

VANESSA OYA

**IMUNIDADE CELULAR PARA O BCG NA DOENÇA
DE CROHN: efeito de proteínas de soro de leite
bovino enriquecido com TGF- β .**

Campinas

2010

VANESSA OYA

**IMUNIDADE CELULAR PARA O BCG NA DOENÇA
DE CROHN: efeito de proteínas de soro de leite
bovino enriquecido com TGF- β .**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Marluce dos Santos Vilela

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Oyli Oya, Vanessa
Imunidade celular para o BCG na Doença de Crohn: efeito de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β / Vanessa Oya. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Crohn, doença de. 2. Resposta imune. 3. BCG. 4. Suplementos dietéticos. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Cellular immunity to BCG in Crohn's Disease: effect of bovine milk proteins enriched with TGF- β

Keywords: • Crohn's disease
• Respose immune
• BCG
• Dietary supplements

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

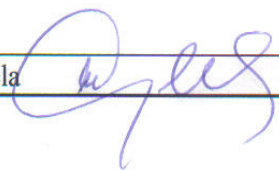
Profª. Drª. Maria Marluce dos Santos Vilela
Prof. Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos
Profª. Drª. Adriana Maria Alves de Tommaso

Data da defesa: 26-02-2010

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluno(a) Vanessa Oya

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Marluce dos Santos Vilela



Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Dewton de Moraes Vasconcelos	
Professor (a) Doutor (a) Adriana Maria Alves de Tommaso	

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/02/2010

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus amados pais, *Fumio* e *Shirley* e a minha amada avó *Lurdes*, pelo carinho, incentivo, apoio e amor incondicional fundamental para que eu concretizasse esta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu conseguisse concretizar essa etapa de minha vida. E por me fazer acreditar que é nas dificuldades enfrentadas, que aprendemos a ser uma pessoa melhor.

À minha orientadora Professora Marluce Vilela, agradeço pela confiança depositada desde o estágio, pela oportunidade, incentivo, paciência e pelos ensinamentos, tão úteis nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Marcos Nolasco, pela disponibilidade e auxílio nesses anos. E por sempre me receber muitíssimo bem na sua sala, durante as análises de proliferação e fenotipagem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por conceder minha bolsa de mestrado e o financiamento do projeto.

À Hilmar Cheese Company pela doação do suplemento alimentar.

Aos pacientes que participaram deste trabalho e seus acompanhantes, pela confiança que me concederam e por acreditarem que o suplemento (nem sempre tão gostoso) pudesse ser uma alternativa de tratamento e também por nunca reclamarem das diversas coletas de sangue realizadas no decorrer do trabalho. Sem a participação de vocês, esse trabalho não seria possível. E, finalmente, por tornarem um sonho em realidade!

À equipe do Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Gastrocentro da Unicamp: aos médicos Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono, Dr. João José Fagundes e a Dra. Raquel Franco Leal por me receberem muitíssimo bem e pela disponibilidade sempre que aparecia uma dificuldade e à enfermeira Catarina, pela disponibilidade e cooperação quanto às coletas de sangue.

Ao Professor Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela confiança e parceria nos projetos relacionados à proteína de soro de leite bovino.

À querida **amiga Yara Maria**, presente ao meu lado desde o início, sempre me incentivando e apoiando. Obrigada por me ensinar todas as técnicas desenvolvidas nesse trabalho, pelas correções, companhia, pelas conversas na sala de cultura e, acima de tudo, a amizade. Você foi um anjo que Deus colocou em minha vida!

À **amiga** Taís Mazzola, por toda a paciência que teve comigo durante o estágio, me ensinando cada técnica, pelas correções dos relatórios, do artigo de qualificação enfim, por toda ajuda durante o mestrado. Por estar do meu lado em momentos difíceis, sempre me mostrando o caminho da luz. Obrigada por tudo!

À Taciana Davanço, por estar comigo em todas as manhãs de ambulatório. Por dividir comigo, as alegrias e as tristezas durante o ensaio clínico.

Às queridas amigas e companheiras de muitas horas de laboratório e dos passeios ao shopping e à Padaria Alemã: **Vanessa Ramalho, Beatriz Abramczuk e Taciana Davanço**, obrigada pela ajuda, apoio e carinho. E acima de tudo pela amizade que foi construída durante esses anos!

Às minhas companheiras de ELISA: **Daniela Miotto e Fabiane La Flor Ziegler Sanches**, pela cooperação durante os experimentos e por dividirem comigo as emoções de um ELISA sem intercorrência e por entenderem o meu momento. E acima de tudo, a amizade que construímos durante todos os dias de trabalho (todos mesmo). *“E vamo bater placa, faca na bota.”*

À Ana Carolina Mary Diogo e Michele Vicentin, pela amizade durante esses anos.

À Simone Ferreira, Milton e Tathyane, obrigada por estarem sempre à disposição.

À enfermeira Silvana Dalgé, por todas as coletas de sangue realizadas

durante o trabalho e por sempre me receber com um sorriso no rosto.

Aos **meus amados pais Fumio e Shirley**, por todo carinho, apoio, incentivo e amor incondicional. Por sempre acreditarem no meu potencial e fazerem o impossível para que eu conseguisse alcançar todos os meus sonhos. Vocês são o meu exemplo de garra e perseverança. Agradeço todos os dias por fazerem a diferença na minha vida. Espero um dia poder retribuir tudo o que já fizeram por mim. Amo vocês e obrigada por tudo!

Aos **meus irmãos Leandro e Bruno**, por demonstrarem tanto orgulho. O que me fez sempre querer ser melhor!

Ao **Meu Amado Douglas**, por trilhar comigo esse caminho e os demais que ainda virão e por me amparar e me escutar em todos os momentos difíceis. Por tolerar todos os dias em que estava mal humorada, porque um paciente tinha desistido ou, simplesmente, porque a curva do ELISA não tenha ficado boa. Meu Amor, você é o meu porto seguro! Obrigada por fazer toda a diferença na minha vida! Amo você!

À **minha amada avó Lurdes** por todas as preces diárias, tão indispensáveis durante toda a minha vida e, principalmente, pelas orações em todas as apresentações durante o mestrado. A senhora é meu exemplo de fé e força. Obrigada por tudo! Te amo muito!

Ao **querido João** por todos esses anos ter sido a figura de avô materno na minha vida! Obrigada por sempre me tratar como se fosse sua neta.

A todos os meus familiares (**Araújo, Hermenegildo e Oya**) e a mais nova família que agora faço parte "**Britto**", pela torcida carinhosa e pelas orações. Por compreenderem a minha ausência e os motivos que me levaram a não estar presente em diversas reuniões e festas nos fins de semana durante esses dois anos.

A todos os meus amigos que, diretamente ou não, me incentivaram e contribuíram para esta jornada. **Muito Obrigada!**

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

(Martin Luther King)

	Pág.
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xlili
1- INTRODUÇÃO	47
1.1. Doença Inflamatória Intestinal.....	49
1.2. A Doença de Crohn.....	49
1.2.1. Epidemiologia.....	49
1.2.2. Etiologia e Patogênese.....	50
1.2.3. A genética e a DC.....	53
1.2.4. Características Clínicas.....	54
1.2.5. Tratamentos utilizados na DC.....	55
1.2.6. Terapia Biológica: Anti-TNF- α	57
1.3. Imunomodulação por meio da Proteína do Soro do Leite Bovino	59
1.3.1. Propriedades das proteínas do soro do leite bovino.....	59
1.4. Propriedades do TGF- β	62
2 – OBJETIVOS	65
2.1. Objetivo Geral.....	67
2.2. Objetivos Específicos.....	67
3 – MÉTODOS	69
3.1. Delineamento do Estudo.....	71
3.2. População.....	72
3.3. Suplemento Alimentar.....	74
3.4. Suplementação Alimentar.....	77
3.5. Avaliação Imunológica.....	77

3.5.1. Coleta das Amostras Biológicas.....	77
3.5.2. Fenotipagem dos Linfócitos T.....	78
3.5.3. Proliferação Linfocitária.....	79
3.5.4. Dosagem de Citocinas.....	82
3.6 Aspectos Éticos.....	84
3.7 Análise Estatística.....	84
4 – RESULTADOS.....	87
4.1. Caracterização da População.....	89
4.2. Fenotipagem dos Linfócitos T.....	91
4.3. Proliferação Linfocitária.....	91
4.4. Produção de Citocinas.....	103
4.5. Resumo dos Resultados.....	117
5 – DISCUSSÃO.....	121
6 – CONCLUSÕES.....	137
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
8 – ANEXOS.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS

6-MP	6-mercaptopurina
AZA	Azatioprina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BSA	Albumina Sérica Bovina
CARD15	Caspase Recruitment domain member 15
CD	Células Dendríticas
CEI	Células Epiteliais Intestinais
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
ELAM-1	Molécula de Adesão de Leucócitos Endoteliais 1
GMP	Glicomacropeptídeo
GSH	Glutathione
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus - 1
IADC	Índice de Atividade da Doença de Crohn
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN-γ	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
MAP	Mycobacterium avium subespécie paratuberculosis
MDP	Dipeptídeo Muramyl
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MTX	Metotrexate
NFκB	Fator Nuclear de Ativação κ B
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2
PHA	Fitohemaglutinina
RCU	Retocolite Ulcerativa
SCN₂	Tiocianato
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento beta
Th	T helper
TGI	Trato Gastrointestinal
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento Beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
Treg	Células T reguladoras

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: Composição centesimal do Concentrado de Proteínas de Soro de Leite Bovino enriquecido com TGF- β , fornecido ao Grupo de Intervenção Nutricional de pacientes com Doença de Crohn.....75

Tabela 2: Perfil de aminoácidos do Concentrado de Proteínas de Soro de Leite Bovino enriquecido com TGF- β , fornecido ao Grupo de Intervenção Nutricional de pacientes com Doença de Crohn.....75

Tabela 3: Características Clínicas Iniciais dos pacientes com Doença de Crohn.
.....90

Tabela 4: Percentual de linfócitos TCD3⁺ e suas subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺, no sangue periférico de pacientes com Doença de Crohn.....92

Tabela 5: Proliferação espontânea de linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ em células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com Doença de Crohn, nos grupos de Intervenção Nutricional, Comparação I, Comparação II e Controles Normais.....94

Tabela 6: Proliferação estimulada por BCG e PHA de linfoblastos TCD4⁺, TCD8⁺, TCR $\gamma\delta$ BCG em cultura de células mononucleares de sangue periférico dos pacientes com Doença de Crohn e do grupo Controles Normais.....102

Tabela 7: Concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, de pacientes com

Doença de Crohn e Controles Normais.....	104
--	-----

Tabela 8: Concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn e Controles Normais.....	106
--	-----

Tabela 9: Concentração de TGF- β 2 no soro e no plasma de pacientes com Doença de Crohn.....	113
---	-----

Tabela 10: Concentração de TGF- β 3 no soro e no plasma de pacientes com Doença de Crohn.....	115
--	-----

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Perfil Eletroforético de diversas Proteínas de Soro de Leite Bovino.....	76
Figura 2: Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da fenotipagem dos linfócitos T de sangue periférico dos pacientes com Doença de Crohn. Os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) (A) e após a seleção das células CD3+ (B), e, as subpopulações de linfócitos T CD4+ (C) e T CD8+ (D) foram avaliadas.....	78
Figura 3: Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da proliferação linfocitária de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (controle) e estimuladas por BCG e PHA dos pacientes com Doença de Crohn. Após a seleção das células CD3+ (A), os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) e, os linfócitos pequenos (resting) e linfoblastos foram separados (B). As subpopulações de linfócitos T (CD4+, CD8+ e TCR $\delta\gamma$ +) foram avaliadas nos linfoblastos (C, D).....	81
Figura 4: Percentual de linfócitos totais (A), TCD3 (B), TCD4 (C), TCD8 (D) em sangue de pacientes com Doença de Crohn, $\square$: intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), e $\diamond$: Comparação II (aza n=11).....	93
Figura 5: Proliferação linfocitária espontânea de cultura em células mononucleares, de pacientes com Doença de Crohn, $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), $\diamond$: Comparação II (aza n= 1) e $\bullet$: Controle normal (n=21).....	95

Figura 6: Proliferação linfocitária espontânea em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11 pacientes).....96

Figura 7: Proliferação linfocitária estimulada por BCG em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11) e ●: Controle Normal (n=21).....98

Figura 8: Proliferação linfocitária estimulada por BCG em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento, n=22), +: Comparação I (aza+anti-TNF- α , n=10) e ◇: grupo Comparação II (aza, n=11).....99

Figura 9: Proliferação linfocitária estimulada por PHA em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n = 22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11) e ●: Controle Normal (n=21).....100

Figura 10: Proliferação linfocitária estimulada por PHA em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11).....101

Figura 11: Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11), ●: Controles normais (n=21).....107

Figura 12: Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e $\diamond$: Comparação II (aza n=11).....**108**

Figura 13: Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), $\diamond$: Comparação II (aza n=11), $\bullet$: Controle (n=21).....**109**

Figura 14: Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e $\diamond$: Comparação II (aza n=11).....**110**

Figura 15: Concentração de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e $\diamond$: Comparação II (aza n=11).....**112**

Figura 16: Concentração de TGF- β 2 no soro ou plasma dos pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22 pacientes), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10 pacientes) e $\diamond$: Comparação II (aza n=11 pacientes).....**114**

Figura 17: Concentração de TGF- β 3 no soro ou plasma dos pacientes com Doença de Crohn: $\square$: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=

2 pacientes), **+**: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10 pacientes) e $\diamond$:
Comparação II (aza n=11 pacientes).....**116**

RESUMO

A doença de Crohn (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o trato gastrointestinal (TGI) com repercussão sistêmica. Existe uma interação de agentes patogênicos, tais como a microbiota intestinal e a imunidade de mucosa em indivíduos geneticamente susceptíveis. DC é mediada por uma resposta T helper 1 (Th1). Atualmente, dietas compostas de proteínas de soro de leite bovino enriquecidas com TGF- β poderiam indicar uma alternativa para controlar a doença, já que não são uma opção invasiva, resultando em uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

Objetivos: Avaliar a influência da suplementação nutricional oral com proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β durante 16 semanas, na resposta imune celular para o BCG em pacientes com DC.

Métodos: Vinte e dois pacientes com DC que estavam em terapia anti-TNF- α e azatioprina participaram de um ensaio clínico, prospectivo, de intervenção nutricional com um concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β durante 16 semanas. Os grupos de comparação sem suplementação nutricional foram compostos por 10 pacientes com DC sob terapia com anti-TNF- α e azatioprina, 11 pacientes em uso apenas de azatioprina e 21 indivíduos normais como controle. A imunidade celular para o BCG foi caracterizada pela proliferação linfocitária (por citometria de fluxo) em cultura de células mononucleares de sangue periférico e a produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-6, dosadas por ELISA) em sobrenadante de cultura. Foi realizada a fenotipagem de subpopulações de linfócitos T em sangue periférico e a dosagem de TGF- β 2 e TGF- β 3 em soro e plasma por ELISA.

Resultados: Em pacientes com DC, a suplementação nutricional com um concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β aumentou o percentual de linfócitos T em sangue periférico e a concentração de TGF- β 2 no plasma, após as 16 semanas de intervenção. Os pacientes apresentaram proliferação de subpopulações de linfócitos T (CD4+, CD8+ e TCR

$\gamma\delta$ +) e a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-6 BCG específicas, que não diferiram no início e no fim da suplementação nutricional. Com relação ao grupo controle normal, os três grupos de pacientes com DC apresentaram menor concentração de IFN- γ BCG específica.

Conclusão: Assim, conclui-se que, uma dieta baseada em proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β pode levar a uma imunomodulação sistêmica.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a inflammatory chronic disease that affects the gastrointestinal tract with systemic repercussion. There is an interaction of pathogens such as enteric microbiota with mucosal immunity in genetically susceptible individuals. CD is mediated by a T-helper 1 (Th1) response. Currently diets containing bovine whey proteins enriched with TGF- β could indicate an alternative for controlling the disease.

Objective: To investigate the influence of oral supplementation for 16 weeks with bovine whey proteins enriched with TGF- β on the BCG cellular immune response in patients with Crohn's disease.

Methods: Twenty-two CD patients who were under anti-TNF- α and azathioprine therapy took part in a prospective, clinical trial of nutritional intervention with bovine whey proteins enriched with TGF- β for 16 weeks. As comparison groups without nutritional supplementation, 10 CD patients under anti-TNF- α and azathioprine therapy, 11 CD patients under taking just azathioprine and 21 health controls were selected. The cellular immunity to BCG was evaluated by lymphoproliferation (by flow cytometry) in peripheral blood mononuclear cell cultures and cytokine production (IFN- γ , TNF- α and IL-6, by ELISA) on supernatant cultures. Immunophenotyping of T cell subpopulations in peripheral blood and TGF- β 2 and TGF- β 3 plasma and serum levels were also evaluated in CD patients.

Results: Nutritional supplementation with concentrated whey proteins enriched with TGF- β increased T lymphocyte percentage in peripheral blood and plasma TGF- β 2 concentration after 16 weeks of intervention in DC patients. They showed BCG-specific proliferation of CD4+, CD8+ and TCR $\gamma\delta$ + T lymphocytes and IFN- γ , TNF- α and IL-6 production, which were not different between begin and end of the supplementation period. In relation to the healthy controls, all three groups of CD patients had lower BCG-specific IFN- γ production.

Conclusions: Thus, it is concluded that a diet based on bovine whey proteins enriched with TGF- β can lead to a systemic immunomodulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Inflamatória Intestinal

O termo doença inflamatória intestinal (DII) inclui um grupo de doenças, como a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) de causa desconhecida, caracterizada pelo acometimento focal, assimétrico e transmural de qualquer parte do tubo digestivo, da boca ao ânus (1).

1.2. A Doença de Crohn

A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica complexa, de etiologia desconhecida. É caracterizada por inflamação focal ou segmentar transmural que pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, com períodos de agudização e formação de granulomas. Esta inflamação transmural rompe a integridade da mucosa intestinal, favorecendo o desenvolvimento de abscessos e fístulas (2). A inflamação intestinal inicia-se e perpetua-se por meio de uma resposta imunológica a antígenos desconhecidos num hospedeiro geneticamente susceptível (3). Pode envolver, também, o sistema músculo-esquelético, pele e olhos (4).

É importante considerar que embora a DC possa afetar qualquer porção do trato digestivo, ela afeta o íleo e o ceco em 40% dos casos, o intestino delgado em 30% e o cólon em 25% dos casos (1).

1.2.1. Epidemiologia

A DC pode ocorrer em qualquer idade, mas o maior número de casos surge, geralmente, na segunda e terceira década de vida, ocorrendo outro pico, embora menor, entre os 60 e 80 anos (5).

A incidência da DC varia de acordo com as regiões geográficas, o que poderá sugerir a intervenção de fatores ambientais. Na Ásia e na América do Sul

as taxas de incidência são de 0,08 por 100.000 habitantes. Já nos EUA a incidência é de 7 para 100.000 habitantes. Não há predominância de sexo (6).

No Brasil, são poucos os estudos sobre os aspectos epidemiológicos das DII. A maioria deles apenas descreve as características clínicas e a frequência de internação, sem qualquer referência à incidência e prevalência dessas doenças em termos de população. Dados recentes mostram que as internações devido às DII têm se tornado mais frequentes, com predomínio de DC em comparação com RCU (7, 8).

1.2.2. Etiologia e Patogênese

Sua etiologia ainda não está definida, mas acredita-se que os resultados de uma inflamação inapropriada e uma ativação crônica do sistema imune da mucosa (inata e adaptativa) em um hospedeiro geneticamente suscetível, e a microflora entérica desempenham um papel central no início e na manutenção da doença (9).

Quatro hipóteses têm sido propostas para explicar essa etiologia desconhecida:

■ **Desequilíbrio dos sistemas imunes inato e adaptativo:** Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a DC pode ser desencadeada por uma disfunção de componentes do sistema imune inato como neutrófilos, monócitos e células dendríticas (CD), (10). Da mesma maneira que na ativação do sistema inato, a ativação do sistema imune adaptativo resulta na produção de interleucinas (IL) que irão mediar a diferenciação, proliferação e apoptose de células T, B e macrófagos (11). O sistema imune adaptativo desempenha um papel essencial na patogênese da DC. A natureza das respostas imunes e o tipo de citocinas produzidas determinam as características do processo inflamatório (12).

A DC é caracterizada por uma resposta anormal de células T do tipo T-helper 1 (Th1). Há evidências de uma imunorregulação defeituosa na

diferenciação das células T CD4 para células Th1, principalmente de interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18) que estão elevadas na mucosa dos indivíduos com DC. Há, também, liberação de grandes quantidades de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) pelas células T CD4⁺ (13).

É importante ressaltar que os padrões Th1 e Th2 tendem a uma inibição mútua. Novas subpopulações de células T efetoras são conhecidas como Treg e a mais recente subpopulação Th identificada, distinta de Th0, Th1 e Th2 é a chamada Th17, que representa uma nova subpopulação de TCD4⁺, a qual protege contra agentes extracelulares e são responsáveis por doença autoimune em camundongos. Foi demonstrada que a presença de Th17 no intestino de indivíduos com DC é capaz de cooperar com o linfócito B, apresentando baixa citotoxicidade e susceptibilidade para regulação (14).

É provável que as bactérias da microbiota intestinal de indivíduos geneticamente susceptíveis à DC sejam as responsáveis pela indução deste desequilíbrio na secreção de interleucinas (15). Na DC, os macrófagos e as CD não só estão aumentados em número, como também expressam de forma exagerada *toll like 2* (TLR2) e *toll like 4* (TLR4), moléculas co-estimuladoras produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, com a consequente ativação de células Th1 (16). Além disso, as CD produzem menos IL-10, o que diminui as respostas reguladoras (17).

■ **Defeitos na função de barreira da mucosa intestinal:** No intestino, o sistema imune da mucosa deve manter a capacidade de tolerância às bactérias comensais e aos alimentos, mas também desenvolver respostas de defesa perante os agentes patogênicos (12).

A microbiota intestinal normal e o sistema imune associado à mucosa representam a primeira linha de defesa contra vários patógenos. A microbiota ativa a imunidade inata e a resposta imune adaptativa, além de modular as reações de hipersensibilidade. Após o reconhecimento e apresentação do antígeno ocorre a construção de uma resposta imune, a qual poderá ter papel na proteção, na

tolerância ou na doença (17).

As células epiteliais atuam como uma barreira inicial na prevenção de penetração de antígenos na mucosa intestinal. Defeitos nesta barreira epitelial do sistema imune da mucosa de indivíduos com DC são caracterizados por diminuição da integridade epitelial, da permeabilidade e da composição anormal de muco podendo resultar na elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1- β , (18). Há maior expressão de IL-12, TNF- α e IFN- γ na mucosa intestinal, e nas áreas de inflamação aguda há elevada taxa de apoptose das células epiteliais e aumento da proliferação das células nas criptas. Algumas interleucinas como IL-4, IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF- β), têm efeitos antiinflamatórios (19).

■ **Disbiose da microbiota comensal:** Ocorre uma alteração no equilíbrio entre os microrganismos protetores e os agentes patogênicos da microbiota intestinal, o que resulta numa inflamação intestinal crônica em indivíduos geneticamente susceptíveis (20).

■ **Infecção por bactérias persistentes:** As semelhanças entre DC e algumas formas de enterocolite são propostas como evidência para a etiologia da DC. O que inclui algumas espécies microbianas como: *Pseudomonas maltophilia*, *Mycobacterium kansasii*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacteroides fragilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (MAP), (21).

O MAP é o agente que mais têm sido alvo de investigações no sentido de se estabelecer alguma relação com a DC. É uma micobactéria atípica, que causa a doença de Johne's, uma infecção sistêmica e uma inflamação crônica do intestino que afeta ruminantes e outros animais, e que é muito semelhante à DC. Mas os resultados dos estudos realizados ainda são controversos (22).

A *E.coli* é uma bactéria gram-negativa com importantes funções na manutenção da homeostasia intestinal, mas, que raramente causa doença. No

entanto, existem algumas cepas patogênicas que têm a capacidade de desencadear respostas inflamatórias exacerbadas. Essas bactérias patogênicas têm a capacidade de ultrapassar a barreira do epitélio intestinal e multiplicar-se no interior dos macrófagos induzindo a produção de TNF- α e IFN- γ , podendo estar envolvidas, também, na formação de granulomas (23).

1.2.3. A genética e a DC

Vários loci de suscetibilidade para DC já foram identificados e o mais forte é o CARD15. Contudo, polimorfismos ocorrem em apenas 40% dos pacientes (aqueles com doença no íleo) e em 15% dos indivíduos saudáveis (20).

O gene NOD2/CARD15 foi o primeiro gene que se descobriu relacionado a DC. Ele codifica a proteína citoplasmática NOD2, expressa nos macrófagos, neutrófilos, linfócitos B e T, CD, células de Paneth e nas células epiteliais intestinais (CEI) que reconhece o dipeptídeo muramil (MDP), componente do peptídeoglicano da parede de bactérias gram-positivas e negativas. O receptor citoplasmático NOD2 está expresso, principalmente, em fagócitos mononucleares da luz intestinal. A ligação de MDP com o NOD2 ativa a transcrição do fator nuclear de ativação κ B (NF κ B) levando a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (24).

Esse gene é responsável pela expressão de várias moléculas protetoras essenciais para uma eficaz eliminação bacteriana: as defensinas (24). Produzidas pelas células de Paneth (um tipo de CEI especializadas), as defensinas são péptidos antibióticos naturais que representam um importante mecanismo de defesa da imunidade inata, sendo que eliminam rapidamente os microorganismos, ajudando a prevenir a invasão bacteriana da mucosa intestinal e mantendo uma homeostasia no local (24). As mutações no gene NOD2/CARD15 estão presentes em até 30% dos indivíduos com DC (25). Os portadores heterozigóticos têm o risco aumentado de doença de cerca de 2-4 vezes e os

homozigóticos de cerca de 20-40 vezes (25).

As mutações podem levar a consequências como a diminuição do reconhecimento bacteriano e da produção de citocinas como IL-1 e de quimiocinas como a IL-8, o que pode resultar no defeito da eliminação de bactérias invasoras e aumento das infecções (26). Pode ocorrer, também, a diminuição de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 pelas CD e consequente perda de respostas imunes reguladoras, o que poderia resultar em respostas inflamatórias exageradas (25).

Os TLRs constituem uma família de cerca de onze receptores transmembranares, sendo expressos na superfície dos monócitos, macrófagos, CD e CEI (26). São proteínas de reconhecimento do sistema imune inato da mucosa, que reconhecem diferentes classes de produtos microbianos, atuando na homeostasia intestinal e no controle de infecções por meio da ativação do NF- κ B (27).

A interação das bactérias comensais com os TLR2 e TLR4 contribui para a manutenção da integridade da barreira epitelial por meio da produção de IL-6 e TNF- α , apesar dessas citocinas estarem associadas com o desencadeamento de mecanismos inflamatórios, também desempenham um papel protetor (28).

1.2.4. Características Clínicas

DC engloba um espectro de padrões clínicos e patológicos e pode ser manifestada por acometimento focal, assimétrico, transmural e, ocasionalmente, inflamação granulomatosa que acomete o trato gastrointestinal, com o potencial de complicações sistêmicas ou extraintestinais (1). Quando a doença está ativa, o paciente pode apresentar fraqueza, palidez, febre, fadiga, com aparência de doença crônica. A diarreia está presente na maioria dos casos, mas a gravidade é dependente do local anatômico e do processo da doença (1).

Uma das manifestações extraintestinais mais comum é a artrite. Os dois tipos de envolvimento articular incluem artrite periférica e espondilite anquilosante. A artrite periférica afeta as grandes articulações como joelhos, tornozelos, cotovelos e quadris. A espondilite anquilosante afeta a coluna vertebral e pode apresentar-se com rigidez matinal, postura curvada e dor lombar (29). Podem ocorrer complicações oculares (uveíte, ceratopatia, episclerite e olhos secos) decorrentes do processo inflamatório ou do tratamento da doença com corticosteroides (30).

1.2.5. Tratamentos utilizados na DC

O tratamento da doença de Crohn é definido segundo sua localização, grau de atividade e complicações. As opções são individualizadas de acordo com a resposta sintomática e a tolerância ao tratamento. Definir o grau de atividade é complicado devido à multiplicidade de sintomas possíveis. O Índice de Atividade da Doença (IADC) também pode ser utilizado para classificar os pacientes de acordo com a intensidade de atividade inflamatória (31):

- em remissão: pacientes com IADC abaixo de 150;
- doença leve a moderada: IADC entre 150-219;
- doença moderada a grave: IADC entre 220-450;
- doença grave a fulminante: IADC acima de 450.

Na DC são utilizados tratamentos farmacológicos que incluem os aminossalicilatos, antibióticos, corticosteroides e outros imunossupressores, e tratamento cirúrgico que tem por objetivo diminuir os sintomas da fase aguda e manter a remissão clínica da doença (32).

A escolha dos fármacos depende da gravidade e localização da doença, dos seus efeitos secundários, se pretende-se induzir uma remissão ou se

é necessária uma terapêutica de manutenção, de aspectos emocionais e sociais, e da eficácia comprovada e perfil de segurança dos fármacos (3). Ainda há casos que não respondem totalmente a estas terapêuticas, que são utilizadas como primeira linha na DC com atividade leve. Por outro lado os imunossuppressores, terapia biológica e corticoides sistêmicos estão reservados para os casos de atividade moderada a grave (3).

■ **Aminossalicilatos:** São utilizados a sulfasalazina e a mesalazina na DC com atividade leve. Estes fármacos têm efeito antiinflamatório. O agente 5-ASA é funcionalmente ativo, bloqueando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibindo o peptídeo bacteriano capaz de induzir a quimiotaxia dos neutrófilos e a secreção de adenosina induzida, que retira os metabólitos reativos do oxigênio e inibe a ativação do NF- κ B (33).

■ **Corticosteroides:** São utilizados quando o 5-ASA se mostra ineficiente. Eles, geralmente, agem pelas mesmas propriedades funcionais relativas dos processos inflamatórios. Parecem controlar a doença de uma maneira complexa, o que pode incluir a modulação de fosfolipase A, IL-1, TNF- α , molécula-1 de aderência aos leucócitos endoteliais (ELAM-1) e molécula-1 de aderência intercelular (ICAM-1) e a lise dos linfócitos e dos eosinófilos (34).

■ **Antibióticos:** São utilizados na indução da remissão e na manutenção da DC, visto o papel das bactérias na patogênese da DC. Os fármacos geralmente utilizados são o metronidazol e a ciprofloxacina, que atuam nos microrganismos gram-negativos, impedindo o crescimento bacteriano (35).

■ **Imunossuppressores:** Os mais utilizados são a azatioprina (AZA) e seu metabólito ativo 6-mercaptopurina (6-MP) e o metotrexate (MTX). A AZA e a 6-MP são membros da classe das tiopurinas, com início de ação lento (cerca de 3 meses), mas com eficácia demonstrada no tratamento da DC (36). Eles interferem na síntese de ácidos nucleicos, têm efeitos anti-proliferativos nos linfócitos induzindo a apoptose dessas células (37). A AZA e a 6-MP apresentam um conjunto de efeitos secundários que podem ser dose-dependentes, associados à

produção de metabólitos potencialmente tóxicos ocasionando mal-estar, náuseas, complicações infecciosas, hepatite e mielossupressão, mas que podem ser diminuídos com a redução da dose ou suspensão do medicamento. Seus efeitos dose-independentes são: febre, rash e artralgias. A utilização destes agentes poderá estar associada a um risco de cerca de quatro vezes de desenvolver linfoma, em comparação com a população geral, o que poderá ser explicado pela leucopenia prolongada (36).

O MTX é um antagonista do ácido fólico e inibidor da diidrofolato redutase, o que ocasiona diminuição da síntese do ácido desoxiribonucleico. Tem propriedades antiinflamatórias, incluindo a diminuição de citocinas e na apoptose dos linfócitos (32). É utilizado como alternativa às tiopurinas no tratamento da DC em pacientes corticodependentes. É usado para indução da remissão da DC moderada a grave (32).

O tratamento cirúrgico está indicado nas obstruções, complicações supurativas e doença refratária ao tratamento clínico, ou quando sintomas graves persistem, mesmo após tratamento intensivo com drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras (38).

1.2.6. Terapia Biológica: Anti-TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória fundamental na patogênese da DC. É produzido, pela primeira vez, como uma proteína transmembrana 26-kDa com uma cauda intracelular, que é clivada pela metaloproteinase, a ser secretada como uma proteína solúvel de 17-kDa. Atua na ativação de macrófagos e linfócitos T, entre outras células, induzindo outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e IL-6, aumentando a migração de leucócitos e induzindo a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais e leucócitos. O TNF- α inibe a apoptose de células inflamatórias.

Na lâmina própria do intestino de pacientes com DC encontra-se grande quantidade de TNF- α (39, 40).

É recente o desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti-TNF- α da subclasse IgG1, que tem na sua composição 75% de IgG humana e 25% de origem murina, com porção Fab de reconhecimento antigênico e associado com reações de hipersensibilidade e à perda de resposta ao fármaco de aplicação intravenosa (41). É indicado na DC refrátaria e fistulizante para redução dos sintomas e manutenção da remissão da doença.

Para induzir a manutenção recomenda-se uma dose de 5 mg/kg para indução a 0, 2 e 6 semanas, seguida por um regime de manutenção de 5 mg/kg a cada 8 semanas para o tratamento da DC moderada a grave ou fistulizante. Para os pacientes que respondem e depois perdem sua resposta, deve ser estudada a possibilidade para o tratamento com 10 mg/kg. Os pacientes que não respondem por 14 semanas não são susceptíveis de reagir com a administração continuada e deve considerar-se a interrupção de seu uso (41).

O principal efeito do anti-TNF- α é o desaparecimento de células inflamatórias da mucosa intestinal previamente inflamada, com indução da apoptose de células T. A lâmina própria de pacientes com doença de Crohn é resistente à apoptose (41).

A neutralização do TNF- α livre impede a interação com seu receptor de membrana celular, enquanto que a sua ligação ao receptor induz a ativação do complemento, a citólise das células inflamatórias e apoptose das células T - ativadas (42).

A terapêutica com anti-TNF- α pode resultar na formação de anticorpos contra o anti-TNF- α . A presença destes anticorpos tem sido associada a reações à infusão de 6,9 a 19 por cento dos pacientes. Estes anticorpos também podem ter reduzida a duração do efeito dos tratamentos repetidos com esse fármaco (43, 44).

Mais recentemente, está disponível em nosso meio anticorpo monoclonal anti TNF- α com 100% de IgG humana. Até hoje é o único produto biológico aprovado para o tratamento da doença de Crohn nos pacientes refratários às terapêuticas convencionais (42).

1.3. Imunomodulação por meio da Proteína do Soro do Leite Bovino

1.3.1. Propriedades das proteínas do soro do leite bovino

As proteínas do soro do leite não são coaguladas por ácido e são resistentes à ação da quimosina. Constituem 20% do total das proteínas lácteas bovinas e possuem o potencial de serem transformadas em ingredientes imunomoduladores para alimentos funcionais (45). São altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, o que as torna de grande utilidade para situações de estresse metabólico (46, 47). As principais proteínas do soro de leite bovino são a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina bovina sérica, lactoferrina, imunoglobulinas, lisozima, lactoperoxidase e glicomacropéptido.

■ A β -lactoglobulina: é uma proteína globular de massa molecular de 18,3 kDa, que corresponde a, aproximadamente, 50% do conteúdo proteico do soro. Apesar de se conhecer muito sobre a estrutura e a funcionalidade da β -lactoglobulina, pouco se conhece sobre seu papel fisiológico. Foi descrito proteção pelo papel antioxidante presente no grupo tiol da proteína (48, 49).

■ A α -lactalbumina: é uma metaloproteína de 14,1 kDa, que representa entre 20 a 25% das proteínas do soro. É rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. Sua principal atividade biológica é a de modular a síntese de lactose na glândula mamária (48, 49).

■ A albumina bovina sérica (BSA): é uma proteína globular de 66,2 kDa, que representa, aproximadamente, 10 a 15% das proteínas do soro. Sabe-se que é fonte de aminoácidos essenciais, porém pouco se sabe sobre suas

potenciais funções fisiológicas (48, 49).

■ A lactoferrina: é uma glicoproteína ligadora de ferro com 86,1 kDa. Corresponde entre 1 a 2% das proteínas do soro. É um antioxidante não enzimático encontrado tanto no soro do leite quanto no colostro (48). No intestino exerce função imunoestimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (50).

■ As imunoglobulinas: são uma família de proteínas de elevado peso molecular que apresentam propriedades físicas, químicas e imunológicas diversas. Aparecem em elevada concentração no colostro e transmitem imunidade passiva aos recém-nascidos. As imunoglobulinas encontradas no soro de leite são a IgG (aproximadamente 160 kDa), IgA (aproximadamente 400 kDa) e IgM (aproximadamente 900 kDa) (48).

■ A lisozima: é uma enzima anti-microbiana, de 15 kDa, encontrada no colostro e leite humano e bovino. Tem ação antimicrobiana e possui efeito sinérgico com imunoglobulinas e lactoferrina (51, 52).

■ A lactoperoxidase: é uma hemoproteína com massa molecular de 77 kDa, representa de 0,5 a 1,0% das proteínas do soro de leite. Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisa a oxidação do tiocianato (SCN_2) gerando um produto intermediário com propriedades antimicrobianas, principalmente contra *Salmonella* e *Streptococcus* patogênicos (52, 48, 49).

■ O glicomacropéptido (GMP): é derivado da precipitação enzimática, por ação da quimosina, da kappa-caseína (κ -caseína), representa entre 10 a 15% das proteínas do soro. Tem propriedades antimicrobiana, antiviral e bifidogênica (49).

As proteínas do soro do leite possuem atividade imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, anticâncer e antiúlcera. Elas estão associadas aos efeitos prebióticos, promoção de restauração de tecidos, manutenção da integridade intestinal, destruição de patógenos e eliminação de toxinas (53).

As proteínas são essenciais para estrutura e funções celulares tais como: catalítica (enzimas), motilidade (actina, miosina), mecânica (elastina, colágeno), transporte e armazenamento (hemoglobina, mioglobina, citocromos), proteção (anticorpos) e regulação (hormônios, interleucinas) (54).

Os concentrados de proteína de soro de leite e os isolados de proteína de soro, geralmente, contêm uma concentração de cisteína pelo menos quatro vezes maior do que outras proteínas de alta qualidade, e isso produz uma melhora da resposta imune (55).

Os possíveis mecanismos estimulatórios das proteínas sobre o sistema imune parecem estar relacionados com sua estrutura primária rica em aminoácidos sulfurados, cisteína e grupamentos glutamil-cisteína, precursores da síntese da glutathione (GSH). Ela é sintetizada no interior das células a partir de glutamato, glicina e cisteína, sendo essa última, essencial para manter alto os níveis de GSH nas células, promovendo assim a proliferação de células T (54).

O GSH é um tripeptídeo (γ -glutamyl-cystinyl-glicina) hidrossolúvel de vital importância na proteção celular contra estresse oxidativo. Possui ação direta como antioxidante na remoção dos peróxidos produzidos durante o metabolismo de toxinas exógenas. Além disso, mantém outros antioxidantes celulares nas suas formas reduzidas e algumas enzimas antioxidantes nos seus estados reduzidos e ativos (56, 57). Níveis de GSH em células apresentadoras de antígeno desempenham um papel na direção da resposta para um padrão do tipo Th1 ou "T-helper 2 (Th2)" (58).

Há poucos estudos clínicos que demonstram a ação das proteínas do soro de leite sobre o sistema imune. A ingestão de um concentrado de proteínas do soro de leite nativas (20g/dia) durante 3 meses, por adultos jovens com fibrose cística, resultou em aumento de 46,6% da GSH linfocitária (59). Em adultos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) a ingestão de concentrado de proteínas de soro do leite nativas (45g/dia) aumentou significativamente a GSH plasmática em 15 dias e esse efeito se manteve após 6

meses de ingestão (60). Em crianças com AIDS, a ingestão de concentrado proteico de soro de leite nativo aumentou a GSH nos linfócitos após 6 meses, e nos eritrócitos, após 4 meses, além de diminuir a morbidade relacionada à doença (61, 62).

O desequilíbrio do sistema imune associado à mucosa intestinal leva à inflamação crônica que têm como consequência a destruição do epitélio intestinal e graves anormalidades funcionais, como perda da capacidade de absorção e secreção exagerada de eletrólitos e fluidos intestinais. Nesse contexto, os indivíduos com Doença de Crohn podem apresentar desnutrição grave (63). As crianças e adolescentes podem desenvolver deficiência de crescimento, com retardo da maturação esquelética e da puberdade (64). Para indução e manutenção da remissão da doença são necessários um tratamento clínico e nutricional adequado para garantir melhora do crescimento e da altura final da criança (64). Os nutrientes imomoduladores ou alimentos funcionais apresentam perspectivas promissoras nas suas propriedades farmacológicas de modular a inflamação, mantendo a integridade da mucosa intestinal, melhorando o estado clínico e o estado nutricional destes pacientes (63).

1.4. Propriedades do TGF- β

Leite humano e bovino contém o fator transformador do crescimento β (TGF- β), polipeptídio multifuncional com importante papel no desenvolvimento da tolerância e prevenção da auto-imunidade (65). Existem três isoformas (TGF- β 1, 2 e 3) e três receptores (I, II e III) (66).

TGF- β é uma citocina reguladora, produzida por células T e macrófagos, com propriedades antiinflamatórias e de regulação da resposta imune (67). Possui ação sobre o crescimento e a diferenciação celular. Durante uma doença, atua em conjunto com o derivado de plaquetas para estimular a proliferação celular e a produção de matriz extracelular para, dessa maneira, reparar os danos (66). Pode

agir de forma autócrina e parácrina, controlando a diferenciação, proliferação e ativação de linfócitos, macrófagos e células dendríticas e, como tal, desempenha papel fundamental nos mecanismos de tolerância, para a prevenção de autoimunidade e atividade antiinflamatória (68). Além disso, pode antagonizar citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , o que ocasiona reparação de tecidos lesados, bem como modular a expressão de MHC classe II (69).

Sua deficiência está relacionada com doença inflamatória intestinal. A administração de uma dieta rica em TGF- β pode ajudar na remissão clínica da doença de Crohn e melhora das lesões intestinais (70, 71).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a resposta imune celular para o BCG em pacientes com Doença de Crohn e os efeitos de um concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β sobre essa resposta.

2.2. Objetivos específicos

Comparar a resposta imune celular para o BCG entre indivíduos portadores da Doença de Crohn examinando:

- a proliferação de linfócitos T de sangue periférico para a vacina BCG e estimulados com o mitógeno PHA;
- a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-6 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico;
- A concentração de TGF- β 2 e TGF- β 3 no soro e plasma;

Comparar a resposta imune celular para o BCG entre indivíduos portadores da Doença de Crohn e indivíduos normais examinando:

- a proliferação de linfócitos T de sangue periférico para a vacina BCG e estimulados com o mitógeno PHA;
- a produção de TNF- α , IFN- γ , em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico.

3. MÉTODOS

3.1. Delineamento do Estudo

Ensaio clínico prospectivo de intervenção nutricional com um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β com duração de 16 semanas.

Foram realizadas três avaliações imunológicas para o grupo de intervenção nutricional (IN), (azatioprina + anti-TNF- α + suplemento) durante o ensaio:

- no início: antes do início da suplementação, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ;
- 8 semanas após o início da suplementação, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ;
- ao final das 16 semanas de suplementação alimentar.

Foram realizadas duas avaliações imunológicas para o grupo comparação I (CI), (azatioprina + anti-TNF- α) durante o ensaio:

- no início, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ;
- ao final das 16 semanas de acompanhamento.

Foi realizada uma avaliação imunológica para o grupo comparação II (CII), (azatioprina) durante o ensaio.

3.2. População

Inicialmente, foram selecionados 50 indivíduos com Doença de Crohn, sob seguimento clínico no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), (Campinas, São Paulo, Brasil).

O grupo de Intervenção Nutricional (IN) (azatioprina + anti-TNF- α + suplemento) foi constituído por 22 pacientes com Doença de Crohn que receberam o concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β . Os critérios de inclusão dos pacientes foram:

- Pacientes de ambos os sexos;
- Estar sob terapia intravenosa com anti-TNF- α a cada 2 meses;
- Azatioprina via oral diariamente;
- Apresentar acometimento no delgado;
- Não fumante;
- Não droga adito;
- Não estar usando outros medicamentos;
- Ter boa adesão ao seguimento clínico ambulatorial.

Os critérios de exclusão foram:

Pacientes que, por algum motivo, não completaram as 16 semanas de suplementação alimentar.

O grupo Comparação I (CI) (azatioprina + anti-TNF- α) foi constituído de 10 pacientes com Doença de Crohn com os mesmos critérios de inclusão estabelecidos para o grupo de intervenção nutricional.

O grupo Comparação II (CII) (azatioprina) foi constituído de 11 pacientes com Doença de Crohn com os seguintes critérios de inclusão foram:

- Pacientes de ambos os sexos;
- Azatioprina via oral diariamente;
- Não estar sob terapia intravenosa com anti-TNF- α ;
- Não fumante;
- Não droga adito;
- Não estar usando outros medicamentos;
- Ter boa adesão ao seguimento clínico ambulatorial.

Os critérios de exclusão foram:

Pacientes que, por algum motivo, não contemplassem os critérios de inclusão.

Para comparação com os pacientes com Doença de Crohn, foi utilizado o grupo de Controles Normais do laboratório, que continha 21 indivíduos normais.

3.3. Suplemento Alimentar

O suplemento contendo um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β foi produzido e gentilmente doado pela HILMAR CHEESE COMPANY, 9001. North Lander Avenue Hilmar, Califórnia 95324 USA.

Para determinar a composição centesimal do concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β , foram utilizados os procedimentos descritos no AOAC (72) (umidade, sólidos totais, cinzas e proteína) e o método descrito por BLIGH e DYER (73) para a determinação de lipídios totais.

Para caracterizar o perfil de aminoácidos do concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β foi utilizado o método de Spackman (74). E para determinar o perfil eletroforético o método de Laemmli (75).

A composição centesimal, o perfil de aminoácidos e a eletroforese do suplemento alimentar, encontram-se nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 1 respectivamente.

O suplemento foi devidamente pesado, embalado em sachês laminados (Hembapack, São Paulo-SP) protegidos da luz e umidade e, posteriormente, selados com retirada total do ar. Cada sachê continha 15 gramas do concentrado de proteínas de soro de leite bovino.

Após essa etapa, os sachês foram irradiados com raios gama na dosagem de 10 Kgy pela Empresa Brasileira de Radiações LTDA (EMBRARAD), Av. Cruzada Bandeirante 290, Cotia-SP.

Para garantir a qualidade microbiológica dos suplementos foi realizada análise microbiológica em dois momentos (antes do acondicionamento em sachês e após a irradiação) pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Av. Brasil 2800, Campinas-SP. O laudo emitido pelo ITAL encontra-se nos Anexos 8.1 e 8.2.

Tabela 1: Composição centesimal do Concentrado de Proteínas de Soro de Leite Bovino enriquecido com TGF- β , fornecido ao Grupo de Intervenção Nutricional de pacientes com Doença de Crohn.

Componentes	(%)
<i>Proteína (N x F)¹</i>	68,85 $\pm$ 0,58
<i>Proteína (base seca)</i>	73,5
<i>Lipídios totais</i>	13,98 $\pm$ 0,50
<i>Cinzas</i>	4,26 $\pm$ 0,02
<i>Umidade</i>	6,33 $\pm$ 0,09
<i>Carboidrato²</i>	6,58

Fonte: (76); ¹Fonte: Concentrado de Proteínas de Soro de Leite Bovino enriquecido com TGF- β = 6,38; ² Calculado por diferença = 100 – (proteína + lipídios totais + cinzas + umidade). Resultados são média de 3 determinações analíticas.

Tabela 2: Perfil de aminoácidos do Concentrado de Proteínas de Soro de Leite Bovino enriquecido com TGF- β , fornecido ao Grupo de Intervenção Nutricional de pacientes com Doença de Crohn.

Aminoácidos	Percentual do total de aminoácidos
Essenciais	
Histidina	1.9
Isoleucina	5.8
Leucina	10.3
Lisina	8.6
Metionina	3.1
Cistina	2.3
Fenilalanina	3.5
Tirosina	3.2
Triptofano	ND
Valina	5.3
Treonina	6.3
Não-essenciais	
Alanina	5.0
Arginina	3.3
Ácido Aspártico	10.9
Ácido Glutâmico	16.9
Glicina	2.1
Prolina	5.9
Serina	5.5

Fonte: (76); ND: não determinado. Os resultados são valores médios para a determinação de duas amostras independentes.

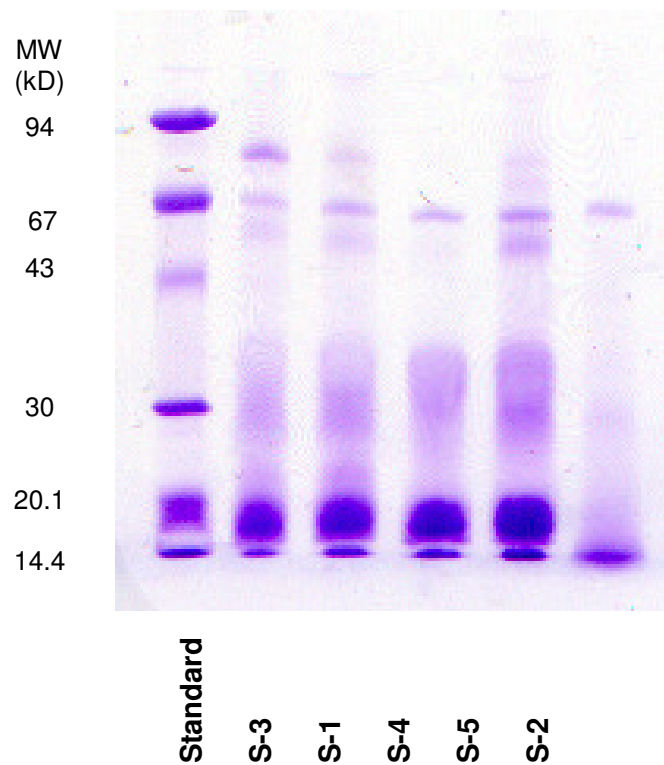


Figura 1: Perfil Eletroforético de diversas Proteínas de Soro de Leite Bovino.

Padrão da massa molar de Pharmacia (14.4 - 94 kD). S-1, Concentrado de Proteína de Soro de Leite Bovino comercial; S-2, Concentrado de Proteína de Soro de Leite Bovino comercial; S-3, Concentrado de Proteína de Soro de Leite Bovino experimental (TGF- β e Lactoferrina); S-4, Isolado de Proteína de Soro de Leite Bovino comercial; S-5, Isolado de Proteína de Soro de Leite Bovino experimental.

Fonte: (76)

3.4. Suplementação Alimentar

O suplemento alimentar foi administrado ao longo de 16 semanas e recomendado para ser ingerido duas vezes ao dia (30 gramas ao dia), no jejum e na ceia. Os pacientes foram cuidadosamente orientados quanto à diluição (1 sachê diluído em água ou suco não ácido de sua preferência) e o preparo (não sendo recomendado bater em liquidificador e nem diluir em água quente).

A oferta do concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β baseou-se no seu conteúdo proteico, o que caracterizava 50% da recomendação de proteínas propostas pelo *Recommended Dietary Allowances* (RDA, 1989).

Caso algum paciente apresentasse qualquer manifestação de intolerância gastrointestinal ou alérgica, a suplementação foi imediatamente interrompida.

3.5. Avaliação Imunológica

3.5.1. Coleta das Amostras Biológicas

Foram coletados 30mL de sangue venoso periférico por técnicas padrão em tubos adequados para cada procedimento realizado, no período da manhã, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α .

3.5.2. Fenotipagem dos Linfócitos T

Foi realizada a partir de 500 µL de sangue periférico total coletado em frasco com EDTA (Vacuette, Brasil).

Primeiramente, 100µL de sangue total foram incubados com anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD3-PC5, anti-CD4-RD1, anti-CD8-FITC (Beckman-Coulter, EUA) por 20 minutos a 4°C, protegidos da luz. A seguir, as hemáceas foram lisadas com uma solução de cloreto de amônio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM e EDTA 4Na 37mg/L). Após lavagem com tampão de lavagem (PBS acrescido de 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 0,1% de azida sódica), as células foram ressuspendidas no mesmo tampão e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA).

Foram adquiridos no mínimo 10.000 eventos para posterior análise no programa computacional *EXPO* 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA), conforme descrito na Figura 2.

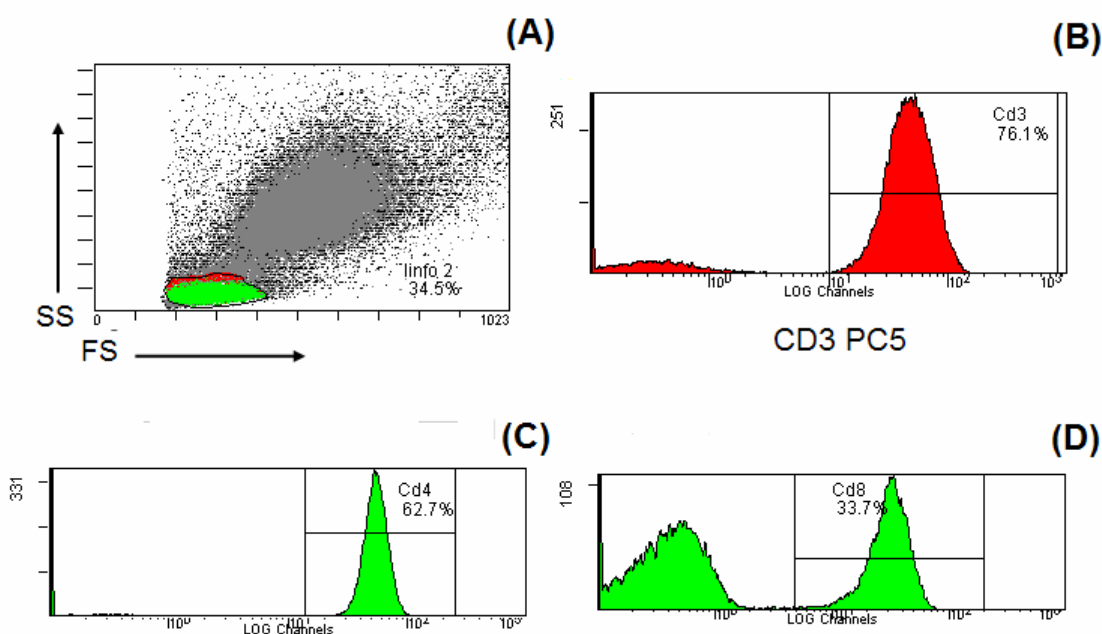


Figura 2: Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da fenotipagem dos linfócitos T de sangue periférico dos pacientes com Doença de Crohn. Os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) (A) e após a seleção das células CD3+ (B), e, as subpopulações de linfócitos T CD4+ (C) e T CD8+ (D) foram avaliadas.

3.5.3. Proliferação Linfocitária

O ensaio de proliferação foi realizado a partir de 18 mL de sangue total periférico coletado em tubo heparinizado (Vacuette, Brasil), modificado do protocolo de Gaines *et al.* (1996).

A fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 7,5 µg/mL (Sigma, EUA), foi utilizada como controle positivo; o meio de cultura completo (meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), acrescido de 1% de glutamina (Sigma, EUA), 0,1% de gentamicina e 10% de soro AB humano (Sigma, EUA) inativado como controle negativo. A vacina de BCG Moreau Rio de Janeiro liofilizada (Instituto Butantan, SP, Brasil), após reconstituída com meio RPMI 1640, foi usada na concentração ótima de 5×10^5 UFC/mL.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através da centrifugação com um gradiente de densidade, Ficoll-Hypaque 17-1440-02 (Amersham Biosciences, EUA), por 20 minutos a 1800 rpm, com posterior lavagem e ressuspensão em meio de cultura completo RPMI.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuncclon, NUNC™, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ durante seis dias.

A suspensão de células recuperada, aproximadamente 1 mL, foi

incubada com 50µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20mM por 15 minutos, para desfazer possíveis agregados celulares e lavada com solução de lavagem (solução salina tamponada com fosfato, com 2% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor (Nutricell, SP, Brasil) e 0,1% de azida sódica) a 2200 rpm à temperatura ambiente.

Após o descarte do sobrenadante, a suspensão foi incubada com 20 µL de imunoglobulina G humana (Bläusiegel, Alemanha), para bloquear os sítios Fc e, em seguida, incubada com anticorpos anti-CD3 (conjugado ao fluorocromo cooperativo ficoeritrina -PC5), anti-CD4 (conjugado a ficoeritrina - RD1), anti-CD8 (conjugado a isotiocianato de fluoresceína - FITC) (Beckman Coulter, EUA) e anti-CD3-PC5 (Beckman Coulter, EUA) e anti-TCR pan γδ (conjugado a ficoeritrina - PE) (Immunotech, Beckman Coulter, France), por 20 minutos, em ambiente escuro a 4°C.

Após centrifugação com tampão de lavagem a 2200rpm, foi efetuada a leitura no citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA).

A leitura das amostras foi realizada com aquisição de 25.000 a 40.000 eventos. Os resultados obtidos foram armazenados em arquivos FCS II e posteriormente analisados com o auxílio do programa computacional *EXPO* 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA).

Após estabelecer a região (*gate*) de células CD3⁺, os linfócitos pequenos (*resting lymphocytes*) e blásticos foram identificados por observação em *forward* (tamanho celular) e *side light* (complexidade interna) *scatters*. O esquema representativo de aquisição está demonstrado na Figura 3.

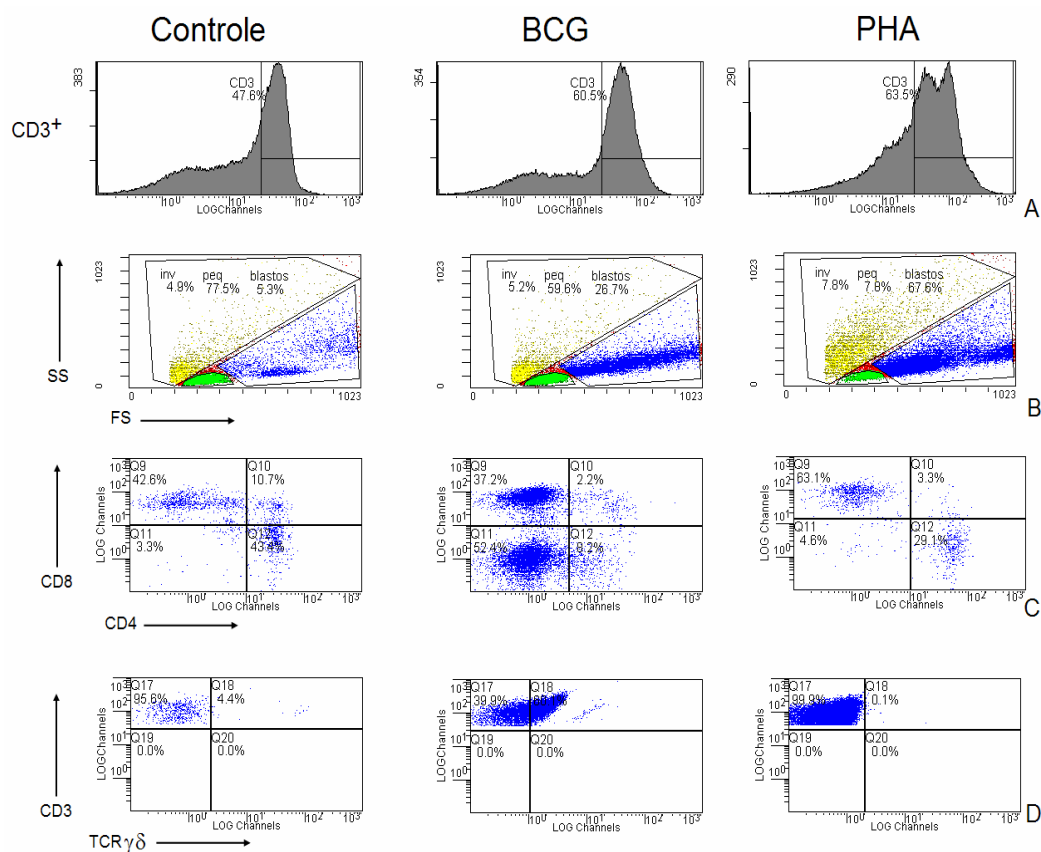


Figura 3: Figura representativa da análise, por citometria de fluxo, da proliferação linfocitária de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas (controle) e estimuladas por BCG e PHA dos pacientes com Doença de Crohn. Após a seleção das células CD3⁺ (A), os eventos foram analisados por tamanho e complexidade (FS e SS) e, os linfócitos pequenos (resting) e linfoblastos foram separados (B). As subpopulações de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺ e TCR δγ⁺) foram avaliadas nos linfoblastos (C, D).

A proliferação linfocitária foi medida por percentual de células blásticas CD3⁺. O percentual é calculado por:

$$\text{Proliferação Linfocitária} = \frac{\text{células no gate de blastos}}{\text{células no gate de blastos} + \text{células no gate de linfócitos}} \times 100\%$$

O cálculo de blastos para cada cultura estimulada é feito da seguinte forma:

1- Blastos de BCG = $\frac{\text{percentual de blastos estimulados pelo BCG}}{\text{percentual de blastos do controle}}$

2- Blastos de PHA = $\frac{\text{percentual de blastos estimulados pela PHA}}{\text{percentual de blastos do controle}}$

3.5.4. Dosagem de Citocinas

As dosagens de Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), foram realizadas a partir da cultura de CMSP, conforme protocolo acima descrito, a análise da produção de citocinas no sobrenadante foi realizada da seguinte maneira.

As células, na concentração de 2×10^6 células/mL, foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 poços com fundo arredondado (Nuncclon, NUNCTM, Dinamarca) em incubadora (CH-33M, Hitachi, Japão) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

Os antígenos foram utilizados nas mesmas concentrações descritas no ensaio de proliferação linfocitária.

Enquanto que as dosagens de Fator Transformador de Crescimento beta 2 (TGF- β 2) e Fator Transformador de Crescimento beta 3 (TGF- β 3) foram determinadas no soro e plasma. A partir da coleta de sangue onde foram coletadas em tubo seco para o armazenamento de soro (Vacuette, Brasil) e em tubo de EDTA (Vacuette, Brasil), para o armazenamento do plasma, as amostras foram centrifugadas, aliquotadas, identificadas e armazenadas juntamente com as amostras de sobrenadante de cultura em freezer a -80°C até a realização do

ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Para as dosagens de Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), Fator Transformador de Crescimento beta 2 (TGF- β 2) e Fator Transformador de Crescimento beta 3 (TGF- β 3) foram utilizados Kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA).

Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) conforme os protocolos do fabricante. Brevemente, as placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do *Kit*. Em seguida, incubadas com anticorpos de detecção, conjugados à biotina.

A incubação seguinte ocorre com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e tetrametil-benzidina (TMB) e a interrupção ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450 nm. Os limites de detecção de IFN- γ e TNF- α foram de 15,62 pg/mL, IL-6, foi de 9,75 pg/mL, TGF- β 2 e TGF- β 3 foram de 31,25 pg/mL.

Em todos os ensaios foi estabelecida uma curva padrão com gráfico de dispersão no qual a variável *X* foi a densidade óptica obtida nas leituras e *Y*, a concentração das citocinas. A equação da figura do gráfico foi gerada através de uma linha de tendência polinomial, e aceita apenas quando o *r*² fosse maior que 0,95. Para este cálculo foi utilizado o programa Microsoft Excel versão 2003 (Microsoft Corporation, EUA).

Todas as amostras e pontos da curva padrão foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.6. Aspectos Éticos

Foram garantidos o anonimato e o sigilo aos participantes, tendo estes sido devidamente informados sobre a pesquisa e consentido sua participação por meio da assinatura de um termo de consentimento (Anexos 8.3 e 8.4).

Os participantes do protocolo de pesquisa foram informados sobre os objetivos e os métodos que foram empregados por meio de uma carta de informação. Uma vez cientes da natureza dos procedimentos e desconfortos aos quais seriam submetidos, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação, foi solicitado que assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A natureza e os objetivos da pesquisa foram explicados aos pacientes e, na concordância, foi solicitado que assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os ensaios obedecerem às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Campinas, SP. (Parecer nº 304/2007, anexo 8.5).

3.7. Análise Estatística

Os dados foram organizados e analisados com o programa *SPSS® for Windows, version 7.5.1*. (SPSS Inc., 1989 – 1996, EUA).

As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como mediana, valores mínimo e máximo.

Em relação aos pacientes estudados, as possíveis diferenças entre os tempos nos grupos foram calculadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ou Teste de Friedman e as diferenças entre os tempos foram calculadas com o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

As figuras foram feitas no Software *GraphPad Prism*, version 4.0 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da População

De junho de 2008 a novembro de 2009, foram estudados 50 pacientes com Doença de Crohn, que foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com os critérios de inclusão. As características clínicas iniciais dos pacientes encontram-se na Tabela 3.

Os pacientes dos grupos intervenção nutricional e Comparação I, além da azatioprina via oral diária, estavam em uso de terapia anti-TNF- α a cada 8 semanas. O grupo de comparação II estava em uso apenas de azatioprina.

O grupo de intervenção nutricional (azatioprina + anti-TNF- α + suplemento) foi, inicialmente, composto por 29 pacientes, dos quais 22 finalizaram o ensaio clínico. Todos os casos de desistência foram pelo motivo da baixa palatabilidade do suplemento. Para melhorar a ingestão do suplemento foram oferecidas alternativas para a administração do mesmo com sucos de frutas, gelatinas, compotas de doces, ou outros alimentos da preferência do paciente.

No grupo de Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) 10 pacientes concluíram o ensaio clínico e no grupo de Comparação II (azatioprina) 11 indivíduos foram até o final da pesquisa.

Durante o período dessa pesquisa, dois pacientes do grupo de intervenção nutricional mudaram a dose de manutenção de anti-TNF- α , de 400 mg para 700 mg e de 200 mg para 400 mg. No grupo de Comparação I, dois pacientes mudaram a dose de 300 mg para 600 mg e de 300 mg para 400 mg.

Durante todo o período da pesquisa, nenhum paciente apresentou intercorrência grave, com necessidade de internação.

Tabela 3: Características Clínicas Iniciais dos pacientes com Doença de Crohn.

Características	Grupos		
	<i>Intervenção Nutricional</i> (n=22)	<i>Comparação I</i> (n=10)	<i>Comparação II</i> (n=11)
Idade (anos)	38 (13 a 72) ¹	34 (26 a 54)	38 (23 a 66)
Gênero (masc./fem.)	(16 / 6)	(4 / 6)	(6 / 4)
Tempo de Diagnóstico (anos)	7 (2 a 20)	8,5 (2 a 18)	6 (2 a 28)
Dose de Anti-TNF-α			
200 mg	2	1	N / F / U ²
250 mg	1	-	N / F / U
300 mg	10	6	N / F / U
400 mg	8	2	N / F / U
450 mg	1	-	N / F / U
500 mg	-	1	N / F / U
Cirurgia no Trato Gastrointestinal			
Nenhuma	7	2	5
1 a 2	13	7	4
3 a 4	-	1	1
> 5	2	-	1

¹: mediana (valores mínimo e máximo).

²: N / F / U: Não Faziam Uso da terapia Anti-TNF- α .

Grupos: Intervenção Nutricional (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) e Comparação II (azatioprina).

4.2. Fenotipagem dos Linfócitos T

No grupo de Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + suplemento), as medianas das porcentagens dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no início, 8 e 16 semanas após a intervenção nutricional não apresentaram diferenças significativas. Da mesma maneira, não foram observadas diferenças para os grupos de Comparação I e II (Tabela 4 e Figura 4).

Os percentuais das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico não foram influenciados pela suplementação alimentar. Entretanto, ao comparar os valores observados entre o início e ao final da suplementação alimentar no grupo de Intervenção Nutricional, foi observada aumento no percentual de linfócitos TCD3⁺ ($p=0,013$, Teste de Wilcoxon).

4.3. Proliferação Linfocitária

Em relação à proliferação linfocitária das culturas não estimuladas, observou-se diferença significativa no percentual de linfócitos T CD3⁺ ($p=0,019$, Teste de Kruskal-Wallis) e na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ ($p=0,004$, Teste de Kruskal-Wallis) entre os pacientes e controles normais (Tabela 5 e Figura 5) e entre os três grupos de pacientes no início do estudo (IN, CI, CII) (Tabela 5 e Figura 6).

No grupo Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + suplemento) houve redução significativa na proliferação de linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de suplementação com as proteínas do soro enriquecidas com TGF- β ($p=0,033$, Teste de Friedman) (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 4: Percentual de linfócitos TCD3⁺ e suas subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺, no sangue periférico de pacientes com Doença de Crohn.

Grupos	Percentual de Linfócitos			
	Linfócitos Totais	T CD3 ⁺	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺
<i>Intervenção</i>				
Início	23,10 (8,7 a 57,1) ¹	58,85 (31,1 a 84,4)	65,00 (34,0 a 83,4)	28,10 (13,7 a 51,8)
8 semanas	23,55 (9,7 a 58,2)	66,60 (24,8 a 86,5)	64,95 (46,7 a 82,2)	29,70 (14,5 a 45,3)
16 semanas	25,35 (9,1 a 63,4)	67,65 (12,6 a 89,4)	63,40 (44,6 a 85,7)	28,20 (11,8 a 50,0)
<i>p²</i>	0,385	0,108*	0,700	0,804
<i>Comparação I</i>				
Início	32,10 (8,3 a 61,4)	66,05 (25,8 a 83,0)	67,30 (43,2 a 90,0)	26,65 (9,0 a 43,4)
16 semanas	34,35 (9,5 a 52,4)	70,40 (45,6 a 85,6)	64,20 (38,9 a 88,4)	30,20 (10,6 a 43,5)
<i>p³</i>	0,241	0,575	0,959	0 575
<i>Comparação II</i>				
	24,80 (18,5 a 49,1)	63,30 (25,8 a 79,5)	63,00 (35,7 a 84,6)	32,70 (13,2 a 62,2)
<i>p⁴</i>	0,248	0,576	0,585	0,174

* Valor de (p = 0,013 na comparação entre o início e o final da intervenção nutricional).

¹: Os valores foram expressos em mediana (mínimo e máximo).

²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (azatioprina + anti-TNF-α + Suplemento), (Teste de Friedman).

³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF-α), (Teste de Wilcoxon).

⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (anti-TNF-α + azatioprina + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF-α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis).

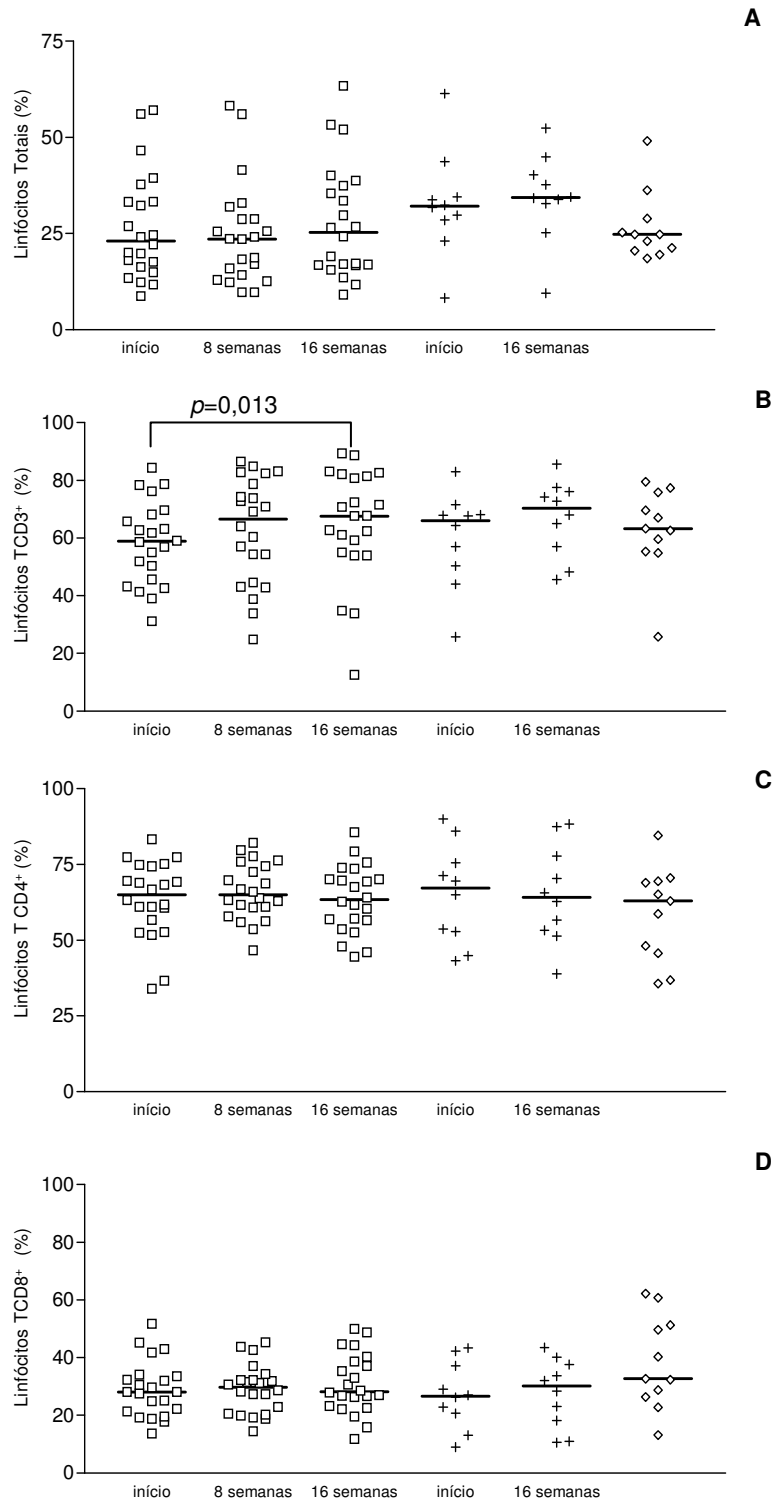


Figura 4: Percentual de linfócitos totais (A), TCD3 (B), TCD4 (C), TCD8 (D) em sangue de pacientes com Doença de Crohn, $\square$: intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), $+$: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), e $\diamond$: Comparação II (aza n=11).

Tabela 5: Proliferação espontânea de linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺ e TCRγδ em células mononucleares de sangue periférico, de pacientes com Doença de Crohn, nos grupos de Intervenção Nutricional, Comparação I, Comparação II e Controles Normais.

Grupo	Percentual de Linfócitos			
	T CD3 ⁺	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺	TCR γδ
<i>Espontâneo</i>				
Intervenção				
Início	4,70 (1,3 a 30,8) ¹	41,80 (14,2 a 92,3)	44,75 (4,4 a 74,3)	7,85 (0 a 76,9)
8 semanas	3,85 (1,5 a 24,7)	41,10 (5,3 a 77,9)	40,30 (7,8 a 85,2)	8,45 (0 a 62,0)
16 semanas	4,35 (0 a 36,0)	45,25 (0 a 80,8)	35,80 (0 a 61,8)	5,85 (0 a 59,0)
p²	0, 727	0, 956	0, 033	0, 923
Comparação I				
Início	3,75 (1,7 a 7,2)	38,15 (16,7 a 74,6)	38,50 (12,5 a 73,1)	24,50 (5,4 a 42,1)
16 semanas	4,90 (1,9 a 10,5)	41,95 (13,7 a 75,0)	25,70 (10,1 a 61,3)	14,25 (2,1 a 61,2)
p³	0,139	0, 575	0, 059	0, 959
Comparação II				
	8,20 (1,6 a 15,6)	30,30 (7,0 a 53,9)	15,80 (6,6 a 43,0)	5,70 (0,8 a 47,9)
p⁴	0, 019	0, 120	0, 004	0, 139
Controles Normais				
	6,67 (3,2 a 14,2)	50,5 (30,7 a 70,6)	31,6 (14,3 a 53,8)	7,5 (0,80a 13,6)
p⁵	0,037	0,208	0,035	0,343
p⁶	0,001	0,100	0,267	0,008
p⁷	0,367	0,003	0,008	0,584

¹: Mediana (mínimo e máximo); ²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção Nutricional (azatioprina + anti-TNF-α+ Suplemento), (Teste de Friedman); ³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF-α), (Teste de Wilcoxon); ⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (azatioprina + anti-TNF-α+ Suplemento), Comparação I (azatioprina +anti-TNF-α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis). Comparação controle normal com ⁵: Intervenção Nutricional, ⁶: Comparação I, ⁷: comparação II.

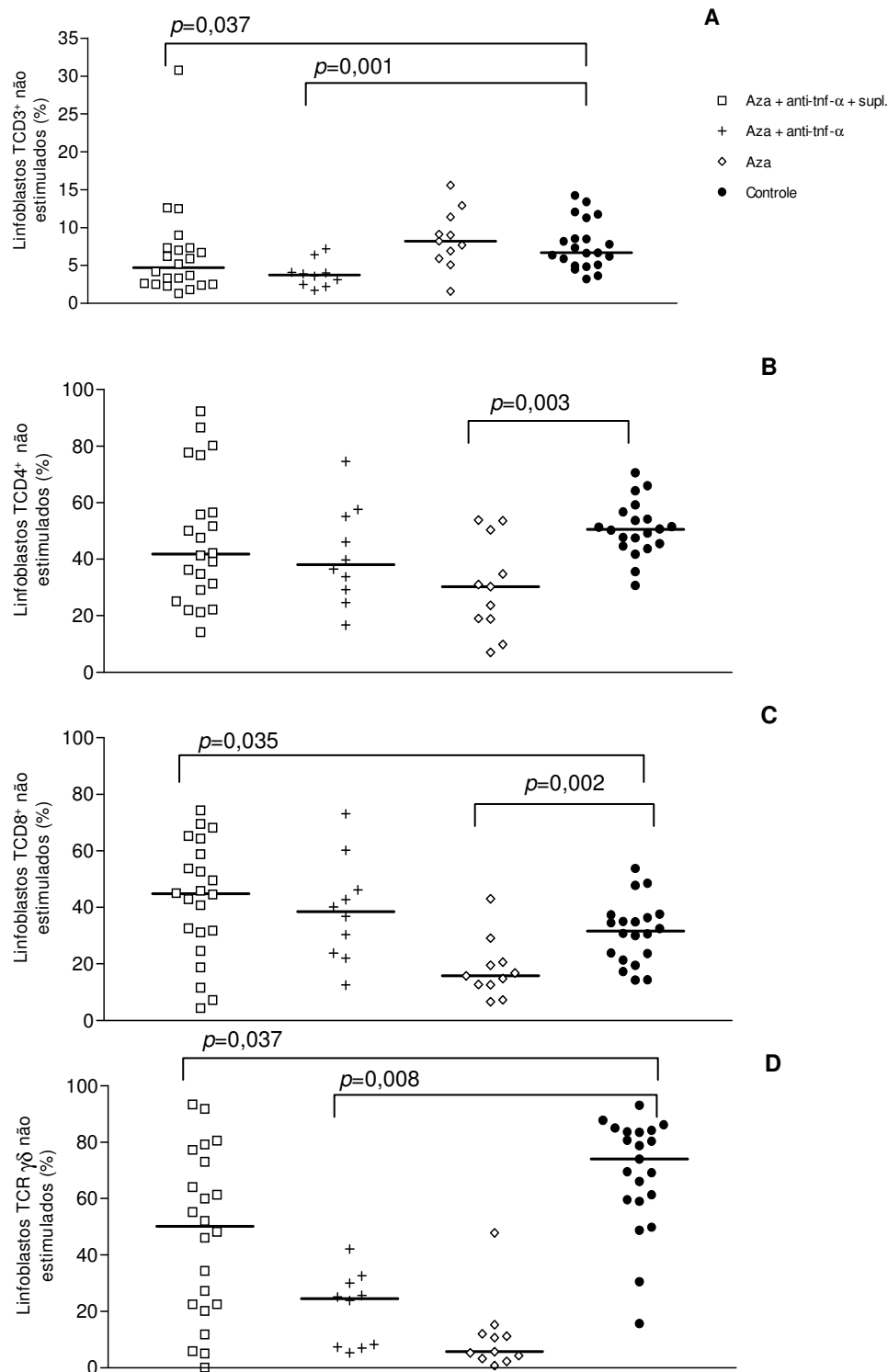


Figura 5: Proliferação linfocitária espontânea de cultura em células mononucleares, de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11) e ●: Controle normal (n=21).

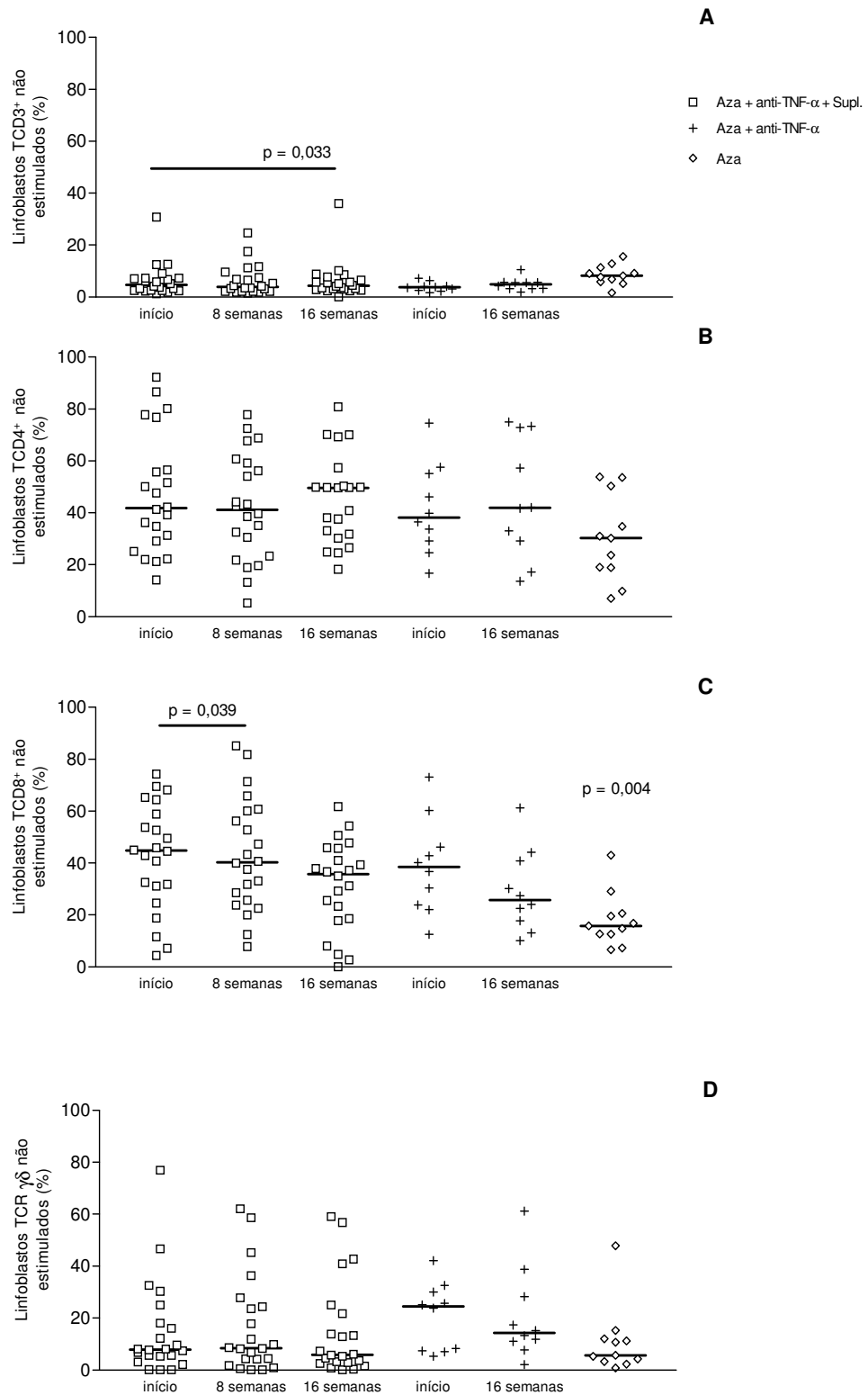


Figura 6: Proliferação linfocitária espontânea em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação II (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11 pacientes).

Na Tabela 6 e Figura 7 estão ilustrados a comparação entre os pacientes e o grupo controle normal em relação à proliferação de linfócitos TCD4+, TCD8 e TCR $\gamma\delta$ BCG específicos.

Nos grupos de Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + suplemento), Comparação I (aza + anti-TNF- α) e Comparação II (aza) as medianas iniciais dos linfoblastos BCG específicos não mostraram diferença significativa (Tabela 6 e Figura 8).

Na Figura 9 e na Tabela 6 estão ilustrados os valores referentes à proliferação inespecífica de linfócitos estimulados com PHA dos pacientes e controles normais.

Na Figura 10 e na Tabela 6 estão ilustrados os valores referentes à proliferação inespecífica de linfócitos estimulados com PHA, entre os três grupos de pacientes: Intervenção Nutricional, Comparação I e Comparação II. Contudo, a comparação das medianas dos linfoblastos PHA iniciais entre os grupos de intervenção, Comparação I e Comparação II mostrou diferença significativa ($p=0,006$, Teste de Kruskal-Wallis) entre eles, com medianas mais baixas no Comparação II (Tabela 6 e Figura 10).

Na comparação das medianas da proliferação de TCR $\gamma\delta$ estimulada por PHA, houve também redução significativa ($p=0,002$, Teste de Kruskal-Wallis) entre os tempos iniciais nos três grupos.

O percentual de linfoblastos CD4⁺ e CD8⁺ nas culturas não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA não mostrou diferenças significativas nos três grupos de pacientes com Doença de Crohn.

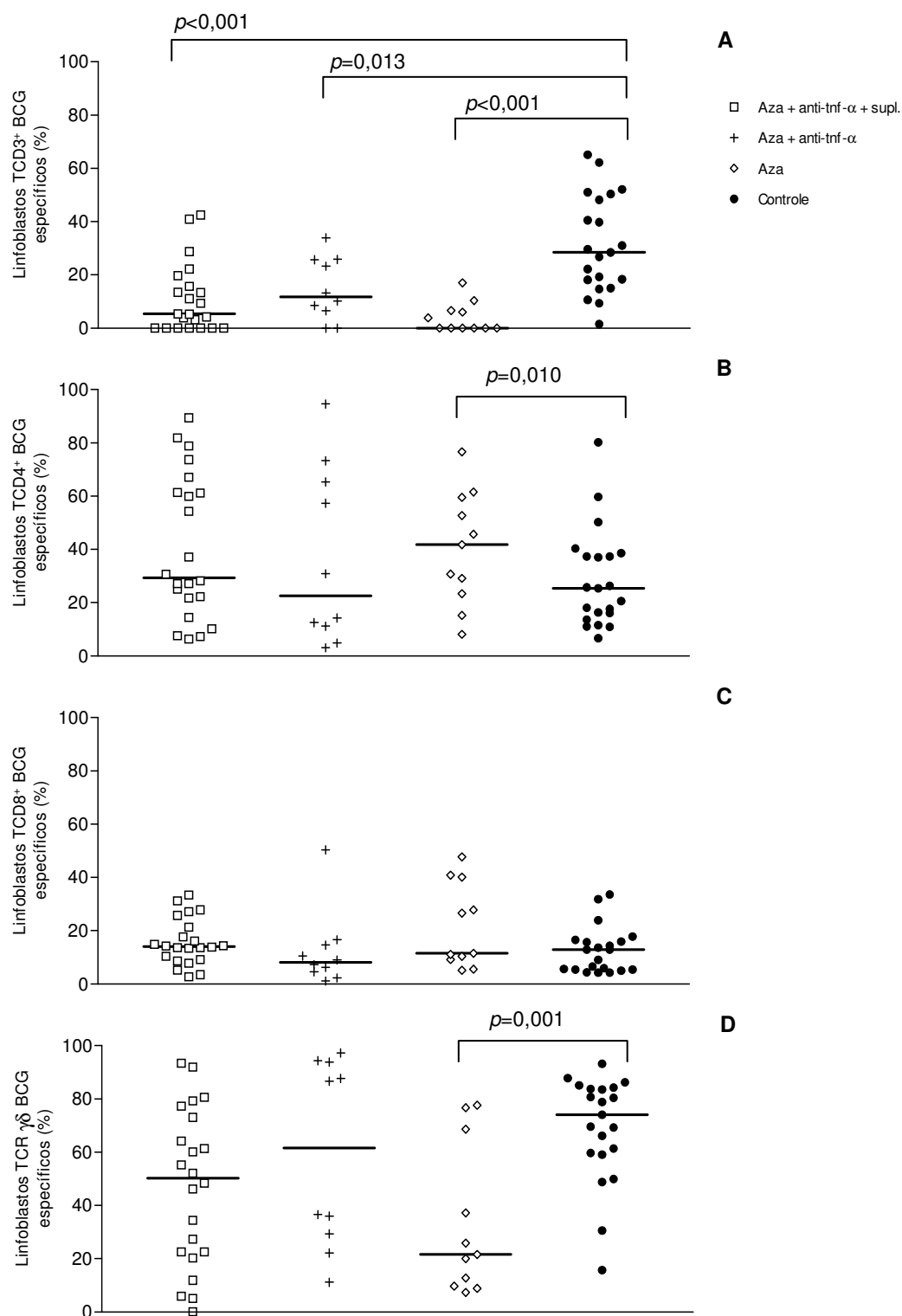


Figura 7: Proliferação linfocitária estimulada por BCG em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11) e ●: Controle Normal (n=21).

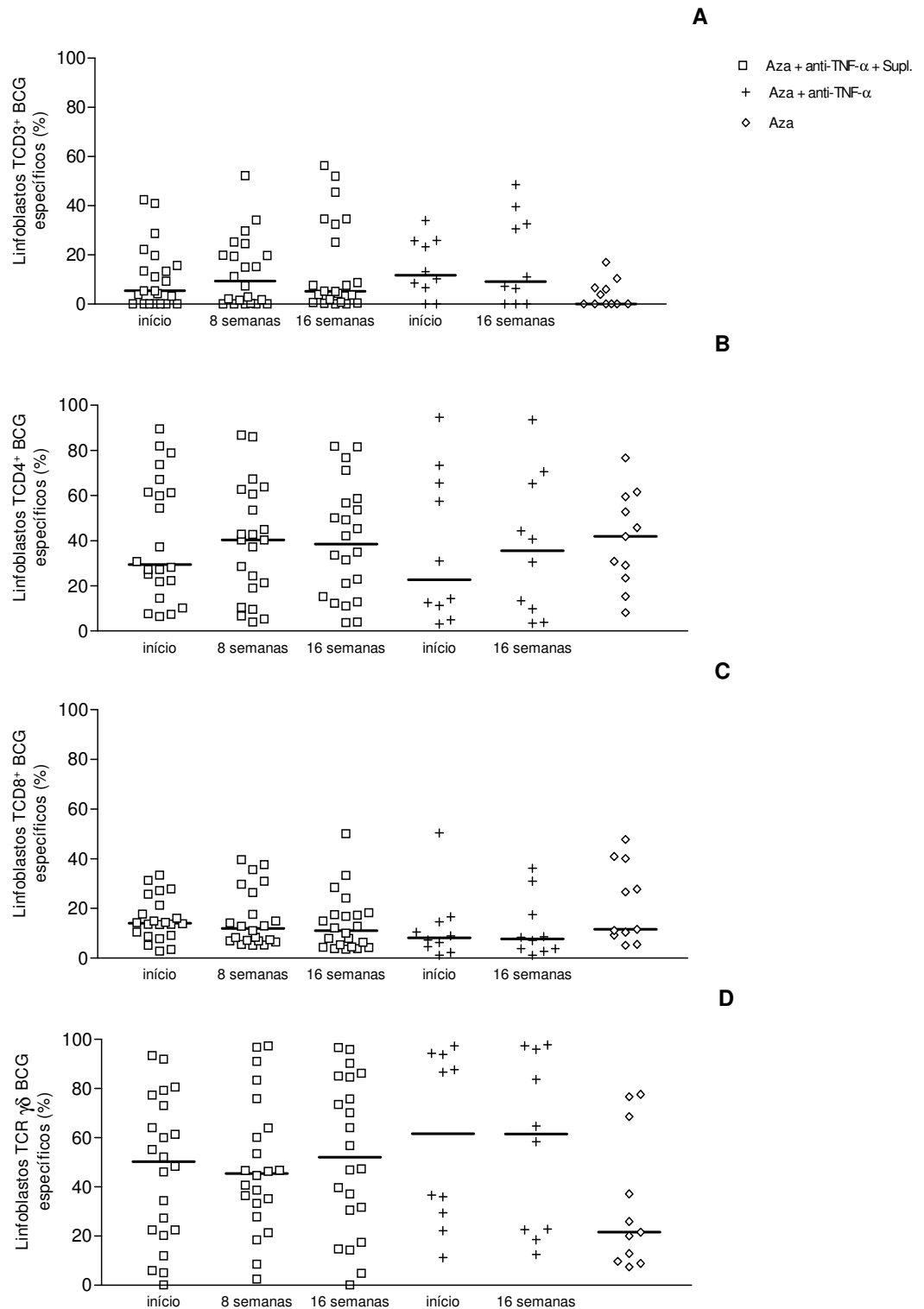


Figura 8: Proliferação linfocitária estimulada por BCG em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento, n=22), +: Comparação I (aza+anti-TNF- α , n=10) e ◇: grupo Comparação II (aza, n=11).

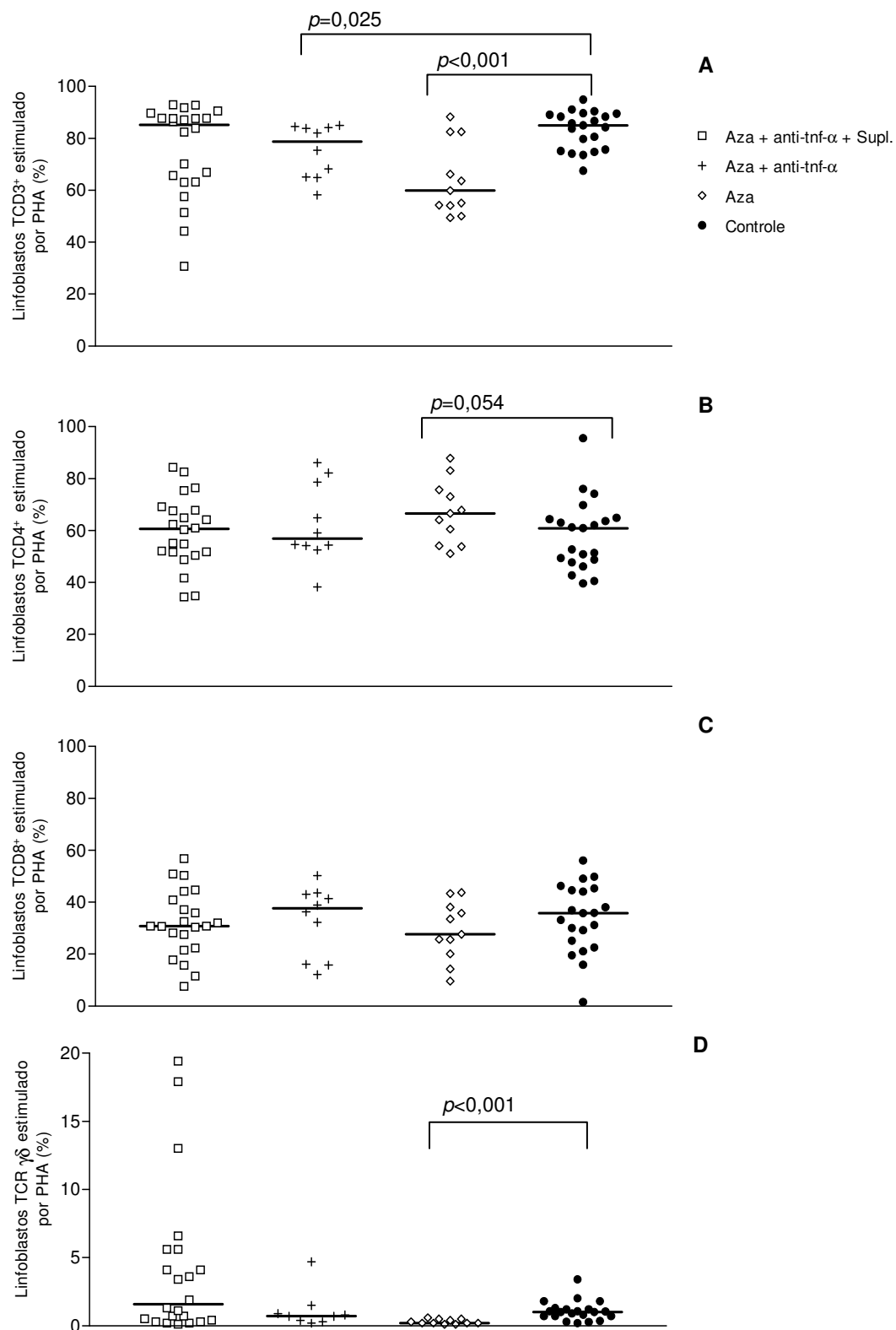


Figura 9: Proliferação linfocitária estimulada por PHA em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF-α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF-α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11) e ●: Controle Normal (n=21).

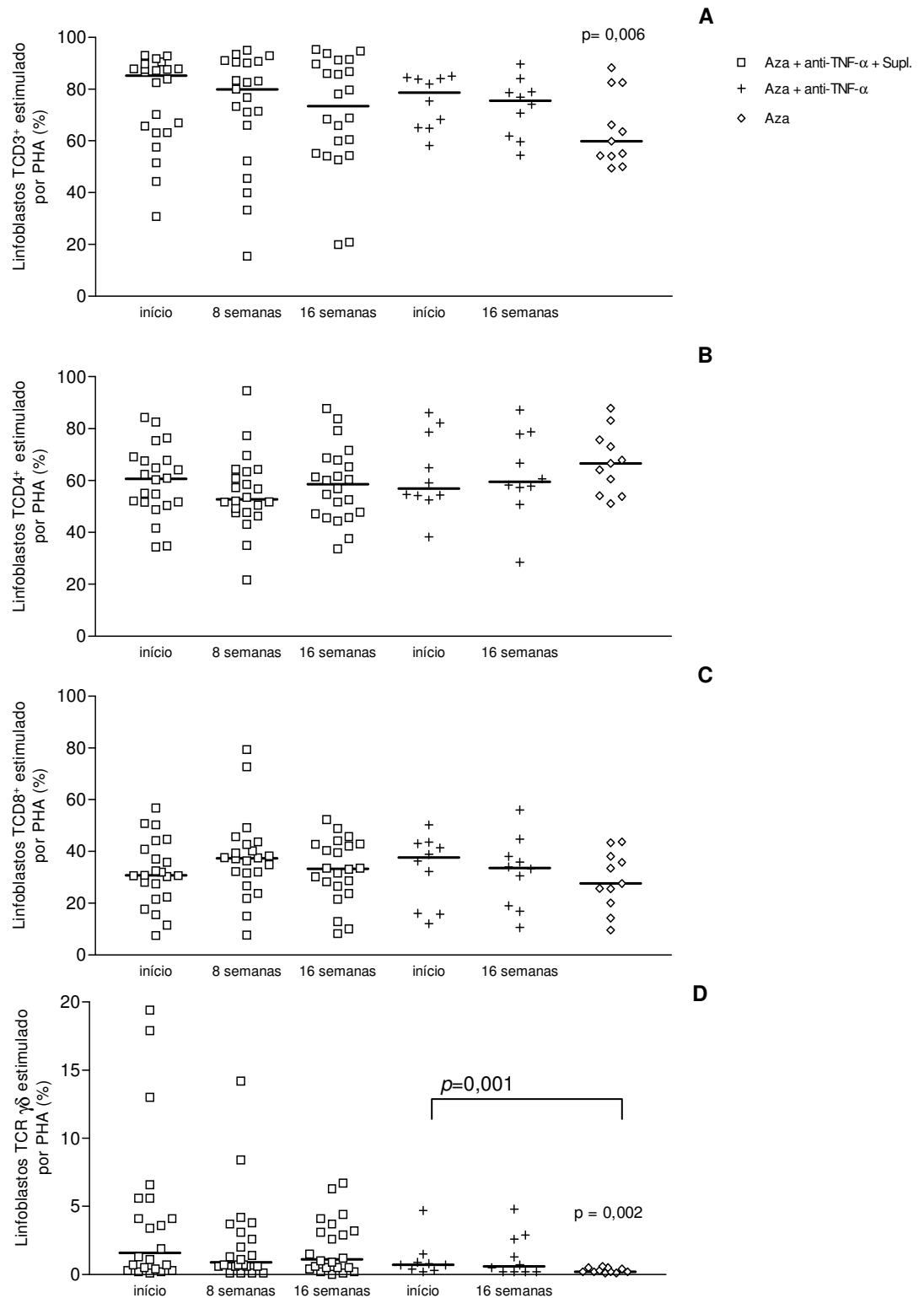


Figura 10: Proliferação linfocitária estimulada por PHA em cultura de células mononucleares de pacientes com Doença de Crohn, □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11).

Tabela 6: Proliferação estimulada por BCG e PHA de linfoblastos TCD4+, TCD8+, TCRγδ BCG em cultura de células mononucleares de sangue periférico dos pacientes com Doença de Crohn e do grupo Controles Normais.

Grupos	Percentual de Linfoblastos			
	Blastos Específicos	T CD4 ⁺	T CD8 ⁺	TCR γδ
Estimulado por BCG				
Intervenção				
Início	4,76 (0,0 a 42,45) ¹	29,35 (6,3 a 89,4)	14,00 (2,7 a 33,4)	50,20 (0,0 a 93,4)
8 semanas	9,29 (0,0 a 52,22)	40,20 (3,9 a 86,6)	11,90 (5,1 a 39,5)	45,45 (2,4 a 97,3)
16 semanas	5,17 (0,0 a 56,30)	38,50 (3,6 a 81,7)	11,05 (3,5 a 50,0)	52,05 (0,0 a 56,31)
p²	0,338	0,923	0,186	0,483
Comparação I				
Início	14,80 (1,5 a 29,3)	22,60 (3,1 a 94,6)	8,15 (1,1 a 50,4)	61,65 (11,2 a 97,3)
16 semanas	4,90 (1,9 a 10,5)	41,95 (13,7 a 75,0)	25,70 (10,1 a 61,3)	14,25 (2,1 a 61,2)
p³	0,537	0,838	0,838	0,799
Comparação II				
Início	0 (0 a 17,00)	41,80 (8,1 a 76,6)	11,50 (5,1 a 47,7)	21,60 (7,4 a 77,6)
p⁴	0,097	0,790	0,183	0,105
Controle	28,44 (1,51 a 65,12)	25,40 (6,6 a 80,2)	12,90 (4,1 a 33,5)	74,0 (15,7 a 93,1)
p⁵	< 0,001	0,189	0,239	0,113
p⁶	0,013	0,239	0,574	0,168
p⁷	< 0,001	0,010	0,950	0,001
Estimulado por PHA				
Intervenção				
Início	85,17 (30,73 a 92,93)	60,60 (34,4 a 84,3)	30,75 (7,5 a 56,8)	1,60 (0,1 a 19,40)
8 semanas	79,97 (15,35 a 94,99)	52,80 (21,7 a 94,6)	37,35 (7,7 a 79,4)	0,90 (0,1 a 14,2)
16 semanas	73,47 (19,84 a 95,29)	58,50 (33,6 a 87,8)	33,30 (8,3 a 52,3)	1,10 (0 a 6,7)
p²	0,651	0,664	0,554	0,455
Comparação I				
Início	78,68 (58,17 a 85,02)	56,85 (38,3 a 86,1)	37,60 (12,1 a 50,3)	0,70 (0,2 a 4,7)
16 semanas	75,53 (54,46 a 89,73)	59,45 (28,5 a 87,2)	33,65 (10,6 a 56,0)	0,60 (0,2 a 4,8)
p³	0,751	0,959	0,444	0,813
Comparação II				
Início	59,90 (49,46 a 88,24)	66,60 (51,1 a 87,9)	27,60 (9,6 a 43,7)	0,20 (0,1 a 0,6)
p⁴	0,006	0,400	0,647	0,002
Controle	85,6 (67,5 a 94,9)	60,9 (39,6 a 60,9)	35,8 (1,5 a 56,0)	1,0 (0,20 a 3,4)
p⁵	0,331	0,536	0,536	0,197
p⁶	0,025	0,386	0,884	0,307
p⁷	< 0,001	0,054	0,234	< 0,001

¹ : Os valores foram expressos em mediana (mínimo e máximo); ²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (aza + anti-TNF-α + Suplemento), (Teste de Friedman); ³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (aza + anti-TNF-α), (Teste de Wilcoxon); ⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (aza + anti-TNF-α + Suplemento), Comparação I (aza + anti-TNF-α) e Comparação II (aza), (Teste Kruskal-Wallis). Comparação do controle normal com ⁵: Intervenção Nutricional, ⁶: Controle I, ⁷: Controle II.

4.4. Produção de Citocinas

A Figura 11 ilustra os valores de concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, espontâneo, estimuladas por BCG ou fitohemaglutinina (PHA), dos pacientes com Doença de Crohn e o grupo Controles Normais.

Na Tabela 7 estão os valores de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, dos pacientes com Doença de Crohn e Controles Normais.

Na tabela 8 estão os valores de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por BCG e PHA, dos pacientes com Doença de Crohn e Controles Normais.

No grupo Comparação I (aza + anti-TNF- α) a concentração mediana da produção inicial de TNF- α foi 520,72 (150,77 a 1022,84) pg/mL, e ao final das 16 semanas foi 91,26 (7,82 a 836,22) ($p=0,022$, Teste de Wilcoxon) (Tabela 7 e Figura 12). E no grupo Comparação II (aza) a concentração mediana da produção de TNF- α foi 15,55 (0,0 a 54,00) pg/mL ($p<0,001$, Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 7 e Figura 12).

Tabela 7: Concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico não estimuladas, de pacientes com Doença de Crohn e Controles Normais.

Grupo	Produção de Citocinas (pg/mL)		
	TNF- α	IFN- γ	IL-6
<i>Espontânea</i>			
<i>Intervenção</i>			
Início	560,77 (36,77 a 1079,47) ¹	0 (0,0 a 42,60)	1313,34 (443,33 a 3861,44)
8 semanas	322,77 (0,0 a 1160,59)	0 (0,0 a 381,67)	1090,89 (481,89 a 2305,64)
16 semanas	526,56 (5,15 a 1020,03)	0 (0 a 0)	1177,34 (498,83 a 3521,14)
p ²	0,483	0,061	0,956
<i>Comparação I</i>			
Início	520,72 (150,77 a 1022,84)	0 (0 a 27,42)	900,86 (440,86 a 2424,80)
16 semanas	91,26 (7,82 a 836,22)	0 (0 a 0)	861,27 (463,27 a 2378,44)
p ³	0,022	0,317	0,721
<i>Comparação II</i>			
	15,55 (0 a 54,0)	0 (0 a 0)	818,42 (716,63 a 1000,70)
p ⁴	< 0,001	0,449	0,012
<i>Controle</i>			
	29,8 (6,9 a 378,6)	0 (0 a 0)	-
p ⁵	< 0,001	0,083	-
p ⁶	< 0,001	0,663	-
p ⁷	0,104	1	-

¹: Os valores foram expressos em mediana (mínimo e máximo); ²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), (Teste de Friedman); ³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α), (Teste de Wilcoxon); ⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis). Comparação do controle normal com ⁵: Intervenção Nutricional, ⁶: Controle I, ⁷: Controle II.

Resultados

A mediana da produção de TNF- α estimulada por BCG são apresentadas na Tabela 8 e Figura 12. Não foram encontradas diferenças significativas na produção de TNF- α entre os tempos e nos grupos.

Nas culturas estimuladas por PHA, foram observadas diferenças entre o início e ao final das 16 semanas no grupo Comparação I ($p=0,028$, Teste de Wilcoxon). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os outros grupos nas culturas estimuladas por PHA dos pacientes com DC. Porém, foi observada diferença entre os tempos iniciais dos três grupos ($p=0,002$, Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 8 e Figura 12).

No grupo de intervenção nutricional, a concentração mediana da produção de IFN- γ estimulada por PHA foi 507,61 (4,82 a 4066,28) pg/mL, após 8 semanas de suplementação foi 0,0 (0,0 a 232,34) pg/mL, e ao final das 16 semanas foi 256,58 (0,0 a 1179,55), com significativa redução ($p=0,002$, Teste de Friedman), (Tabela 8).

No grupo Comparação I a concentração mediana da produção inicial de IFN- γ estimulado com PHA foi 653,76 (41,71 a 1089,12) pg/mL, e ao final das 16 semanas foi 358,44 (0,0 a 739,32) pg/mL ($p=0,022$, Teste de Wilcoxon) (Tabela 8 e Figura 14).

No grupo Comparação II a concentração mediana da produção de IFN- γ estimulado com PHA foi 223,51 (0,0 a 778,47) pg/mL ($p=0,076$, Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 8 e Figura 14).

A Figura 13 ilustra os valores da concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, dos pacientes com Doença de Crohn e do grupo Controles Normais.

Tabela 8: Concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-6 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn e Controles Normais.

Grupo	Produção de Citocinas (pg/mL)		
	TNF- α	IFN- γ	IL-6
Estimulado por BCG			
Intervenção			
Início	743,49 (203,15 a 1423,96) ¹	33,35 (0 a 697,61)	2504,84 (745,13 a 7222,63)
8 semanas	848,41 (293,67 a 1251,60)	0 (0 a 381,67)	2436,28 (835,26 a 6894,05)
16 semanas	807,21 (0 a 1213,81)	31,59 (0,0 a 392,23)	4750,84 (1093,50 a 7188,90)
p ²	1,000	0,155	0,108
Comparação I			
Início	964,01 (304,53 a 1087,65)	102,20 (0 a 1062,66)	6744,32 (1115,56 a 6987,74)
16 semanas	815,71 (300,28 a 1088,97)	119,53 (0 a 967,06)	6729,23 (1043,67 a 7192,16)
p ³	0,646	0,674	0,508
Comparação II			
Início	751,48 (499,93 a 1028,38)	0 (0 a 611,71)	6794,00 (1495,58 a 7176,65)
p ⁴	0,388	0,216	0,707
Controle	5004,67 (1360,5 a 17125,2)	1349,6 (0,01 a 3644,8)	-
p ⁵	< 0,001	< 0,001	-
p ⁶	< 0,001	0,007	-
p ⁷	< 0,001	< 0,001	-
Estimulado por PHA			
Intervenção			
Início	601,35 (201,40 a 1216,85)	507,61 (4,82 a 4066,28)	2279,98 (709,34 a 7140,25)
8 semanas	381,180 (79,20 a 1540,93)	0,0 (0,0 a 232,34)	2331,90 (897,26 a 31202,94)
16 semanas	507,42 (0 a 1305,43)	256,58 (0,0 a 1179,55)	2287,57 (713,78 a 7146,88)
p ²	0,142	0,002	0,483
Comparação I			
Início	541,54 (191,95 a 1543,15)	653,76 (41,71 a 1089,12)	3723,05 (908,02 a 6777,23)
16 semanas	239,52 (101,25 a 808,68)	358,44 (0,0 a 779,32)	4079,71 (957,72 a 6895,66)
p ³	0,028	0,022	0,646
Comparação II			
Início	126,86 (72,06 a 513,46)	223,51 (0,0 a 778,47)	1465,11 (1258,84 a 1578,47)
p ⁴	0,002	0,076	0,033
Controle	548,86 (114,9 a 5731,3)	143,06 (0,01 a 1559,7)	-
p ⁵	0,528	0,006	-
p ⁶	0,306	0,012	-
p ⁷	0,001	0,755	-

¹: Mediana (mínimo e máximo); ²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), (Teste de Friedman); ³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α), (Teste de Wilcoxon); ⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis). Comparação do controle normal com ⁵: Intervenção Nutricional, ⁶: Controle I, ⁷: Controle II.

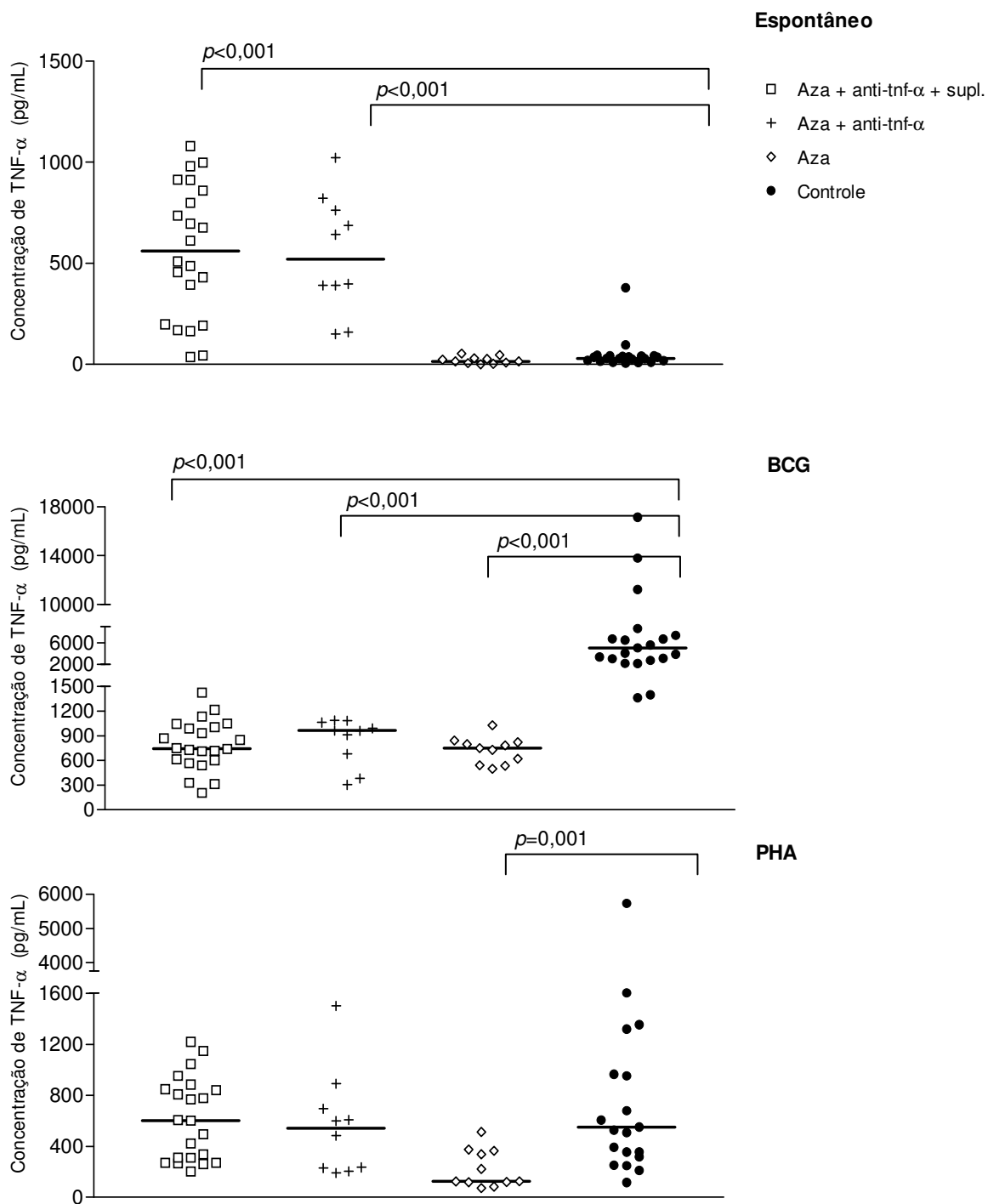


Figura 11: Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11), ●: Controles normais (n=21).

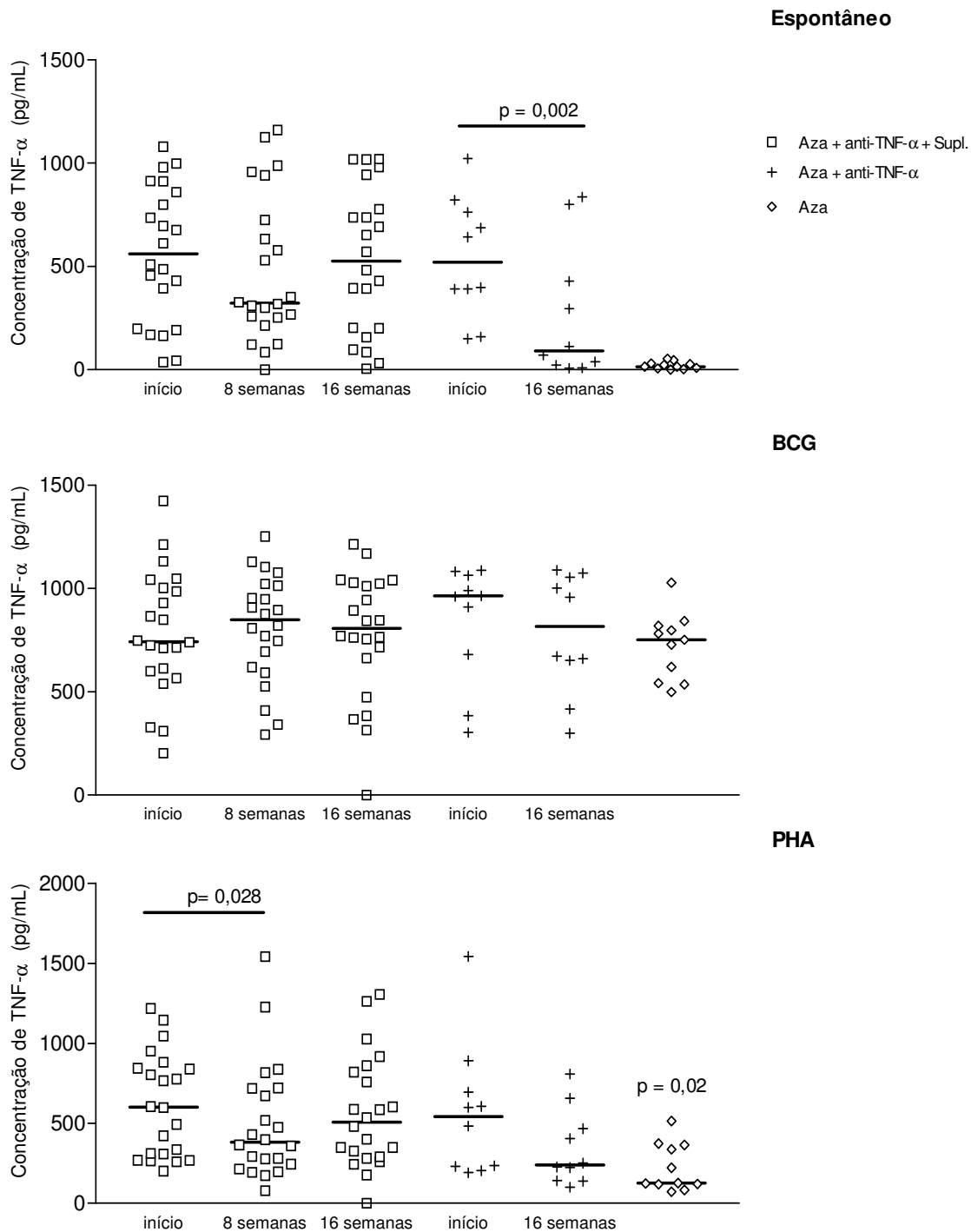


Figura 12: Concentração de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11).

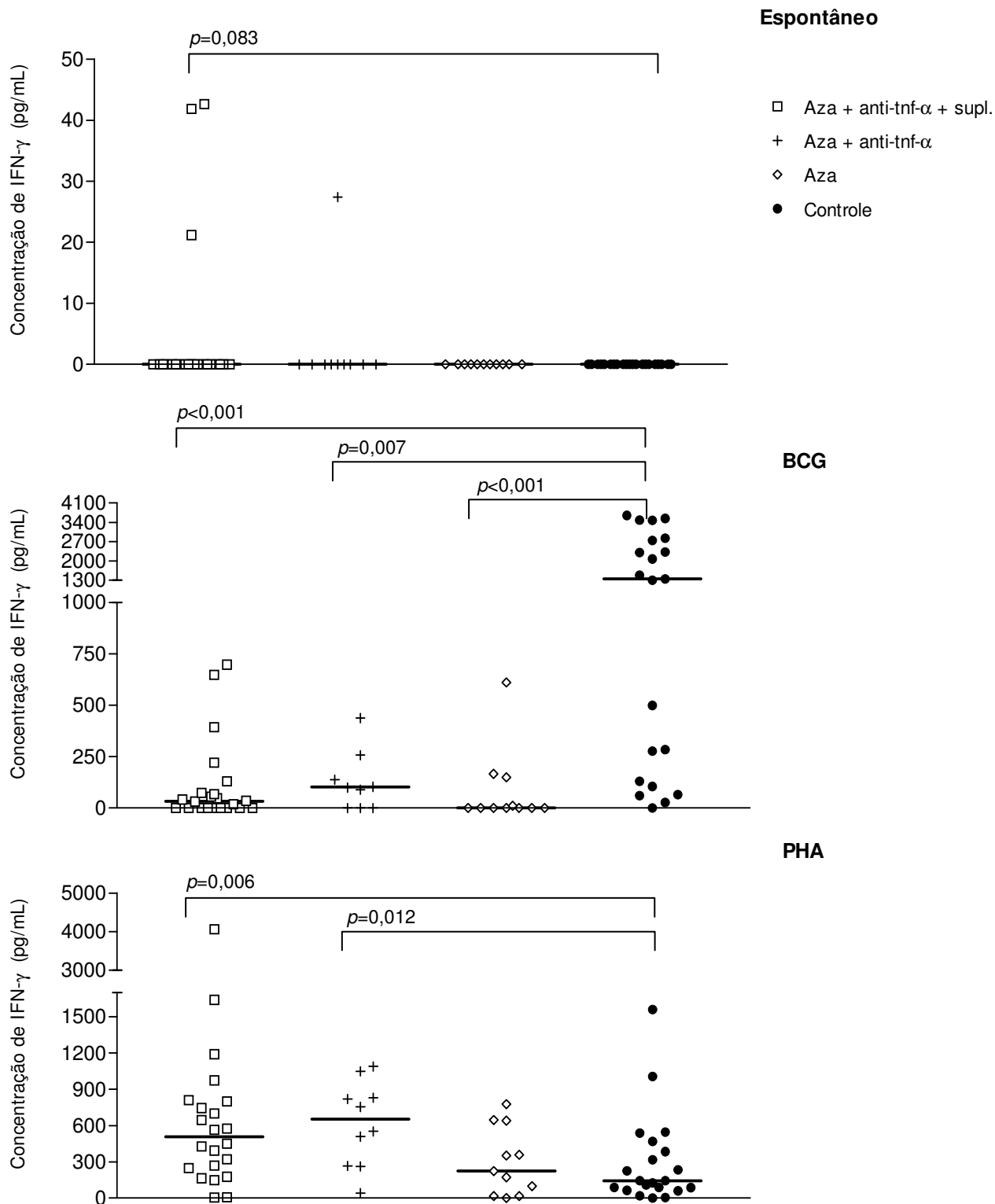


Figura 13: Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10), ◇: Comparação II (aza n=11), ●: Controle (n=21).

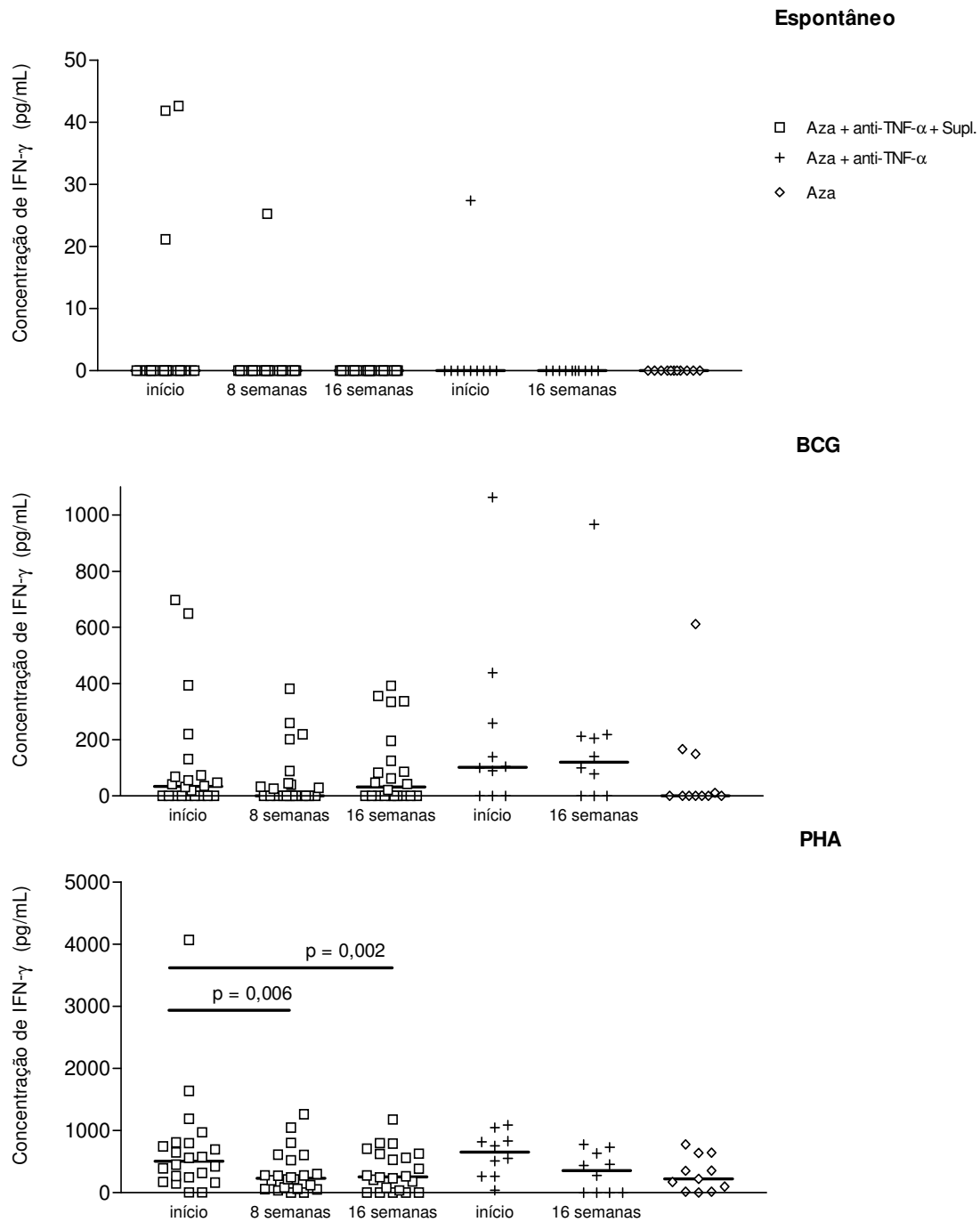


Figura 14: Concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11).

A mediana da produção de IL-6 espontânea é apresentada na Tabela 7. Não foram encontradas diferenças significativas na produção de IL-6 entre os tempos e nos grupos de pacientes (Tabela 7 e Figura 15). Entretanto foi encontrada diferença significativa entre os tempos iniciais dos três grupos ($p=0,012$, Teste de Kruskal-Wallis).

Também não foram encontradas diferenças significativas na produção de IL-6 estimuladas por BCG apresentadas na Tabela 8 e Figura 15.

Entretanto a mediana inicial da produção de IL-6 estimulada por PHA no grupo de intervenção nutricional foi 2279,98 (709,34 a 7140,25) pg/mL, após 8 semanas de suplementação nutricional foi 2331,90 (897,26 a 31202,94) pg/mL e ao final das 16 semanas de intervenção nutricional foi de 2287,57 (713,78 a 7146,88) pg/mL ($p=0,483$, Teste de Friedman) (Tabela 8 e Figura 15).

A concentração mediana da produção de IL-6 estimulada por PHA nos sobrenadantes de cultura dos pacientes com Doença de Crohn do grupo Comparação I foi 3723,05 (908,02 a 6777,23) pg/mL, e ao final das 16 semanas 4079,71 (957,72 a 6895,66) pg/mL ($p=0,646$, Teste de Wilcoxon) (Tabela 8 e Figura 15). E no grupo Comparação II a concentração mediana da produção de IL-6 foi 1465,11 (1258,84 a 1578,47) pg/mL ($p=0,033$, Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 8 e Figura 15). Essa significância é baseada na mediana dos três grupos nos tempos iniciais.

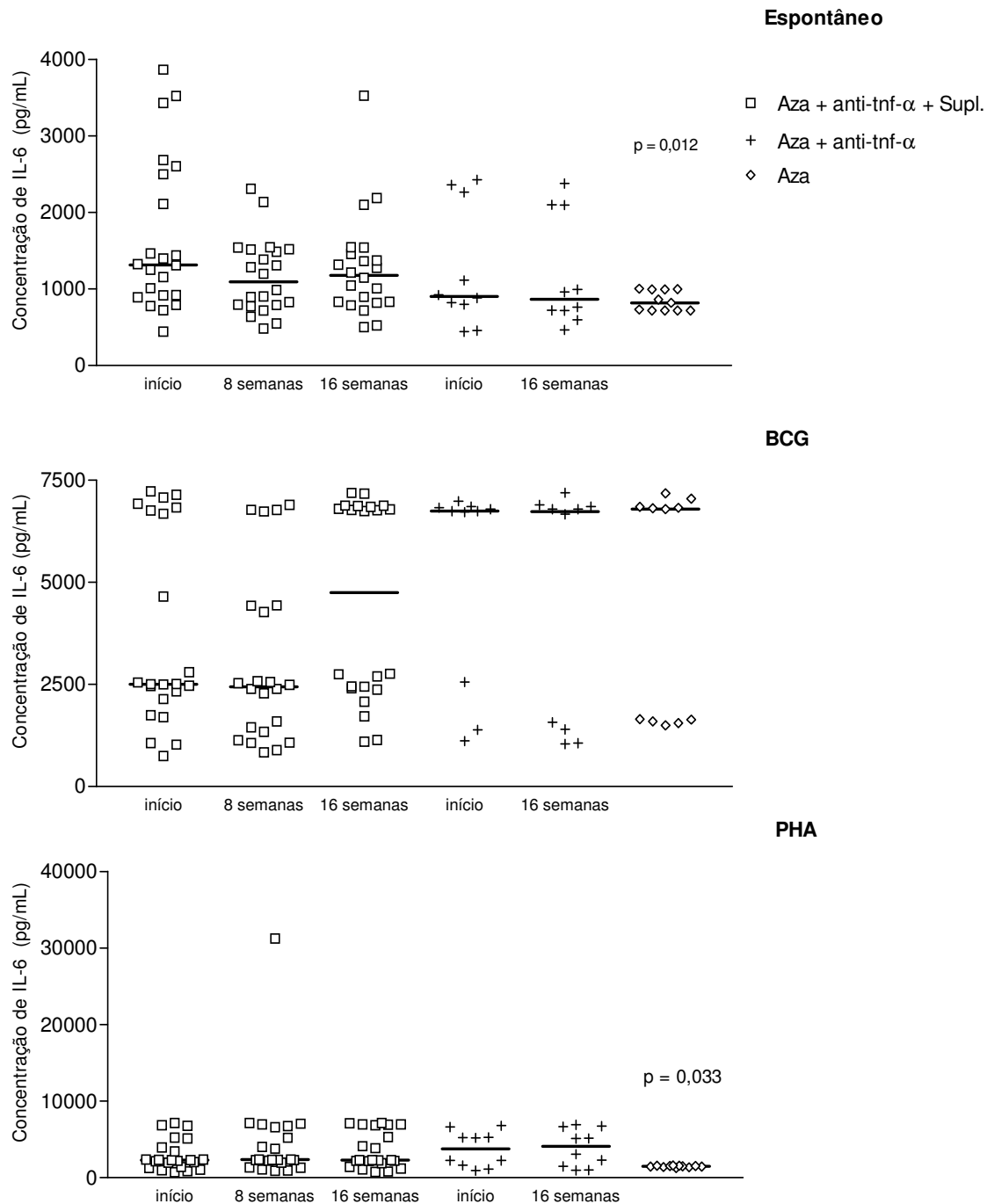


Figura 15: Concentração de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares, espontâneo, estimuladas por BCG ou PHA, de pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10) e ◇: Comparação II (aza n=11).

As concentrações de TGF- β 2 dosadas em soro e plasma dos pacientes estão distribuídos na tabela 9 e figura 16. Os valores de TGF- β 3 no soro e no plasma estão na Tabela 10 e figura 17.

Tabela 9: Concentração de TGF- β 2 no soro e no plasma de pacientes com Doença de Crohn.

Grupo	Produção de TGF- β 2 (pg/mL)	
	Soro	Plasma
Intervenção		
Início	0 (0 a 176,16) ¹	0 (0 a 124,41)
8 semanas	0 (0 a 186,43)	72,19 (0 a 280,30)
16 semanas	0 (0 a 351,81)	0 (0 a 289,27)
p²	0,076	0,011
Comparação I		
Início	13,70 (0 a 71,69)	0 (0 a 108,97)
16 semanas	0 (0 a 78,25)	0 (0 a 94,68)
p³	0,225	0,655
Comparação II		
	0 (0 a 68,78)	0 (0 a 26,0)
p⁴	0,387	0,108

¹: Teste de Friedman. Os valores foram expressos em mediana, mínimo e máximo.

²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), (Teste de Friedman).

³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α), (Teste de Wilcoxon).

⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (anti-TNF- α + azatioprina + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis).

A concentração mediana da produção de TGF- β 2 dosada em plasma de sangue periférico total dos pacientes com Doença de Crohn do grupo de intervenção nutricional no início foi 0,0 (0,0 a 124,41) pg/mL, após 8 semanas de suplementação foi 72,19 (0,0 a 280,30) pg/mL, e ao final das 16 semanas de intervenção nutricional foi 0,0 (0,0 a 289,27) ($p=0,011$, Teste de Friedman) (Tabela 9 e Figura 16). O aumento significativo já foi observado 8 semanas após de intervenção nutricional ($p=0,009$, Tese de Wilcoxon). Entretanto, nos grupos Comparação I e Comparação II não foi observada diferença significativa na produção de TGF- β 2 (Tabela 9 e Figura 16).

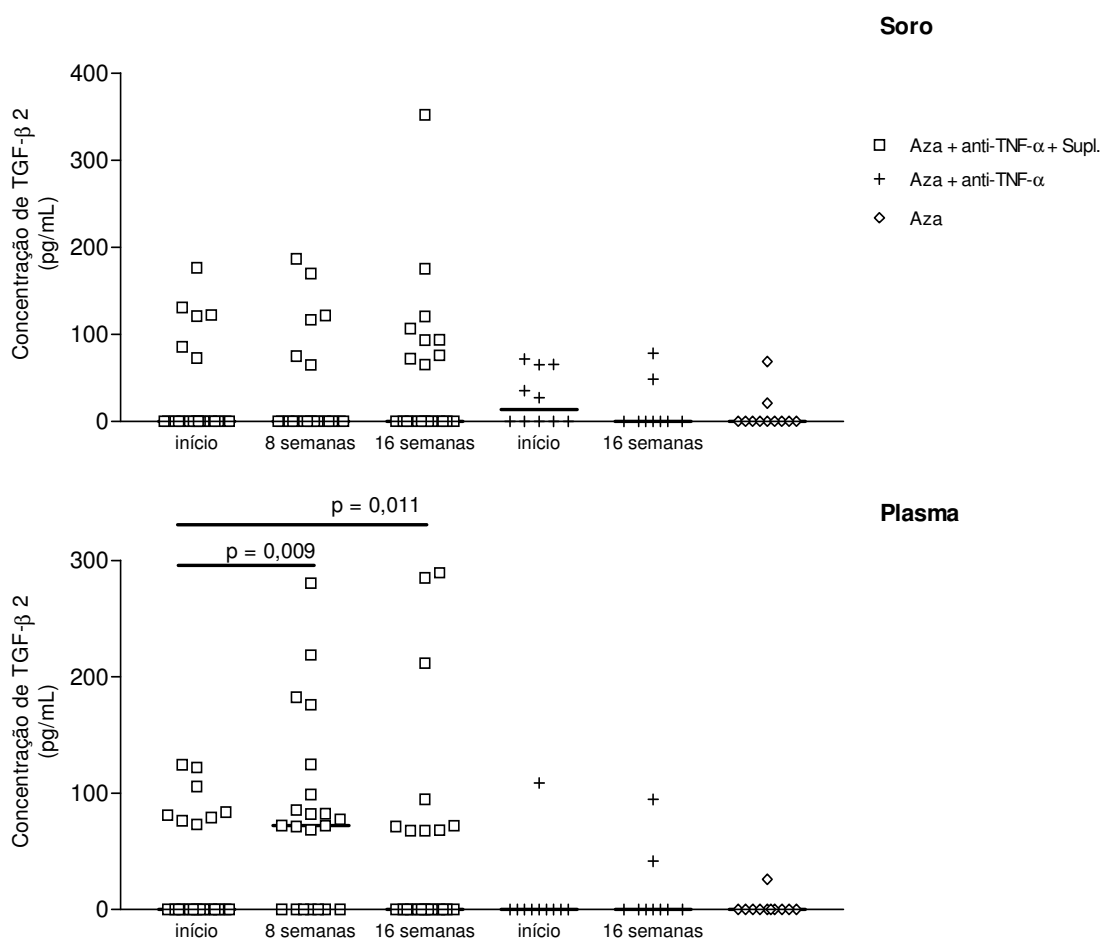


Figura 16: Concentração de TGF- β 2 no soro ou plasma dos pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22 pacientes), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10 pacientes) e ◇: Comparação II (aza n=11 pacientes).

Tabela 10: Concentração de TGF- β 3 no soro e no plasma de pacientes com Doença de Crohn.

Grupo	Produção de TGF- β 3 (pg/mL)	
	Soro	Plasma
Intervenção		
Início	0 (0 a 402,15)	0 (0 a 248,61)
8 semanas	0 (0 a 731,26)	31,75 (0 a 774,95)
16 semanas	0,0 (0 a 1128,46)	15,99 (0 a 412,33)
p^2	0,792	0,238
Comparação I		
Início	0 (0 a 67,41)	17,33 (0,0 a 147,87)
16 semanas	0 (0 a 40,58)	17,36 (0 a 96,77)
p^3	0,273	0,600
Comparação II		
	0 (0 a 49,31)	0 (0 a 96,62)
p^4	0,950	0,508

¹: Os valores foram expressos em mediana (mínimo e máximo).

²: Comparação entre os tempos no Grupo de Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), (Teste de Friedman).

³: Comparação entre os tempos no Grupo Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α), (Teste de Wilcoxon).

⁴: Comparação entre os tempos iniciais dos Grupos: Intervenção (azatioprina + anti-TNF- α + Suplemento), Comparação I (azatioprina + anti-TNF- α) e Comparação II (azatioprina), (Teste Kruskal-Wallis).

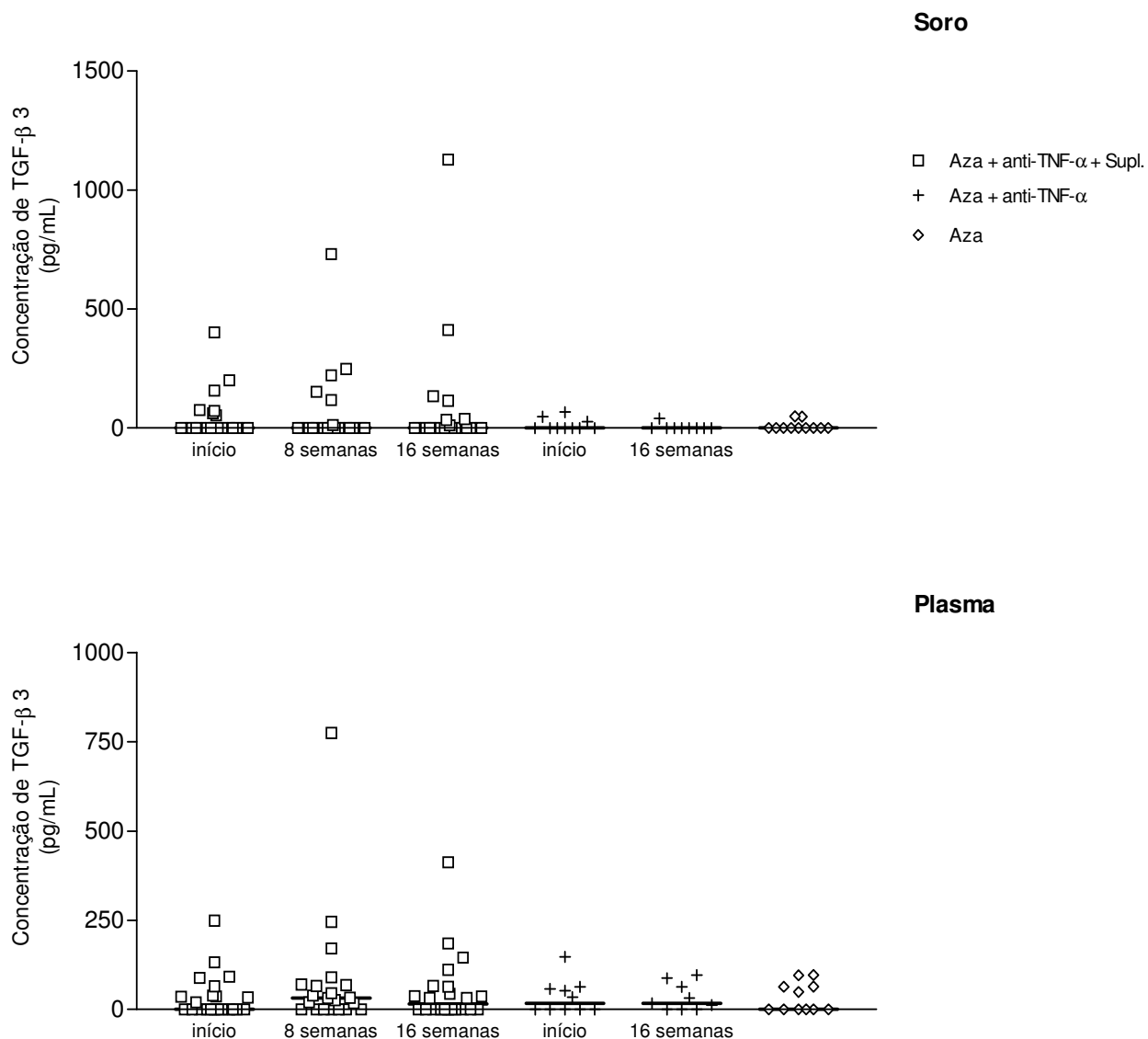


Figura 17: Concentração de TGF- β 3 no soro ou plasma dos pacientes com Doença de Crohn: □: Intervenção Nutricional (aza + anti-TNF- α + Suplemento n=22 pacientes), +: Comparação I (aza + anti-TNF- α n=10 pacientes) e ◇: Comparação II (aza n=11 pacientes).

4.5. Resumo dos Resultados

I. Em relação aos linfócitos T no sangue periférico, nos três grupos de pacientes com Doença de Crohn, Intervenção Nutricional (IN: aza + anti-TNF- α + suplemento), Comparação I (CI: aza + anti-TNF- α) e Comparação II (CII: aza), observamos que:

1. Não houve diferença nos percentuais de linfócitos T entre os pacientes com DC.
2. A suplementação nutricional aumentou o percentual de linfócitos T CD3.

II. Em relação à proliferação não estimulada de TCD3, TCD4, TCD8, TCR $\gamma\delta$, observamos que:

1. A intervenção com suplemento nutricional (IN) reduziu de modo significativo o percentual de linfoblastos TCD8+ ($p=0,033$), após 8 e 16 semanas de intervenção.
2. No grupo IN o percentual de linfoblastos TCD8+, na fase inicial, foi mais elevado do que no grupo CII ($p=0,004$)
3. No grupo CII o percentual de linfoblastos TCD3 foi maior ($p=0,019$) do que no grupo IN e de TCD8 foi menor ($p=0,04$) do que no grupo IN.
4. Houve diferença significativa no percentual de linfoblastos TCD3 iniciais entre os grupos de controles normais com IN (0,037), CI (0,001). O grupo CII não mostrou diferença para TCD3+ mas para TCD4($p=0,003$) e TCD8 ($p=0,008$) que estavam mais baixos do que os normais, indicando que TCD3 estava próximo do normal, mas TCD4 e TCD8 estavam mais baixos do que os normais.
5. No grupo CI o percentual de linfoblastos TCR $\gamma\delta$ foi maior do que no grupo normal ($p=0,008$).

III. Em relação à proliferação de TCD3, TCD4, TCD8, TCR $\gamma\delta$ estimulada por BCG observamos que:

1. A suplementação nutricional não influenciou a proliferação TCD3, TCD4, TCD8 e TCR $\gamma\delta$ BCG específica.
2. Linfoblastos TCD3 BCG específico foi significativamente mais baixo nos grupos IN ($p<0,001$) CI ($p<0,013$) CII ($p<0,001$) do que no grupo normal.
3. No grupo CII, o percentual de linfoblastos TCD4 BCG específico foi significativamente mais alto ($p<0,01$) e de TCR $\gamma\delta$ ($p=0,001$) mais baixo do que no grupo normal.

IV. Em relação à proliferação de TCD3, TCD4, TCD8, TCR $\gamma\delta$ estimulada por PHA observamos que:

1. A suplementação nutricional não influenciou a proliferação TCD3, TCD4, TCD8 e TCR $\gamma\delta$ PHA inespecífica.
2. Linfoblastos TCD3 foi significativamente mais baixo nos grupos CI ($p=0,025$) e CII ($p<0,001$) do que no grupo normal.
3. O grupo CII apresentou linfoblastos TCD3 mais baixo do que nos grupos IN e CI ($p=0,0006$) e dos normais ($p<0,001$). Também, TCR $\gamma\delta$ foi mais baixo do que nos grupos IN e CI ($p=0,002$) e controle normal ($p<0,001$).

V. Em relação à secreção de TNF- α espontânea, estimulada por BCG e por PHA, observamos que:

1. A suplementação nutricional não influenciou a secreção de TNF- α espontânea, estimulada por BCG nem por PHA.
2. Embora os pacientes dos grupos IN ($p<0,001$) e CI ($p<0,001$) apresentassem TNF- α espontânea com valores iniciais mais altos do que os controles normais, não se observaram diferença significativa entre a secreção de TNF- α espontânea, com a estimulada por BCG nem por PHA

entre os pacientes dos três grupos. Indicando baixa resposta de secreção de TNF- α ao estímulo com BCG, talvez pelo uso de anti-TNF- α e aza nos pacientes.

3. No entanto, houve diferença altamente significativa quando se compara entre os controles normais, a secreção de TNF- α espontânea e estimulada com PHA com a estimulada por BCG, indicando a elevada resposta ao BCG.
4. O grupo CI reduziu ($p=0,022$) os valores de TNF- α espontânea após 16 semanas de seguimento.
5. O grupo CII apresentou baixos valores ($p<0,001$) de TNF- α espontânea quando comparado aos grupos IN e CI e similar aos controles normais.

VI. Em relação à secreção de IFN- γ espontânea, estimulada por BCG e por PHA, observamos que:

1. A suplementação nutricional reduziu a secreção de IFN- γ estimulada por PHA.
2. Em relação ao grupo controle normal, os pacientes dos 3 grupos apresentaram acentuada redução na produção de IFN- γ estimulada por BCG ($p<0,001$) mas, elevados valores de IFN- γ estimulada por PHA.
3. A redução acentuada para produção de IFN- γ por BCG nos pacientes pode ser resultado do uso de aza e de anti-TNF- α .

VII. Em relação à secreção de IL-6 espontânea, estimulada por BCG e por PHA, observamos que:

1. A suplementação nutricional não influenciou a secreção de IL-6 espontânea, estimulada por BCG nem por PHA.
2. Foram observados valores muito elevados de IL-6 espontânea nos grupos IN e CI e mais baixos no grupo CII ($p=0,012$) e também para IL-6 estimulada com PHA ($p=0,033$). O CII mostra controle na secreção espontânea e estimulada por PHA.

3. Diferente da $\text{TNF-}\alpha$ houve acentuada resposta na secreção de IL-6 estimulada com BCG e com PHA em relação à espontânea, indicando que ela é independente do circuito de $\text{TNF-}\alpha$.
4. Os valores de IL-6 espontâneo e estimulado por BCG são muito elevados, indicando que o suplemento, o anti- $\text{TNF-}\alpha$ e aza não conseguem reduzir esses valores.

VIII. Em relação à secreção de $\text{TGF-}\beta 2$ no soro e no plasma:

A suplementação interferiu nos valores de $\text{TGF-}\beta 2$ no plasma com diferença estatística.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se, no sangue periférico, o equilíbrio Th1/Th2, examinando *in vitro* a proliferação espontânea e estimulada com BCG e PHA de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ e TCR $\gamma\delta$ e a secreção de IFN- γ , TNF- α , e IL-6 no sobrenadante das culturas. TGF- β foi avaliada no plasma e no soro desses pacientes. Havia três grupos de pacientes. O grupo de intervenção com o suplemento sob terapia com azatioprina e anti-TNF- α a cada 8 semanas, e o grupo sem intervenção com suplemento, mas em uso da mesma terapia de medicamentos, e um terceiro grupo apenas com azatioprina. O grupo de pacientes com DC avaliados nesse estudo possuía características clínicas variáveis embora o Índice de atividade da Doença de Crohn estivesse abaixo de 160. (dados cedidos por Pinto EACL e Davanço T). O grupo de Intervenção Nutricional (IN aza + anti-TNF- α + Suplemento) com mediana, valor mínimo e máximo de IADC 91 (38 a 162)%, o grupo Comparação I (CI aza + anti-TNF- α) IADC 89 (51 a 152)% e grupo Comparação II (CII aza) IADC 58 (43 a 74)%.

O tratamento convencional da DC consiste de corticoides, aminossalicilatos e agentes imunossupressores tais como azatioprina ou ciclosporina, cujo alvo é o processo inflamatório certamente mais amplo porém, são inefetivos em um subgrupo de pacientes (77).

Muitas terapias com biológicos estão em investigação, mas o único correntemente licenciado é o anti-TNF- α , um anticorpo quimérico IgG1 para TNF- α . Dois terços dos pacientes com doença crônica ativa resistente aos corticosteroides e outros imunossupressores respondem ao anti-TNF- α , e uma proporção similar de pacientes com fístula (primariamente perianal) responde 50% de cura das fístulas, pelo menos superficialmente (41).

As reações à infusão do anti-TNF- α ocorrem ocasionalmente e são mediadas, pelo menos em parte, por anticorpos anti-anti-TNF- α que podem ser, também, responsáveis pela perda de resposta à droga. Altos títulos de anticorpos podem ser prevenidos tanto pela aplicação regular a cada 8 semanas ou por terapia concomitante com azatioprina (41). Esse regime foi o adotado para os

pacientes dos grupos IN e CI.

Hanauer (43) sugere que a terapia de manutenção com uma infusão a cada 8 semanas mantém a resposta, mas terapia episódica (infusões subsequentes quando a doença recai) promove quase o mesmo bom resultado durante o seguimento de um ano após a indução inicial. Contudo, ainda ocorrem recidivas sob terapia regular de manutenção.

Efeitos colaterais do anti-TNF- α são incomuns, mas há preocupações com ativação de tuberculose latente e aparecimento de anticorpos para DNA (10-15%) com manifestações ocasionais de síndrome lupus e possivelmente malignidade. Estão relatados raros casos de linfomas de células T hepatoesplênico em pacientes com DC e artrite reumatóide sob terapia também com azatioprina. Foram relatados, também, linfomas não Hodgkin.

Quase todos os pacientes do presente estudo foram submetidos à cirurgia. Durante o curso da DC, 75 - 85% dos pacientes necessitam, de pelo menos, uma cirurgia. As principais indicações são: estenose causando sintomas obstrutivos, falha na resposta ao tratamento, fístulas e doença perianal. A ressecção deve ser limitada para preservar o máximo de intestino normal à macroscopia. Derivação de passagem deve ser evitada porque há elevado risco de recorrência e pode ser complicado pelo super crescimento bacteriano e mal absorção.

Consequentemente, é provável que os fatores etiológicos predominantes, e, portanto, os alvos terapêuticos mais efetivos, diferem entre os pacientes com DC, podendo ser constituído subpopulações de pacientes. Contudo, as terapias imunossupressoras correntes (azatioprina, metotrexate, glicocorticoides e anticorpos anti-TNF- α ou anti-integrina- α) são de efetividade variável e não focalizam a via TCD4+ efetora específica (78).

Um aspecto cardinal da DC é a presença da inflamação crônica da mucosa. Os tipos de células que direcionam essa resposta inflamatória e por qual

estímulo ela é desencadeada constituem os desafios para o entendimento da sua fisiopatologia. Contudo, os estudos de observação e de resposta terapêutica revelam grande heterogeneidade com respeito à atividade celular e resposta ao tratamento. Isso pode refletir tanto a heterogeneidade entre os pacientes em relação à biologia da doença ou heterogeneidade com relação ao curso da doença de um paciente em diferentes momentos. Com essa premissa em mente, foram considerados critérios de inclusão que minimizassem essa heterogeneidade de resposta terapêutica entre os pacientes. Por essa razão, o critério da presente casuística foi incluir pacientes sob o mesmo esquema terapêutico e um grupo como o CII que estava na fase estável da doença.

Entre os pacientes com DC, os percentuais de linfócitos T foram semelhantes, mas o percentual de linfoblastos TCD3 no grupo CII foi maior ($p=0,019$) e de TCD8 menor ($p=0,04$) do que no grupo IN, justificando porque o grupo CII estava fora do tratamento com anti-TNF- α e recebiam apenas aza. Os grupos IN e CI apresentaram mais semelhanças nesses parâmetros.

Recentemente, foi relatado que os pacientes com DC compartilham um fenótipo comum que é a resposta imune alterada para infecção bacteriana. Avanços da genética e da genômica apontam que a lesão funcional primária na patogênese da DC está mais para imunodeficiência do que para autoimunidade.

As teorias prevalentes advogam um papel central para disfunção de T na patogênese da DC e, mais recentemente, o foco está na deficiência do sistema imune inato. A confirmação de defeitos na inflamação aguda nesses pacientes seguida pela identificação de múltiplos variantes genéticos associados com susceptibilidade à doença têm centrado as anormalidades nos fagócitos. A hipótese explica as manifestações clínicas e patológicas da DC e considera agentes microbianos, permeabilidade da mucosa e disfunção de células T como fatores etiológicos. Não seria qualquer patógeno que faria surgir a doença de Crohn, mas a presença de número suficiente de microrganismos viáveis para superar a resposta inflamatória inicial e provocar uma reação granulomatosa com

ativação secundária de T (20).

Assim, hoje considera-se que falha genética de clareamento bacteriano ao invés de taxas de infecção elevada, pode ser o marcador do processo subjacente da DC mais do que um evento patogênico primário. As rupturas da célula epitelial intestinal e da camada de muco contribuem para aumentar o número de bactérias que podem ganhar acesso aos tecidos subjacentes. Influências do ambiente podem agir sinergisticamente com fatores herdados para atenuar na resposta inflamatória aguda.

Nesse contexto de imunodeficiência, os pacientes com DC constituíram um grupo significativamente diferente do grupo controle normal nos parâmetros de proliferação celular BCG específico e secreção de TNF- α e IFN- γ estimulados com BCG. Linfoblastos TCD3 BCG específico foram significativamente mais baixos nos grupos IN ($p < 0,001$), CI ($p < 0,013$), CII ($p < 0,001$) do que no grupo normal. A baixa resposta de secreção de TNF- α ao estímulo com BCG, talvez seja uma das consequências do anti-TNF- α e aza nos pacientes. Embora os pacientes dos grupos IN ($p < 0,001$) e CI ($p < 0,001$) apresentassem TNF- α espontânea com valores iniciais mais altos do que os controles normais, não se observou diferença significativa entre a secreção de TNF- α espontânea, com a estimulada por BCG nem por PHA entre os pacientes dos três grupos.

O presente trabalho se reveste de grande importância porque avaliou um suplemento nutricional enriquecido com TGF- β , oferecido por via oral para atingir o tecido alvo que é a mucosa intestinal. Por outro lado, o fato de se ter utilizado o sangue periférico para examinar resposta celular BCG específico sugere que o defeito imune é global e está associado com doença intestinal. Talvez fosse melhor considerar a DC como doença sistêmica com manifestações intestinais. Deveriam os pacientes com anormalidades histopatológicas similares em outros órgãos serem investigados para um defeito imune. Com a identificação de um fenótipo geral específico para DC, surgem novas questões.

Na genética da DC a frequência dos alelos predispondo a doença é alta na população geral, enquanto a correlação entre a presença de um dado alelo predispondo à doença e a doença clínica é baixa. O cromossomo 16 (NOD2, CARD15) e a região HLA no cromossomo 6 têm sido implicados na susceptibilidade da DC. Há confirmação de que a DC pode ser definida por genótipos específicos (79).

Esses alelos CARD15 têm dado informações sobre fenótipos alternativos e, também, sobre o prognóstico de DC. Outros genes, como o IBD5 (um haplótipo de 250 kb no 5q31 do grupo do gene da citocina) conferem susceptibilidade a DC independente de CARD15. E OCTN1/SLC22A4 e OCTN2/SLC22A5, representam os transportadores de cátion orgânico para epitélio, macrófagos e outros tipos de células. Todos esses genes estão associados com susceptibilidade à DC e, talvez, com a doença perianal, particularmente no contexto de CARD15 (79).

Três loci genéticos NOD2/CARD15, ATG16L1, IRGM, preenchem estes critérios, no qual um ou mais polimorfismos predispõem especificamente a doença. NOD2 é um sensor bacteriano intracelular, enquanto ATG16L1 e IRGM estão envolvidos na autofagia, um processo implicado no clareamento de bactéria intracelular. Qual é o papel de autofagia na imunidade mediada por NOD2? O reconhecimento bacteriano por NOD2 e autofagia tem papel em modular a transcrição, transdução, ou a secreção de citocinas próinflamatórias? (20, 80, 81).

Recentemente, Cooney e col. (81) demonstraram que NOD2 estimulado por muramildipeptídeo (MDP) induz autofagia na célula dendrítica (CD). Esse efeito é necessário para o manejo da bactéria e geração de resposta de T CD4+ antígeno específico do complexo MHC II das CD. As CD de indivíduos com DC expressam variantes de NOD2 e ATG16L1 associados que são defeituosas na indução de autofagia, no tráfego bacteriano e na apresentação de antígeno. Os autores ligam dois genes da suscetibilidade da DC em uma via funcional simples e revelam defeitos nessa via de CD que poderia levar a persistência da bactéria por

alteração da via lisossomal e do clareamento da bactéria mediada pelo sistema imune. Embora a atenção tenha sido previamente focalizada nos genes HLA classe 1 e 2, o locus também inclui genes do TNF- α e linfotoxina- α . Certos haplótipos nessa região podem predizer a resposta para a terapia com anti-TNF- α .

Consequentemente, a imunodeficiência como origem da DC está cada vez mais se fortalecendo, com profundas implicações para o tratamento clínico dessa doença. Enquanto o tratamento corrente está direcionado para a imunossupressão da inflamação e é efetivo na fase secundária da doença, ele pode de fato exacerbar a anormalidade subjacente e, potencialmente, converter uma doença esporádica em uma condição recidivante crônica. Pode ser que promover uma estimulação imune em pacientes com doença quiescente possa ajudar a remissão e prevenir o intercurso da inflamação.

Nesse sentido, os resultados do presente estudo mostram que um suplemento nutricional com proteínas do soro de leite enriquecido com TGF- β aumentou o percentual de linfócitos T CD3, reduziu de modo significativo o percentual de linfoblastos TCD8+ ($p=0,033$) após 8 e 16 semanas de intervenção, reduziu a secreção de IFN- γ estimulada por PHA e aumentou os valores de TGF- β 2 no plasma com diferença estatística ($p=0,011$).

Contudo, o suplemento não influenciou na proliferação TCD3, TCD4, TCD8 e TCR $\gamma\delta$ BCG específica nem PHA inespecífica. Também não interferiu na secreção de TNF- α e IL-6 espontânea, estimulada por BCG nem por PHA.

Consequentemente, embora a resposta TCD4+ possa na verdade ser o centro da inflamação associada à DC, seu recrutamento pode ser secundário às disordens da comunidade microbiana e ou do hospedeiro. Se for verdade, a terapia definitiva para DC necessitará de estratégias para determinar quais defeitos existem nos fatores etiológicos subjacentes: disbiose, integridade da barreira da mucosa, agentes microbianos, sistema imune inato, e ou

imunorregulação. Biomarcadores para diagnosticar esses defeitos e as terapias para corrigí-los, constituem a oportunidade para caracterizar definitivamente e curar essa categoria de doença (82).

Desde 1980, os linfócitos T helper (Th) vêm sendo classificados em diferentes subpopulações Th1, Th2, Th17, T regulatórias, de acordo com o padrão de secreção de interleucinas. Nesse aspecto, a DC é considerada uma doença Th1 típica, e caracterizada pelo excesso de produção de IFN- γ no intestino inflamado. A importância da via Th1 na patogênese de DC é creditada como definitiva.

Em relação ao grupo controle normal, os pacientes dos 3 grupos apresentaram acentuada redução na produção de IFN- γ estimulada por BCG. ($p < 0,001$) mas, elevados valores de IFN- γ estimulada por PHA.

IFN- γ pode ativar uma série de células imunocompetentes como macrófagos, células endoteliais e linfócitos e é um fator chave para a expressão de MHC classe II nas células apresentadoras de antígenos. Adicionalmente, IFN- γ , diminui a função da barreira epitelial e promove a migração do neutrófilo pela elevada expressão de quimiocinas e seus receptores. Na DC é observado nível elevado de IFN- γ na mucosa. Os dados aqui apresentados mostram que havia redução da secreção do IFN- γ estimulada com BCG justificada pela supressão de TNF- α com anti- TNF- α , mas não inibiu a secreção estimulada por PHA que é inespecífica, sugerindo um estado de ativação dessas células.

Estudo do balanço Th1/Th17 dos linfócitos TCD4+ avaliado por meio do eixo IL23/IL17 em linfócitos TCD4+ do sangue periférico e de lâmina própria de pacientes mostrou aumento significativo de produção de IFN- γ nas células TCD4+ da lâmina própria. IL-23 compartilha a subunidade p40 com IL-12, direciona a inflamação crônica, e constitui a principal citocina na pesquisa da imunidade inata com papel mais relevante do que a IL-12 na patogenia das doenças inflamatórias. Além disso, IL-23 promove a sobrevivência das células Th17 (83).

Th17 são caracterizadas como produtoras preferencialmente de IL-17 A, IL-17 F, IL-21 e IL-22, e mediam mecanismos de defesa para várias infecções, especialmente bactérias extracelulares e estão envolvidas na patogênese de muitas doenças autoimunes. Os receptores para IL-17 e IL-22 estão amplamente expressos sobre vários tecidos epiteliais. As citocinas efetoras das células Th17, além do mais, mediam a comunicação essencial entre o sistema imune e os tecidos e tem papel indispensável na imunidade tecidual (83).

Annunziato e col. (14) observaram a presença de células T produzindo IL-17 no intestino de pacientes com DC. Essas células também expressavam IFN- γ , IL-23R, IL-6, CCR6. Camundongos deficientes em expressão de IL-17R A mostram reduzida emigração de polimorfonucleares para dentro do cólon assim como reduzida quantidade de CXCL2.

Está em desenvolvimento um anticorpo anti-IL17 para empregar na psoríase e DC, mas será importante entender se essa estratégia terá algum benefício comparado com anti-TNF- α dado a natureza cooperativa entre TNF- α e IL-17 na indução de quimiocinas como ICAM1 e CXC nas células epiteliais.

Contudo, ainda não estão completamente estabelecidas as condições que promovem a diferenciação de Th17. Segundo, como IL-6, TGF- β , IL-23 e outros fatores controlam as células Th17 *in vivo* sob várias condições inflamatórias ainda não está esclarecido. As respostas a essas questões são importantes para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas. As citocinas efetoras IL-17, IL-22, IL-21 são alvo potencial do futuro terapêutico (14).

Evidências acumuladas indicam que ativação não controlada de linfócitos T é o mecanismo central da patogenia envolvida no início e na regulação do processo inflamatório (84). As células T na lâmina própria na DII estão caracterizadas por um aumento na proliferação e tráfego de linfócitos T dentro da mucosa intestinal, (85) produção exagerada de citocinas inflamatórias e uma resistência contra apoptose, a qual leva ao acúmulo de células T e perpetuação da

resposta inflamatória (86).

Há evidências de que a IL-6 pró-inflamatória é crucial no processo inflamatório intestinal não controlado. Há elevada produção de IL-6 e de seu receptor solúvel (SIL-6R) pelos macrófagos intestinais e células TCD4+. A formação dos complexos IL-6 SIL-6R interagem com gp130 na membrana TCD4+ (trans-sinalização) levando a uma elevada expressão e translocação nuclear de STAT3, a qual causa indução de genes anti-apoptóticos, tais como Bcl-xl. Isto leva a uma alta resistência à apoptose das células T da lâmina própria. A expansão subsequente de células T contribui para a perpetuação da inflamação intestinal crônica. Esse entendimento referente ao papel patogênico predominante de uma cascata inflamatória dependente de IL-6 pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento dessa doença (87).

A perda de tolerância aos antígenos e a resposta exacerbada do sistema imune da mucosa intestinal, levam a uma ativação de populações celulares centrais e consequente desregulação da homeostasia de mucosa. Esse mecanismo emerge como evento chave na patogenia de DII. A ativação subsequente das populações imunes centrais é acompanhada pela produção de vários mediadores da inflamação que aumentam o processo inflamatório e destruição do tecido (87).

A mucosa dos pacientes com DC é dominada por TCD4+ com fenótipo Th1, caracterizado por produção de IFN- γ e IL-2. Enquanto a mucosa de RCU é dominada por TCD4+ com fenótipo atípico Th2 caracterizado pela produção de IL-5 e IL-13, mas não de IL-4. Essa diferenciação é apoiada pelo fato de que a concentração de IL-12 é significativamente mais alta na DC do que na RCU. Além disso, macrófagos na DC e na RCU são as principais produtoras de IL-1 e TNF- α . Esse excesso de citocinas pró-inflamatórias está envolvido na promoção de processo inflamatório, tanto através de ativação de células T e B ou indução de fibrogênese, produção de colágeno, ativação das metaloproteinases do tecido, ou ativação da cascata da coagulação a qual sucede na manifestação da doença

através do aumento do processo inflamatório. As citocinas são alvos ideais acessíveis para terapias imunossupressoras ou imunomodulatórias (88).

Em relação à secreção de IL-6 espontânea, estimulada por BCG e por PHA, observamos que a suplementação nutricional não influenciou a secreção de IL-6 espontânea, estimulada por BCG nem por PHA. Foram observados valores muito elevados de IL-6 espontânea nos grupos IN e CI e mais baixos no grupo CII ($p=0,012$) e também para IL-6 estimulada com PHA ($p=0.033$). O CII mostra controle na secreção espontânea e estimulada por PHA. Diferente da TNF- α houve acentuada resposta na secreção de IL-6 estimulada com BCG e com PHA em relação à espontânea, indicando que ela é independente do circuito de TNF- α . Os valores de IL-6 espontânea e estimulado por BCG são muito elevados, indicando que o suplemento, anti-TNF α e aza não conseguem reduzir esses valores.

Em contraste com o paradigma predominante de uma diferenciação Th1/Th2 na DC e na RCU, a IL-6 tem papel patogênico em ambas as doenças. Na DC, IL-6 é substancialmente elevada nos pacientes (89).

Além disso, no soro, IL-6 é um parâmetro clínico relevante para DC e se correlaciona com atividade inflamatória (90). Nos pacientes com recidivas da DC, a frequência de recidivas é bem correlacionada com o nível sérico de IL-6 durante a remissão. Além disso, é demonstrado que as concentrações elevadas de IL-6 nos pacientes com remissão induzida por corticoide é altamente preditivo para uma recaída da doença (91).

Foi amplamente discutido IL-6 sérico em pacientes com DC como indicador para estratificar pacientes com alto risco de recidivas e desenvolvimento de dependência aos corticoides (90). Nesse contexto, deve ser considerado que corticoides na doença de Crohn aguda suprime os níveis séricos de IL-6. Esse efeito foi observado, também, no tratamento da RCU, com inibição da produção de IL-6 pelas células mononucleares da lâmina própria (92). Nos pacientes que

sofreram cirurgia com doença crônica ativa não houve supressão da produção de IL-6 pelas células mononucleares da lâmina própria pela terapia com corticoides (92).

Esses dados são consistentes com resultados das medidas de IL-6 na mucosa intestinal, onde RNA mensageiro de IL-6 estava elevado em biópsia de mucosa colônica de pacientes com DC. Experimentos in vitro também confirmaram produção elevada de IL-6 das células mononucleares da lâmina própria.

Em relação à secreção de TGF- β 2 a suplementação aumentou os valores no plasma com diferença estatística. TGF- β é considerada uma citocina pleiotrópica e sua principal característica é atuar na proliferação e diferenciação celular, reparação tecidual (cicatrização), embriogênese, angiogênese e induzir apoptose. TGF- β é produzida por células epiteliais, endoteliais, células do tecido conjuntivo, neural e hematopoiéticas que apresentam receptores para TGF- β (93).

Atua como um potente inibidor de diferentes células, em especial das células epiteliais. Existem enzimas capazes de regular a degradação dos componentes da sinalização de TGF- β por um sistema de proteólise que é dependente de ubiquitinação. O desequilíbrio da via de ubiquitinação pode estar associado à perda da responsividade ao efeito anti-proliferativo de TGF- β . TGF- β regula a produção de matriz extracelular (MEC), e provoca a diminuição da produção de enzimas que degradam essa matriz (colagenase, heparinase). Na cicatrização, TGF- β , induz a produção de componentes da MEC, MMP-2 (metaloproteinase da matriz -2) e MMP-9 (metaloproteinase da matriz -9), que facilitam a migração dos queratinócitos da membrana basal para a região lesada, acelerando o processo de cicatrização (94).

A sinalização do TGF- β gera inibição da proliferação celular. Em células epiteliais, endoteliais, hematopoiéticas, neurais e certos tipos de células mesenquimais, o fator é capaz de induzir respostas antiproliferativas em qualquer

ponto do ciclo celular. Em células normais, age como supressor de tumor, uma vez que inibe a proliferação celular ou promove diferenciação ou apoptose (95).

TGF- β também possui a habilidade de induzir um processo denominado *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) que inibe a produção de proteínas envolvidas na adesão celular e aumento da produção de MEC que estimulam propriedades migratórias e invasivas da célula (93).

Em relação à secreção de TNF- α espontânea, estimulada por BCG e por PHA, observamos que: a suplementação nutricional não influenciou a secreção de TNF- α espontânea, estimulada por BCG nem por PHA. Embora os pacientes dos grupos IN ($p<0,001$) e CI ($p<0,001$) apresentassem TNF- α espontânea com valores iniciais mais altos do que os controles normais, não se observaram diferenças significativas entre a secreção de TNF- α espontânea, com a estimulada por BCG nem por PHA entre os pacientes dos três grupos. Isso indica baixa resposta de secreção de TNF- α ao estímulo com BCG, talvez pelo uso de anti-TNF- α e aza nos pacientes. No entanto, houve diferença altamente significativa quando se compara entre os controles normais, a secreção de TNF- α espontânea e estimulada com PHA com a estimulada por BCG, indicando a elevada resposta ao BCG nos normais e a imunodeficiência nos pacientes. O grupo CI reduziu ($p=0,022$) os valores de TNF- α espontânea após 16 semanas de seguimento. O grupo CII apresentou baixos valores ($p<0,001$) de TNF- α espontânea quando comparado aos grupos IN e CI e similar aos controles normais.

Discutiremos apenas se o anti-TNF- α teve influência nesses achados. Em relação aos efeitos adversos da associação de corticoides e anti-TNF- α na DC há relatos de elevado risco para infecção por cândida, herpes Zoster, doenças desmielinizantes e displasia cervical (96). Também são relatados novos casos de tuberculose ativa em pacientes tratados com todos os anti-TNF- α disponíveis devido a falta de adesão às recomendações para prevenir reativação de infecção de tuberculose latente (97). Vários estudos têm confirmado o alto risco para

tuberculose posto pelos anticorpos anti-TNF- α comparado com o receptor TNF- α solúvel, particularmente com relação à reativação de tuberculose latente (98).

Tomados em conjunto, esse trabalho traz resultados inéditos sobre a resposta ao BCG em pacientes com DC sob terapia com aza e anti-TNF- α e mostra a relevância de terapia imunomoduladora por via oral.

6. CONCLUSÕES

1. A suplementação nutricional aumentou o percentual de linfócitos TCD3, reduziu de modo significativo o percentual de linfoblastos TCD8 ($p = 0,033$) após 8 e 16 semanas de intervenção, reduziu a secreção de IFN- γ estimulada por PHA e aumentou os valores de TGF- β 2 no plasma com diferença estatística ($p = 0,011$).

2. A suplementação nutricional não influenciou na proliferação TCD3, TCD4, TCD8 e TCR $\gamma\delta$ BCG específico nem PHA inespecífica. Também não interferiu na secreção de TNF- α e IL-6 espontânea, estimulada por BCG nem por PHA.

3. Os pacientes com DC constituíram um grupo significativamente diferente do grupo controle normal nos parâmetros de proliferação celular BCG específico e secreção de TNF- α e IFN- γ estimulados com BCG. Linfoblastos TCD3 BCG específico foi significativamente mais baixo nos grupos IN ($p < 0,001$) CI ($p < 0,013$) CII ($p < 0,001$) do que no grupo normal com baixa resposta de secreção de TNF- α ao estímulo com BCG, talvez pelo uso do anti-TNF- α e aza nos pacientes. Embora os pacientes dos grupos IN ($p < 0,001$) e CI ($p < 0,001$) apresentassem TNF- α espontânea com valores iniciais mais altos do que os controles normais, não se observaram diferença significativa entre a secreção de TNF- α espontânea, com a estimulada por BCG nem por PHA entre os pacientes dos três grupos.

4. Entre os pacientes com DC os percentuais de linfócitos T eram semelhantes, mas o percentual de linfoblastos TCD3 no grupo CII foi maior ($p = 0,019$) e de TCD8 menor ($p = 0,04$) do que no grupo IN, justificando porque o grupo CII estava fora do tratamento com anti-TNF- α e recebiam apenas aza. Os grupos IN e CI apresentaram mais semelhanças nesses parâmetros.

5. Em relação ao grupo controle normal, os pacientes dos 3 grupos apresentaram acentuada redução na produção de IFN- γ estimulada por BCG. ($p < 0,001$) mas, elevados valores de IFN- γ estimulada por PHA.

6. Foram observados valores muito elevados de IL-6 espontânea nos grupos IN e CI e mais baixos no grupo CII ($p = 0,012$) e também para IL-6

estimulada com PHA ($p=0.033$). O CII mostra controle na secreção espontânea e estimulada por PHA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruthruff B, MSN, APRN-BC, CWOCN. Clinical review of Crohn disease. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 2007;19:392-397.
2. Taxonera C, Schwartz DA, Damián García-Olmo D. Emerging treatments for complex perianal fistula in Crohn's disease. *World J Gastroenterology*. 2009;34:4263-4272.
3. Bamias G, Cominelli F. Novel strategies to attenuate immune activation in Crohn's disease. *Current Opinion In Pharmacology*. 2006;6:401-407.
4. Shanahan F. Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics. *Gastroenterology*. 2001;120:622-635.
5. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al. editors. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw Hill, Health; Professions Division; 2008. 17th ed.
6. Podolsky DK, Xavier RJ. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;26:448:427.
7. Gaburri PD, Castro LEVV, Ferreira JOD, Lopes MHM, Ribeiro AMB, Alves RA, et al. Epidemiology, clinical features and evolution of Crohn's disease: a study of 60 cases. *Arq Gastroenterol*. 1998;35:240-246.
8. Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Vianna CF, Onofre PH, Monteiro RA, et al. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in an university hospital in the southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2002;39:98-105.
9. Arnott IDR, Satsangi J. Disease behaviour in Crohn's disease is dynamic and not stable over time. *Gut*. 2003;52:460-61.

- 10.** Furusho YKJ, Korzenik RJ. Crohn's disease: Innate immunodeficiency. *World Journal Gastroenterol.* 2006 ;12(42):6751-6755.
- 11.** Neutra RM, Mantis JN, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Publishing Group.* 2001.
- 12.** Torres MI, Ríos A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World Journal Gastroenterol.* 2008;14(13):1972-1980.
- 13.** Macdonald TT, Disabatino A, Gordon JN. Immunopathogenesis of Crohn's disease. *JPEN.* 2005;29:S118-S125.
- 14.** Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-1861.
- 15.** Braun J, Wei B. Body Traffic: Ecology, Genetics, and Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2007;2:401-429.
- 16.** Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal Gastroenterol.* 2006;12(30):4807-4812.
- 17.** Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pædiatrica.* 2003;441:441-448.
- 18.** Cobrin MG, Abreu TM. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological Reviews.* 2005;277-295.

- 19.** Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Gaskins HR. Schook LB. Twist and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75:58-71.
- 20.** Marks DJB, Harbord MWN, Macallister R, Rahman FZ, Young ALLB, Lees W, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*. 2006;367:668–678.
- 21.** Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P, et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and cefazolin for Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2007;132:2313-2319.
- 22.** Uzoigwe JC, Khaita ML, Gibbs PS. Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect*. 2007; 135:1057-1068.
- 23.** Chambrun GP, Colombel JF, Poulain D, Darfeuille-Michaud A. Pathogenic agents in inflammatory bowel diseases. *Current Opin Gastroenterol*. 2008; 24:440-47.
- 24.** Cario E. Bacterial interactions with cells of intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005;19(54):1182-1193.
- 25.** Bamias G, Cominelli F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Current Opin Gastroenterol*. 2007;23:365-369.
- 26.** Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(42):5577-5580.

- 27.** Cario E. Bacterial interactions with cells of intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005;19(54):1182-1193.
- 28.** Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;23(118):229-241.
- 29.** Stenson WF. Textbook of Gastroenterology. Inflammatory bowel disease. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. 1775-1839. v.2.
- 30.** Crohn's and Colitis Foundation of America. (2004). CCFA.org. Retrieved November 15, 2004, from <http://www.ccfa.org/research/info/>.
- 31.** Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:512.
- 32.** Hanauer SB, Sandborn W. The practice Parameters Committee of the American College Of Gastroenterology. Management of Crohn's Disease in Adults. *Am Journal Gastroenterol*. 2001;96:635-943.
- 33.** Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347(6):417-429.
- 34.** Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumours necrosis factor (alpha) and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut*. 2002;50:196-200.
- 35.** Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, et al. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*. 1991;32:1071-1075.

- 36.** Kozuck PL, Stephen BH. Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):354-377.
- 37.** Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremain W. American Gastroenterological Association Institute Medical Position Statement on Corticosteroids, Immunomodulators, and Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol*. 2006;130(935):935-939.
- 38.** Souza HT, Portela F, Ferreira M, Andrade P, Leitão MC, Freitas D. Eficácia e segurança do Infliximab no tratamento da Doença de Crohn-Experiência de um certo Português. *J Port Gastrenterol*. 2006;13:75-81.
- 39.** Breese E, Michie C, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB. et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994;106:1455–1466.
- 40.** Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP. et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 1993;94:174–181.
- 41.** Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF. et al. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;126:402–413.
- 42.** Rutgeerts P. A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease. *Journal Gastroenterol Hepatol*. 2002;17:177-186.
- 43.** Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 2002;359:1541-1549.

- 44.** Cohen RD. Efficacy and safety of repeated infliximab infusions for Crohn's disease: 1-year clinical experience. *Inflammation Bowel Dis.* 2001;7:S17-S22.
- 45.** Séverin S, Wenshui X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2007;45(7):645–656.
- 46.** Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion. *Proc Nat Acad Sci.* 1997;94:14930-14935.
- 47.** Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodena C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, et al. The digestion rate is an independent regulating factor of post prandial protein retention. *Am J Physiol Endocrin Metab.* 2001;280:340-348.
- 48.** Sgarbieri VC. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz J Food Technol.* 2005;8(1):43-56.
- 49.** Marshal K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Altern Med Rev.* 2004;9(2):136-156.
- 50.** McIntosh GH, Royle PJ, Leleu RK, Register GO, Johnson MA, Grinsted RL et al. Whey protein as functional ingredients. *Int Dairy J.* 1998;8:423-434.
- 51.** Vannini L, Lanciotti R, Baldi D, Guerzoni ME. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology.* 2004;94:123–135.
- 52.** Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition.* 2000;84:3-10.

- 53.** Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol in Vitro*. 2003;17:27-33.
- 54.** Augustin OM, Munoz MV. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 2006;2:1-4.
- 55.** Cribb PJ, Willians AD, Hayes A, Carey MF. The effect of whey isolate on strength, body composition and plasma glutamine. *Med Science Sports Exercises*. 2005; (34)5:299.
- 56.** Chantry CJ, Rodrigues JL, Febo I, Diaz C, Rodriguez-Orengo JF. Plasma Glutathione Concentrations in Non-infected Infants born from HIV-infected Mothers: Developmental Profile. *Puerto Rico Health Sciences Journal*. 1999;18:267-272.
- 57.** Mcdermid JM, Lalonde RG, Gray-Donald K, Baruchel S, Kubow S. Associations Between Dietary Antioxidant Intake and Oxidative Stress in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Men and Women. *JAIDS*. 2002;29(2):158-64.
- 58.** Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57:145–55.
- 59.** Grey V, Mohammed SR, Smountas AA, Bahloul R, Lands LC. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2003;2:195–198.
- 60.** Micke KM, Beeh JF, Schlaak, Buhl R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001;31:171-178.

- 61.** Baruchel S, Viau G, Olivier G, Bounous G & Wainberg MA In: Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. New York. Marcel Dekker. 1998;447-461.
- 62.** Moreno YF, Sgarbieri VC, Da Silva MTN, Toro AADC, Vilela MMS. Features of Whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection. Journal of Tropical Pediatrics. 2006; (1)52:34-38.
- 63.** Flora APL, Dichi I. Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal. Revista Brasileira nutrição clínica. 2006;21:131-137.
- 64.** Beattie RM. Nutrição enteral como terapia Primária na Doença de Crohn em Crianças: Controle da Inflamação Intestinal e Resposta Anabólica. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2005;29.
- 65.** Marek A, Brodzicki J, Berek A, Korzon M: TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions a new diagnostic and prognostic marker. Med Sci Monit. 2002;8:145-151.
- 66.** Border WA, Noble NA. Targeting TGF- β for treatment of disease. Nat Med. 1995;1:1000–1001.
- 67.** Hauck AL, Swanson KS, Kenis PJ, Gaskins HR, Schook LB. Twist and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. Birth Defects Res C Embryo Today. 2005;75:58-71.
- 68.** Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . Ann Rev Immunol. 1998;16:137–161.
- 69.** Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol. Rev. 1997;156:145–166.

- 70.** Fell JM. Control of systemic and local inflammation with transforming growth factor beta containing growth factor beta containing formulas. *Journal Parenteral Enteral Nutrition*. 2005;29:126-128.
- 71.** Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 1999;5 44-60.
- 72.** A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. W. Washington: 1990:Horwitz.15th ed.
- 73.** Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*.1959; 37:911-917.
- 74.** Spackman DC, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt Biochem*. 1958;(9)30:1190-1206.
- 75.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. 1970;227: 680-685.
- 76.** Ziegler FLF, Moreno YMF, Castro GA, Oya V, Vilela MMS, Wu C et al. Nutritional, physico-chemical and bioactivity characterization of whey protein products. In: 10th European Nutrition Conference, Paris, France. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2007;51:248-249.
- 77.** Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet*. 2002;359:62-69.
- 78.** Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, JS Klein, C de la Motte, SA Strong, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, where as ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996;157:1261–1270.

- 79.** Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy–Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterol.* 2002;122:854-868.
- 80.** Segal AW, Loewi G. Neutrophil dysfunction in Crohn`s disease. *Lancet* 1976;2:219-21.
- 81.** Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* 2010;(1)16:90-97.
- 82.** Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, Yamazaki M, Inoue N, Ikeda M, et al. Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:3108–3117.
- 83.** Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sakuraba A, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 2008;118:2269–2280.
- 84.** Neurath, MF, Finotto, S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Méd.* 2002;8:567-573.
- 85.** Rutgeerts, P, Van Deventer S, Schreiber S. The expanding role of biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease - focus on selective adhesion molecule inhibition. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1435-1450.
- 86.** Ina K, Binion DG, West GA, Dobrea GM Fiocchi C. Crohn's disease mucosal T-cells are resistant to apoptosis. *Gastroenterology.* 1995;108:A841.

- 87.** Holub MC, Mako E, Devay T, Dank M, Szalai C, Fenywesi A et al. Increased interleukin-6 levels, interleukin-6 receptor and gp130 expression in peripheral lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998;50:228-247.
- 88.** Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1993;104:1285-1292.
- 89.** Gross V, Andus T, Casar I, Roth M, Schöllmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1993;102:514-519.
- 90.** Reinisch W, Gasche C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M, et al. Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2156-2164.
- 91.** Van Kemseke C, Belaiche J, Louis E. Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission *Inter J Colorrectalk Dis.* 2000;15:206-210.
- 92.** Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 1999;34:66-74.
- 93.** Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685–700.
- 94.** Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001;276:12477–12480.

- 95.** Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000;6:1365–75.
- 96.** Marehbian J, Arrighi HM, Hass S, Tian H, Sandborn WJ. Adverse events associated with common therapy regimens for moderate-to-severe Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2009;(10)104:2524-2533.
- 97.** Gómez-Reino JJ, Carmona L, Descalzo A, Biobadaser group. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum*. 2007;(15)57:756-761.
- 98.** Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function and tuberculosis risks. *Lancet Infectious*. 2008;(10)8:601-611.

8. ANEXOS

8.1. Laudo emitido pelo ITAL antes do embalo.

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ-3858MB/08
DATA DA EMISSÃO: 01/04/08
AMOSTRA: Proteína de soro de leite bovino em pó
INTERESSADO: Maria Marluce dos Santos Vilela
ENDEREÇO: R. Tessália Vieira de Camargo, 126, Centro de Investigação em Pediatria, FCM4,
Unicamp, Barão Geraldo – Campinas/SP
DATA DA ENTRADA DA AMOSTRA: 26/03/08
DATA DA ANÁLISE: 27/03/08
NATUREZA DA ANÁLISE: Microbiológica
ANALISTA(S): Valéria C. A. Junqueira, Rosana F. Siqueira

1. METODOLOGIA

- DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs *Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002.
- HORWITZ, W. & LATIMER, G.W. (edS.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.
- ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)* – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, 1st ed., 1999. Amendment 1:2003.

2. RESULTADOS

Determinação	Resultado
<i>Salmonella</i> (em 25g)	Ausente
Coliformes totais (NMP/g)*	2,3
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)*	<0,3
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)**	<1
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)**	<1
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)**	<1
Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)**	1,5x10 ²

* Número Mais Provável por grama, ** Unidades Formadoras de Colônias por grama

3. OBSERVAÇÕES

O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não respondeu pela amostragem e coleta do material analisado. As informações contidas na identificação da(s) amostra(s) foram fornecidas pelo interessado e os resultados da análise têm valor restrito, aplicando-se exclusivamente à(s) amostra(s) enviada(s).

Visto

Neusely da Silva
Gerente Analítico

Valéria C. A. Junqueira
Pesquisador Científico

---*

8.2. Laudo emitido pelo ITAL após, irradiação.

LAUDO DE ANÁLISE Nº: CQ 5103/2008MB
MATERIAL: Concentrado de proteínas de soro de leite bovino em pó
INTERESSADO: Profa. Dra. Maria Mariuce dos Santos Vilela
ENDEREÇO: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CIPED FCM4 – UNICAMP – Campinas/SP
DATA DE ENTRADA DAS AMOSTRAS: 06/05/2008
DATA DE ANÁLISE: 07/05/2008
DATA DE EMISSÃO DO LAUDO: 14/05/2008
NATUREZA DA(S) ANÁLISE(S): Microbiológica
RESPONSÁVEL(EIS): Valéria C. A. Junqueira, Rosana F. Siqueira

1. MÉTODO(S)

DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs *Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, 4th ed. The International Organization for Standardization, 2002.

HORWITZ, W. & LATIMER, G.W. (eds.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th Ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.

ISO 6888-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)* – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium, 1st ed., 1999. Amendment 1:2003.

2. RESULTADO(S)

Determinação(ões)	Resultado(s)
<i>Salmonella</i> (em 25ml)	Ausente
Coliformes totais (UFC/ml)*	<1
<i>Escherichia coli</i> (UFC/ml)*	<1
<i>Estafilococos coagulase positiva</i> (UFC/ml)*	<1
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/ml)*	<1
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/ml)*	<1
Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/ml)*	4,5 x 10 ³

* Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (de amostra reconstituída segundo instrução fornecida pelo interessado).

3. OBSERVAÇÕES

O Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos não foi responsável pela amostragem e coleta do material analisado. As informações contidas na identificação da(s) amostra(s) foram fornecidas pelo interessado e os resultados da análise têm valor restrito, aplicando-se exclusivamente à(s) amostra(s) enviada(s).

Este relatório somente poderá ser reproduzido na íntegra. A reprodução parcial requer aprovação formal deste laboratório.

É vedado o uso do nome do ITAL, sob pena de indenização, para qualificar produção sobre a qual o mesmo não exerceu qualquer meio de controle.

Quando aplicável, os pareceres e interpretações dos resultados expressos não fazem parte do escopo da habilitação deste Laboratório pela REBLAS.

Este laudo/relatório somente é válido com as assinaturas ou rubricas originais em todas as páginas.

Visto:

Neusely da Silva
Vice-Diretora Técnica ULR Microbiologia

Valéria C. A. Junqueira
Pesquisador Científico

- * - * - *

8.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS DO PACIENTES MENORES DE IDADE COM DOENÇA DE CROHN

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de, _____, com idade de ____ anos e HC de nº _____ sob registro de nascimento _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de ____ anos, com o RG de nº. _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada **“Avaliação do efeito da suplementação com proteínas do soro de leite e TGF-beta, sobre o estado nutricional e a função de linfócitos em pacientes com Doença de Crohn”**, projeto de tese de doutorado da aluna Taciana Davanço, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa Dra. Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto e com co-orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite e o TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 30 ml de sangue para a realização de exames
- c) exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas)
- d) ingestão do suplemento alimentar que for proposto;
- e) fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a oferecer o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____
Taciana Davanço (telefone 19 3289-6554): _____
Profa. Dra. Elizete AP. Lomazi Costa Pinto (telefone 19 3521-861): _____
Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2008.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

8.4. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES ADULTOS COM DOENÇA DE CROHN

Eu, _____, com idade de ____ anos e HC de nº _____, RG _____, permito por livre e espontânea vontade a minha participação na pesquisa intitulada "**Avaliação do efeito da suplementação com proteínas do soro de leite e TGF-beta, sobre o estado nutricional e a função de linfócitos em pacientes com Doença de Crohn**", projeto de tese de doutorado da aluna Taciana Davanço, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa Dra. Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto e com co-orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite e o TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 30 ml de sangue para a realização de exames
- c) exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas)
- d) ingestão do suplemento alimentar que for proposto;
- e) fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a ingerir o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável: _____
Taciana Davanço (telefone 19 3289-6554): _____
Profa. Dra. Elizete AP. Lomazi Costa Pinto (telefone 19 3521-7861): _____
Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2008.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

8.5 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

ANEXO 3

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 10/07/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 304/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0227.0.146.000 -07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E TGF-BETA SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL E A FUNÇÃO DE LINFÓCITOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto.

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP.

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/05/2007.

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/05/08 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Verificar o papel do suplemento Whey Protein com TGF-beta em pacientes portadores de doença de Crohn sob terapia com corticóide.

III - SUMÁRIO

Para determinar o número de sujeitos participantes da pesquisa, será feito um estudo piloto com 20 pacientes, dos quais 10 receberão a dieta com TGF-beta e 10 não a receberão. Os sujeitos da pesquisa serão pacientes (crianças, adolescentes e adultos de ambos os gêneros) com doenças de Crohn atendidos no ambulatório de doenças inflamatórias. O desenho do estudo é prospectivo e exigirá intervenção clínica: os sujeitos receberão, por oito semanas, a fórmula nutricional. Os suplementos deverão ser ingeridos duas vezes ao dia (sugere-se que a ingestão ocorra no café da manhã e na ceia). A ingestão será avaliada quinzenalmente. Se algum paciente apresentar intolerância, seja gastrointestinal ou alérgica, a suplementação será imediatamente interrompida. A proteína do soro de leite utilizada será doada pela Hilma Cheese Company. Para determinação do escore clínico (avaliação da presença e sintomas clínicos: diarreia, dor abdominal, humor, sinais extra-digestivos) serão utilizados as ferramentas de Best W. R., para adultos, e o Hyamas J. S., para crianças. O escore histológico é endoscópico será calculado segundo o método de August. Por fim, os dados obtidos serão analisados por meio do software SPSS.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de doutorado. O protocolo está bem estruturado e escrito, o que o torna bastante claro. Inclui folha de rosto, descrição da pesquisa, orçamento, bibliografia, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, breve curriculum vitae dos pesquisadores e discussão dos aspectos éticos da pesquisa. Em relação à estrutura, portanto, o protocolo atende aos requisitos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13061-097 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado, após resposta do parecer.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2007.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.6. Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Coloproctologia



PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS BCG ESPECÍFICOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN SOB SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL.

Vanessa Oya, Taciana Davanço, Yara Maria Franco Moreno, Cláudia Saddy Rodrigues Coy, Raquel Franco Leal, Maria de Lourdes Setsuko Aynitono, Elizete Aparecida Lomazi Costa Pinto e Maria Marluce dos Santos Vilela.

Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) / Gastrocentro - Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais / Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP, Campinas, SP.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A Doença de Crohn é uma inflamação crônica transmural granulomatosa da mucosa intestinal de causa desconhecida caracterizada pelo acometimento de qualquer parte do tubo digestivo. As proteínas do soro de leite bovino são consideradas compostos bioativos e, algumas de suas propriedades relacionam-se à modulação do sistema imune. Os imunomoduladores orais com propriedades antiinflamatórias, tais como proteínas do soro de leite e TGF- β podem favorecer a evolução dessa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a proliferação celular BCG específicos em pacientes com Doença de Crohn sob suplementação nutricional com proteínas do soro de leite enriquecido com TGF- β .

MÉTODOS

Delineamento do Estudo: Ensaio clínico, prospectivo, de intervenção nutricional com um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β com duração de 16 semanas.

Pacientes: Foram selecionadas 13 pacientes, idades entre 14 e 58 anos com Doença de Crohn, sob seguimento clínico no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais Gastrocentro/UNICAMP. Os critérios de inclusão foram: pacientes de ambos os sexos, em uso de terapia anti-TNF- α a cada 8 semanas, com Índice de Atividade da Doença de 120. Os dados foram coletados em três momentos: antes da introdução do suplemento (Tempo 1), 8 semanas após a ingestão do suplemento (Tempo 2) e ao final de 16 semanas de suplementação (Tempo 3).

Suplemento: Foi ofertado um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β , gentilmente doado pela HILMAR CHEESE COMPANY. A oferta do suplemento baseou-se no conteúdo proteico, fornecendo 50% da recomendação de proteínas proposta pela Recommended Dietary Allowances (RDA, 1989), que corresponde a 30g/dia.

Ensaio de Proliferação Linfocitária: as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade (Ficoll-Paque 1077, Sigma) e cultivadas, na concentração de 1×10^6 células/mL, em placas de cultura, à 37°C, 5% CO₂ por 6 dias nas seguintes condições experimentais: controle (sem estímulo), estímulo antigênico (Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), Instituto Butantan, SP), 5×10^5 UFC/mL ou mitogênico (Fito hemaglutinina (PHA, Sigma, EUA), 7,5 μ g/mL). As amostras foram imunofenotipadas com anticorpos monoclonais (anti-CD3-PC5/CD4-RD1/CD8-FITC e TCR $\gamma\delta$, Beckman-Coulter, EUA), adquiridas em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA) e analisados com o software EXPO 1.0 (Beckman-Coulter, EUA).

Análise Estatística: realizada utilizando o programa SPSS® for Windows (versão 7.5.1, EUA). O teste de Friedman foi utilizado e considerado significativo valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em medianas, valores máximos e mínimos.

RESULTADOS

Antes da intervenção nutricional, o percentual de linfoblastos CD3+ específicos para o BCG foi 9,3 (1,5 a 44,9)%. Em relação as subpopulações, o percentual de TCD4+ foi 28,1 (6,3 a 81,8)%, TCD8+ foi 13,6 (2,7 a 50,4)% e TCR $\gamma\delta$ foi 60,7 (5,9 a 93,9)%. Não foram observadas diferenças no percentual de linfoblastos específicos para o BCG entre os tempos.

O percentual de linfoblastos CD3+ e suas subpopulações, das cultura de CMSP não estimuladas, estimuladas por BCG ou por PHA, encontram-se na Figura 1.

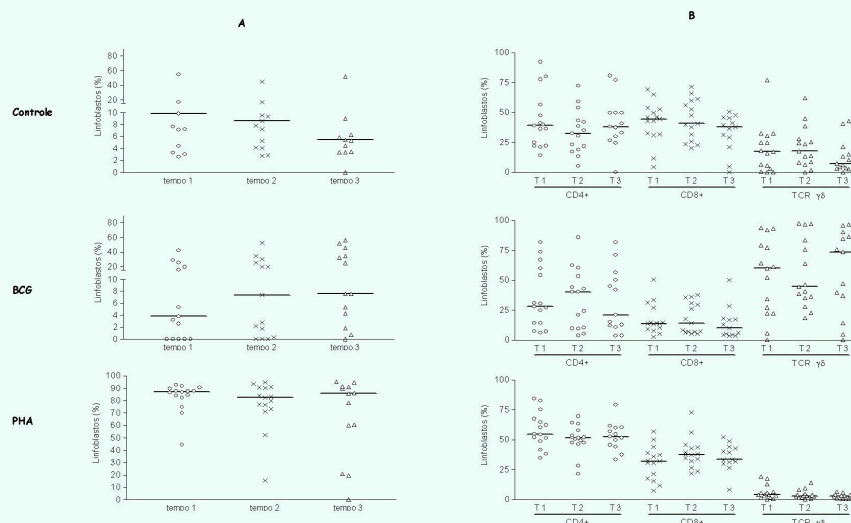


Figura 1: Percentual de linfoblastos CD3+ (A) e subpopulações CD4+, CD8+ e TCR $\gamma\delta$ (B) após 6 dias de cultura de CMSP (não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA) de pacientes com Doença de Crohn no início (Tempo 1), após 8 semanas (Tempo 2) e após 16 semanas (Tempo 3) da suplementação nutricional.

CONCLUSÃO

Nesses pacientes foi observada resposta proliferativa BCG específica. A suplementação nutricional com concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β , durante 16 semanas, não modificou essa resposta.

Pesquisa financiada pela FAPESP (processo: 07/07558-2)

8.7. Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Coloproctologia



CITOCINA BCG ESPECÍFICA EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN SOB SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL.

Vanessa Oya, Taciana Davanço, Yara Maria Franco Moreno, Cláudio Saddy Rodrigues Coy, João José Fagundes, Maria de Lourdes Setsuko Aynitono, Elizete Aparecida Lomazi Costa Pinto e Maria Marluce dos Santos Vilela.

Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) / Gastrocentro - Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais / Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP, Campinas, SP.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A Doença de Crohn é uma inflamação crônica transmural granulomatosa da mucosa intestinal de causa desconhecida caracterizada pelo acometimento de qualquer parte do tubo digestivo. As proteínas do soro de leite bovino são consideradas compostos bioativos e, algumas de suas propriedades relacionam-se à modulação do sistema imune. Os imunomoduladores orais com propriedades antiinflamatórias, tais como proteínas do soro de leite e TGF- β podem favorecer a evolução dessa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de IFN- γ em cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por BCG em pacientes com Doença de Crohn sob suplementação nutricional com proteínas do soro de leite enriquecido com TGF- β .

MÉTODOS

Delineamento do Estudo: Ensaio clínico, prospectivo, de intervenção nutricional com um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β com duração de 16 semanas.

Pacientes: Foram selecionadas 13 pacientes, idades entre 14 e 58 anos, com Doença de Crohn, sob seguimento clínico no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais Gastrocentro/UNICAMP. Os critérios de inclusão foram: pacientes de ambos os sexos, em uso de terapia anti-TNF- α a cada 8 semanas, Índice de Atividade da Doença de 120. Os dados foram coletados em três momentos: antes da introdução do suplemento (Tempo 1), 8 semanas após a ingestão do suplemento (Tempo 2) e ao final de 16 semanas de suplementação (Tempo 3).

Suplemento: Foi ofertado um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β , gentilmente doado pela HILMAR CHEESE COMPANY. A oferta do suplemento baseou-se no conteúdo proteico, fornecendo 50% da recomendação de proteínas proposta pela Recommended Dietary Allowances (RDA, 1989), que corresponde a 30g/dia.

Citocina em Sobrenadante de Cultura de CMSP: as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas por centrifugação com gradiente de densidade (Ficoll-Paque 1077, Sigma) e cultivadas, na concentração de 2×10^6 células/mL, em placas de cultura, à 37°C, 5% CO₂ por 2 dias nas seguintes condições experimentais: controle (sem estímulo), estímulo antigênico (Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), Instituto Butantan, SP), 5×10^5 UFC/mL ou mitogênico (Fitoheماغlutinina (PHA, Sigma, EUA), 7,5 μ g/mL). As amostras foram coletadas e a concentração de IFN- γ foi determinada por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), por kits comerciais (Duo Set®, R&D Systems).

Análise Estatística: realizada utilizando o programa SPSS® for Windows (versão 7.5.1, EUA). O teste de Friedman foi utilizado e considerado significativo valor de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em medianas, valores máximos e mínimos.

RESULTADOS

A produção espontânea de IFN- γ no Tempo 1 foi de 0 (0 a 51,88) pg/mL, no Tempo 2 foi 0 (0 a 43,69) pg/mL e no Tempo 3 foi 0 (0 a 35,36) pg/mL. Nas culturas estimuladas por BCG foi de 86,24 (0 a 916,84) pg/mL no Tempo 1, 48,70 (0 a 457,57) pg/mL no Tempo 2 e 67,01 (0 a 427,37) pg/mL no Tempo 3. Nas culturas estimuladas por PHA foi de 533,51 (147,24 a 2527,05) pg/mL no Tempo 1, 275,68 (50,67 a 2580,20) pg/mL no Tempo 2 e 629,72 (0 a 1394,38) pg/mL no Tempo 3. Não houve diferença significativa na produção de IFN- γ entre os tempos.

A produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de CMSP encontram-se na Figura 1.

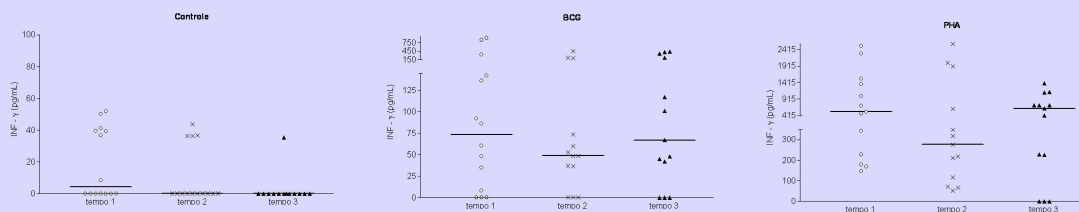


Figura 1: Concentração de IFN- γ (pg/mL) em sobrenadantes de cultura de CMSP (não estimuladas, estimuladas por BCG ou PHA) de pacientes com Doença de Crohn no início (Tempo 1), após 8 semanas (Tempo 2) e após 16 semanas (Tempo 3) da suplementação nutricional.

CONCLUSÃO

Todos os pacientes apresentaram produção de IFN- γ BCG específica e a suplementação nutricional com proteínas do soro de leite enriquecido com TGF- β durante 16 semanas não modificou a sua produção.

Pesquisa financiada pela FAPESP (processo: 07/57558-2)

8.8. Pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Imunologia.

