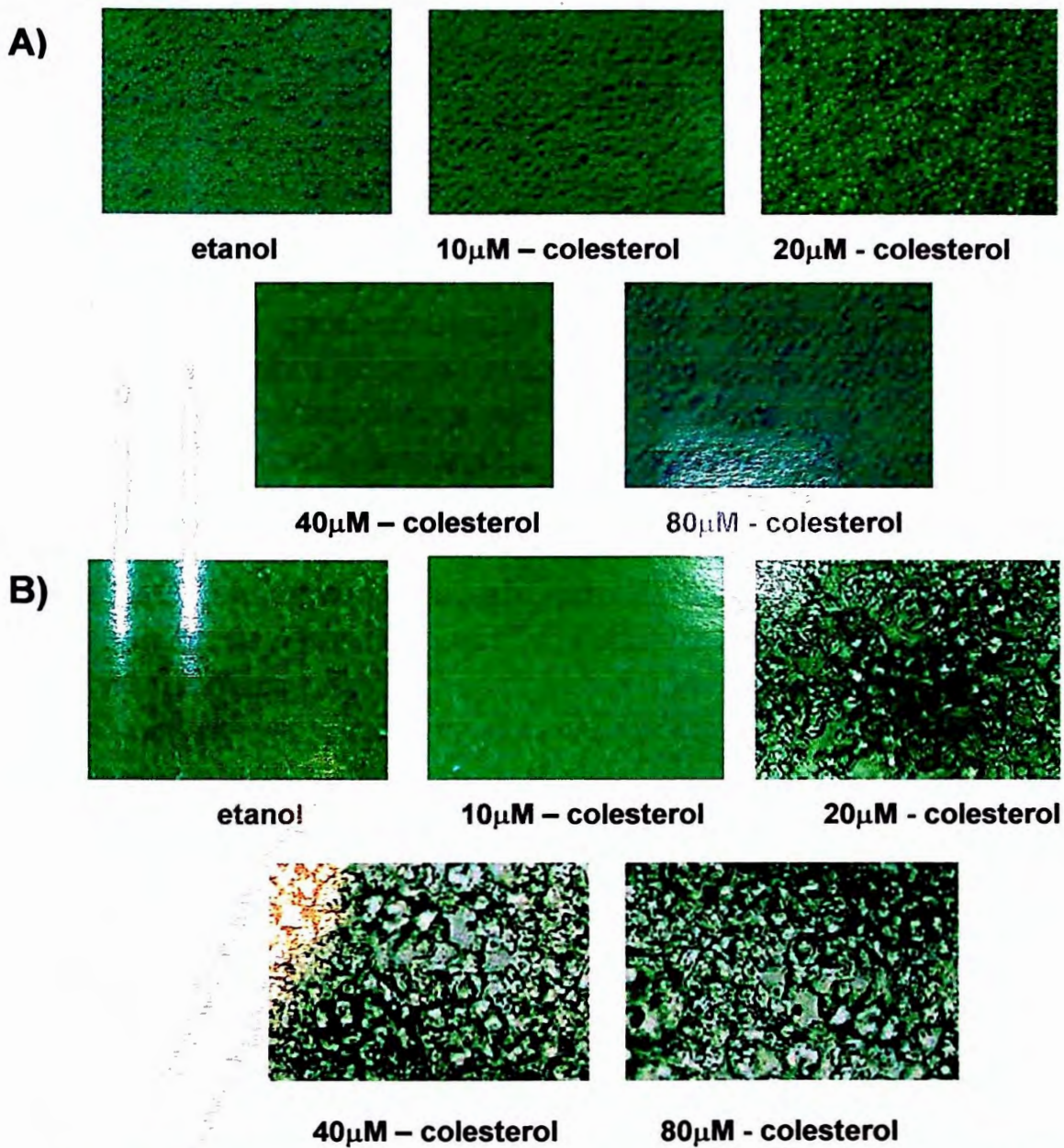


Figura 09. Fotomicrografias de enterócitos fetais analisados em microscópio de luz invertido ao final de 24 horas de cultura em meio HF12 na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 10% de soro fetal bovino (SFB) em diferentes concentrações de colesterol. Observa-se em "B" que a partir de 20 µM de colesterol as células começam a perder sua forma globosa e apresentam a superfície bastante irregular quando comparado ao controle (etanol). Aumento de 400 x.

4.5 Atividade máxima da citrato sintase

Os enterócitos fetais (1×10^7 células/mL) foram cultivados em meio HF12 contendo ou não 10% de SFB com 20 μ M de colesterol, por 24 horas. Após esse período, verificou-se que a atividade da enzima não se alterou quando os enterócitos foram cultivados com 20 μ M de colesterol, na ausência de soro fetal bovino, em relação às células tratadas com etanol. Entretanto, observou-se que a atividade da citrato sintase é diminuída em 14% quando os enterócitos foram cultivados com 20 μ M de colesterol na presença de 10% de SFB em relação ao seu controle, células tratadas com etanol (**Figura 10**).

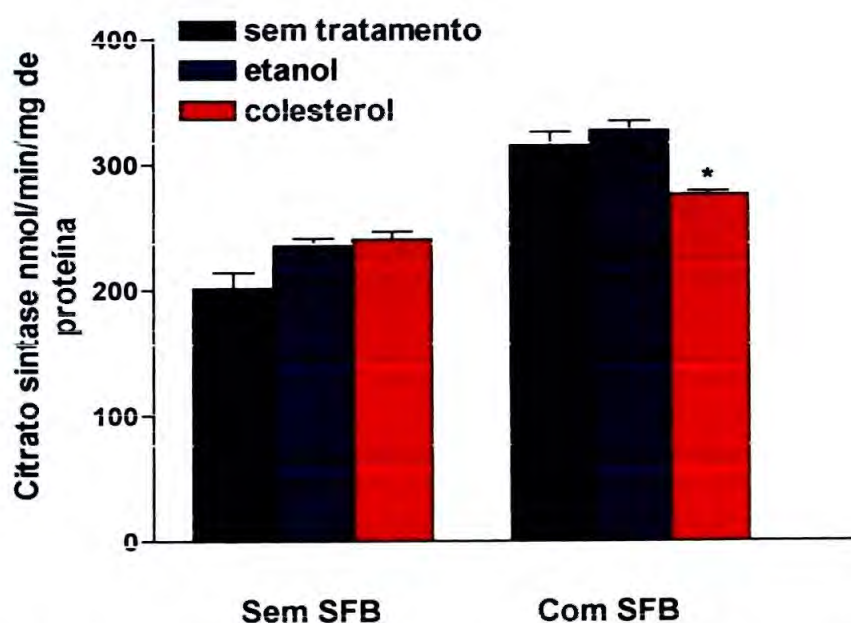


Figura 10. Atividade da citrato sintase em enterócitos fetais cultivados em meio HF12 sem ou com (B) 10% de SFB. As células foram cultivadas sem tratamento ou tratadas com etanol ou colesterol (20 μ M). Os valores representam a média da atividade máxima (nmol/min por mg de proteína) da citrato sintase \pm EPM de 5 preparações celulares em triplicata. (* $P < 0,05$) devido ao efeito do colesterol.

4.6 Composição de ácidos graxos dos enterócitos fetais e da linhagem IEC-6 analisada por HPLC

Na **Figura 11** estão apresentados os dados da composição de ácidos graxos dos enterócitos fetais em três condições: antes e após o cultivo de 24 horas em meio HF12 sem e com 10% SFB. Não houve modificação significativa na composição dos ácidos graxos dos enterócitos fetais pelo cultivo na ausência ou presença de SFB.

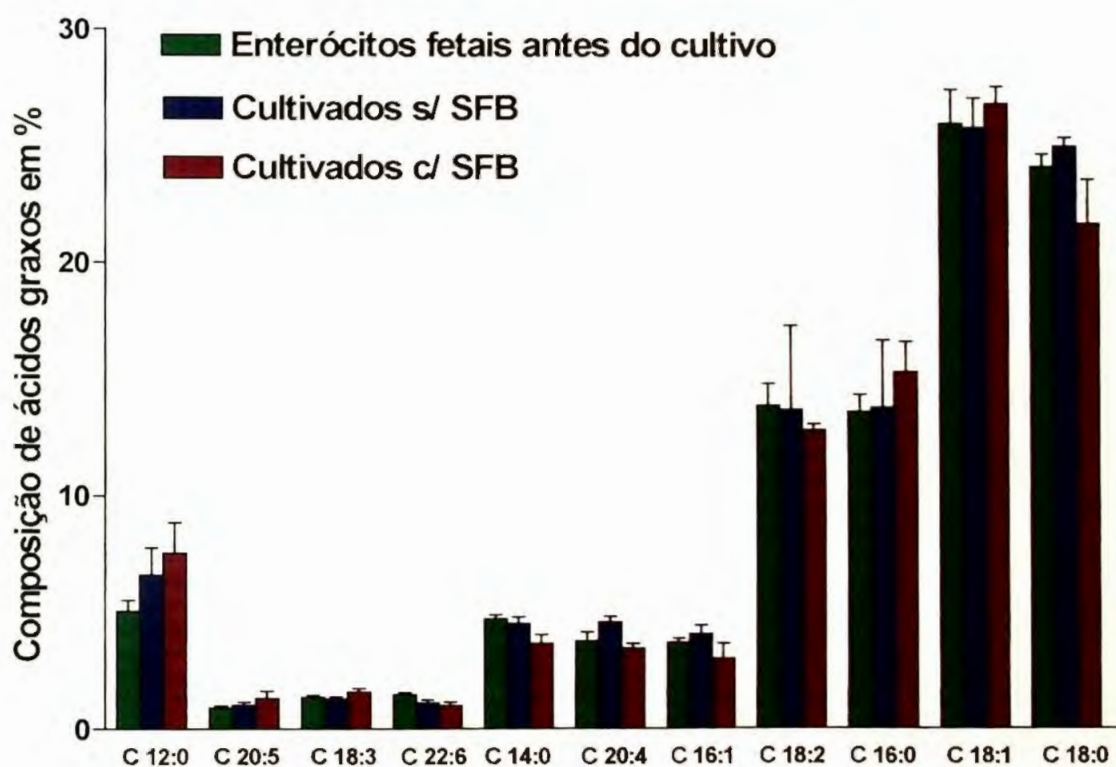


Figura 11. Composição de ácidos graxos dos enterócitos fetais antes e após cultivo de 24 horas na presença ou na ausência de soro fetal bovino (SFB). Os resultados estão expressos como média \pm EPM a partir de 4 experimentos realizados em duplicata.

Na **Figura 12** verifica-se que houve aumento de 81% na composição do ácido araquidônico (C20:4) quando os enterócitos foram tratados com 20 μ M de colesterol na ausência de soro fetal bovino (SFB), em relação àqueles tratados com etanol. Os demais ácidos graxos não apresentaram alterações significativas na sua composição.

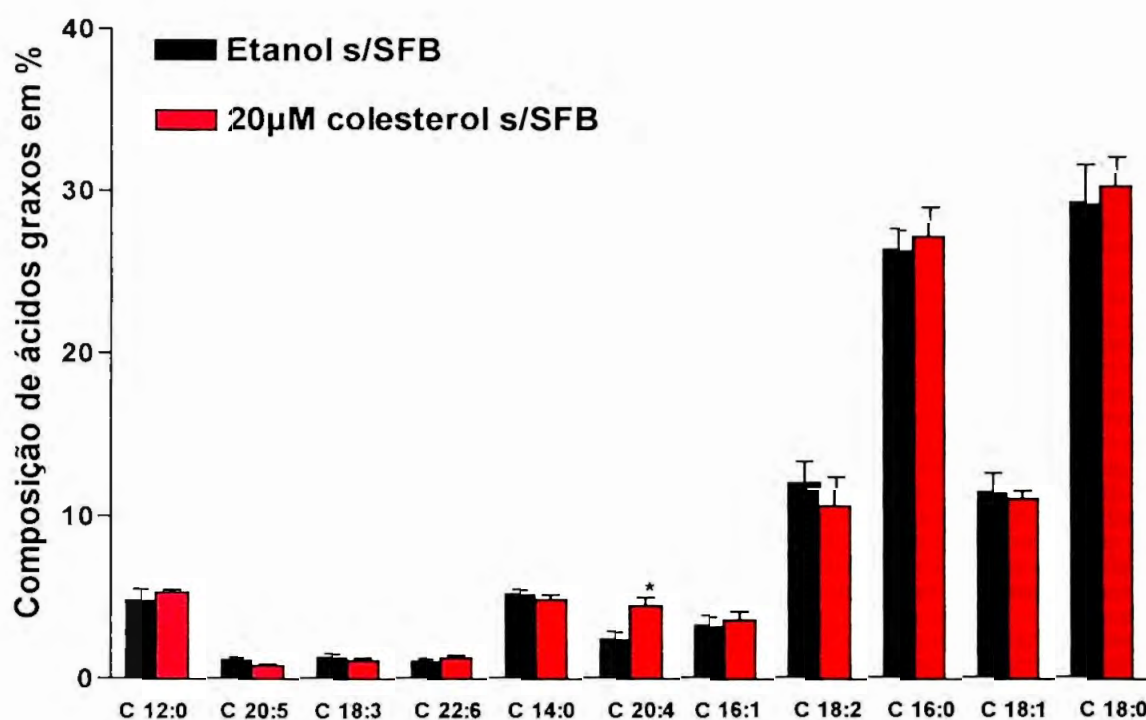


Figura 12. Composição de ácidos graxos dos enterócitos fetais, cultivados com etanol ou 20 μ M de colesterol, na ausência de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Os resultados estão expressos como média \pm EPM a partir de 4 experimentos realizados em duplicata. *($P < 0,05$) devido ao efeito do colesterol.

Na **Figura 13** estão apresentados os dados da composição de ácidos graxos das células submetidas ao tratamento com 20 μ M de colesterol na presença de SFB por 24 horas. Houve aumento na proporção dos ácidos: C12:0,

C18:3, C18:2 e C18:1 de 42%, 19%, 44% e 34%, respectivamente, em relação ao grupo controle (tratado com etanol). Por outro lado, houve redução na proporção dos ácidos C18:0, C16:0, C22:6 e C20:4 de 20%, 12%, 44% e 21%, respectivamente.

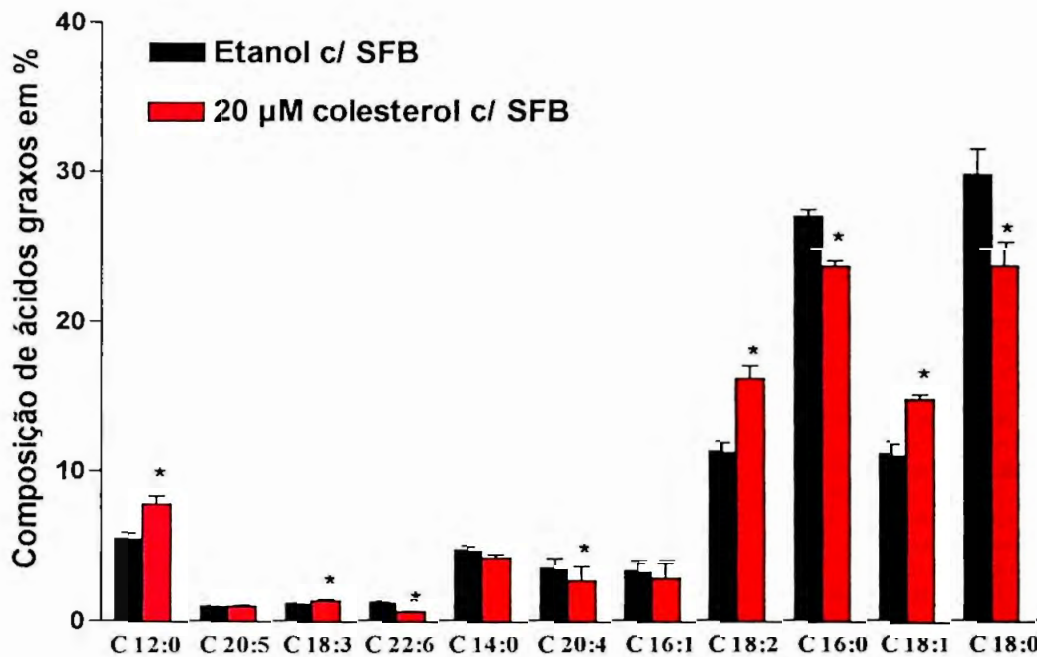


Figura 13. Composição de ácidos graxos dos enterócitos fetais cultivados com etanol ou 20 µM de colesterol, na presença de soro fetal bovino (SFB), por 24 horas. Os resultados estão expressos como média ± EPM a partir de 4 experimentos realizados em duplicata. * (P < 0,05) devido ao efeito do colesterol.

Pelo gráfico da **Figura 14** verifica-se que houve diferença marcante na composição dos ácidos graxos quando as células IEC-6 foram cultivadas por 24 horas na presença de colesterol. O tratamento com colesterol elevou em 23% a proporção de C12:0 e C16:0 em 10% C14:0 e em 15% C20:5 e C22:6. Este esterol causou redução de 52% e 44% nas proporções de C18:3 e C18:2 e de 11% do ácido graxo monoinsaturado C18:1.

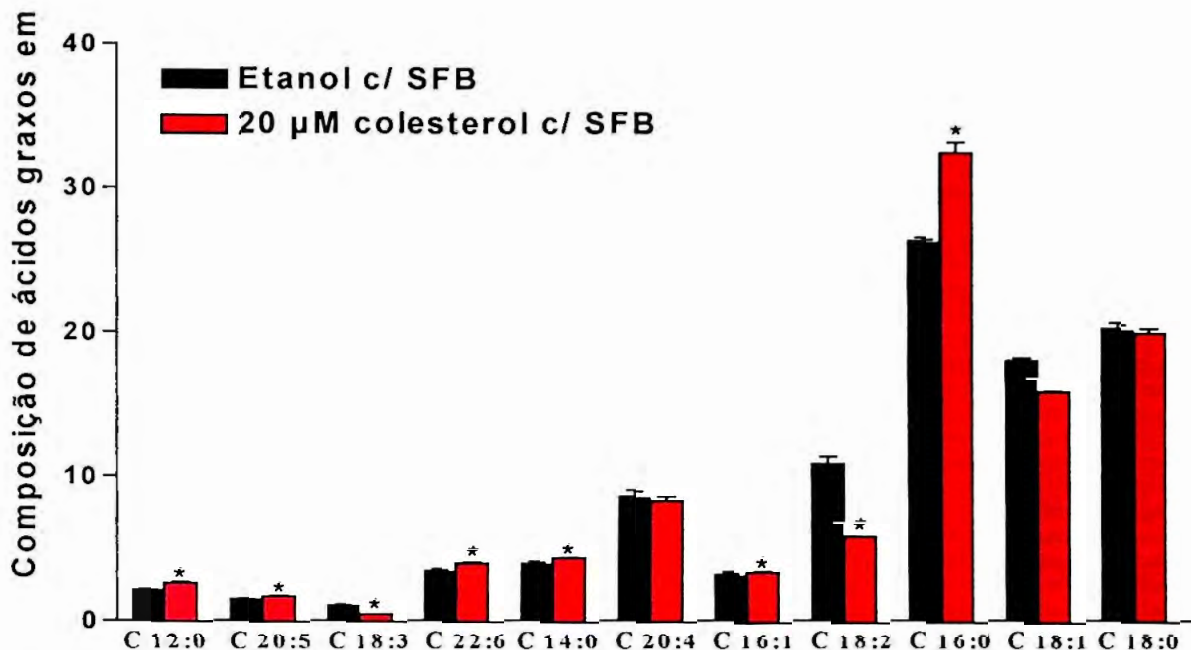


Figura 14. Composição de ácidos graxos das células IEC-6 cultivadas com etanol ou 20 μM de colesterol na presença de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Os resultados estão expressos como média ± EPM a partir de 4 experimentos. * ($P < 0,05$) devido ao efeito do colesterol.

4.7 Efeito do colesterol na proporção de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) e poliinsaturados (AGP) dos enterócitos fetais cultivados na ausência e na presença de SFB e da linhagem IEC-6.

Para esta análise, consideramos como diferenças relevantes valores acima de 5%. Na ausência de SFB, a adição de colesterol não alterou a porcentagem de AGS, AGM, AGP, a razão de I/S e o índice de insaturação nos enterócitos fetais quando comparados ao etanol (controle). Por outro lado, nos enterócitos cultivados na presença de SFB e colesterol, a porcentagem de AGS diminuiu a razão I/S e o índice de insaturação aumentou quando comparados ao controle. Na linhagem IEC-6, o colesterol aumentou a porcentagem de AGS enquanto que a de AGP diminuiu, o mesmo ocorrendo com a I/S e o índice de insaturação. Portanto, a resposta da IEC-6 foi oposta a dos enterócitos (Tabela 01).

Tabela 01. Porcentagem do total de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) e poliinsaturados (AGP), razão de I/S e índice de insaturação das células cultivadas na presença de etanol (controle) ou colesterol (20 μ M). Os valores foram obtidos a partir das Figuras 12, 13 e 14.

Células e Condições de Cultivo

Enterócitos sem SFB					
ADIÇÕES	AGS	AGM	AGP	I/S	Índice de insaturação
Etanol	66%	15%	18%	0,50	64,5
Colesterol	68%	15%	18%	0,49	69,6
Enterócitos com SFB					
Etanol	67%	15%	18%	0,49	67
Colesterol	60%	18%	22%	0,67	75
IEC-6 com SFB					
Etanol	53%	21%	26%	0,88	109
Colesterol	60%	20%	21%	0,67	99

4.7 Determinação do conteúdo de colesterol em segmentos intestinais por HPLC

Dos quatro segmentos estudados, o íleo foi o que apresentou maior quantidade de colesterol livre enquanto que o intestino grosso foi a porção que apresentou o menor conteúdo (**Tabela 02**).

Tabela 02. Conteúdo de colesterol nos segmentos intestinais: duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso de ratos adultos, determinado por HPLC. Os valores estão apresentados como média \pm EPM a partir de 4 animais.

Segmentos intestinais	Colesterol (μ g/g)
Duodeno	2,09 \pm 0,58
Jejuno	2,12 \pm 0,13
Íleo	2,78 \pm 0,19
Intestino grosso	1,59 \pm 0,23

4.8 Estudo da expressão da HMG-CoA redutase e PPAR γ

4.8.1 Padronização do número de ciclos para RT-PCR

A expressão gênica da HMG-CoA redutase e PPAR γ foi avaliada utilizando-se a técnica de RT-PCR (transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase). A reação em cadeia pela polimerase (PCR), descrita por Saiki et al (1985) e Mullis & Faloona (1987), é a reação de amplificação de ácido nucleico mais utilizada. A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, podendo ser utilizada tanto para DNA genômico como para cDNA. Nesta reação são utilizados dois *primers* (sense e antisense) que hibridizam com as fitas opostas do DNA. Esses *primers* são desenvolvidos de acordo com o tamanho do fragmento de interesse que será amplificado. A reação está baseada na desnaturação da fita dupla do ácido nucleico, seguida da hibridização de dois iniciadores oligonucleotídeos que flanqueiam as extremidades da região a ser amplificada, *primers*, e posterior síntese da nova cadeia polinucleotídica, por meio da DNA polimerase. Dessa forma, cada ciclo da PCR consiste de três etapas: desnaturação, hibridização e amplificação. A PCR, portanto, apresenta-se como uma técnica potencialmente sensível, possibilitando detectar até uma única molécula de ácido nucleico.

Para cada reação de PCR existe a necessidade da padronização de vários parâmetros tais como: concentração de MgCl₂, (Mg²⁺ é o cofator da enzima Taq DNA polimerase), temperatura de hibridização dos *primers* e número de ciclos. A transcriptase reversa foi utilizada neste trabalho, porque para análise da expressão do gene, utilizamos o RNA das células, que com o auxílio da enzima transcriptase reversa é convertido em cDNA. A técnica de PCR é semiquantitativa e os resultados devem ser normalizados e expressos em relação à amplificação de um gene constitutivo, que neste caso, foi a β -actina, cujo resultado da sua amplificação é considerado como controle interno para a correção da amplificação dos fragmentos de interesse.

Realizamos os experimentos da expressão gênica com os *primers* da HMG-CoA redutase, iniciando-se pela padronização de parâmetros descritos

anteriormente. A melhor expressão do gene ocorreu com 1,0 mM de $MgCl_2$, temperatura de anelamento de 60° C e 45 ciclos. Para a β -actina, a concentração de $MgCl_2$ também foi de 1,0 mM a 60°C de temperatura de hibridização e 25 ciclos. Os resultados da padronização para a análise da expressão da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais e na linhagem IEC-6 estão representados nas **Figuras 15 e 16**. Também realizou-se experimentos para padronização da análise da expressão gênica com os *primers* do PPAR γ . A análise da expressão do gene foi padronizada para 1,0 mM de $MgCl_2$, com temperatura de hibridização a 55°C e 50 ciclos. Para a β -actina, a concentração de $MgCl_2$ foi de 1,0 mM a 55°C de temperatura de hibridização e 25 ciclos (**Figura 17**). As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1,2% e, após a separação por eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio ($C_{21}H_{20}N_3Br$) e fotografado em camara Kodak digital.

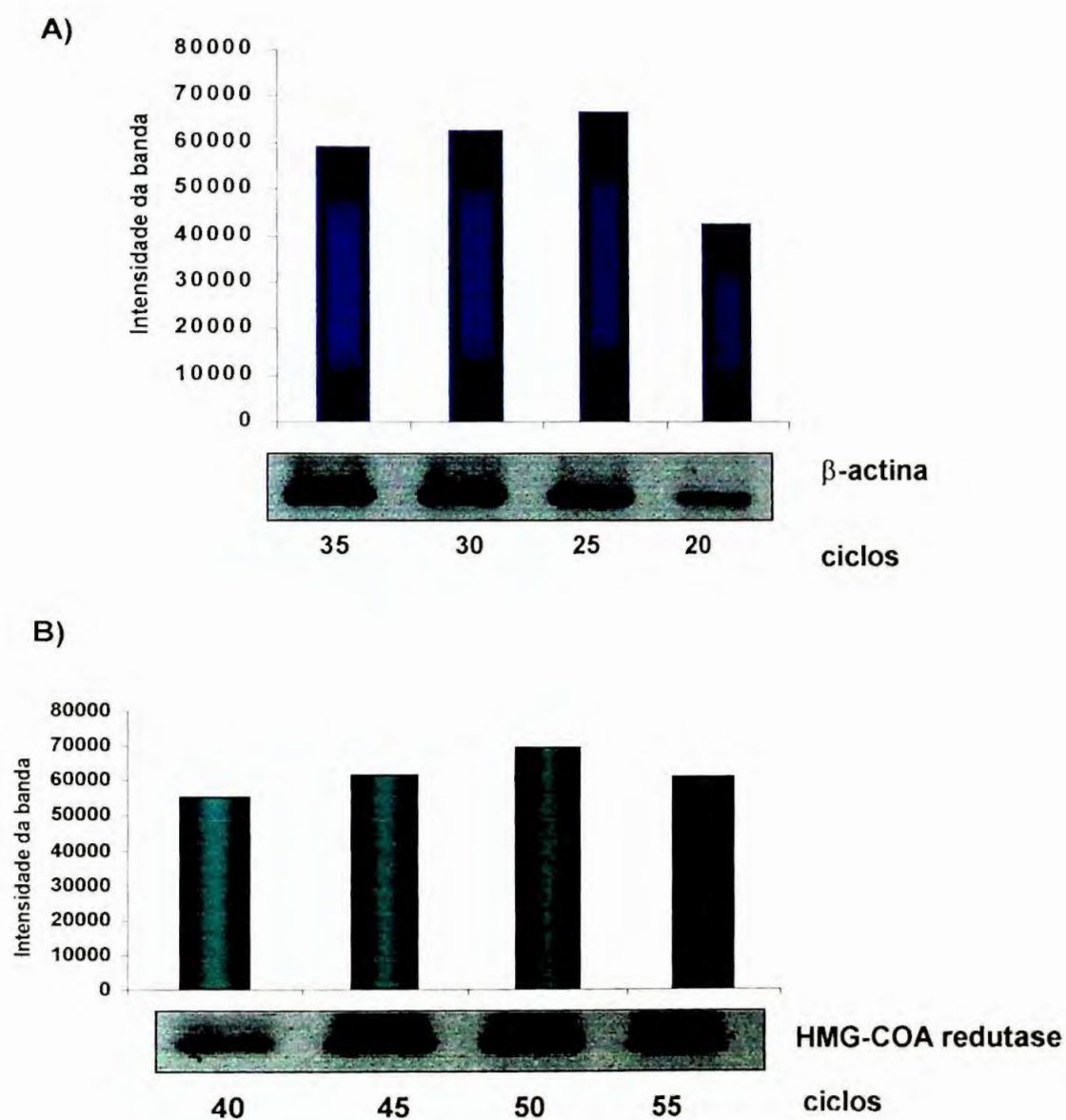
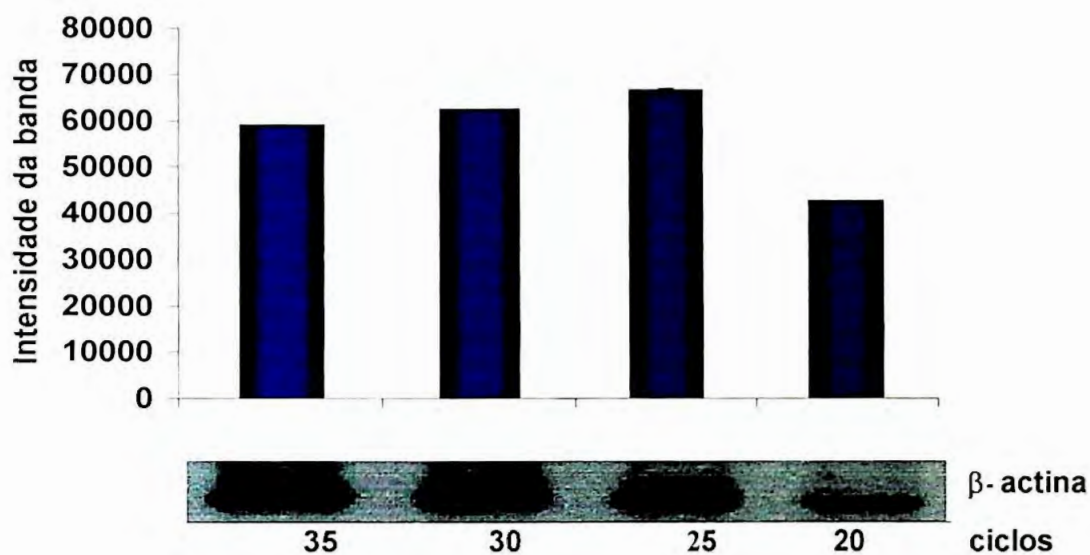


Figura 15. Padronização do número de ciclos da RT-PCR para a β -actina (**A**) e HMG-CoA redutase (**B**) em amostras de intestinos fetais de ratos. Após eletroforese em gel de agarose, confirmou-se a amplificação dos fragmentos de 549pb para o gene da β -actina e de 350pb para o gene da HMG-CoA redutase.

A)



B)

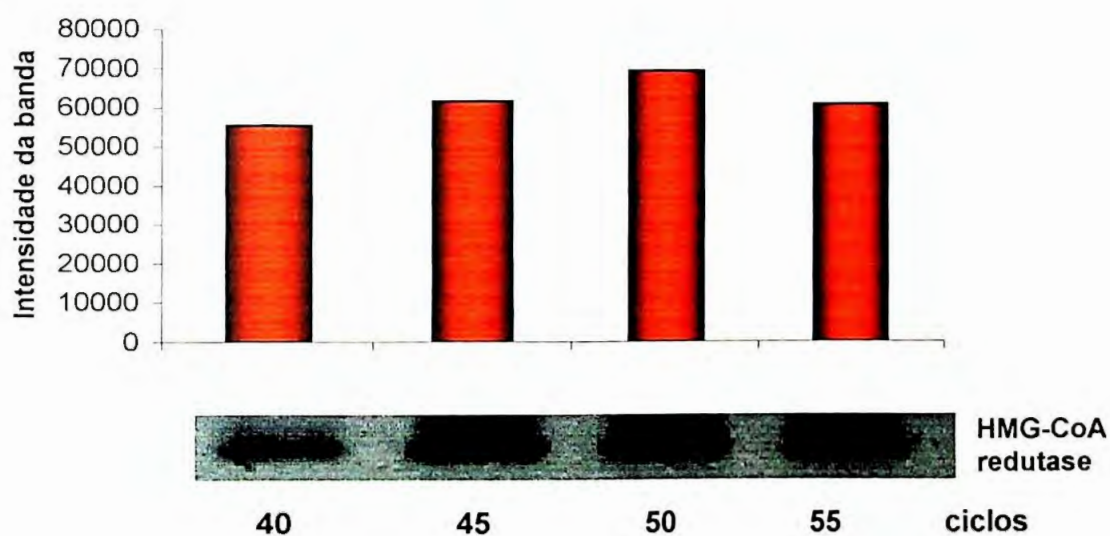
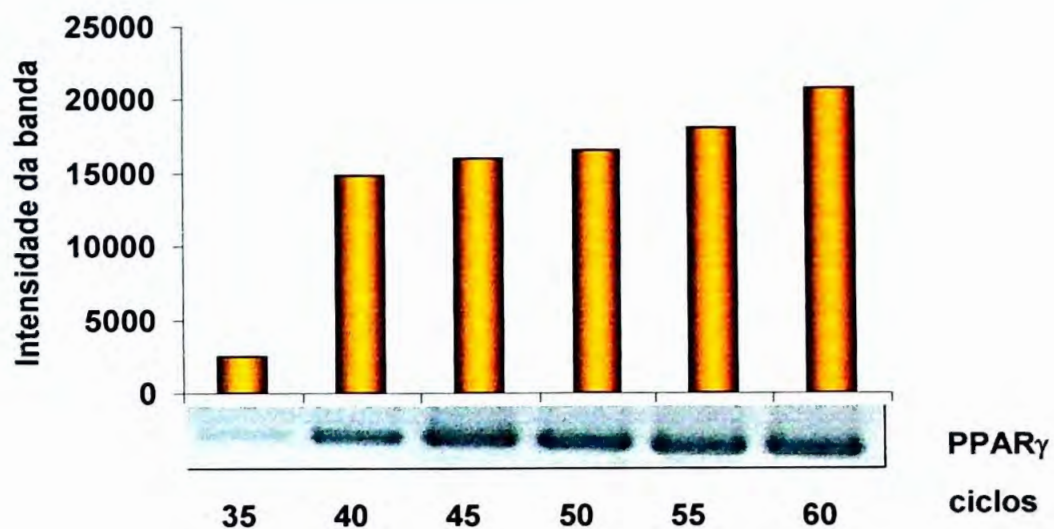


Figura 16. Padronização do número de ciclos da RT-PCR para a β -actina (A) e HMG-CoA redutase (B) na linhagem IEC-6. Após eletroforese em gel de agarose, confirmou-se a amplificação dos fragmentos de 549pb para o gene da β -actina e de 350pb para o gene da HMG-CoA redutase.



B)

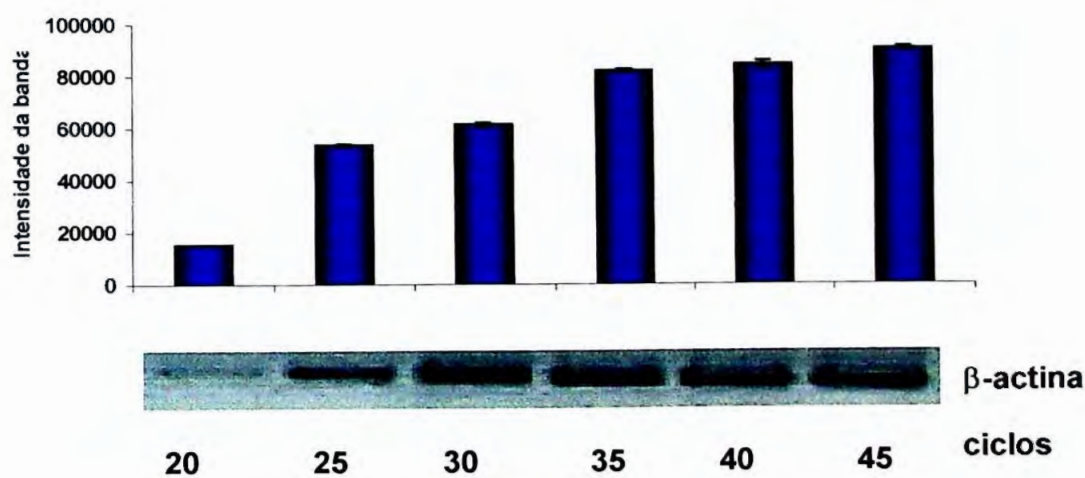


Figura 17. Padronização do número de ciclos da RT-PCR para o PPAR γ (A) e para a β -actina (B). Após eletroforese em gel de agarose, confirmou-se a amplificação dos fragmentos de 474pb para PPAR γ e de 549pb para o gene da β -actina.

4.8.2 Expressão da HMG-CoA redutase nos segmentos intestinais de ratos adultos

Observa-se através da **Figura 18**, que houve expressão da HMG-CoA redutase em todos os segmentos intestinais de ratos adultos. Entretanto, o íleo e o jejuno foram os que apresentaram menor expressão da enzima quando comparados às demais amostras e analisadas por ANOVA e TUKEY. É interessante notar que a expressão da HMG-CoA redutase foi duas vezes maior no raspado da mucosa do íleo que no segmento inteiro. Por sua vez, no jejuno e intestino grosso os valores foram menores no raspado. Assim, a atividade da HMG-CoA não está restrita às células da mucosa e varia com o segmento em estudo.

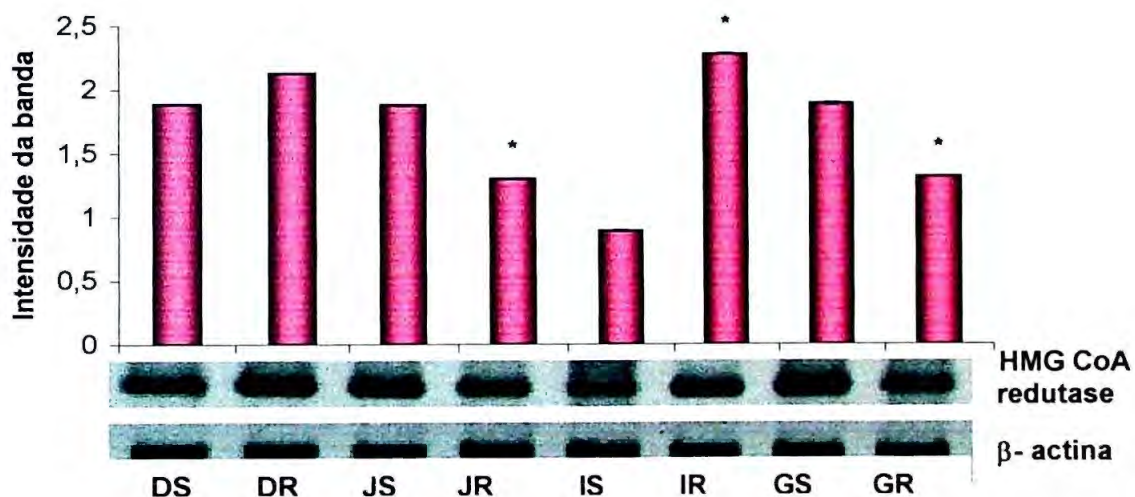


Figura 18. Expressão da HMG-CoA redutase no intestino delgado de ratos adultos. Amostras de quatro segmentos intestinais: duodeno, (D), jejuno (J), íleo (I) e intestino grosso (G) foram utilizadas para verificar a expressão da HMG-CoA redutase. As letras "S" e "R" representam as amostras do segmento intestinal e do raspado do epitélio, respectivamente. A intensidade da banda da HMG-CoA redutase em relação à β -actina está apresentada no gráfico de barras como média \pm EPM de 4 experimentos. * ($P < 0,05$) para a comparação entre o segmento e o raspado.

4.9 Efeito do colesterol na expressão da HMG-CoA redutase

4.9.1 Intestinos fetais de ratos

Na **Figura 19** estão apresentados os resultados da expressão da enzima HMG-CoA redutase em intestinos fetais de ratos cultivados em meio HF12 contendo ou não 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20 μM , 40 μM ou 80 μM de colesterol. Os experimentos foram sempre realizados em células cultivadas por 4 horas. Utilizou-se como controle interno da reação de amplificação, o gene da β -actina. O cultivo das células por 4 horas na presença de etanol reduziu a expressão da HMG-CoA redutase. Este fato foi evidente na ausência de SFB. O colesterol não afetou de modo marcante a expressão da HMG-CoA redutase na presença ou não de SFB. Além disso, a expressão desta enzima nos intestinos fetais não foi diferente entre os grupos tratados com colesterol e o do etanol, conforme avaliação estatística.

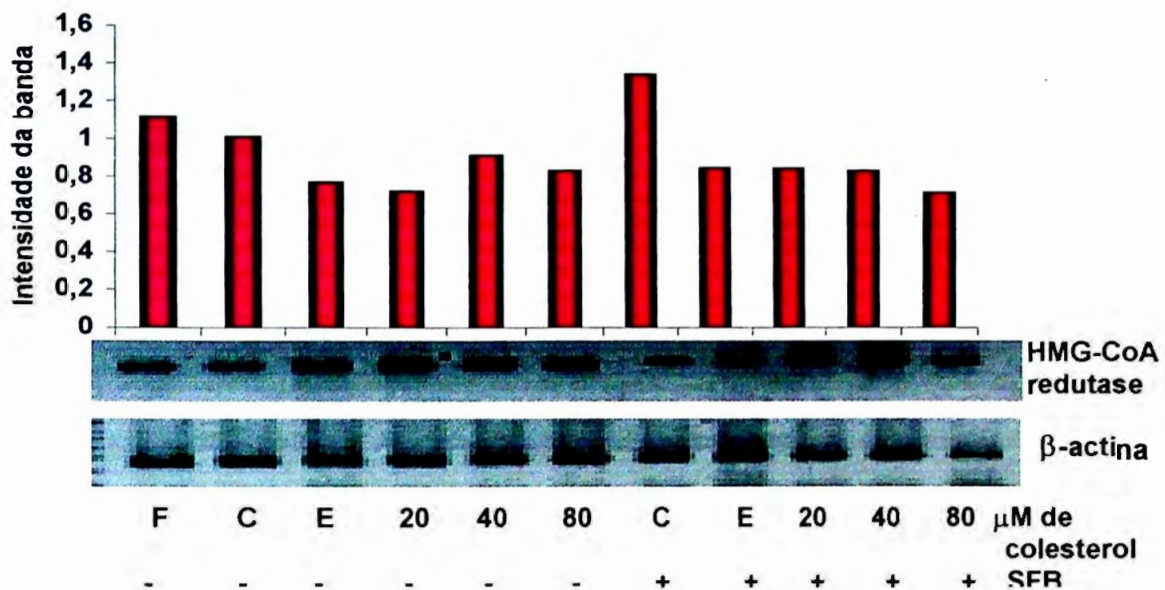


Figura 19. Intestinos fetais de ratos foram cultivados em meio HF12 contendo (+) ou não (-) 10% de soro fetal bovino (SFB), por 4 horas, com 20 μ M, 40 μ M ou 80 μ M de colesterol. As letras “F”, “C” e “E” correspondem a descrição de tecidos: fresco (sem cultivo), cultivado sem tratamento (4 horas) e cultivados na presença de etanol (controle) respectivamente. A intensidade da banda da HMG-CoA redutase em relação à β -actina está apresentada no gráfico de barras como média \pm EPM de 4 experimentos.

4.9.2 Células da linhagem IEC-6

A expressão da HMG CoA redutase, nas células da linhagem IEC-6, cultivadas por 48 horas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20 μ M, 40 μ M ou 80 μ M de colesterol está apresentada na **Figura 20**. O efeito na expressão da HMG-CoA redutase, quando comparado ao etanol foi: aumento com 20 μ M, redução com 40 μ M e aumento novamente com 80 μ M. Esses achados são sugestivos de que a linhagem IEC-6 não responde ao colesterol de maneira uniforme. Esta é talvez uma característica dessa linhagem celular.

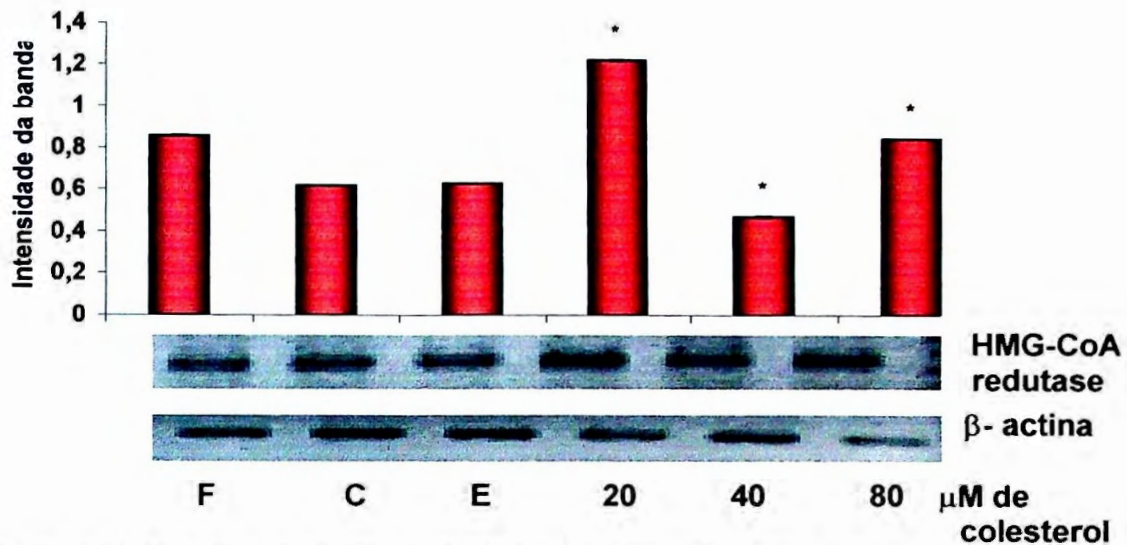


Figura 20. Células IEC-6 foram cultivadas durante 48 horas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20 μM , 40 μM ou 80 μM de colesterol. As letras “F”, “C” e “E” referem-se às células frescas (antes do cultivo), cultivadas sem tratamento (48 horas) e tratadas com etanol (controle). A intensidade da banda da HMG-CoA redutase em relação à β -actina está apresentada no gráfico de barras como média \pm EPM de 4 experimentos. * ($P < 0,05$) devido ao efeito do colesterol em relação ao etanol.

4.10 Efeito do colesterol na expressão do PPAR γ em intestinos fetais de ratos

O gráfico da **Figura 21** apresenta a expressão gênica do PPAR γ em intestinos fetais de ratos cultivados por 4 horas em meio HF12 contendo ou não 10% SFB com diferentes concentrações de colesterol: 20 μM , 40 μM ou 80 μM . A adição de etanol provocou redução drástica na expressão de PPAR γ . A expressão do gene do PPAR γ aumentou proporcionalmente quando os intestinos fetais de ratos foram tratados com 20 μM , 40 μM e 80 μM de colesterol na presença de 10% de SFB quando comparado com etanol. Por outro lado, quando os intestinos fetais foram tratados com as mesmas concentrações de colesterol na ausência de SFB, o gene do PPAR γ só foi expresso a partir de 40 μM de colesterol.

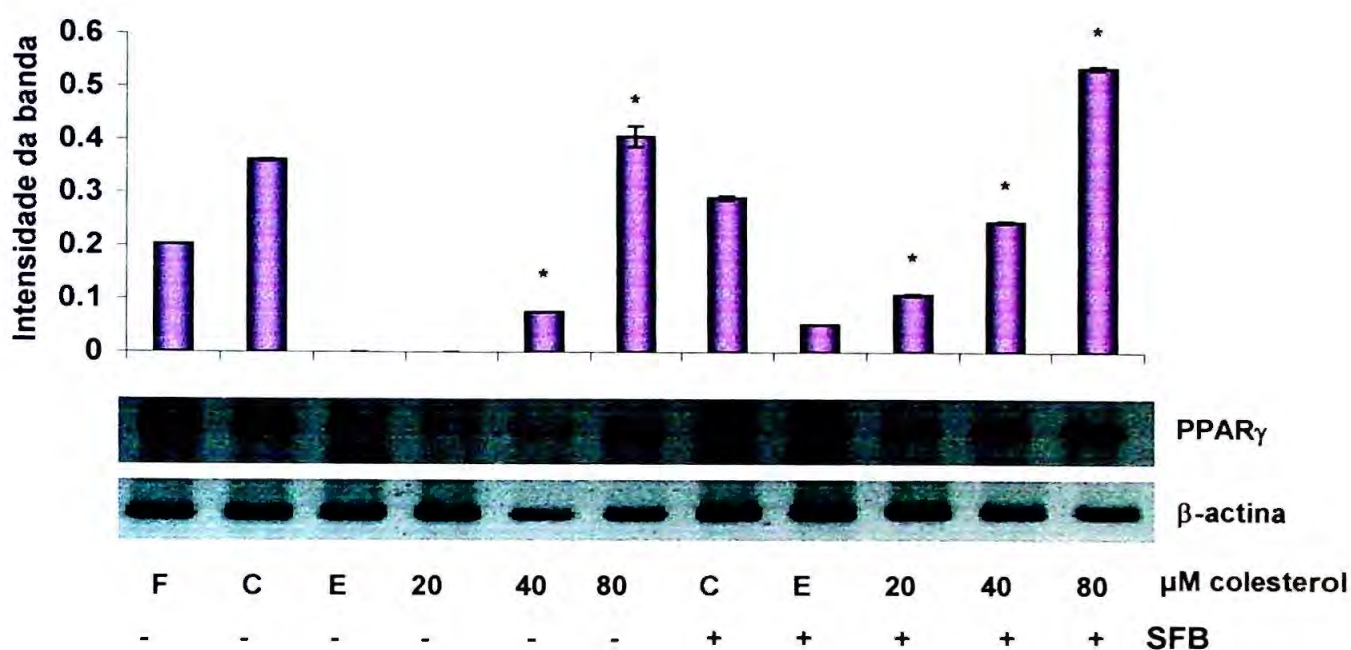


Figura 21. Efeito do colesterol na expressão do PPAR γ . Intestinos fetais de ratos foram cultivados em meio HF12 contendo (+) ou não (-) 10% de soro fetal bovino (SFB) por 4 horas com 20 μ M, 40 μ M ou 80 μ M de colesterol. A intensidade da banda do PPAR γ em relação à β -actina está apresentada no gráfico de barras como média \pm EPM de 4 experimentos. * ($P < 0,05$) devido ao efeito do colesterol em relação ao etanol.

4.11. Efeito de drogas hipolipidêmicas e antidiabéticas (ativadoras de PPAR γ e α) na expressão da HMG-CoA redutase em intestinos fetais

O gráfico da **Figura 22** apresenta a expressão gênica da HMG-CoA redutase verificada em intestinos fetais de ratos tratados com drogas hipolipidêmicas (WY14643), ativadoras do PPAR α , e antidiabéticas (ciglitizona), ativadora do PPAR γ . Após 4 horas de cultivo, não houve diferença significativa na expressão da HMG-CoA redutase quando os intestinos foram tratados com esses agonistas de PPARs. As concentrações utilizadas (4 μ M e 40 μ M de WY 14643 e 5,0 μ M de ciglitizona e 0,5 μ M de ácido retinóico) não alteraram a expressão da enzima em estudo.

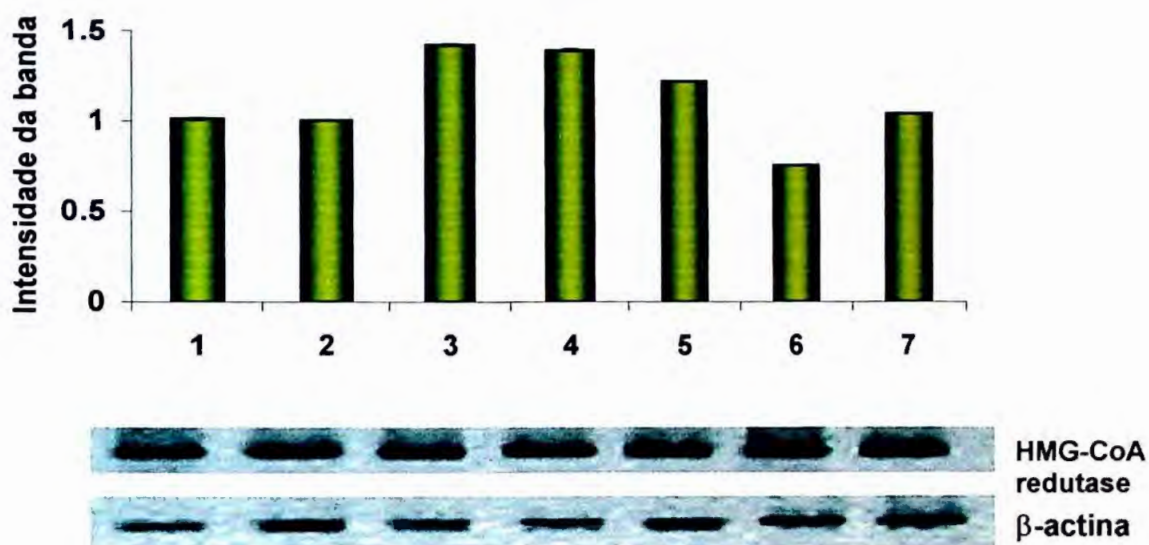
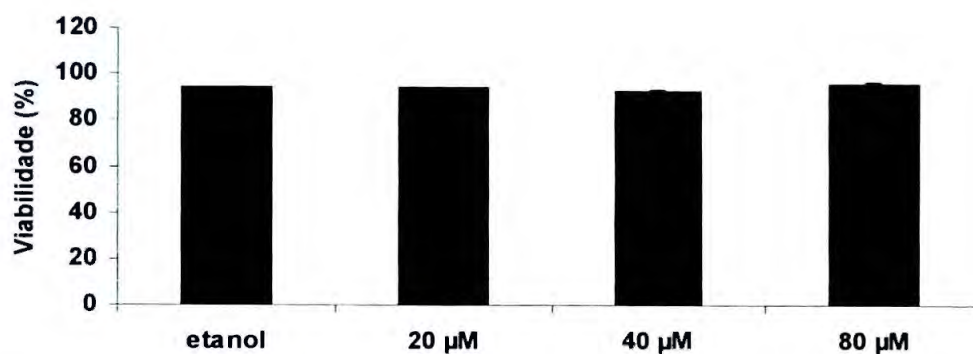


Figura 22. Efeito das drogas ativadoras de PPAR na expressão da HMG-CoA redutase. Os intestinos fetais de ratos foram cultivados em meio HF12 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) por 4 horas com as seguintes drogas: **1)** sem tratamento **2)** DMSO (40 μ L), **3)** ácido retinóico (0,5 μ M), **4)** WY 14643 (4 μ M + 0,5 μ M de ác. retinóico), **5)** WY14643 (40 μ M + 0,5 μ M de ác. retinóico), **6)** DMSO+ác. retinóico (2,5 μ L) e **7)** ciglitizona (5,0 μ M). A intensidade da banda da HMG-CoA redutase em relação à β -actina está apresentada no gráfico de barras como média \pm EPM de 4 experimentos.

4.12 Análise de viabilidade das células da linhagem IEC-6 por FACS (“fluorescence-activated cell sorter”)

Para análise de viabilidade das células IEC-6, utilizou-se o fluoróforo iodeto de propídio (PI) em PBS. Células com membrana íntegra – viáveis - não permitem a entrada do PI. Essas células apresentam, portanto, baixa fluorescência e encontram-se na região M1. Células que perderam a integridade da membrana são permeáveis ao PI, apresentando alta fluorescência na região M2 (**Figuras 23, 24 e 25**). O colesterol não causam perda de integridade das células.

A



B

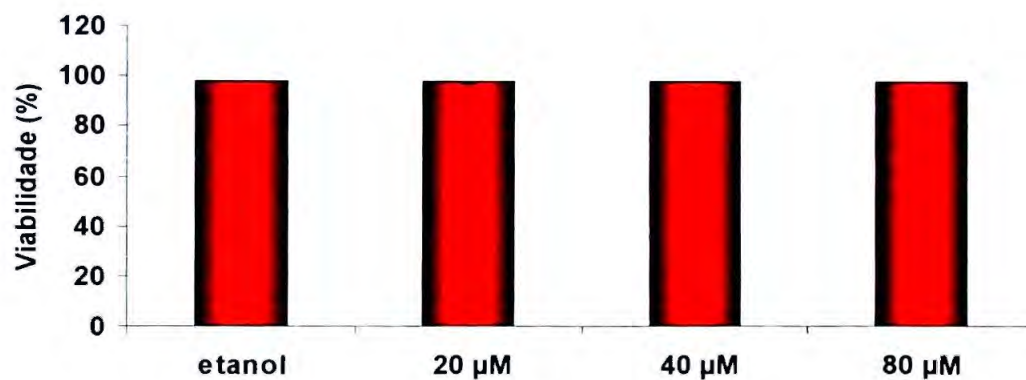


Figura 23 – Viabilidade das células IEC-6 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento com diferentes concentrações de colesterol (20 μM, 40 μM ou 80μM). O gráfico representa a porcentagem de células viáveis analisadas através de citometria de fluxo (FACS). Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5 experimentos feitos em duplicata.

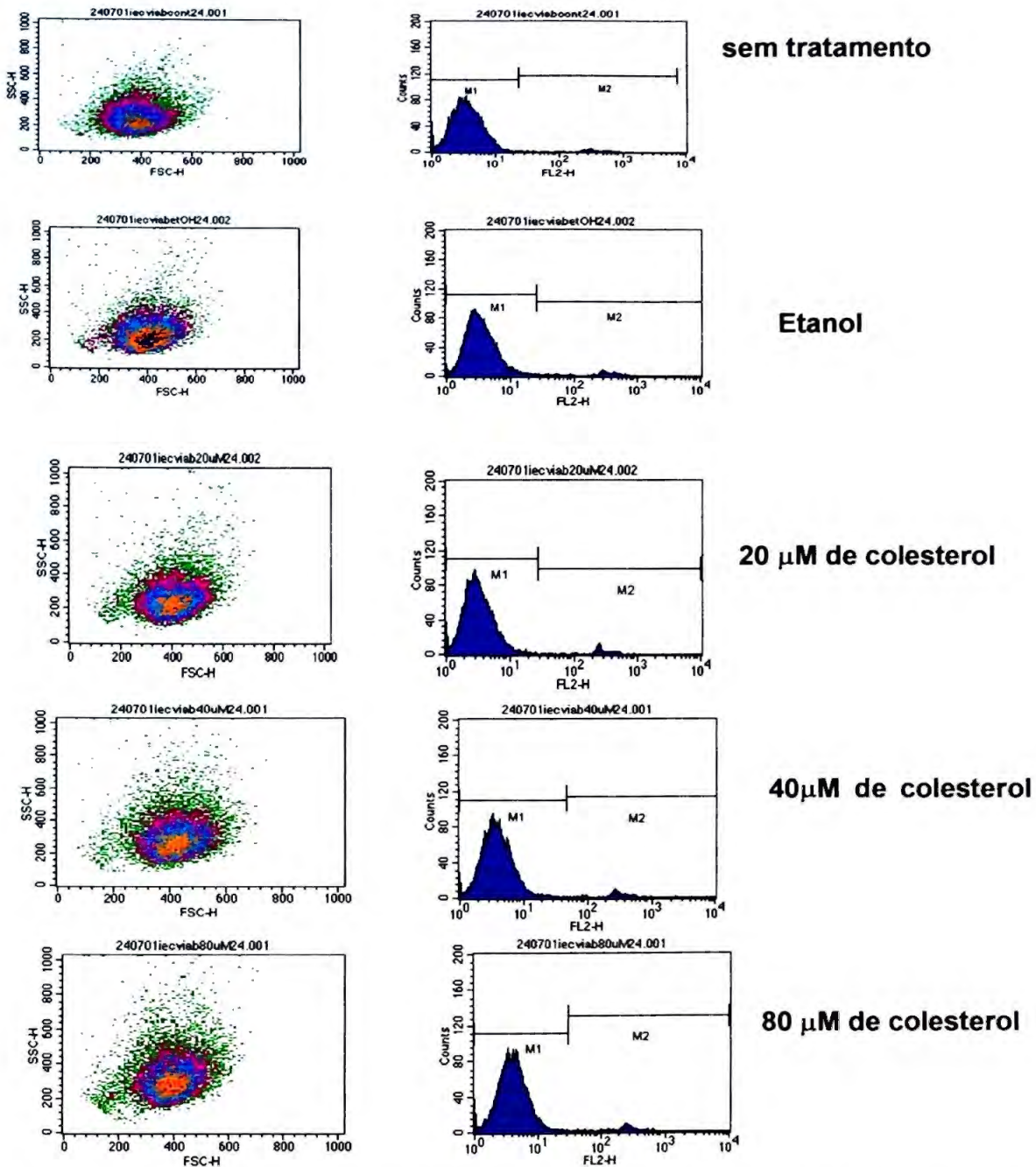


Figura 24 – Análise da viabilidade das células IEC-6 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de etanol absoluto, o solvente do colesterol. M1 corresponde a porcentagem de células viáveis e M2 a de células com perda de integridade da membrana.

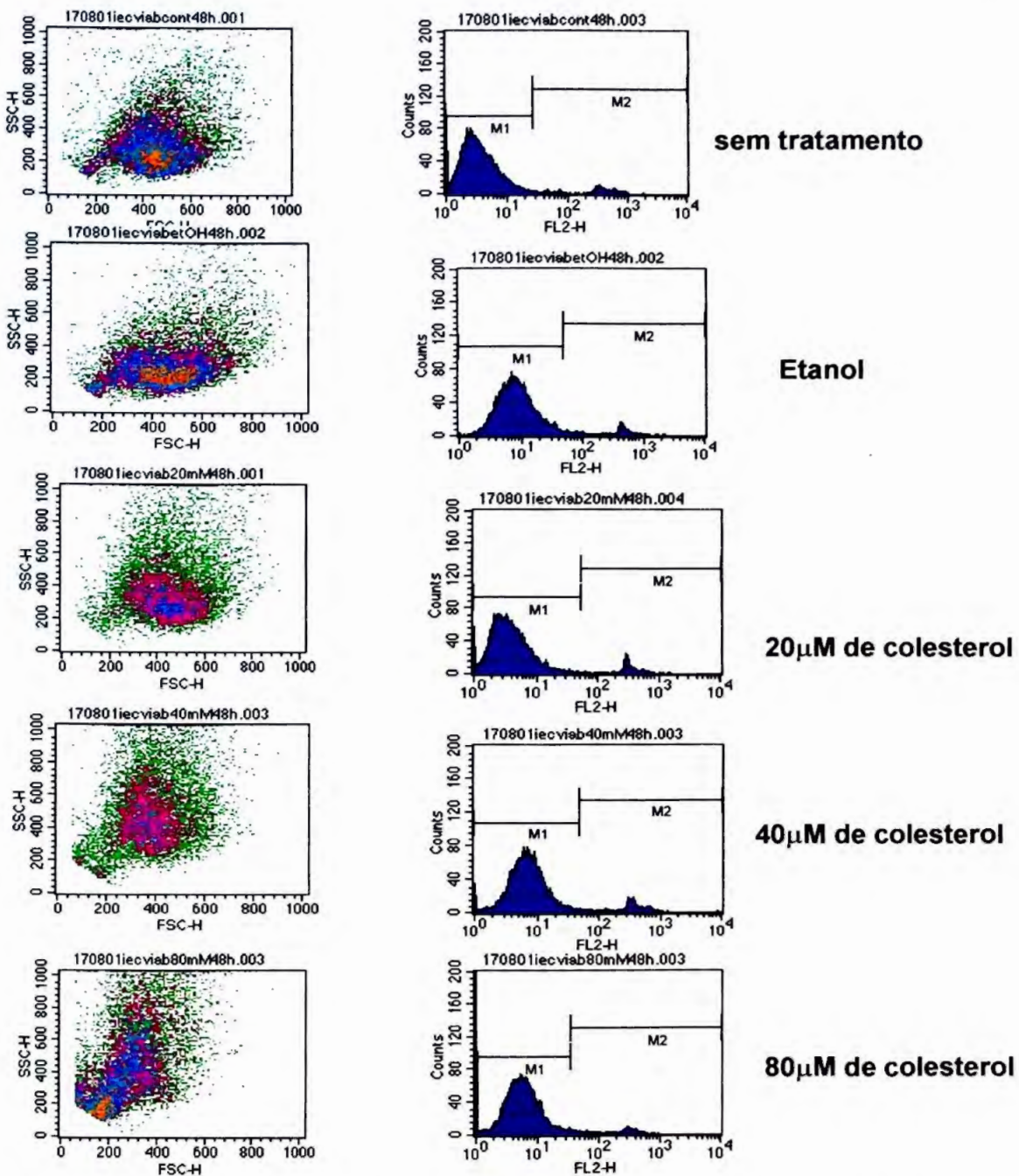


Figura 25 - Análise da viabilidade das células IEC-6 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de etanol absoluto, o solvente do colesterol. M1 corresponde a porcentagem de células viáveis e M2 a de células com perda de integridade da membrana.

4.13 Análise de apoptose das células da linhagem IEC-6 por FACS (“fluorescence-activated cell sorter”)

4.13.1 Princípios da citometria de fluxo

Os citômetros de fluxo podem ser descritos como 4 sistemas inter-relacionados. Esses 4 sistemas básicos são comuns a todos os citômetros. O primeiro é um sistema fluídico que transporta as partículas da amostra pelo instrumento, para a análise. O segundo é um sistema de iluminação, que é usado para a análise da partícula. O terceiro é um sistema óptico e eletrônico para direcionamento, armazenamento e tradução dos sinais de desvio de luz e fluorescência que resultam da iluminação das partículas. O quarto é um sistema de controle computacional que interpreta os sinais elétricos e os transforma em dados significativos para armazenamento e posterior análise.

Esses parâmetros podem ser usados para determinar diversos aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares de diferentes partículas. Essa técnica é extremamente importante, pois permite realizar estudos qualitativos e quantitativos de células inteiras ou constituintes celulares que tenham sido marcados com algum reagente disponível comercialmente, como corantes e anticorpos monoclonais.

As amostras são preparadas como suspensões de células ou partículas soltas para serem analisadas por citometria de fluxo. Isso permite que elas passem como uma fila única enquanto o líquido passa pelo raio laser. Quando o raio laser encontra as células individualmente, dois fenômenos ocorrem e fornecem informações sobre as mesmas. Primeiramente ocorre o desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia em seguida ocorre a fluorescência, se a célula estiver marcada com alguma sonda fluorescente. As sondas fluorescentes são, tipicamente, anticorpos monoclonais que foram conjugados com fluorocromos, mas podem ser reagentes ou corantes fluorescentes não conjugados a anticorpos. Após a aquisição do desvio da luz e

fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro.

A citometria de fluxo se tornou uma ferramenta importante porque os citômetros têm a capacidade de processar milhares de partículas individuais em questão de segundos. Como a maioria das preparações biológicas são heterogêneas, a análise de células individualmente oferece muitas vantagens, como análise de subpopulações raras. Além disso, a citometria de fluxo permite o isolamento de células sem perda de viabilidade, ou purificação de partículas sem perda de estrutura.

A fragmentação do DNA, uma importante característica de células apoptóticas, pode ser quantitativamente avaliada através de citometria de fluxo. Esta técnica consiste na avaliação do conteúdo do DNA da célula, individualmente, após tratamento dessas com iodeto de propídio, um fluoróforo que intercala-se ao DNA, de maneira semelhante ao brometo de etídio, seguindo-se de detecção fluorimétrica. O equipamento utilizado para esta técnica (citômetro de fluxo) produz uma coluna de células em suspensão, que passa por uma fonte de luz (488 nm – laser monocromático) para excitação do iodeto de propídio. O aparelho contém detectores para a luz emitida por este composto, o que permite quantificá-la, além de detectores para a luz refletida, de modo a ser possível avaliar o seu diâmetro e a regularidade da superfície de suas membranas (granulosidade). A análise é feita com 10^4 células, podendo-se, no final do experimento, avaliar o efeito apoptótico quanto ao volume celular (diminuído), quanto à irregularidade da membrana (aumentada) e ao conteúdo de DNA. Células que sofrem apoptose geralmente apresentam fragmentação internucleossomal de DNA, com saída de fragmentos do núcleo. Com a fragmentação do núcleo, o conteúdo total de DNA por célula progressivamente diminui, à medida que o processo apoptótico evolui. Além disso, o método utilizado refere-se às células tratadas com detergente, de modo a romper seletivamente a membrana externa, liberando os fragmentos nucleares, sendo cada um destes registrado pelo equipamento como um evento. O índice de

células com fragmentação de DNA foi obtido através do histograma que apresenta a fluorescência de 10.000 eventos.

Os resultados da análise em citômetro de fluxo podem ser expressos de diversas formas, conforme a combinação das variáveis estudadas. Uma possibilidade é o histograma, que como ordenada apresenta a porcentagem de células com determinado grau de fluorescência e, na abcissa, a quantidade de fluorescência emitida pelas células, indicativo do conteúdo de DNA. Numa população normal de células em proliferação, grande parte dessas contêm uma quantidade de DNA correspondente a um número $2n$ de cromossomos (46 em humanos, células nas fases G0-G1 do ciclo celular, indicadas no histograma como M2). Estas populações estão representadas no histograma, com seu pico próximo a 10^3 . Entre estes picos estão as células em duplicação do seu DNA (fase S e M2 no gráfico). A população de células à esquerda de G0-G1 estão com fragmentação de DNA e possivelmente contêm menos de $2n$ cromossomos (M1).

Outra maneira de analisar os resultados de fragmentação no citômetro de fluxo é através de gráficos de dispersão. Estes gráficos são compostos, na ordenada, por uma medida de dispersão de luz, estando diretamente relacionada à granulosidade celular; quanto maior a dispersão, menor a granulosidade. Na abcissa, avalia-se a medida do volume celular. Células normais, sem estarem em apoptose, apresentam determinado volume e granulosidade, sendo que, as células apoptóticas apresentam volume reduzido e aumento da granulosidade.

As figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam os resultados do processo de fragmentação ocorrido nas células IEC-6, obtidos através do citômetro de fluxo (FACS). O colesterol causou aumento significativo na proporção de DNA fragmentado nas células IEC-6 após 24 e 48 horas. Foi nítido que o efeito do colesterol torna-se mais pronunciado com o período mais longo de tratamento. Após 24 horas de cultivo a proporção de células com DNA fragmentado foi 3,8% no controle; 5,0% com 20 μM ; 9,7% com 40 μM e 20,8% com 80 μM de

colesterol. Nas células cultivadas por 48 horas, esta proporção foi de 18% no controle; 19,6% com 20 μM ; 53,5% 40 μM e 84,3% com 80 μM de colesterol.

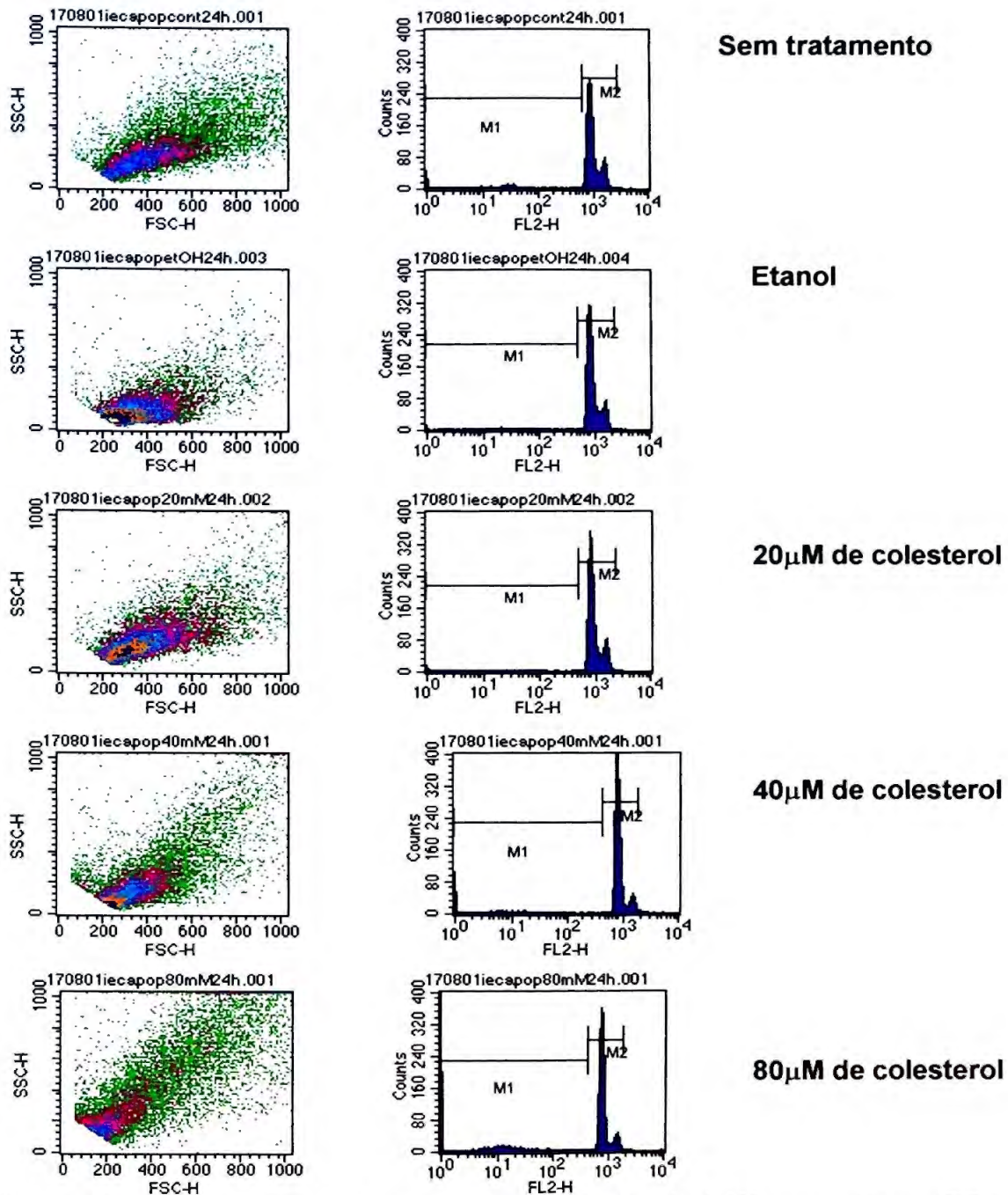


Figura 26- Análise da ocorrência de fragmentação de DNA nas células IEC-6 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol. Como controle, as células foram tratadas com 0,5% de etanol absoluto, o solvente do colesterol. M1 corresponde a porcentagem de células com fragmentação de DNA e M2 à de células sem fragmentação do DNA.

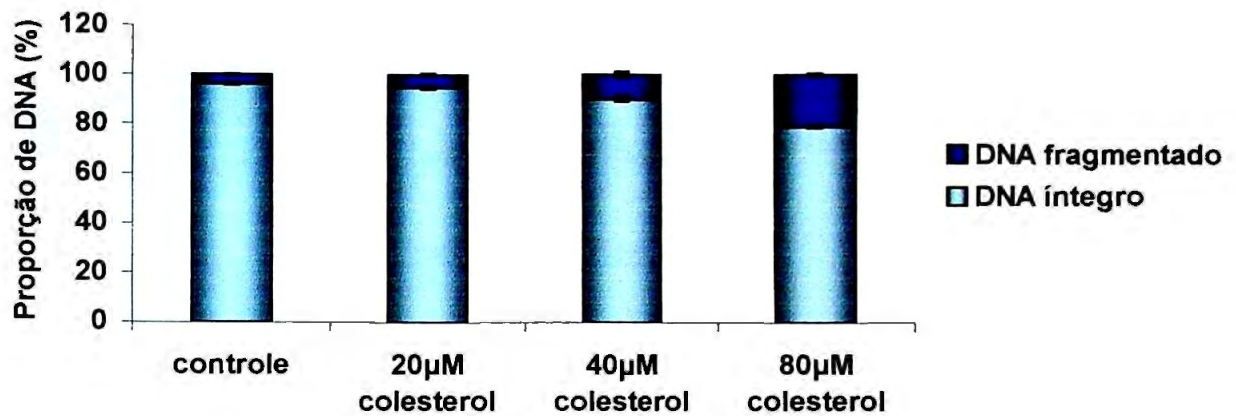


Figura 27 - Análise da ocorrência de fragmentação de DNA nas células IEC-6 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol ou etanol (controle). O gráfico representa a porcentagem de células com fragmentação de DNA analisadas através de citometria de fluxo (FACS). Os valores de DNA íntegro são maiores em relação aos do DNA fragmentado. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 5 experimentos feitos em duplicata.

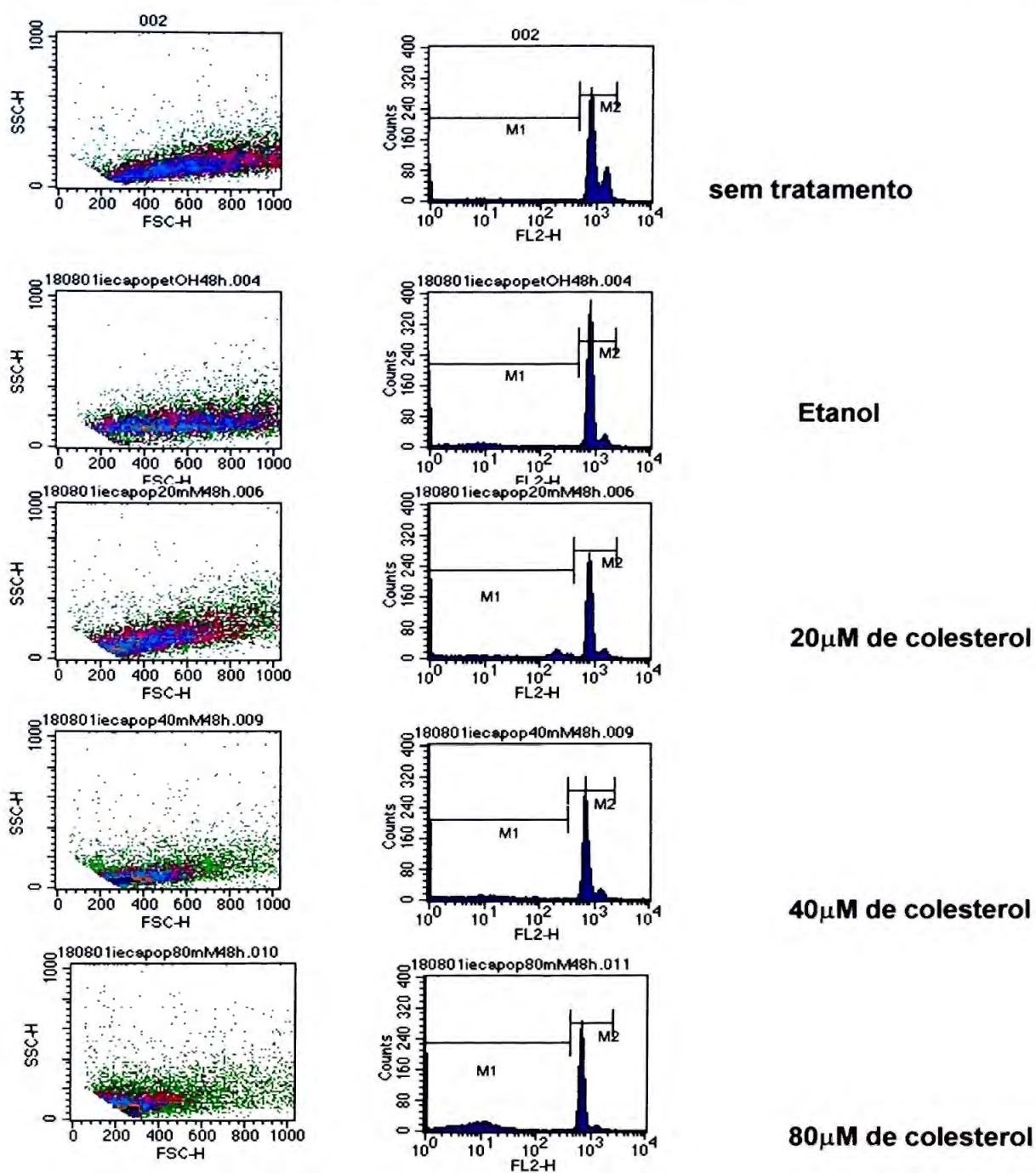


Figura 28- Análise da ocorrência de fragmentação de DNA nas células IEC-6 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol. Como controle as células foram tratadas com 0,5% de etanol absoluto, o solvente do colesterol. M1 corresponde a porcentagem de células com fragmentação e M2 à de células sem fragmentação de DNA.

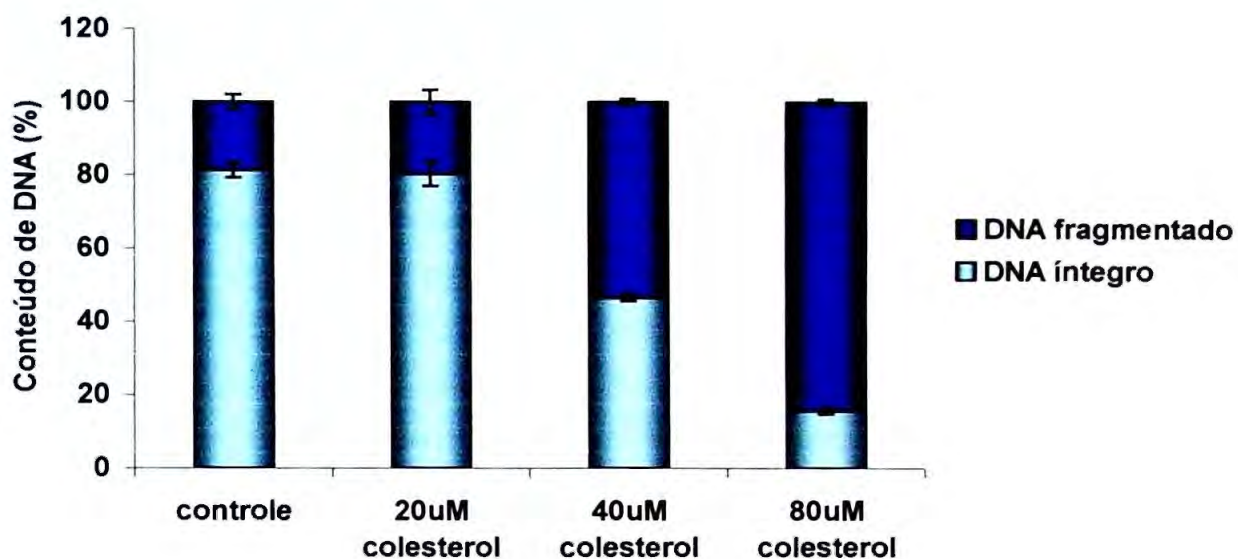


Figura 29 - Análise da ocorrência de fragmentação de DNA nas células IEC-6 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de colesterol ou etanol (controle). O gráfico representa a porcentagem de células com fragmentação de DNA analisadas através de citometria de fluxo (FACS). Os valores de DNA fragmentado são maiores em relação aos do DNA íntegro. Os resultados estão expressos como média \pm EPM de 5 experimentos feitos em duplicata.

4.14 Ensaio de condensação de cromatina

A coloração com Hoescht 33342 possibilita determinar a condensação da cromatina, que é uma das características mais evidentes da apoptose. Seu mecanismo ainda não é totalmente conhecido, mas pode estar associado à alterações no citoesqueleto nuclear e/ou à liberação da proteína mitocondrial AIF ("apoptosis inducing factor"). A condensação da cromatina ocorre concomitantemente com a diminuição do volume celular e a fragmentação do DNA, mas ainda não há associação dos eventos com os mecanismos bioquímicos. Na **Figura 30-A**, estão apresentados os resultados obtidos com as células IEC-6 cultivadas por 48 horas, tratadas com 20 μM , 40 μM ou 80 μM de colesterol e coradas com Hoescht 33342.

O Hoescht 33342 é um corante fluorescente excitado com luz ultravioleta, utilizado para visualizar o DNA celular, permitindo a caracterização da presença de corpos apoptóticos e de fragmentação da cromatina. Células viáveis, com cromatina dispersa, a marcação é sutil, tornando-se bastante pronunciada em células apoptóticas (Amarantes-Mendes *et al.* 1997). As células apoptóticas captam ativamente este corante, que então se liga ao DNA, permitindo sua visualização em azul. As células tratadas com 40 μM e 80 μM de colesterol, apresentaram cromatina condensada e os núcleos fragmentados característicos de células que estão sofrendo apoptose (**Figura 30-A**). Na **Figura 30-B** podemos observar que as células apresentam características de degeneração a partir do tratamento com 20 μM de colesterol e com 40 μM de colesterol praticamente todas as células estão em degeneração formando grumos. Com a perda de adesão, as células soltaram-se e morreram. Esta é uma observação notória pois este tipo celular cresce em monocamada com forte aderência a placa de cultivo.

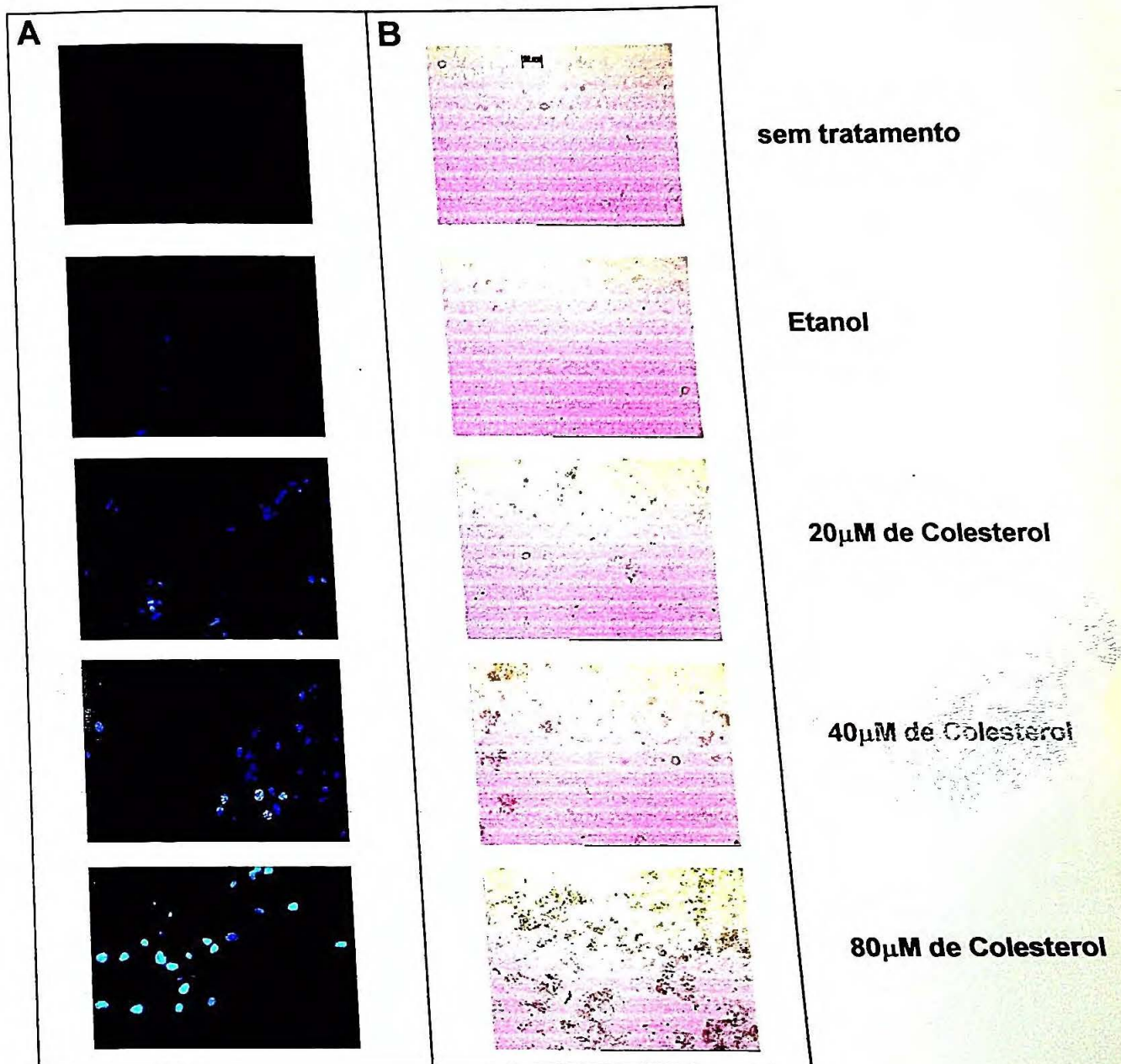


Figura 30 – Indução de condensação de cromatina por colesterol. Fotomicrografias de células IEC-6 tratadas com colesterol por 48 horas. Em **A** as células foram observadas em microscopia de fluorescência após coloração com Hoescht 33342. Notá-se que com 40 µM de colesterol as células IEC-6 apresentam cromatina condensada e fragmentação do núcleo típicos de apoptose. Em **B** as mesmas células observadas em microscopia de contraste de

fase. Verifica-se que as células apresentam características de degeneração a partir de 20 μM de colesterol e com 80 μM de colesterol praticamente todas as células estão em degeneração formando grumos. Aumento de 200 X.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A justificativa para o uso dos modelos experimentais foi: cultivo de enterócitos fetais: devido a contaminação freqüente de enterócitos de ratos adultos, a linhagem IEC-6 permite o uso de células isoladas para os experimentos com FACS e microscopia de fluorescência e os segmentos intestinais de ratos adultos fornecem a quantidade de amostras suficientes para se determinar o conteúdo de colesterol.

O colesterol é o precursor dos hormônios esteróides, sexuais e da adrenal, além de ser um constituinte essencial das membranas celulares. O colesterol da dieta é absorvido no intestino e incorporado aos quilomícrons formados no enterócito. Esses liberam ácidos graxos no tecido adiposo e os remanescentes dos quilomícrons levam o colesterol até o fígado. A maior parte desse esterol é incorporada em lipoproteínas no fígado e outra é metabolizada em sais biliares.

A concentração de LDL-colesterol no plasma, em humanos, está relacionada com a absorção de colesterol intestinal (Sehayek *et al.* 1998). A capacidade de absorção do colesterol da dieta é variável em humanos (Bosner *et al.* 1999), sendo muito provavelmente um processo saturável (Sehayek *et al.* 1998). Estudos feitos por Dubois *et al.* (1996) são sugestivos de que o colesterol da dieta não é preferencialmente ou rapidamente incorporado em quilomícrons. Dentro do enterócito, os mecanismos de secreção do colesterol absorvido para o lado basolateral não são completamente entendidos. A aparição tardia do colesterol da dieta em quilomícrons foi observada em humanos (Beaumier-Gallon *et al.* 2001).

O ponto de contato inicial entre as micelas de sais biliares contendo colesterol e as células que o absorvem, ocorre na superfície da borda em escova do enterócito, no jejuno (Wilson & Rudel, 1994). Neste sítio, o colesterol é seletivamente removido das micelas. Células de mamíferos como fígado e fibroblastos regulam a síntese de mevalonato porque o colesterol, o principal produto final do metabolismo do mevalonato, derivado do plasma (LDL), que entra nas células por endocitose, inibe a síntese de colesterol da própria célula

(Goldstein & Brown, 1990). Esse equilíbrio é alcançado através da regulação por retroalimentação negativa de pelo menos duas enzimas seqüenciais da síntese de mevalonato; a HMG - CoA redutase e HMG-CoA sintase e também dos receptores da LDL. Nossos achados confirmam a presença da HMG-CoA redutase tanto nos intestinos fetais como na linhagem IEC-6 tratadas ou não com 10% de SFB e colesterol. Contudo, o colesterol nas concentrações utilizadas, não regula a atividade da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais e nas células IEC-6.

O colesterol é também sintetizado no organismo. O fígado é o principal órgão para a produção do colesterol (Field *et al.* 1990). Recentemente, contudo, grande importância vem sendo dada ao intestino (Field *et al.* 2001). Como visto nesse estudo, o trato gastrointestinal sintetiza colesterol. No fígado, o colesterol exerce efeito de retroalimentação negativa (*feedback*), ao inibir a atividade da HMG-CoA redutase, enzima que converte a HMG-CoA em mevalonato (Goldstein & Brown, 1990). Assim, quando a ingestão de colesterol na dieta é elevada, a síntese hepática deste diminui e vice-versa. Entretanto, a compensação por retroalimentação negativa é incompleta, visto que uma dieta com baixo teor de colesterol e de gordura saturada resulta apenas em declínio moderado do colesterol circulante.

Field *et al.* (2001), ofereceram dieta controle e dietas ricas ou depletadas em colesterol para hamsters e, após 2 semanas, foram estimados os níveis de mRNA da HMG-COA redutase no duodeno, jejuno e íleo. A expressão da HMG-CoA redutase foi aumentada nos intestinos dos animais com dieta depletada de colesterol mas minimamente suprimida pela dieta enriquecida com colesterol. Esses achados estão de acordo com as observações do presente estudo. A adição de colesterol ao meio de cultivo causou apenas efeito moderado na expressão da HMG-CoA redutase.

A região intersticial da mucosa intestinal representa um microambiente capaz de interferir na função de enterócitos através do efeito de fatores de crescimento, citocinas, hormônios e lipídios. Assim, o meio contendo SFB

apresenta algumas das principais substâncias presentes no plasma intersticial, como, por exemplo, fatores de crescimento e lipoproteínas.

A composição do lúmen intestinal, depende, principalmente, dos componentes da dieta. A resposta da mucosa intestinal está relacionada com o tipo de nutriente. Dessa forma, uma refeição com grande quantidade de proteína estimula a secreção de enzimas proteolíticas, enquanto que os lipídios da dieta promovem a secreção da bile, esterase (que converte ésteres de colesterol em colesterol) e enzimas lipolíticas (Tso *et al.* 1995; Compassi *et al.* 1995). Nos experimentos com meio sem soro, a adição de colesterol não esterificado, simulou a administração deste nutriente pelo lúmen intestinal.

O crescimento das células epiteliais intestinais foi compatível com o período do ciclo celular do epitélio intestinal de ratos adultos, cuja duração *in vivo* é de aproximadamente 11 horas (Aldewachi *et al.* 1974). Em relação à curva de crescimento das células IEC-6, sua duplicação após 14 horas de cultivo está de acordo com a duração do ciclo celular descrito por Quaroni (1979). Ao serem retiradas do animal e colocadas em condições padronizadas de cultivo, as células do epitélio intestinal deixam de receber essa grande variedade de estímulos sistêmicos, mas, ainda apresentam características semelhantes às do tecido *in vivo*.

Comparando-se os enterócitos com as células IEC-6 observa-se que as primeiras, apesar de provenientes do intestino fetal, apresentam-se quase que completamente diferenciadas (Palanch, 2000). O segundo tipo celular provém de uma população indiferenciada da cripta das glândulas intestinais (Quaroni, 1979). Este fato pode estar relacionado com a não inibição da HMG-CoA redutase pelo colesterol.

O crescimento e a diferenciação celulares podem ser regulados pelo metabolismo lipídico (Mao & Hamosh, 1992; Brown & Goldstein, 1997). O colesterol é um dos componentes das membranas plasmática e subcelulares (Voelker, 1991) tendo importante papel na funcionalidade de enterócitos (Bose *et al.* 1998; Tso *et al.* 1995). O colesterol apresentou evidente efeito inibidor da

proliferação de enterócitos na presença e na ausência de soro fetal bovino (SFB). Efeito inibitório do colesterol na proliferação foi observado em linfócitos (Homem de Bittencourt & Curi, 1998) e células neoplásicas (Lescano-de -Souza & Curi, 1999).

Ficou evidente pelas curvas de crescimento que a presença de SFB reduz significativamente a proliferação dos enterócitos fetais. Esse dado é sugestivo de que fatores presentes no soro podem reduzir a proliferação dessas células. O microambiente sem soro, que reflete aquele do epitélio intestinal (lado luminal das células), favorece o crescimento dos enterócitos. Esses resultados levaram-nos a conduzir os experimentos sempre na presença e na ausência de SFB. O propósito era mimetizar os dois microambientes que influenciam a função do enterócito: lados luminal e basolateral. Assim, o efeito do colesterol foi sempre avaliado na presença e ausência de soro.

O crescimento dos enterócitos foi reduzido de modo marcante por colesterol e este efeito foi mais pronunciado na presença de soro fetal. Esses dados são sugestivos de que o colesterol da dieta regula a atividade proliferativa dos enterócitos no epitélio intestinal. Por sua vez, este esterol quando na corrente sangüínea apresenta efeito menos evidente. Permanece para ser investigado contudo se as lipoproteínas podem também regular a proliferação de enterócitos.

A redução da atividade proliferativa dos enterócitos, induzida pelo colesterol, foi acompanhada de alterações evidentes na morfologia das células. Os enterócitos cultivados em meio com soro e na presença de colesterol não se apresentaram aderidos à placa de cultivo e organizados em monocamada.

O colesterol regula sua própria síntese mas também a de ácidos graxos através de modificação na expressão de enzimas chave do metabolismo das vias da colesterogênese e da síntese *de novo* de ácidos graxos (Brown & Goldstein, 1997). Por sua vez, os ácidos graxos são importantes para a proliferação celular (Goldstein & Brown, 1990) pois além de fazer parte das moléculas de fosfolípidios e triacilgliceróis podem regular a expressão de

proteínas (Brown & Goldstein, 1999). Por esta razão, o efeito do colesterol sobre a composição de ácido graxos das células foi avaliado. As condições de cultivo por si só não afetaram a composição de ácidos graxos das células. O colesterol aumentou a proporção do ácido araquidônico dos enterócitos fetais na ausência de soro fetal bovino. Tal ácido graxo é essencial e é conhecido por ser convertido em eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, lipoxinas, entre outros), produtos oxidados com alta atividade biológica, importantes em uma série de sistemas fisiológicos, como renal, gastrointestinal, reprodutor e cardiovascular (Pompéia, 2000). Contudo, o efeito do esterol foi pronunciado nos enterócitos fetais cultivados na presença de soro. Houve aumento na proporção dos ácido graxos insaturados e redução dos ácidos graxos saturados. O mesmo não ocorreu em relação às células IEC-6, ou seja, a resposta dessa linhagem ao colesterol foi oposta a dos enterócitos. Esse resultado foi idêntico a expressão da HMG-CoA redutase. Os mecanismos envolvidos nesta resposta permanecem para ser esclarecidos mas as alterações observadas na composição de ácidos graxos podem estar relacionados com a redução na atividade proliferativa induzida pelo colesterol. Postula-se que mudanças na composição de ácidos graxos em enterócitos pode ter um papel importante na recuperação e proteção da mucosa intestinal após cirurgias, radiação e quimioterapia (Ruthig & Gill, 1999).

A citrato sintase converte acetil-CoA e oxaloacetato em citrato (Newsholme & Leech, 1983; Stanley & Newsholme, 1985). Este é descarboxilado ao longo do ciclo de Krebs fornecendo energia e/ou sai da mitocôndria para o citoplasma e fornece acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos, através da ATP-citrato liase (Newsholme & Leech, 1983; Curi & Newsholme, 1989). Sua regulação está relacionada ao caráter cíclico desta via, bem como a sua dupla função metabólica. Genericamente, o controle dessa via metabólica é assumido ser dependente da atividade da citrato sintase (Krebs, 1980). Os enterócitos utilizam glicose e glutamina ativamente (Windmueller & Spaeth, 1978). Esses metabólitos são importantes para a proliferação e diferenciação dessas células

(Salloum *et al.* 1990). O colesterol reduziu a atividade da citrato sintase que é uma enzima importante do ciclo de Krebs e portanto para a oxidação de glicose e glutamina e produção de ATP. Em vista disso, esse pode ser um dos mecanismos pelos quais o colesterol leva à redução da proliferação de enterócitos.

Em ratos, mais de 24% da síntese do colesterol total ocorre no intestino delgado e em outras espécies como coelhos, porquinho da Índia, hamster, esquilo, macaco e, possivelmente, o homem, a produção de colesterol no intestino pode ser quantitativamente mais importante (Spady & Dietschy, 1983). Em estudos *in vitro* e *in vivo* com ratos foi demonstrado que a localização anatômica da síntese desse esterol na mucosa é maior no íleo que no jejuno (Stange *et al.* 1983). Em 2001, Field *et al.* observaram que o íleo apresenta alta síntese de colesterol. Nossos resultados estão de acordo com essa proposição. Dos segmentos intestinais, o íleo foi o que apresentou maior conteúdo de colesterol seguido do jejuno, duodeno e intestino grosso. Por outro lado, quando avaliamos a expressão da HMG-CoA redutase nos segmentos intestinais, o íleo integro foi o que apresentou menor expressão dessa enzima. É possível portanto que o colesterol acumulado não seja proveniente de síntese *de novo*.

Na mucosa intestinal, a HMG-CoA redutase catalisa a redução do ácido mevalônico sob condições fisiológicas (Loirdighi *et al.* 1997). Estudar a expressão da HMG-CoA redutase é importante porque esta capacita o intestino para a síntese de colesterol necessário no crescimento e diferenciação celulares (Stange, 1988). Na mucosa intestinal de ratos, a atividade da HMG-CoA redutase diminui após o nascimento e permanece baixa durante o período de amamentação (Little & Hahn, 1990; Sugano, 1980). O declínio da atividade da HMG-CoA redutase parece ser consequência da absorção exógena do colesterol através do leite materno (Arsenault & Ménard, 1985). Loirdighi *et al.* (1997) descreveram que a atividade da redutase ao longo do intestino fetal humano parece ser dependente do período de desenvolvimento. Da 10^a a 14^a semanas, a atividade é mais alta no segmento distal, semelhante nos três

segmentos nas 15^a a 17^a semanas e dominante na região proximal nas 18^a a 20^a semanas. Dietschy & Gamel (1971), descreveram síntese elevada de colesterol no íleo quando comparado ao duodeno e jejuno. Entretanto, Gebhard *et al* (1985) reportaram atividade equivalente da HMG-CoA redutase no jejuno e íleo, em humanos.

PPARs foram primeiramente identificados por Issemann e Green em 1990 e assim designados em virtude de serem receptores ativados por drogas que induzem a proliferação de peroxissomas (Issemann & Green, 1990). A proliferação de peroxissomas é uma resposta celular a uma variedade de compostos químicos e a certas condições fisiopatológicas, que envolvem mudanças drásticas na morfologia celular e atividades enzimáticas do peroxissoma. Três isoformas de PPARs foram identificadas PPAR α , β/δ e γ , codificadas por genes específicos e com padrão distinto de expressão em anfíbios, roedores e humanos (Schoonjans *et al.*1996a; Schoonjans *et al.*1996b). PPAR α é predominantemente expresso em hepatócitos, fibras musculares cardíacas, células do túbulo proximal renal, células endoteliais e enterócitos. O PPAR β , também chamado de PPAR δ ou receptor ativado por ácidos graxos (FAAR – “Fatty acid activated receptor”) em roedores, e receptor hormônio nuclear 1 (NUC1) em humanos, apresenta ampla distribuição nos tecidos e é freqüentemente mais expresso que PPAR α e γ . O PPAR γ é encontrado sob 3 isoformas (PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3) e apresenta uma distribuição mais restrita. A expressão do PPAR γ 1 foi detectada no intestino, coração, fígado e rins (Schoonjans *et al.*1996a). Isoformas dos PPARs são farmacologicamente distintas, apresentando ativação diferencial, apesar do alto grau de conservação dos domínios ligantes. Esses ligantes por sua vez podem ser: naturais (endógenos) como são os AG e derivados, ou sintéticos, como os proliferadores de peroxissoma, drogas antiinflamatórias, hipolipemiantes e anti-diabéticas (Wilson *et al.* 1996). Entre os grupos dos ligantes, os fibratos (WY 14643, clofibrato, fenofibrato e outros) que são drogas hipolipidemiantes, ativam preferencialmente PPAR α . As TZDs, compostos anti-diabéticos da classe das

tiazolidinedionas, são seletivos para o PPAR γ com alta afinidade pelo receptor (Wilson *et al.* 1996). Os tratamentos dos intestinos fetais com WY 14643 e ciglitizone não ativaram a expressão da HMG-CoA redutase.

A atividade do PPAR γ é mediada por ácidos graxos, tais como: ácido araquidônico, ácido linoléico, ácido oléico, ácido docosa-hexaenóico e ácido eicosapentaenóico (Mukherjee *et al.* 1994). O PPAR γ controla a expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico, na diferenciação de adipócitos e das células do intestino delgado (Huin *et al.* 2001). Segundo Huin *et al.* (2001), o PPAR γ é expresso ao longo das criptas e vilos, regiões de proliferação e diferenciação celulares o que sugere-se um importante papel desse receptor no trato digestivo humano. Ainda é difícil precisar o papel do PPAR γ nas células intestinais uma vez que os subtipos de PPARs exibem diferentes padrões de expressão em relação à morfogênese do trato digestivo (Ricote & Glass, 2001). Por outro lado, verificamos que a expressão do PPAR γ ocorre nos intestinos fetais de ratos. A expressão dessa proteína mostrou-se regulada de modo significativo pelo colesterol e por fatores do SFB. Assim, nos intestinos, o colesterol parece ter efeito menos importante sobre a sua própria síntese e mais relevante sobre o fator de transcrição ativado por ácidos graxos, especialmente quando esses foram tratados com maiores concentrações de colesterol na presença de SFB.

A mucosa do intestino delgado é classificada como um sistema orgânico cujo epitélio é renovado a cada 2-3 dias (Tutton, 1973). A regulação do crescimento das células epiteliais é altamente complexo e controlado por vários fatores, incluindo àqueles de ação direta tais como nutrientes, perda celular e estimuladores como as poliaminas, e àqueles de ação indireta como hormônios gastrointestinais (gastrina, colecistoquinina, secretina) e peptídios (somatostatina, enteroglucagon) (Jonhson & Mc Cormack, 1994). O controle da proliferação celular por poliaminas e ornitina descarboxilase (ODC) é um processo importante de renovação da mucosa. Enquanto a regulação intestinal, crescimento e proliferação são extensivamente estudados, o controle da morte

celular intestinal, é pouco conhecido (Iwakiri *et al.* 2001). Para preservar o estado fisiológico, o epitélio intestinal mantém estável a renovação de enterócitos. A alimentação estimula o crescimento das células epiteliais intestinais via indução da atividade da ornitina descarboxilase (ODC) da mucosa (Tabata & Jonhson, 1986). Iwaki *et al.* 2001 demonstraram que o jejum estimula a morte celular intestinal apical via ativação de endonuclease e subsequente descamação das células apoptóticas. Nessa condição, ocorre fragmentação do DNA das células da mucosa e geração de fragmentos de 200 pb típicos de células em apoptose. É significativo que a morte celular inicie durante o jejum, período em que o crescimento e a proliferação celulares estão diminuídos.

Os resultados obtidos através da análise de citometria de fluxo são indicativos de que as diferentes concentrações de colesterol não provocam perda de integridade de membranas das células estudadas, durante o período de 24 horas, portanto, não é causa de necrose. Por outro lado, o colesterol parece induzir apoptose nas células IEC-6. Essa afirmação está baseada na análise de fragmentação de DNA e nas alterações morfológicas observadas.

A fragmentação do DNA, avaliada nas células IEC-6 durante o período de 24 e de 48 horas através do citômetro de fluxo, ocorreu em uma proporção significativamente maior quando essas foram cultivadas por período mais longo. Esses resultados indicam que nessas células o efeito do colesterol foi mais pronunciado após um período maior de cultivo e na concentração de 80 μM . O processo apoptótico observado foi confirmado pela utilização do corante Hoescht 33342. A apoptose nessas células foi caracterizada morfológicamente pela diminuição dos volumes celular e nuclear, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e presença de vacúolos (**Figura 30-A**). Na concentração de 40 μM de colesterol, a fragmentação de DNA foi bastante evidente, enquanto que na concentração maior (80 μM de colesterol), as células não apresentaram nem mesmo adesão à superfície. Fica evidente, dessa forma, que o colesterol regula a proliferação dos enterócitos pelo menos parcialmente pela indução de apoptose.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Face as proposições estabelecidas e de acordo com a metodologia empregada, conclui-se que:
- 1. O colesterol causa redução do crescimento de enterócitos fetais Este efeito é mais pronunciado na presença de soro que mimetiza o lado basolateral.
- 2. Os segmentos intestinais apresentam conteúdo significativo de colesterol e a via de síntese *de novo* está ativa conforme os dados de expressão da HMG-CoA redutase.
- 3. O colesterol não inibe a expressão da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais mas aumenta a expressão de PPAR γ e portanto pode modular o efeito de ativadores desse receptor como os ácidos graxos. Por outro lado, ativadores de PPAR α e PPAR γ não são efetivos em alterar a expressão da HMG-CoA redutase e portanto a síntese *de novo* do colesterol.
- 4. A redução da proliferação de enterócitos induzida pelo colesterol deve ser o resultado do efeito deste sobre o metabolismo (indicado pela atividade da citrato sintase), alteração da composição de ácidos graxos, mas provavelmente de modo mais importante devido à indução de apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1-ABUSHUFA, R., REED, P., WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. *Clin. Chem.*, Washington, v.40, p.1707-1712,1994.
- 2-AI-DEWACHI, H.S., WRIGHT, N.A., APPIETON, D.R., WATSON, A.J. The cell cycle time in the rat jejunal mucosa. *Cell. Tissue Kinet.*, Oxford, v.7, p.587-594,1974.
- 3-ALP, P.R., NEWSHOLME, E.A., ZAMMI, V.A. Activities of citrate syntase and NAD⁺ - linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, London, v.154, p.689-700,1976.
- 4-AMARANTES-MENDES, G.P., BOSSY-WESTZED, E., BRUNNER, T., GREEN, D.R. Apoptosis assays. In: Spector, D.L., Goldman, L. & Leinwand, (eds). *Cell: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor, p.15.1-24,1997.
- 5-ARSENAULT, P., MENARD, D. Development of enteropeptidase activity in mouse small intestine: influence of hormones. *Can. J. Physio. Pharmacol.*, Ottawa, v.63, n.5, p.472-475,1985.
- 6-BARNARD, J. A., WARWICK, G. J., GOLD, L. I. Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology*, Orlando, v.105, n.1, p.67-73,1993.
- 7-BEAUMIER-GALLON, G., DUBOIS, C., SENFT, M., VERGNES, M. F., PAULI, A. M., PORTUGAL, H., LAIRON, D. Cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.73, n.5, p.870-877, 2001.
- 8-BEYER, E. S. & JENSEN, L. N. Overestimation of the cholesterol content of eggs. *J. Agric. Food. Chem.*, Columbus, v.37, p.919,1989.
- 9-BOOTH, C., O'SHEA, J. A., POTTEN, C. S. Maintenance of functional stem cells isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp. Cell. Res.*, Orlando, v.249, p.359-366,1999.

* De acordo com as normas da ABNT NBR 6023/89

- 10-BOSE, S., CHAPIN, S. J., SEETHERAM, S., FEIX, J., MOSTOV, K.E., SEETHARAM, B., BREFELDIN, A. (BFA) inhibits basolateral membrane (BLM) delivery and dimerization of transcobalamin II receptor in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.273, p.1616316169, 1998.
 - 11-BOSNER, M. S., LANGE, L. G., STENSON, W. F., OSTLUND, R. E. JR. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.40, n.2, p.302-308, 1999.
 - 12-BOUDREAU, N., SYMPSON, C. J., WERB, Z., BISSELL, M. J. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, Washington, v.267, p.891-893, 1995.
 - 13-BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.7, n.72, p.248-254, 1976.
 - 14-BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, Washington, v.96, p.11041-11048, 1999.
 - 15-BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J. L. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.21, n.5, p.505-517, 1980.
 - 16-BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane – bound transcription factor. *Cell.*, Cambridge, v.89, p.331-340, 1997.
 - 17-BRUSCALUPI, G., LEONI, S., MANGIANTINI, M.T. MINIERI, M., SPAGNUOLO, S., TRENTALANCE, A. True uncoupling between cholesterol synthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in an early stage of liver regeneration. *Cell. Mol. Biol.*, Oxford, v.31, n.5, p. 365-368, 1985.
 - 18-CARR, B. R., MACDONALD, P.C., SIMPSON, E. R. The regulation of *de novo* synthesis of cholesterol in the human fetal adrenal gland by low density lipoprotein and adrenocorticotropin. *Endocrinology*, Tokyo, v.107, p.1000-1006, 1980.
 - 19-CHANG, J., MUSSER, J. H., MCGREGOR, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.36, n.15, p.2429-2436, 1987.
-

- 20-CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.162, n.1, p.156-159,1987.
- 21-CLARKE, C.F., FOGELMAN, A.M., EDWARDS, P.A. Transcriptional regulation of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in rat liver. *J. Biol. Chem.*, v.260, p.14363-14367, 1985.
- 22-COMPASSI S, WERDER M, BOFFELLI D, WEBER FE, HAUSER H, SCHULTHESS G. Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated. *Biochemistry.*, Columbus, v.34, n.50, p.16473-16482, 1995.
- 23-CORMACK, D. H. Fundamentos de Histologia. Guanabara-Koogan. Cap. 13, p.236, 1996.
- 24-CORNELL, R. B.; HORWITZ, A. F. Apparent coordination of the biosynthesis of lipids in cultured cells: its relationship to the regulation of the membrane sterol: phospholipid ratio and cell cycling. *J. Cell. Biol.*, New York, v.86, n.3, p.810-819, 1980.
- 25-CURI, R., NEWSHOLME, E.A. The effect of adenine nucleotides on the rate and fate of glutamine utilization by incubated mitochondria isolated from rat mesenteric lymphnodes. *Mol. Cell. Biochem.*, Dordrecht, v.86, n.1, p.71-76, 1989.
- 26-CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T.C., PIRES-DE-MELO, M., GARCIA, C., HOMEM-DE-BITTENCOURT, JUNIOR, P.I., GUIMARAES, A.R. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.32, n.1, p.15-21,1999.
- 27-DEMTERS, P. A., PATEL, S., HERNANDEZ, M., MONTENEGRO, J., LISNOCK, J. M., PIKOUNIS, B., STEINER, M., KIM, D., SPARROW, C., CHAO, YS., WRIGHT, S. D. A target for cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1486, p.243-252, 2000.
- 28-DIETSCHY, J.M. Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J Lipid Res. Bethesda*, v.9, n.3, p.297-309,1968.
- 29-DIETSCHY, J.M.; GAMEL, W.G. Cholesterol synthesis in the intestine of man: regional differences and control mechanisms. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.50, n.4, p.872-880,1971.

- 30-DIETSCHY, J. M., SIPERSTEIN, M. D. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.8, p.97-104,1967.
- 31-DIETSCHY, J.M., TURLEY, S.D., SPADY, D.K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.34, n.10, p.1637-1659, 1993.
- 32-DUBOIS, C., ARMAND, M., FERZOU, J., BEAUMIER, G., PORTUGAL, H., PAULI, A.M., BERNARD, P.M., BECUE, T., LAFONT, H., LAIROND. Postprandial appearance of dietary deuterated cholesterol in the chylomicron fraction and whole plasma in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.64, n.1, p.47-52, 1996.
- 33-FIELD, F. J., BORN, E., MURTHY, S., MATHUR, S. N. Regulation of sterol regulatory element-binding proteins in hamster intestine by changes in cholesterol flux. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.276, n.20, p.17576-17583, 2001.
- 34-FIELD, F. J., NATHAN, T. P., MATHUR, S. N. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterolog.*, Orlando, v.99, p.539-551, 1990.
- 35-FIELD, F. J., MATHUR, S. N., LaBRECQUE, D. R. Cholesterol metabolism in the regeneration liver of the rat. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.249, p.679-684, 1985.
- 36-FIOCCHI, C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and non immune cell interactions. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.273, p.769-775, 1997.
- 37-FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.226, p.497-503, 1957.
- 38-FRESHNEY, I. R. Cultured of animal cells. Wiley Liss, Jonh Wiley Sons, Inc., 1994.
- 39-FUKAMACHI, H. Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J. Cell Sci.*, Cambridge, v.103, p.511-519,1992.
-

- 40-GEBHARD, R.L., STONE, B.G., PRIGGE, W.F. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in the human gastrointestinal tract. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.26, n.1, p. 47-53, 1985.
- 41-GLICKMAN, R. M., GREEN, P. H. The intestine as a source of apolipoprotein A1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, Washington, v.74, n.6, p. 2569-2573, 1977.
- 42-GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.*, London, v.343, p.425-430, 1990.
- 43-GOLDSTEIN, J. L., HELGESON, J. A., BROWN, M. S. Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.254, n.12, p.5403-5409, 1979.
- 44-GREEN, D.R. REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, Washington, v.281, p.1309-1312, 1998.
- 45-GREEN, P. H., GLICKMAN, R. M., SAUDEK, C. D., BLUM, C. B., TALL, A. R. Human intestinal lipoproteins. Studies in chyluric subjects. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.64, n.1, p.233-242, 1979.
- 46-GRUNDY, S. M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Ann. Rev. Nutr.*, Palo Alto, v.3, p.71-96, 1983.
- 47-GUIMARÃES, A.R.P., KUGA, E., TORRES, R.P., COLQUHOUN, A., CURI, R., MANCINI FILHO, J. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acid-rich diets. *Biochemistry and Molecular Biology International*, New York, v.36, p.451-461, 1995.
- 48-HALL, P. A, COATES, P. J, ANSARI, B., HOPWOOD, D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell. Sci.*, Cambridge, v.107, p.3569-3577, 1994.
- 49-HAMILTON, R. J., HAMILTON, S. Lipid analysis – a practical approach. Oxford: University Press, 1992. p.13-64.
- 50-HELGERUD, P., SAAREM, K., NORUM, K. R. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human small intestine: its activity and some properties of the enzymic reaction. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.22, n.2, p.271-277, 1981.
- 51-HENNING, S. Postnatal development: coordination of feeding, digestion and metabolism. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.241, p.199-214, 1981.

- 52-HERMISTON, M. L.; GORDON, J. I. Organization of crypt-villus axis and evolution of its stem cell hierarchy during intestinal development. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.268, p.813-822, 1995.
- 53-HERNANDEZ, M., MONTENEGRO, J., STEINER, M., KIM, D., SPARROW, C., DETMERS, P. A., WRIGHT, S. D., CHAO, YS. Intestinal absorption of cholesterol is mediated by a saturable, inhibitable transporter. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1486, p.232-242, 2000.
- 54-HOMEM DE BITTENCOURT, Jr.P. I., CURI, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. *Biochem. Mol. Bio. Int.*, New York, v.44, p.347-362, 1998.
- 55-HORTON, J. D., SHIMOMURA, I., BROWN, M. S., HAMMER, R. E., GOLDSTEIN, J. L., SHIMANO, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.101, p.2331-2339, 1998.
- 56-HUA, X., WU, J., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., HOBBS, H. H. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11. 2 and 22q13. *Genomics*, Orlando, v.25, p.667-673, 1995.
- 57-HUIN, C., CORRIVEAU, L., BIANCHI, A., KELLER, J. M., COLLET, P., BOUILLAUD, P. K., DOMENJOUR, L., BÉCUWE, P., SCHOHN, H., MÉNARD, D., DAUÇA, M. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J. Histochem. Cytochem.*, Seattle, v.48, n.5, p.603-611, 2001.
- 58-INGEBRITSEN, T. S., PARKER, R. A., GIBSON, D. M. Regulation of liver hydroxymethylglutaryl-CoA reductase by a bicyclic phosphorylation system. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.256, n.3, p.1138-1144, 1981.
- 59-INNIS, M. A., GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SMINSKY, J.J., WHITE, T. J., eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, Academic Press, Cap. 1, p.3-12, 1990.
- 60-ISSEMAN, I., GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.*, London, v.347, p.645-650, 1990.

- 61-IWAKIRI, R., GOTOH, Y., NODA, T., SUGIHARA, H., FUJIMOTO, K., FUSELER, J., AW, T. Y. Programmed cell death in rat intestine: effect of feeding and fasting. *Scand. J. Gastroenterol.*, Oslo, v.36, p.39-47, 2001.
- 62-JOHNSON, L. R., McCORMACK, S. A. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. In: JOHNSON, L. R., ALPERS, D. H., CHRISTENSEN, J., JACOBSON, E. D., WALSH, J. H. *Physiology of the gastrointestinal tract*. v. 1, 3rd, New York: Raven Press, p.611-641, 1994.
- 63-KANEKO, I., HAZAMA-SHIMADA, Y., ENDO, A. Inhibitory effects on lipid metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. *Eur. J. Biochem.*, Oxford, v.87, n.2, p.313-321, 1978.
- 64-KERR, J. F., WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, London, v.26, n.4, p.239-257, 1972.
- 65-KHAN, S.A. & MOULTON, B.C. Regulation of 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in rat uterine tissues. *J. Steroid. Biochem.*, Oxford, v.35, n.6, p.701-704, 1990.
- 66-KRAMER, W., GLOMBIK, H., PETRY, S., HEUER, H., SCHÄFER, H. L., WENDLER, W., CORSIERO, D., GIRBIG, F., WEYLAND, C. Identification of binding proteins for cholesterol absorption inhibitors as components of the intestinal cholesterol transporter. *FEBS Letters*, Amsterdam, v.487, p.293-297, 2000.
- 67-KREBS, H.A. Glutamine metabolism in the animal body. In *Glutamine metabolism, Enzymology and Regulation*, New York, Academic Press, p. 319-329, 1980.
- 68-LESCANO-DE-SOUZA JR., A., CURI, R. Cholesterol inhibits glutamine metabolism in LLC WRC256 tumor cells but does not affect it in lymphocytes: possible implications for tumour cell proliferation. *Cell. Biochem. Funct.*, Chichester, v.17, p.223-228, 1999.
- 69-LEVY, E. MÉNARD, D. Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut. *Microscopy Research and Technique*, New York, v.49, p.363-373, 2000.
- 70-LINDSEY, C.A. WILSON, J.D. Evidence for a contribution by the intestinal wall to the serum cholesterol in the rat. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.6, p.173-181, 1965.

- 71-LITTLE, M.T., HAHN, P. Diet and metabolic development. *FASEB J.*, Bethesda, v.4, n.9, p.2605-2611, 1990.
- 72-LOIRDIGHI, N., MENARD, D., DELVIN, E., LEVY, E. Ontogeny and location of HMG-CoA reductase, ACAT, and MGAT in human small intestine. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.273, p.62-67, 1997.
- 73-LUNDQVIST, C., BARANOV, V., HAMMARSTRÖM, S., ATHLIN, L., HAMMARSTRÖM, M. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T.cell maturation in the human gut epithelium. *Int.Immunol.*, Oxford, v.7, n.9, p.1473-1487, 1996.
- 74-LUTTON, C. The role of the digestive tract in cholesterol metabolism. *Digestion*, Basel, v.14, n. 4, p. 342-356, 1976.
- 75-MACDONALD, T. T., BAJAJ-ELLIOTT, M., PENDER, S. L. F. T. cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunology Today*, Cambridge, v.20, p.505-510, 1999.
- 76-MAGANA, M. M., OSBORNE, T. F. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.271, p.32689-32694, 1996.
- 77-MALTESE, W. A., DEFENDINI, R., GREEN, R. A., SHERIDAN, K. M., DONLEY, D. K. Suppression of murine neuroblastoma growth *in vivo* by mevilonin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.76, p.1748-1754, 1985.
- 78-MAO, J.; HAMOSH, M. Postnatal development of plasma-lipid-clearing enzymes (lipoprotein lipase, hepatic lipase and lecithin: cholesterol acyl transferase) and lipid profiles in suckling rats. *Biol. Neonate.*, Basel, v.62, p.1-9, 1992.
- 79-MARTIN, K., KJRKWOOD, T. B. L., POTTEN, C.S. Age changes in stem cells of murine small intestinal crypts. *Exp. Cell. Res.*, Orlando, v.241, p.316-323, 1998.
- 80-MOWAT, A.M. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol. Today*, Cambridge, v.8, n.3, p.93-98, 1987.
- 81-MUKHERJEE, R., JOW, L., NOONAN, D., McDONNELL, D. P. Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, Oxford, v.51, p.157-166, 1994.

- 82-MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, New York, v.155, p.335-350, 1987.
- 83-NEPTUNE, E. M. Respiration and oxidation of various substrates by ileum in vitro. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.209, p.329-233, 1965.
- 84-NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. In: Biochemistry for the medical sciences. New York, John Wiley & Sons, p.951, 1983.
- 85-NEWSHOLME, E. A, CRABTREE, B., ARDAWI, M. S. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Quart. J. Exp. Physiol.*, Cambridge, v.70, p.473-489, 1995.
- 86-NICOLETTI, I., MAGLIOVATI, G., PAGLIACCI, M. C., GRIGNANI, F., RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.139, p.271-279, 1991.
- 87-NISHIYAMA-NARUKE, A., DE SOUSA, J. A. A., CARNELÓS FILHO, M., CURI, R. HPLC determination of underivatized fatty acid saponified at low temperature analysis of fatty acids in oils and tissues. *Anal. Lett.*, New York, v.31: p.2565-2576, 1998.
- 88-OCKNER, R.K., HUGHES, F.B., ISSELBACHER, K. J. Very low density lipoproteins in intestinal lymph: origin, composition, and role in lipid transport in the fasting state. *J. Clin. Invest.*, New York, v.48, p. 2079-2088, 1969.
- 89-OGRA, P. L., STROBER, W., MESTECKY, J., McGHEE, J. R., LAMM, M. E., BIENENSTOCK, J. Handbook of Mucosal Immunology. Academic Press, Inc., p.766, 1994.
- 90-OKINE, E.K., GLIMM, D.R., THOMPSON, J.R., KENNELLY, J.J. Influence of stage of lactation on glucose and glutamine metabolism in isolated enterocytes from dairy cattle. *Metabolism.*, Rome, v.44, n.3, p.325-331, 1995.
- 91-OSBORNE, T. F. Transcriptional control mechanisms in the regulation of cholesterol balance. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, New York, v.5, p.317-335, 1995.
- 92-PALANCH, A. C.; ALVARES, E. P. Feeding manipulation elicits different proliferative responses in the gastrointestinal tract of suckling and weanling rats. *Bra. J.*, Ribeirão Preto, v.31, n.4, p.453-592, 1998.
-

- 93-PALANCH, A. C. Interação de enterócitos com linfócitos e macrófagos através da transferência de colesterol., (Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) São Paulo, p.130, 2000.
- 94-PELCZAR Jr, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R., EDWARDS, D. D., PELCZAR, M. F. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2 ed, São Paulo: Makron Books, p.517, 1997.
- 95-POLZAR, B., ZANOTTI, S., STEPHAN, H., RAUCH, F., PEITSCH, M.C., IRMLER, M., TSCHOPP, J., MANNHERZ, H. G. Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eu.r J. Cell. Biol.*, New York, v.64, n.1, p. 200-210, 1994.
- 96-POMPÉIA, C. Toxicidade do ácido araquidônico em leucócitos, (tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) São Paulo, p.168, 2000.
- 97-POTTEN, C. S. LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.*, Berlin, v.110, n.4, p.1001-1020, 1990.
- 98-POTTEN, C. S. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.273, p.253-257, 1997.
- 99-POTTEN, C. S. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev.*, Dordrecht, v.11, n.2, p.179-195, 1992.
- 100-POTTEN, C. S., MORRIS, R. J. Epithelial stem cell in vivo. *J. Cell. Sci.*, Cambridge, Suppl.,10, p.45-62, 1988.
- 101-POTTEN, C. S., O'SHEA, J. A., FARRELL, C. L., REX, K., BOOTH, C. The effects of repeated doses of keratinocyte growth factor on cell proliferation in the cellular hierarchy of the crypts of the murine small intestine. *Cell. Growth. Differ.*, Philadelphia, v.12, n.5, p.265-275, 2001.
- 102-POTTEN, C.S., OWEN, G., HEWITT, D., CHADWICK, C.A., HENDRY, H., LORD, B.I., WOOLFORD, L.B. Stimulation and inhibition of proliferation in the small intestinal crypts of the mouse after in vivo administration of growth factors. *Gut*, London, v.36, n.6, p.864-873, 1995.

- 103-POUSSIER, P., JULIUS, M. Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Immunol.*, Palo Alto, v.12 p.521-553, 1994.
- 104-PROBSTMEIER, R., MARTINI, R., SCHACHNER, M. Expression of J1/tenascin in the crypt-villus unit of adult mouse small intestine: implications for its role in epithelial cell shedding. *Development.*, Berlin, v.109, n.2, p.313-321, 1990.
- 105-PROKSCH, E., ELIAS, P. M., FEINGOLD, K. R. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in murine epidermis. Modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.85, n.3, p.874-882, 1990.
- 106-QUARONI, A., WANDS, J., TRELSTAD, R.L., ISSELBACHER, K.J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell. Biol.*, New York, v.80, n.2, p.248-265, 1979.
- 107-RACHMILEWITZ, D., ALBERS, J. J., SAUNDERS, D. R., FAINARU, M. Apoprotein synthesis by human duodenojejunal mucosa. *Gastroenterology*. Orlando, v.75, n.4, p.677-682, 1978.
- 108-RAFF, M. C., BARRES, B. A., BURNE, J. F., COLES, H. S., ISHIZAKI, Y., JACOBSON, M. D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, Washington, v.262, p.695-700, 1993.
- 109-RICOTE, M., GLASS, C. New roles for PPARs in cholesterol homeostasis. *Trends. Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v.22 n.9, 2001.
- 110-RODWELL, V. W., NORDSTROM, J. L., MITSCHELEN, J. J. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid. Res.*, San Diego, v.14, n.1, p.74, 1976.
- 111-ROTH, K. A., HERTZ, J.M., GORDON, J. I. Mapping enteroendocrine cell populations in transgenic mice reveals an unexpected degree of complexity in cellular differentiation within the gastrointestinal tract. *J. Cell. Biol.*, New York, v.110, p.1791-1801, 1990.
- 112-RUOSLAHTI, E. REED, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.*, Cambridge, v.77, n.4, p.477-478, 1994.
- 113-RUTHIG, D.J. MECKLING-GILL, K.A. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J. Nutr.*, Bethesda, v.129, n10, p.1791-1798, 1999.

- 114-SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.
- 115-SALLOUM, R. M., SOUBA, W. W., FERNANDEZ, A. Dietary modulation of small intestinal glutamine transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats. *J. Surg. Res.*, Orlando, v.48, p.635-638, 1990.
- 116-SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning. 2. Ed. Cold Spring Harbor, Plainview, v.3, p.18.2-18.75, 1989.
- 117-SAVILL, J. FADOK, V. HENSON, P. HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, Amsterdam, v.14, p.131-136, 1993.
- 118-SCHOONJANS, K., STAELS, B., AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.37, p.907-925, 1996.
- 119-SCHOONJANS, K., STAELS, B., AUWERX, J. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.1302, p.93-109, 1996.
- 120-SEHAYEK, E., NATH, C., HEINEMANN, T., MCGEE, M., SEIDMAN, C.E., SAMUEL, P., BRESLOW, J.L. U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.39, n.12, p.2415-2422, 1998.
- 121-SEWELL, P. High-performance liquid chromatography. In: *Lipid analysis: A practical approach*, Ed IRL Press, New York, p.157-203, 1982.
- 122-SHENG, Z., OTANI, H., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.92, p.935-938, 1995.
- 123-SHIBAHARA, T., SATO, N., WAGURI, S., IWANAGA, T., NAKAHARA, A., FUKUTOMI, H., UCHIYAMA, Y. The fate of effect epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch. Histol. Cytol.*, Niigata. v.58, n.2, p.205-219, 1995.

- 124-SHIMANO, H., HORTON, J. D., SHIMOMURA, I., HAMMER, R. E., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.*, Arbor, v.99: p.846-854, 1997.
- 125-SIPERSTEIN, M. D. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v.25, p.1462-1468, 1984.
- 126-SOUBA, W. W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.4, p.2-9, 1993.
- 127-SOUBA, W. W., HERSKOWITZ, K., SALLOUM, R. M., CHEN, M. K., AUSTGEN, T. R. Gut glutamine metabolism. *J. Parenter. Ent. Nutr.*, Washington, v.14, n.4, p. 45S-50S, 1990.
- 128-SPADY, D. K. & DIETSCHY, J. M. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel, monkey, guinea pig, rabbit, hamster and rat. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v 24, p.303-315, 1983.
- 129-SPADY, D. K., BILHEIMER, D. W., DIETSCHY, J. M. Rates of receptor-dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Washington, v.80, p.3499-3503, 1983.
- 130-STANGE, E. F., PRECLIK, G., SCHNEIDER, A., REIMANN, F. The role of enterocyte cholesterol metabolism in intestinal cell growth and differentiation. *Scand. J. Gastroenterol.*, Oslo, v.23, n.1 51, p.79-85, 1988.
- 131-STANGE, E.F., SUCKLING, K.E., DIETSCHY, J.M. Synthesis and coenzyme A-dependent esterification of cholesterol in rat intestinal epithelium. Differences in cellular localization and mechanisms of regulation. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.258, n.21, p.12868-12875, 1983.
- 132-STANLEY, J.C. & NEWSHOLME, E.A. The effect of dietary guar gum on the activities of some key enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in mouse liver. *Br. J. Nutr.*, Bethesda, v.53, n.2, p.215-222, 1985.
- 133-SUGANO, M., IDE, T., OKAMATSU, H., FUJISAKI, Y., TAKAHARA, H. Dietary modification of the distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and sterol synthesizing activities in the rat small intestine. *J. Nutrition.*, Bethesda, v.110, p.360-370, 1980.
-

- 134-SYLVEN, C., NORDSTROM, C. The site of absorption of cholesterol and sitosterol in the rat small intestine. *Scand. J. Gastroenterol.*, Oslo, v.5, p.57-63,1970.
- 135- TABATA, K. JOHNSON, L.R. Mechanism of induction of mucosal ornithine decarboxylase by food. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.251, p.370-374, 1986.
- 136-TRENTALANCE, A., LEONI, S., MANGIANTINI, M.T., SPAGNUOLO, S., FEINGOLD, K., HUGHES-FULFORD, M., SIPERSTEIN, M., COOPER, A. D., ERICKSON, S. K. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol synthesis and esterification during the first cell cycle of liver regeneration. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v.794, n.1, p.142-151, 1984.
- 137- TSO, P., KARLSTAD, M.D., BISTRAIAN, B.R., DEMICHELE, S.J. Intestinal digestion, absorption, and transport of structured triglycerides and cholesterol in rats. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.268, p.568-577, 1995.
- 138-TSO, P. Intestinal lipid absorption. In: JOHNSON, L.R. (ed). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, 3.Ed., v.2, p.1867-1907, 1994.
- 139-TUTTON, P. J. M. Variations in crypt cell cycle time and mitotic time in the small intestine of the rat. *Virchows Arch.*, Heidelberg, v.13, p.68-78, 1973.
- 140-VOELKER, D. R. Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. *Microbiological Reviews.*, Washington, v.55, p.543-560, 1991.
- 141-WANG, X., SATO, R., BROWN, M.S., HUA, X., GOLDSTEIN, J. L. SREBP-1, a membrane bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.*, Cambridge, v.77, p.53-62, 1994.
- 142-WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology Today*, Cambridge, v.18, n.7, p.335-341, 1997.
- 143-WILKIN, D.J., KUTSUNAI, S.Y., EDWARDS, P.A. Isolation and sequence of the human farnesyl pyrophosphate synthetase cDNA. Coordinate regulation of the mRNAs for farnesyl pyrophosphate synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase by phorbol ester. *J.Biol.Chem.*, Bethesda, v.265, n.8, p.4607-4614, 1990.

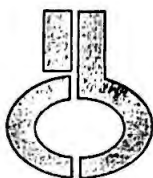
- 144-WILSON, M. D., RUDEL, L. L. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J. Lipid Res.* Bethesda, v.38: p.2173-2192, 1994.
- 145-WILSON, T. M., COBB, J. E., COWAN, D. J., WIETHE, R. W., CORREA, D. I., PRAKASH, S. R., BECK, K. D., MOORE, L. B., KLIEWER, S. A., LEHMANN, J. M. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.39: p.665-668, 1996.
- 146-WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v.253, n.1, p.69-76, 1978.
- 147-WINDMUELLER, H. G., SPAETH, A. E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.171, n.2, p.662-72, 1975.
- 148-WRIGHT, N. A. ALISON, M. The biology of epithelial cell populations. *Clarendon Press*, Oxford. Vols. I e II, p.1247, 1984.
- 149-WU, G, KNABE, D. A., YAN, W., FLYNN, N.E. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.268, p.334-342, 1995.
- 150-ZAR, J. H. Bioestistical analysis. 2nd ed., New Jersey, Prentice-Hall, 1994.
-

RESUMO

Investigou-se o efeito do colesterol em enterócitos fetais e na linhagem IEC-6. Para isso, analisou-se a composição dos ácidos graxos, a atividade da citrato sintase e a proliferação dessas células na presença de colesterol. A expressão da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais, células IEC-6 e em quatro segmentos intestinais de ratos adultos: duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso foi determinada por RT-PCR. Estudou-se a indução da fragmentação do DNA e condensação da cromatina na linhagem IEC-6 pelo colesterol, através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência utilizando o Hoescht 33342. Avaliou-se o efeito do colesterol na expressão da HMG-CoA redutase e PPAR γ . Também, o efeito de drogas ativadoras de PPAR γ e α na expressão da HMG-CoA redutase foi investigado em intestinos fetais. A redução da proliferação de enterócitos induzida por colesterol resulta do efeito deste sobre o metabolismo de glicose e glutamina (indicado pela atividade da citrato sintase), alteração da composição de ácidos graxos, mas provavelmente de modo mais importante pela ocorrência de apoptose. Os segmentos intestinais apresentam conteúdo significativo de colesterol e capacidade de síntese deste conforme indicado pela expressão da HMG-CoA redutase. O colesterol não inibe a expressão da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais mas aumenta a expressão de PPAR γ . Por outro lado, ativadores de PPAR γ e α não são efetivos em alterar a expressão da HMG-CoA redutase nos intestinos fetais. Esses resultados são indicativos de que o intestino é um importante órgão produtor de colesterol já na fase fetal. O colesterol da dieta é capaz de inibir a proliferação de enterócitos e induzir apoptose desses, sendo portanto um agente ativo no controle da função do epitélio intestinal.

ABSTRACT

The effect of cholesterol on metabolism of fetal enterocytes and IEC-6 cells was investigated. The composition of fatty acids, citrate synthase activity and proliferation of these cells were analysed in the presence of cholesterol in the medium. The expression of HMG-CoA reductase in fetal intestines, IEC-6 cells and in four intestinal segments of adult rats (duodenum, jejunum, ileum and large intestine) was determined by RT-PCR. The induction of DNA fragmentation and of condensation chromatin in IEC-6 cells by cholesterol was analysed by flow cytometry and optical microscope using 33342 Hoescht staining. The effect of cholesterol on the expression of HMG-CoA reductase and PPAR γ was also evaluated. Also, the effect of drugs that activate PPAR γ and α on the expression of HMG-CoA reductase was investigated in fetal intestines. The decrease of enterocytes proliferation induced by cholesterol resulted from its effect on glucose and glutamine metabolism (as indicated by the activity of citrate synthase), alteration of the composition of fatty acids, but probably in a more important manner by the induction of apoptosis. The intestinal segments showed significant amount of cholesterol and capacity for its synthesis as indicated by the expression of HMG-CoA reductase. Cholesterol did not inhibit the expression of HMG-CoA reductase in the fetal intestine but increased the expression of PPAR γ . On the other hand, activators of PPAR γ and α were not effective in causing alteration of HMG-CoA reductase expression in the fetal intestine. These results indicate that the intestine is an important organ for cholesterol production already from the fetal life. The dietary cholesterol is able to inhibit the proliferation of enterocytes by inducing apoptosis, being an active agent in the control, of the intestinal epithelium function.



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


Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 38130900 – telefax : (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 053/2000, sobre o projeto intitulado “*Efeito do Colesterol Sobre o Metabolismo e Função dos Enterócitos*” sob a responsabilidade Jussara Gazzola está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 03/08/2000

(We certify that the protocol nº 053/2000 about “*Cholesterol effect up on enterocytes function and metabolism*” with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 03/08/2000 meeting.)

São Paulo, 03 de agosto de 2000.



Prof. Dr. Hi-Sei Watanabe
Coordenador - CEEA



Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado
Secretário - CEEA