

EDUARDO LOURENÇO DA SILVA

EFEITOS DA SILIMARINA EM CÉLULAS CACO-2 EXPOSTAS AO PEPTÍDEO
GLIADINA

BRASÍLIA-DF
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDUARDO LOURENÇO DA SILVA

EFEITOS DA SILIMARINA EM CÉLULAS CACO-2 EXPOSTAS AO PEPTÍDEO
GLIADINA

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

BRASÍLIA-DF
2016

EDUARDO LOURENÇO DA SILVA

EFEITOS DA SILIMARINA EM CÉLULAS CACO-2 EXPOSTAS AO PEPTÍDEO

GLIADINA

Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção de título de Doutor em
Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovado em 10 de outubro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dr. Riccardo Pratesi - Presidente
Universidade de Brasília

Dr. Carlos Eduardo Speck Martins
Hospital Sarah Kubitschek-Brasília

Dr.^a Mariana Machado Hecht
Universidade de Brasília

Dr. Luiz Alberto Simeoni
Universidade de Brasília

Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro
Universidade de Brasília

Dr.^a Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo - Suplente
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a meu pai Paulo Lourenço da Silva (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Riccardo Pratesi por me receber em seu laboratório e me ajudar de maneira decisiva em momento muito difícil de minha jornada. Suas palavras, orientações e o exemplo que é foram minha bússola na elaboração desse doutorado. Agradeço à professora Yanna Nóbrega que me conduziu fraternamente por entre projetos, experimentos e análises em tempo tão reduzido. Professora Yanna aceitou me coorientar em momento em que mesmo eu não acreditava na conclusão desta caminhada, razão pela qual me sinto profundamente afortunado por sua ajuda e atenção. Agradeço à professora Lenora pelas palavras delicadas e cuidadosas em relação às dificuldades de se cursar pós-graduação em nível de doutorado, sempre me lembrando que este momento de conclusão chegaria.

Agradeço profundamente aos colegas de laboratório, em nome de Fernanda Coutinho, Isabella Nogueira, Nicole Selleski e Lucas Malta, que em muitos momentos me ajudaram ao me permitir a utilização de equipamentos e reagentes de maneira prioritária, sensíveis ao pouco tempo que eu tive para concluir esse doutorado. Agradeço aos colegas estudantes de outros laboratórios que dividiram equipamentos e reagentes comigo, sempre de maneira educada e prestativa.

Agradeço à equipe técnica da secretaria de pós-graduação pelo auxílio em momentos de entraves burocráticos ou durante a tramitação de pedidos. Nesse sentido, agradeço especialmente à coordenadora da pós-graduação em Ciências da Saúde, professora Eliete Neves, por me auxiliar de maneira aberta, clara, decisiva, durante a reta final de minha participação no doutorado, sempre me atendendo prontamente e buscando de todas as formas contribuir para que essa minha conclusão de ciclo fosse possível.

Agradeço aos membros formadores da banca Dr. Carlos Eduardo Speck, Dr.^a Mariana Machado Hecht, Dr. Luiz Alberto Simeoni e Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro por aceitarem o convite de participarem desse momento. Busquei uma banca rica em diversidade de formação acadêmica e capacidade de contribuição científica e encontrei em vocês críticas, sugestões, auxílios e orientações que com certeza contribuíram para minha evolução. Agradeço também a Dr.^a Nadjar Araújo que, mesmo suplente, sempre se apresentou extremamente generosa e atenciosa comigo.

Agradeço à minha família, minha mãe Maria Marlene Dantas, minha irmã Paula Lourenço e a meu cunhado Ilvan Cardoso Júnior, que souberam me ajudar, mesmo à distância, a enfrentar e superar os grandes desafios que se apresentaram para nós ao longo dessa jornada. Esses desafios não foram poucos, nem foram simples. Em muitos momentos pensei em desistir. Mas foi pensando em vocês e vendo o sorriso da pequena Ana que encontrei forças para chegar aqui.

Não posso deixar de agradecer meu pai Paulo Lourenço da Silva, em memória, que sempre me apoiou, qualquer fosse minha decisão quanto aos caminhos que escolhi trilhar. Quis a vida que nos separássemos precipitadamente, antes da conclusão desse trabalho. Com meu pai celebrei a entrada no curso de doutorado, e é em nome dele que concluo essa jornada.

Agradeço minha família como um todo, avó, tios, primos e sobrinhos. Foram muitos casamentos, nascimentos, batizados, aniversários, festas, velórios e enterros que não pude estar presente para me dedicar a conclusão desse doutorado. E sempre encontrei em vocês a compreensão e força necessárias para agir assim.

Quero agradecer especialmente à minha doce Patrícia Maria Fritsch, minha esposa, minha amiga, minha companheira, que me conduziu em momentos cruciais ao longo dessa jornada. Eu simplesmente não estaria aqui se não fosse sua atuação, seu empenho, sua dedicação ao longo de todo o doutorado. Te amo muito e nossas lutas continuam!

Por fim, e não menos importante, agradeço à família da Patrícia. Agradeço José Fritsch, Ivoni Klock, Marcos Santiago, Daniela Fritsch e Luana Fritsch. Agradeço também aos cunhados e concunhados (e o faço em nome de Carlos Eduardo Francischetti). Agradeço todos vocês por me proporcionarem muitos momentos de conforto e convívio familiar, não havendo ansiolítico ou antidepressivo melhor em toda medicina.

*“Do, or do not. There is no try”
(Mestre Yoda)*

RESUMO

Introdução: A doença celíaca é uma desordem autoimune de desenvolvimento intestinal e desdobramentos sistêmicos com interação entre componente genético e ambiental em sua etiologia. A exposição ao peptídeo gliadina é considerada o evento-gatilho ambiental para o desenvolvimento dessa doença nos indivíduos que desenvolvem essa desordem. A gliadina é um peptídeo presente em grandes quantidades no glúten, sendo esse peptídeo e outros de estrutura assemelhada presentes em cereais como trigo, cevada, centeio e alguns tipos de aveia. A gliadina, quando digerida e absorvida por pacientes celíacos, leva a um quadro de estresse oxidativo no lúmen intestinal, acompanhado de inflamação e resposta imunológica com alteração de mediadores químicos, hiperplasia de cripta, achatamento microvilositário e infiltração de macrófagos. Pode evoluir com grave morbidade e, em casos extremos, com óbito. Trata-se de doença sem cura, cujo único tratamento é a não ingestão de glúten. **Objetivo:** Tendo em vista a doença celíaca estar relacionada com o desenvolvimento de quadro oxidativo e inflamatório no lúmen intestinal, e posto que os modelos experimentais *in vivo* são de difícil acesso e apresentam limitações, sendo as células de adenocarcinoma intestinal humano (Caco-2) o modelo *in vitro* que melhor mimetiza células intestinais, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da silimarina em células Caco-2 expostas ao peptídeo gliadina. **Método:** O presente estudo avaliou o comportamento das células Caco-2 expostas a gliadina e tratadas com silimarina, sendo avaliadas a expressão dos genes *GAPDH*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, *IL-15RA*, *iNOS*, *NFκB*, a liberação de óxido nítrico no sobrenadantes dessas células e, também, a presença da prostaglandina E_2 no meio celular após exposição por 6 h, 24 h e 48 h. **Resultados:** Foi observada redução na expressão de todos os genes relacionados à resposta inflamatória avaliados neste estudo nas células que foram tratadas com silimarina após exposição à gliadina por 6 h, 24 h e 48 h. Foi verificada redução na liberação de óxido nítrico no sobrenadante das células tratadas com silimarina após exposição à gliadina por 6 h, 24 h e 48 h bem como foi verificada redução significativa na presença da prostaglandina E_2 nas células tratadas com silimarina após exposição por 48 h à gliadina. **Conclusão:** Foi possível concluir que, após o tratamento com silimarina, houve uma redução na expressão dos genes relacionados com a resposta inflamatória presente na doença celíaca, foi possível observar redução dos níveis de óxido nítrico e de prostaglandina E_2 , o que sugere que a silimarina pode contribuir para a redução do estresse oxidativo e consequente na redução da inflamação.

Palavras-chave: Doença celíaca; Estresse oxidativo; Inflamação; Silimarina.

ABSTRACT

Introduction: Celiac disease is an intestinal autoimmune disorder with systemic development, characterized by strong interplay between genetic and environmental background. Exposure to gliadin peptide is the start-event for the pathology development in major cases of celiac patients. Gliadin is a peptide vastly present in gluten and gluten-like proteins that can be found in wheat, barley, rye and some kinds of oat. When ingested by celiac patients it leads to a severed oxidative stress, followed by inflammatory and immunological response in the intestinal lumen, resulting in chemical mediators alterations, enteric crypts hyperplasia, lowering of the enteric microvilosity and macrophages infiltration in this tissue. This disorder can cause to severe morbidity and, in extreme cases, death. Celiac disease is a disorder with no cure and the only treatment possibly is a gluten-free diet. **Objectives:** Due to the fact that this pathology has no cure and pointed that its development is related to overrated intestinal oxidative and inflammatory stress gliadin-depended response, and knowing that *in vivo* experimental models are still very limited to study celiac disease, the objective of this work is evaluate the Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, one of the best cellular model available to study intestinal events, mimicking celiac intestinal cells) response to silymarin (an anti-oxidative substance) in gliadin presence. **Methodology:** This study evaluated Caco-2 performance, analyzing the gene expression of *GAPDH*, *NFκB*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, *IL-15RA* and *iNOS*, also the nitric oxide production and the prostaglandin E₂ liberated by the Caco-2 treated with silymarin after 6 h, 24 h and 48 h of gliadin exposition. **Results:** It was observed a statistical relevant reduction for all the genes expression for the periods of time analyzed. It was observed a statistical relevant decrease of the nitric oxide levels in 6 h, 24 h and 48 h, and in prostaglandin E₂ liberated after 48 h of exposition to gliadin before or after treatment with silymarin. **Conclusion:** It is possible to conclude that silymarin was able to reduce inflammation-related gene expression related to celiac disease, as like the nitric oxide and prostaglandin levels, suggesting that silymarin can contribute to the reduction of oxidative stress an the consequently inflammatory response.

Keywords: Celiac disease; Oxidative stress; Inflammation; Silymarin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da gliadina: Porção em vermelho associada a efeitos citotóxicos, porção em verde claro associada a efeitos imunomodulatórios, porções em azul associadas ao trânsito tecidual da gliadina e porção em verde escuro associada à ativação da expressão de interleucina-8 em pacientes

Figura 2: Conversão de glutamina em ácido glutâmico por desamidação realizada pela enzima tTG-2 na presença de cálcio, com ênfase nos grupos amida e ácido carboxílico

Figura 3: Fragmentos de gliadina modificados ligados às fendas P1, P4 e P9 por meio de A) HLA-DQ2 e B) HLA-DQ8. C) Modelo de apresentação às células T CD4

Figura 4: Representação da ativação de iNOS, COX e expressão de citocinas inflamatórias

Figura 5: Flor da Silimarina

Figura 6: Células Caco-2 com confluência de crescimento de 40 % e 80 %, respectivamente

Figura 7: Delineamento experimental das triplicatas biológicas

Figura 8: Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células Caco-2 nas concentrações celulares de 5×10^5 e 5×10^6 células por poço nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h, após estímulo com gliadina (GLI) e lipopolissacarídeo (LPS)

Figura 9: Concentração de RNA extraído de células Caco-2 nas concentrações celulares de 5×10^5 e 5×10^6 células por poço nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 10: Dosagem de óxido nítrico em células Caco-2 na concentração 5×10^5 células por poço expostas a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 11: Dosagem de óxido nítrico em células Caco-2 na concentração 5×10^5 células por poço estimuladas com 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gliadina (GLI) nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 12: Quantificação relativa de transcritos do gene *NF κ B* em células Caco-2 na concentração 5×10^5 por poço estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) e tratadas com 10 μM , 100 μM e 1.000 μM de silimarina (SIL) após 48 h

Figura 13: Teste de interação química do reagente WST-8 com lipopolissacarídeo (LPS), gliadina (GLI) e silimarina (SIL), e gliadina + silimarina (GLI+SIL) nas concentrações pré-estabelecidas

Figura 14: Teste de viabilidade celular pelo método WST-8. Interação entre células Caco-2 na concentração 5×10^5 por poço após 48 h, na presença de $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS), $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL) e $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina + $100 \mu\text{M}$ silimarina (GLI + SIL)

Figura 15: Modulação gênica das células Caco-2 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) em concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ e gliadina (GLI) em concentração de $80 \mu\text{g/mL}$, comparados com células não tratadas (NT)

Figura 16: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *NFκB* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 17: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-6* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 18: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-8* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 19: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-15* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 20: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-15RA* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 21: Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *iNOS* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 22: Dosagem de óxido nítrico (NO) nas células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL), expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL (GLI+SIL) e tratadas com $100 \mu\text{M}$ de SIL e expostas a $80 \mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Figura 23: Dosagem de prostaglandina E₂ (PGE₂) presente no sobrenadante das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM de silimarina (SIL), estimuladas com 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e estimuladas com 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), após 48 h de exposição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Organização das células Caco-2 nas placas de 6 poços

Tabela 2 – Sequência de iniciadores utilizadas

Tabela 3 – Parâmetros de eficiência dos iniciadores

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA: Análise de variância
APC: Células apresentadoras de antígenos
ATCC: *American Type Culture Collection*
Caco-2: Células de adenocarcinoma colorretal humano
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
cDNA: DNA complementar
CD71: Receptores de transferrina
CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX: Ciclooxygenase
DC: Doença celíaca
DMEM: Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DO: Densidade óptica
EM: Espectrometria de massas
FDA: *Food and Drug Administration*
GLI: Gliadina
GLI+SIL: Exposição prévia a gliadina e tratamento com silimarina
GWAS: estudos amplos de associação genômica
HEPES: Ácido N-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfônico
HLA: Antígenos Leucocitários Humanos
HPLC: Cromatografia Líquida de alta eficiência
IAL: Instituto Adolfo Lutz
IFN- α : Interferon alfa
IgA: Imunoglobulinas de classe A
IgG: Imunoglobulinas de classe G
IL: Interleucina
iNOS: Óxido nítrico sintetase induzível
LPS: Lipopolissacarídeo
MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal
NEED: dicloridrato de N-1(1-naftil) etilenodiamina

NFκB: Fator nuclear kappa B

NOS: Óxido nítrico sintetase

NOS-1 / nNOS: Óxido nítrico sintetase neural

NOS-2 / iNOS: Óxido nítrico sintetase induzível

NOS-3 / eNOS: Óxido nítrico sintetase endotelial

NT: Não tratadas

P: Prolina

PGE₂: Prostaglandina da subclasse E₂

Q: Glutamina

RNS: Espécies nitrogênio-reativas

ROS: Espécies oxigênio-reativas

RT: Transcrição reversa

SFB: Soro Fetal Bovino

SIL: Silimarina

SIL+GLI: Tratamento prévio com silimarina e exposição a gliadina

TH1: Células T auxiliares de tipo 1

tTG: Enzima transglutaminase tecidual

WST-8: [2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)2H-tetrazólio]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	DOENÇA CELÍACA.....	1
1.1.1	Histórico e prevalência.....	2
1.1.2	Caracterização da Doença Celíaca	3
1.2	GLIADINA.....	4
1.2.1	Imunopatologia	5
1.2.2	Ativação das vias inflamatórias nos enterócitos	8
1.3	SILIMARINA	12
1.4	CÉLULAS CACO-2: UM MODELO CELULAR PARA DOENÇA CELÍACA	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1	OBTENÇÃO E CULTURA DAS CÉLULAS CACO-2	18
3.2	PREPARO DOS REAGENTES DE ESTÍMULO	19
3.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	21
3.4	INTERAÇÃO DAS CÉLULAS CACO-2 COM ESTÍMULOS.....	22
3.5	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA	24
3.6	ANÁLISE DA QUALIDADE DO RNA EXTRAÍDO	25
3.7	SÍNTESE DE cDNA.....	25
3.8	DEFINIÇÃO DOS GENES DE INTERESSE PARA O ESTUDO	25
3.9	PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE qPCR.....	26
3.9.1	Titulação dos iniciadores	27
3.9.2	Ensaio de eficiência	28
3.10	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUALITATIVA EM TEMPO REAL	28
3.11	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	30
3.12	DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E2	31
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4	RESULTADOS	34
4.1	SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	34
4.2	SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LPS	36
4.3	SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLIADINA	37
4.4	SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SILIMARINA	37
4.5	AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO QUÍMICA ENTRE OS REAGENTES	39
4.6	VIABILIDADE CELULAR.....	39
4.7	EXPRESSÃO GÊNICA	40
4.7.1	Comparação da expressão gênica de transcritos de RNA após estímulo por gliadina e LPS	40

4.7.2	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>NFκB</i>	41
4.7.3	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>IL-6</i>	42
4.7.4	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>IL-8</i>	44
4.7.5	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>IL-15</i>	45
4.7.6	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>IL-15RA</i>	46
4.7.7	Quantificação relativa dos transcritos do gene <i>iNOS</i>	47
4.8	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	48
4.9	DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E ₂	49
5	DISCUSSÃO	51
5.1	GLIADINA E LPS	52
5.2	NFκB	52
5.3	INTERLEUCINA 6	54
5.4	INTERLEUCINA 8	55
5.5	INTERLEUCINA 15.....	55
5.6	RECEPTOR ALFA DA INTERLEUCINA 15 (IL-15RA)	56
5.7	iNOS.....	57
5.8	ÓXIDO NÍTRICO	58
5.9	PROSTAGLANDINA	58
5.10	VIABILIDADE DO USO DA SILIMARINA.....	59
6	CONCLUSÃO	62
7	BIBLIOGRAFIA.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA CELÍACA

A Doença Celíaca (DC) é caracterizada como uma desordem autoimune intestinal com manifestações sistêmicas, iniciada principalmente pela exposição a estímulo ambiental por meio de consumo de prolaminas do glúten presentes no trigo e pela exposição a peptídeos com estruturas similares presentes em cereais como cevada e centeio, e em alguns cultivares de aveia por indivíduos geneticamente pré-dispostos a desenvolver essa doença (1, 2). A DC envolve a alteração da morfologia dos enterócitos, causando prejuízo na capacidade funcional dessas células, processo inflamatório persistente, aumento da expressão e consequente deslocamento de anticorpos diversos para os tecidos intestinais, bem como uma maior infiltração de células do sistema imunitário na lâmina própria (3, 4).

Na maioria dos casos, a DC manifesta-se na infância, por meio de sintomas como diarreia e má absorção alimentar, o que não impede a doença de se manifestar mais tardiamente, quando então se desenvolve acompanhada de quadro sintomático mais diversificado. Quando não diagnosticada e não tratada adequadamente pode evoluir com alta morbidade e reduzida, porém não inexistente, mortalidade (5-8). A DC pode evoluir com inflamação crônica no intestino delgado, principalmente duodeno e jejuno, hiperplasia de criptas e infiltração de macrófagos, resultando em atrofia de vilosidades e achatamento da mucosa epitelial (9).

Essas mudanças na morfologia celular e o prejuízo à funcionalidade dos enterócitos e tecidos associados da lâmina própria e do tecido conjuntivo local contribuem para a formação de um quadro clínico muito frequente que envolve perda de peso, dor abdominal recorrente, distensão abdominal, esteatorreia, constipação, baixa absorção de nutrientes e fadiga (1, 2, 6, 9). Além dessas manifestações gastrointestinais, a DC pode desencadear anemia em decorrência à baixa absorção de ferro, baixa absorção de cálcio culminando em osteopenia e osteoporose, depressão e problemas neurológicos como convulsões de repetição e cefaleia persistente, dentre outras manifestações (6, 7).

É possível verificar que as manifestações extragastrointestinais decorrentes da DC são relacionadas à baixa absorção de nutrientes no intestino delgado, mas cabe ressaltar que o próprio processo inflamatório contribui para depleção de nutrientes, principalmente o cálcio. Verifica-se ainda que, durante a manifestação da DC, ocorre uma maior ativação de osteoclastos que atuam no processo de aumentar a degradação das estruturas ósseas, contribuindo assim para o agravamento das manifestações extragastrointestinais (9).

1.1.1 Histórico e prevalência

A descrição de quadros clínicos similares ao que se observa atualmente para a DC remonta o século II depois de Cristo (11, 12). Em 1888 a DC foi parcialmente elucidada, com descrição mais acurada da sintomatologia clássica da doença, recebendo a denominação “afecção celíaca” em referência ao termo *koiliakos* que, em grego, significa sofrimento intestinal (13, 14). Apenas em 1949, após iniciar estudo sobre a DC em 1944, portanto durante a segunda guerra mundial, foi observado que, com a ausência forçada de cereais da dieta de pacientes que viviam em regiões de conflito, verificou-se uma melhora no quadro clínico desses indivíduos, o que apontava para um efeito deletério causado por alguma substância presente nesses alimentos (14, 15).

Atualmente, estudos apontam para uma prevalência de cerca de 1 % da doença celíaca na população mundial, sendo verificada predominantemente em indivíduos com ancestralidade europeia (16). A doença celíaca apresenta prevalência estimada em cerca de 3 % na população da Suécia (17), aproximadamente 2,4 % na Finlândia, 0,7 % na Itália e 0,3 % na Alemanha (18). No Brasil, estudos demonstram que a prevalência da DC é observada entre 0,15 e 0,84 % (19-23), sendo esta variabilidade de prevalência explicada pelas diferentes metodologias de diagnóstico utilizadas nesses estudos, pela variabilidade genética dos diferentes grupos analisados, pela região geográfica dos estudos em questão, dentre outras razões. No Distrito Federal (DF), foi verificada uma prevalência de 0,34 % da doença celíaca na população geral e de 0,54 % de prevalência em crianças (22).

Em estudo divulgado em 2016, foi avaliado que o risco de desenvolvimento da DC em grupo amostral do DF pode ser de até 1 para 7, quando considerados indivíduos que apresentam genotipagem favorável aos desenvolvimento da DC e possuem parentesco com paciente já diagnosticado, em circunstância de exposição prévia a fatores ambientais relacionados com a DC (24).

1.1.2 Caracterização da Doença Celíaca

Sob a perspectiva da predisposição genética, os principais fatores envolvidos com o desenvolvimento da DC são os genes dos Antígenos Leucocitários Humano (HLA) dos tipos DQ2 e DQ8, que codificam as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe 2 (MHC II), responsáveis pela apresentação antigênica (3, 6, 9). Todavia, é possível encontrar indivíduos que apresentam predisposição genética e não desenvolvem a DC, bem como indivíduos que não possuem tais variações genéticas e que, no entanto, desenvolvem a doença (25, 26).

Essas situações podem ser explicadas pelo fato de 40 % do risco de desenvolvimento da doença estar relacionada a estes genes do HLA, 15 % de susceptibilidade estar relacionada a outros *loci* não integrantes do sistema HLA, restando ainda cerca de 45 % de casos provavelmente relacionados a fatores fenotípicos e/ou genéticos relacionados a outros genes ou fatores regulatórios ainda desconhecidos (5). Dentre estas outras condições genéticas já conhecidas, estão descritos genes não HLA identificados por meio de estudos amplos de associação genômica (do inglês, *GWAS*), com destaque para genes como *CTLA4*, *CCR1*, *CCR3*, *CCR2* e *CCR5* (27, 28).

Em relação ao estímulo ambiental, a presença do glúten na dieta é considerada situação determinante para o desenvolvimento da DC. Glúten é definido como o termo utilizado para classificar a maioria das proteínas que compõe o endosperma dos grãos dos cereais em geral. São as gliadinas e gluteninas do trigo, as secalinas do centeio, as hordeínas da cevada, e as avelinas da aveia (2, 29). No trigo, o glúten é composto por duas proteínas distintas e de classes diferentes, a gliadina e a glutenina, sendo a gliadina a proteína envolvida na patogênese da DC.

O glúten é um componente predominante nos alimentos elaborados a partir de cereais, sendo necessário à fisiologia dessas plantas como molécula de armazenamento, estando localizado no endosperma tecidual vegetal, representando até 80 % da massa seca do grão, conferindo elasticidade e maleabilidade para os alimentos produzidos a partir desse componente (29, 30).

1.2 GLIADINA

A gliadina é um peptídeo de 30 kDa, solúvel em álcool, rico em resíduos de prolina (P) e glutamina (Q), com sequências poliglutamínicas localizadas em seu domínio C-terminal. Os peptídeos de gliadina são resistentes à digestão e sua alta concentração de prolina (cerca de 15 %) dificulta a hidrólise com enzimas presentes no lúmen e na borda em escova intestinal. Verifica-se ainda que a gliadina é formada em mais de 40 % por peptídeos de glutamina, o que ajuda a conferir carga residual neutra para esse peptídeo (2). Os peptídeos de gliadina oriundos desse digestão são altamente imunogênicos e se ligam fortemente aos linfócitos T (30, 31).

A presença da gliadina no intestino de indivíduos geneticamente propensos ao desenvolvimento da DC é o fator desencadeador da resposta imunitária nessa doença. Portanto, a entrada dessa molécula através da epitélio intestinal e sua presença na lâmina própria é indispensável na DC (2, 29, 30).

São conhecidos três mecanismos pelos quais ocorre a entrada da gliadina pelas células até alcançar a lâmina própria; 1) pela via transcelular, onde o glúten é endocitado em lisossomos, que o degradam em pequenos peptídeos não imunogênicos (32); 2) pela via paracelular, através da regulação das junções íntimas, responsáveis pela união das células epiteliais, promovendo uma alteração da permeabilidade celular (32, 33) e 3) por transporte transepitelial, quando ocorre o aumento da expressão celular de receptores de transferrina (CD71). Esse receptor reconhece as imunoglobulinas de classe A (IgA) complexadas com gliadina e libera essa associação sem processamento na lâmina própria (34, 35).

Verifica-se uma grande concentração de resíduos de glutamina (representado pela letra Q) e de resíduos de prolina (representado por P) na gliadina (2, 36, 37).

A figura 1 dispõe representação do peptídeo gliadina, com ênfase na sequência de resíduos de aminoácidos que o constitui.

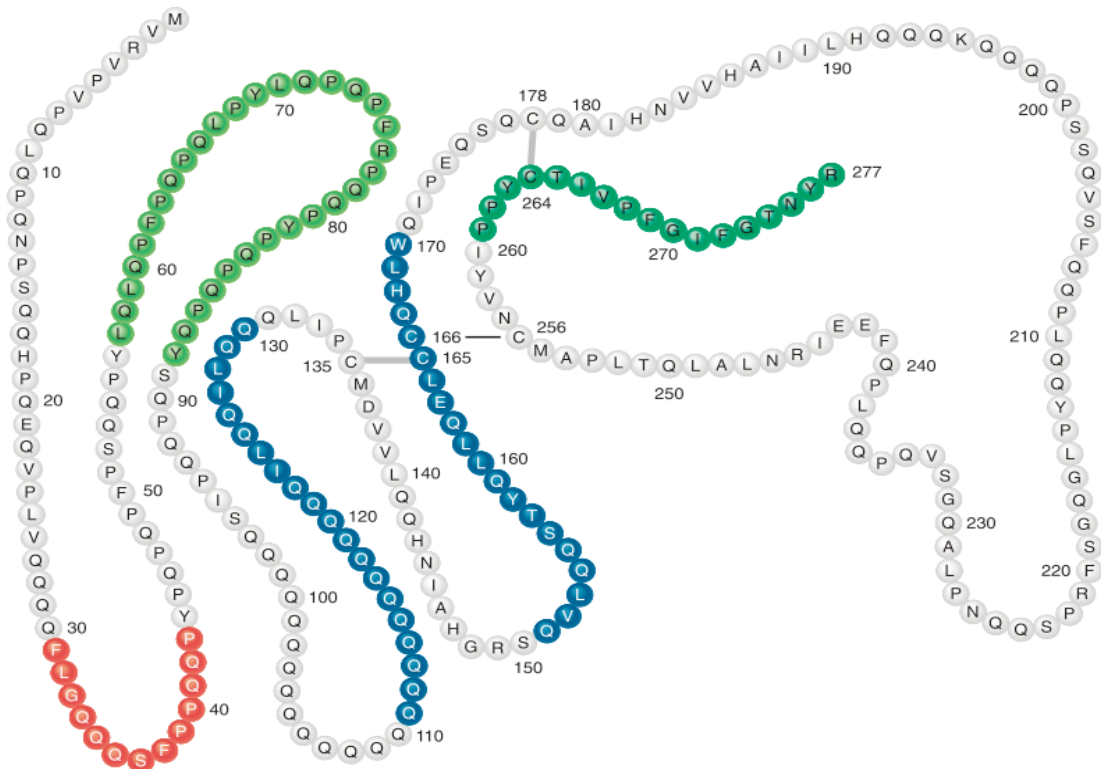


Figura 1: Representação da gliadina: Porção em vermelho associada a efeitos citotóxicos, porção em verde claro associada a efeitos imunomodulatórios, porções em azul associadas ao trânsito tecidual da gliadina e porção em verde escuro associada a ativação da expressão de interleucina-8 em pacientes
Fonte: Adaptado de Fasano, 2011 (33)

1.2.1 Imunopatologia

A gliadina e os peptídeos oriundos de sua digestão no trato gastrointestinal perpassam por processo químico de desamidação provocada pela enzima transglutaminase tecidual (tTG), principalmente a do tipo 2. A tTG-2 é uma enzima γ -glutamil transferase, cálcio-dependente, que converte resíduos de glutamina em ácido glutâmico, o que confere carga residual negativa para esses resíduos de aminoácidos. Para esse processo, a presença de resíduos de prolina auxilia a atividade das tTG-2 por meio do direcionamento dessas para ação mais eficaz e orientada sobre os resíduos de glutamina (32, 38). A figura 2 dispõe como os resíduos de glutamina e prolina são convertidos em ácido glutâmico.

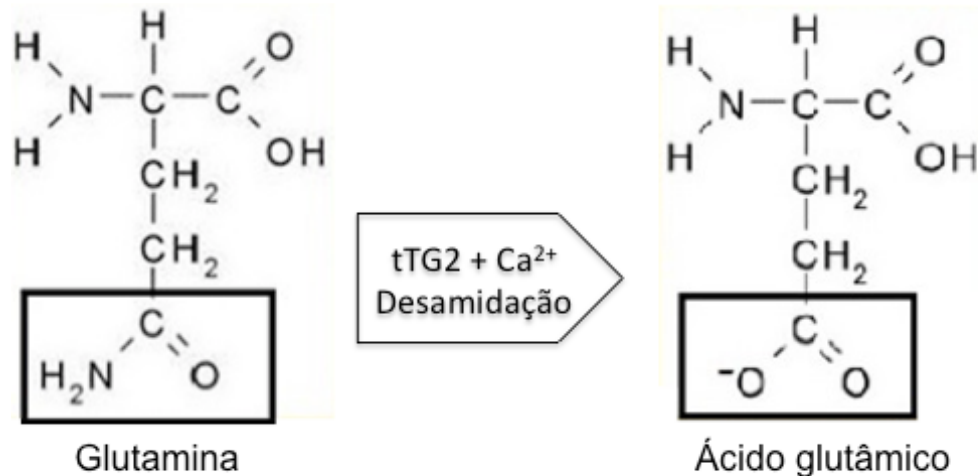


Figura 2: Conversão de glutamina em ácido glutâmico por desamidação realizada pela enzima tTG-2 na presença de cálcio, com ênfase nos grupos amida e ácido carboxílico
 Fonte: Adaptado de Abadie *et al*, 2011 (3)

Após as modificações realizadas pela ação das tTG-2, os resíduos de gliadina carregados negativamente têm sua afinidade de ligação aumentada com as moléculas de MHC de classe II HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC). Esses peptídeos são processados e apresentados pelas APC como antígenos para os linfócitos T CD4 localizados nos linfonodos mesentéricos da lâmina própria intestinal, com sua consequente ativação para linfócitos T CD4⁺ (39, 40).

Tendo em vista a forte interação entre resíduos de gliadina modificados e as fendas P1, P4, P6, P7 e P9 das moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 das APC, bem como a presença de resíduos ainda complexados com as tTG-2, essas macroestruturas são apresentadas para o reconhecimento pelo organismo como se fossem estímulos imunogênicos externos. Assim, verifica-se que a resposta imunológica acentua a resposta inflamatória em desenvolvimento, como acentua também o desenvolvimento da resposta autoimune (3, 38). A figura 3 representa como as moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 ligam-se aos resíduos de gliadina para sua posterior apresentação para as células T CD4.

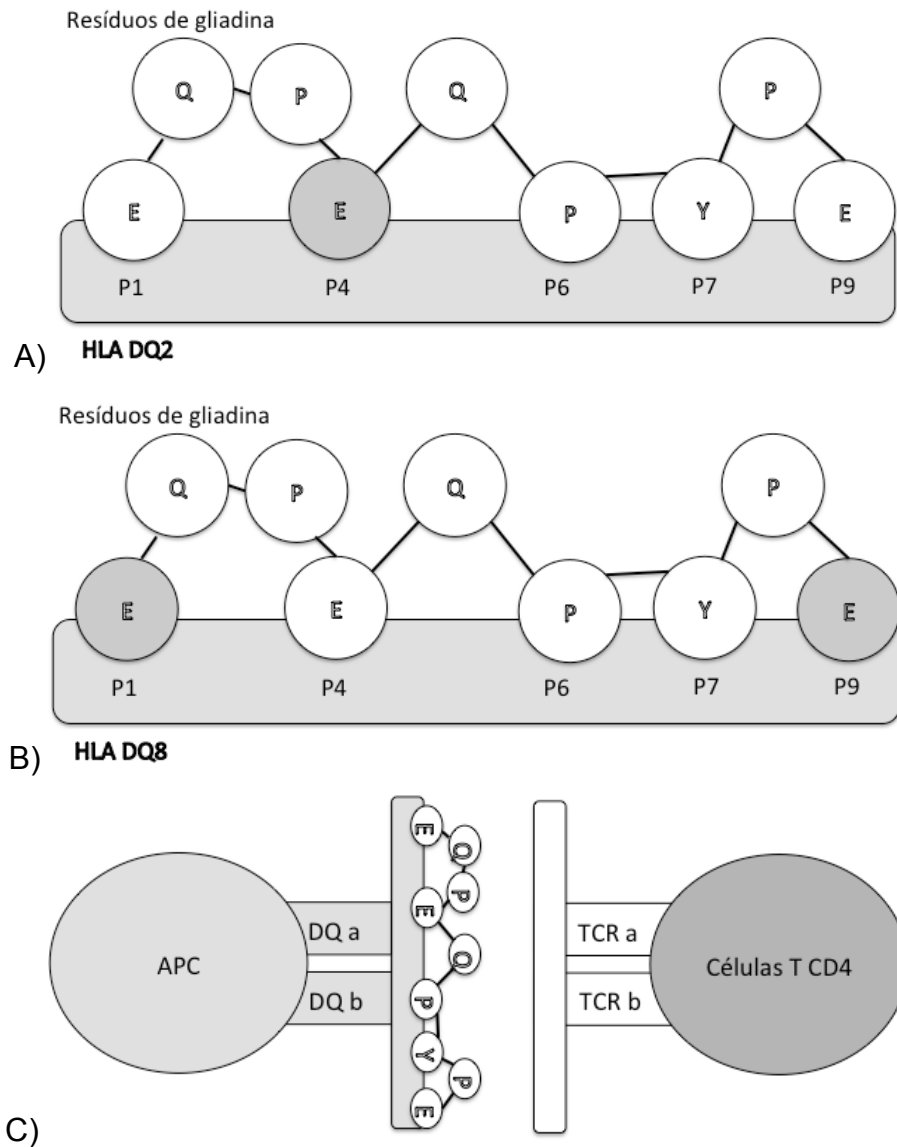


Figura 3: Fragmentos de gliadina modificados ligados às fendas P1, P4 e P9 por meio de A) HLA-DQ2 e B) HLA-DQ8. C) Modelo de apresentação às células T CD4
 Fonte: Adaptado de Abadie *et al*, 2011 (3) e Qiao *et al*, 2009 (40).

Em indivíduos geneticamente pré-dispostos à DC, esse evento estimula a secreção de anticorpos IgA, cuja atuação está relacionada, dentre outras coisas, ao transporte de resíduos de gliadina modificados para a lâmina própria intestinal (32, 33). Também se verifica o estímulo para a expressão da citocina interferon alfa (IFN- α), de caráter pró-inflamatório, por parte das APC, na presença dos antígenos. Essas citocinas induzem outras APC a também desenvolverem perfil pró-inflamatório, ampliando a resposta inflamatória exponencialmente e mantendo os linfócitos T CD4 ativos (2).

Os linfócitos T CD4⁺ passam então a reconhecer os antígenos oriundos da gliadina modificada, o que leva à indução da produção e secreção de citocinas inflamatórias como IFN- α , interleucina 21 (IL-21), dentre outras (39, 41, 42). Essas citocinas atuam na ativação de linfócitos T CD4⁺ do tipo auxiliares 1 (TH1) que, juntamente com a secreção de metaloproteinases de matriz por fibroblastos, iniciam um processo de destruição celular, com consequente atrofia das vilosidades, hiperplasia e inflamação das criptas e apoptose. Essas células TH1 migram para os linfonodos mesentéricos e amplificam o processo inflamatório pela ativação de novas células T CD4 (1, 5).

Além da secreção das IgA, durante a DC, verifica-se a secreção das imunoglobulinas de classe G (IgG) contra resíduos de gliadina modificados, bem como contra as tTG-2 que eventualmente ainda estiverem complexadas com estes peptídeos. Concomitantemente, os linfócitos T CD4⁺ produzem citocinas que ativam as células B e provocam sua multiplicação. Essas células se diferenciam em plasmócitos e passam a produzir anticorpos contra todos os tecidos biologicamente processados durante a destruição celular anteriormente iniciada. Tecidos conjuntivos, gliadina complexada com tTG-2, gliadina residual isolada, tTG-2 isolado, todos estes elementos se tornam alvo da resposta imunológica mediada por anticorpos, agravando o quadro de lesão epitelial (2, 3, 4). Verifica-se ainda a secreção de interleucina 15 (IL-15) pelos enterócitos, que induz o aumento da apoptose e maior permeabilidade para APC transpassarem a camada celular e sustentar o quadro de dano (3, 5).

1.2.2 Ativação das vias inflamatórias nos enterócitos

Além dos efeitos imunogênicos provocados pela gliadina, efeitos diretos de seus peptídeos digeridos também estão envolvidos na patogênese da DC (43). A gliadina e seus peptídeos conduzem a um aumento nos níveis de radicais livres intracelular, principalmente espécies oxigênio-reativas (ROS) e espécies nitrogênio-reativas (RNS), por meio da ativação da expressão do gene óxido nítrico sintetase induzível (*iNOS*). Esses radicais podem induzir modificações na morfologia dos enterócitos, hiperplasia de cripta e apoptose (39).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contribuem para o aumento na atividade das tTG-2, retroalimentando positivamente o processo inflamatório e o estresse oxidativo. O estresse oxidativo corrobora com o processo de hiperpolarização das membranas mitocondriais, o que colabora com a ativação da apoptose celular observada na DC (39, 44). Todos esses eventos ocorrem de maneira concomitante e se retroestimulam positivamente, potencializando os danos ao epitélio intestinal.

Os níveis elevados de ROS, decorrentes da maior concentração de tTG-2, estão relacionados a uma maior degradação proteica, incluindo degradação de fatores mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios (45, 46). Essas alterações contribuem com o aumento na expressão de interleucinas (IL), proteínas expressas pelo epitélio intestinal relacionadas à ativação de mecanismos que desencadeiam resposta inflamatória. Estas IL, dentre elas IL-6, IL-8 e IL-15, geram mais perturbação oxidativa intracelular, provocando a ativação da via do fator nuclear kappa B (NFκB), o que proporciona um aumento da resposta inflamatória. Também verifica-se uma ativação da ciclooxigenase (COX), com posterior expressão de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (47-49). A figura 4 apresenta um modelo de ativação das vias iNOS, citocinas inflamatórias e COX.

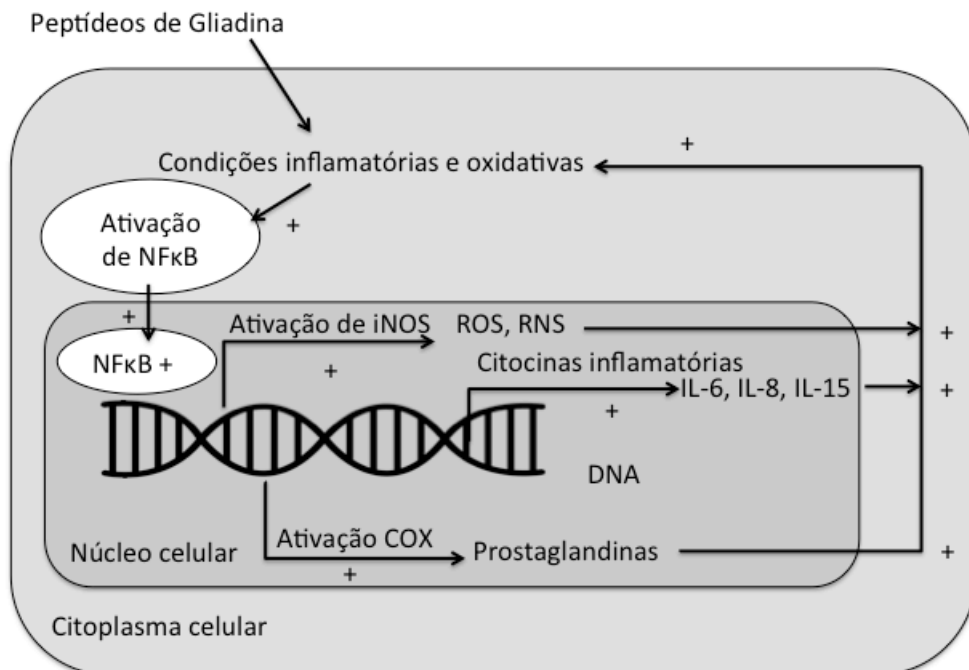


Figura 4: Representação da ativação de iNOS, COX e expressão de citocinas inflamatórias
 Símbolo (+) representa ativação da via

Fonte: Adaptado de Ferretti *et al*, 2012 (39) e Coleman, 2001 (51)

1.2.2.1 Via NFκB

O NFκB ativado modula a expressão de genes essenciais no processo inflamatório e na defesa contra parasitos, atuando também na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e no funcionamento do sistema nervoso central (45). Duas são as vias mais estudadas para a ativação do NFκB; a via clássica e a via alternativa. A via clássica está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à antiapoptose e à sobrevivência celular, sendo essa via a mais comum (45). A via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (50).

Por meio da via clássica, NFκB pode-se ligar em região promotora do DNA e iniciar a transcrição de inúmeros genes-alvo relacionados à atividade pró-inflamatória, dentre eles *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, gene da iNOS e de COX, bem como genes relacionados à expressão de receptores como o IL-15RA, dentre outros genes (45, 46). Assim, verifica-se que a ativação por meio de NFκB pode contribuir com o aumento da resposta inflamatória, bem como com a exacerbação do estresse oxidativo intra e extracelular (47).

1.2.2.2 Estresse oxidativo

As espécies oxigênio-reativas (ROS) e espécies nitrogênio-reativas (RNS) podem ser geradas a partir de várias reações intracelulares, bem como podem atuar como segundos-mensageiros participando da homeostase dos tecidos orgânicos. Quando na presença de estímulos inflamatórios é possível verificar um aumento nas concentrações dessas moléculas reativas (48, 49, 51). Com a elevação dos níveis dessas espécies reativas e com a redução da capacidade de enzimas citoplasmáticas de neutralizar esses eventos, o processo de estresse oxidativo instala-se.

Durante esse processo, ROS e RNS passam a atuar de maneira deletéria, com comportamento citotóxico, reagindo inespecificamente com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos com potencial de causar danos irreversíveis. Além disso, iniciam ou intensificam a resposta inflamatória através da ativação de NFκB (49, 52).

O óxido nítrico (NO) é a molécula mais importante produzida no processo de estresse oxidativo. O NO está envolvido na regulação de diversos mecanismos fisiopatológicos e é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Dentre suas funcionalidades, atua como mediador biológico com ação semelhante a de alguns neurotransmissores e pode regular o tônus de vasos sanguíneos. Todavia, quando em grandes concentrações, pode se comportar como radical livre e gerar efeitos citotóxicos, principalmente durante o desenvolvimento de processos inflamatórios (53).

A enzima NOS possui três isoformas; NOS neural (nNOS ou NOS-1), NOS induzível (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3). A iNOS é a isoforma que responde a estímulos inflamatórios diversos, desencadeando a produção de NO (54). A inibição da produção de NO está associada a uma diminuição na exacerbação da resposta inflamatória, de maneira que essa característica posiciona a iNOS como alvo para estudo de novas substâncias anti-inflamatórias de interesse farmacológico (39, 54).

1.2.2.3 Via ciclooxygenase

Durante a resposta inflamatória acionada via NFκB, tão importante quanto a ativação por iNOS é a ativação pela ciclooxygenase (COX), que podem corregular entre si (55, 56). As COX são enzimas que, juntamente com lipooxigenases e epoxigenases, produzem os mediadores lipídicos prostaglandinas, leucotrienos e endoperóxidos (respectivamente) a partir do metabolismo do ácido araquidônico.

Esses mediadores atuam como sinalizadores intra e extracelulares em processos biológicos de homeostase e inflamação, sendo utilizados como marcadores da resposta inflamatória em testes *ex vivo* (57). As prostaglandinas são organizadas em dez subclasses, das quais D, E, F, G, H e I são as mais importantes durante o processo inflamatório.

Essas prostaglandinas são formadas pela ação da COX de atividade constitutiva (COX-1) e pela COX de atividade relacionada ao processo inflamatório, portanto, induzidas (COX-2). A prostaglandina da subclasse E₂ (PGE₂) é gerada via prostaglandina sintetase E em leucócitos e a sua desregulação ou a degradação da ação da PGE₂ têm sido observadas em várias condições patológicas. Durante o processo inflamatório, a PGE₂ desempenha papel central por estar relacionada a todos os eventos celulares que conduzem ao aumento dos sinais clássicos da inflamação (58).

Portanto, é possível verificar que importantes eventos relacionados à instalação inicial do quadro inflamatório da DC estão também relacionados ao desequilíbrio oxidativo intra e extracelular disparado pela exposição à gliadina e aos peptídeos oriundos de sua digestão. Um tratamento que envolva a redução de intensidade nos eventos inflamatórios, bem como nos eventos de estresse oxidativo observados, poderia reduzir os danos celulares desencadeados pela DC, auxiliando o tratamento usual que é a dieta livre de glúten.

O tratamento da DC está limitado à dieta completamente livre de glúten e peptídeos relacionados (5, 11) o que do ponto de vista da convivência social dificulta a adesão dos pacientes. (9). Essa baixa adesão pode ser em parte explicada tendo-se em vista que não basta o alimento estar livre de glúten, é preciso ter certeza de que a produção e elaboração do alimento se deu com utensílios totalmente isentos de glúten. Assim, o desenvolvimento de estratégias que possam auxiliar no controle da resposta imune-inflamatória da DC pode contribuir para uma melhora na qualidade de vida desses indivíduos.

1.3 SILIMARINA

A planta *Silybum marianum* (L.) Gaertn de onde se extrai a silimarina é conhecida popularmente como *blessed thistle*, *Marian thistle*, *Thistle Variegated*, cardo-leiteiro, cardo-Maria, cardo-de-Santa-Maria, cardo-branco, cardo-santo, serralha-de-folhas-pintadas, cardo-mariano (dentre outras variações) e pertence à família *Asteraceae*. Essa planta possui folhas longas, escuras e espinhosas, cardo robusto, é caducifólia e apresenta floração anual ou bianual. Cresce em solos

preferencialmente rochosos, podendo atingir até três metros de altura, constituindo-se como planta herbácea, com flores arroxeadas e folhas com nervuras de aspecto leitoso (59).

É originária da região sul da Europa, bem como das regiões fronteiriças com a Ásia e, atualmente, está distribuída por todo o planeta, desenvolvendo-se bem em regiões de clima tropical e subtropical (60). Seu crescimento total e produção de substâncias de interesse farmacológico podem variar conforme as características climáticas da região em que se desenvolve (61). Possui flores hermafroditas e desenvolvem inflorescências constituídas por capítulos isolados, localizados no ápice da planta, região em que se encontram as sementes (62).

As sementes de *Silybum marianum* são utilizadas em aplicações da medicina tradicional há mais de 2.000 anos, sendo preparadas maceradas para uso no tratamento de hepatites, cirroses, como agente protetor contra venenos de cobra e toxinas de insetos e contra a intoxicação por cogumelos ou por álcool (63). A composição de substâncias dessa planta se dá em maior concentração nas sementes, que contêm de 70 a 80 % de silibina em sua estrutura, sendo esse o principal componente de interesse farmacológico da silimarina (64).

A silibina pertence ao grupo das flavolignanas, portanto são flavonoides, que na fisiologia da planta atuam como metabólitos secundários responsáveis pela pigmentação amarela, vermelha e/ou azul nas flores da planta (65). Em sua estrutura molecular, a silibina é constituída de grupamentos polifenólicos e, tendo-se em vista essa natureza fortemente fenólica, possui atividade antioxidante por quelar radicais livres, dentre eles o radical hidroxila, contribuindo para a formação de compostos químicos mais estáveis e menos reativos (66). Esta ação contribui para a redução de danos pela peroxidação lipídica de ácidos graxos da membrana celular, relacionada a lesão de membranas lipídicas e de estruturas intracelulares (67).

A figura 5 apresenta a flor da planta de onde se extrai a silimarina presente em suas sementes.



Figura 5: Flor da Silimarina

Fonte: Joaquim Alves Gaspar, Lisboa, Portugal. Acesso por meio do endereço eletrônico [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/31/Thistle_April_2010-2.jpg]. Acesso em outubro de 2016

O mecanismo farmacológico de ação da silimarina está relacionado à inibição do fator de transcrição NFκB, que regula e coordena a expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório, além de estar sujeito à regulação redox, o que reforça seu papel antioxidante (63). Verifica-se ainda que a supressão da atividade de NFκB pode estar relacionada a inibição das vias inflamatórias super expressas por ação direta deste fator de ativação nuclear, contribuindo para a modulação de interleucinas importantes durante o processo inflamatório (64). Dentre estas interleucinas, verifica-se a inibição da interleucina 6, que está envolvida com a ativação de células B e células T, importantes durante a resposta imunológica (65).

Também já foi demonstrada a capacidade da silimarina de inibir a expressão de iNOS, por atuação direta sobre a enzima, contribuindo para seus efeitos antioxidantes (68). As atividades mais estudadas das substâncias presentes na silimarina são seus efeitos hepatoprotetores, atividade anticâncer e atividade antioxidante (69).

1.4 CÉLULAS CACO-2: UM MODELO CELULAR PARA DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca vem sendo estudada há muito tempo e, tão complexo quanto ampliar os conhecimentos sobre esta doença é o desafio de se produzir modelo experimental que viabilize o estudo da DC *in vivo* e/ou *in vitro*. A tentativa de gerar camundongos que produzam de maneira constante níveis altos de linfócitos T CD4⁺, situação observada na DC, não foi suficiente para gerar o quadro de dano tecidual observado em pacientes com DC, mesmo adicionando artificialmente grandes concentrações de tTG-2 (70).

Tendo em vista a dificuldade de gerar animais geneticamente modificados para mimetizar características específicas da DC observadas em seres humanos, alguns estudos buscaram provocar dano celular em animais por meio de intoxicação alimentar com gliadina associada a toxinas, exposição à alimentação radioativa, dentre outras medidas de dano físico direto, com posterior alimentação desses animais por meio de gavagem (71). Embora esses estudos em modelos animais possuam suas vantagens, a inespecificidade dos danos provocados e a resposta a essas lesões não necessariamente reproduzem o que se observa na doença celíaca, o que levanta incertezas quanto a esses modelos experimentais.

Abordagens *in vitro* têm sido aventadas com a utilização de células de biopsia de intestino de pacientes celíacos. Do ponto de vista da reprodutibilidade do que se observaria *in vivo*, trata-se de modelo altamente fidedigno, posto que são células de pacientes celíacos (72). Contudo, tendo em vista a dificuldade de se obter essas células de biopsias, os óbices éticos relacionados à sua obtenção, a dificuldade de se manter a cultura viável por tempo prolongado e a necessidade de se renovar essa cultura, pois não são células imortalizadas, sugerem que manter seu manejo torna-se excessivamente desafiador e, em alguns casos, contraproducente (70).

Com o objetivo de trabalhar com modelo experimental de origem humana e de fenótipo intestinal, de aquisição segura, confiável e perene, e principalmente de manutenção descomplicada, um modelo que se enquadra nessas características são as células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). A morfologia das Caco-2 em baixa e alta confluência pode ser observada na figura 6.

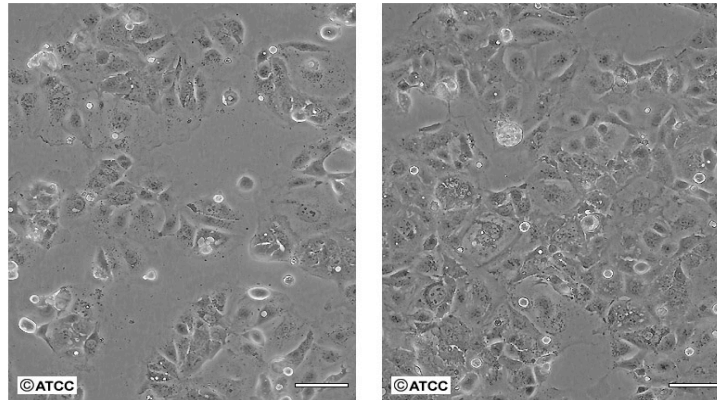


Figura 6: Células Caco-2 com confluência de crescimento de 40 % e 80 %, respectivamente
Fonte ATCC®, 2014 (73)

As Caco-2 são obtidas originalmente de células diferenciadas de carcinoma de cólon humano. Quando atingem confluência, essas células diferenciam-se espontaneamente (73, 74). Em cultura, as Caco-2 são polarizadas e possuem morfologia de enterócitos com a superfície apical coberta por microvilos (75). Organizadas em monocamada, as Caco-2 são unidas por junções apicais complexas que incluem junções íntimas e desmossomos. Culturas em pós-confluência expressam sucrase, isomaltase, fosfatase alcalina e aminopeptidase N, e enzimas típicas de enterócitos diferenciados (76).

Verifica-se ainda que as células Caco-2, embora sejam células de origem tumoral, são competentes na expressão de todos os genes observados em enterócitos normais e celíacos, bem como respondem adequadamente a estresse oxidativo, sendo verificado todos os segundos-mensageiros necessários para estes procedimentos (73, 74). Assim, as Caco-2 se destacam como uma das linhagens celulares mais utilizadas para o estudo de eventos que requerem modelos experimentais que mimetizem a barreira epitelial intestinal, bem como se apresentam como uma das linhagens mais descritas em estudos de DC (70).

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo geral avaliar os efeitos da silimarina em células Caco-2 previamente expostas ao peptídeo gliadina após intervalos de 6 h, 24 h e 48 h.

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- Analisar o perfil de expressão gênica de *NFκB*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, *IL-15RA* e *iNOS* das células expostas aos estímulos avaliados após intervalos de 6 h, 24 h e 48 h;
- Dosar o óxido nítrico presente no meio celular das células expostas aos estímulos avaliados após intervalos de 6 h, 24 h e 48 h;
- Dosar as concentrações de prostaglandina E₂ liberadas pelas Caco-2 após exposição aos estímulos avaliados por 48 h no meio celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca (coordenado pelo professor Riccardo Pratesi) e no Laboratório de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônico-Degenerativas (coordenado pela professora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega), localizados na Faculdade de Ciências da Saúde e Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.1 OBTENÇÃO E CULTURA DAS CÉLULAS CACO-2

As Caco-2 (HTB-37[®]) constituem uma linhagem de células aderentes epiteliais originadas de adenocarcinoma colorretal humano e possui certificado para utilização em pesquisa pela *American Type Culture Collection* (ATCC[®]) (73). Essas células são consideradas o modelo *in vitro* mais fidedigno e de melhor uso padronizado para epitélio intestinal humano reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) (77).

As células Caco-2 utilizadas neste estudo foram adquiridas do banco de células do Instituto Adolfo Lutz (IAL - São Paulo/SP, Brasil) e foram recuperadas conforme orientações e protocolos da ATCC[®]. A recuperação e o cultivo dessas células foram realizados de maneira a manter padrões normais de crescimento celular, confluência, subcultivo e morfologia adequados para a manutenção da cultura celular e para uso durante os ensaios laboratoriais.

Após adquiridas, as células Caco-2 foram mantidas em nitrogênio líquido, para criopreservação, imersas em solução de congelamento contendo 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 22 % de Soro Bovino Fetal (SFB). Para os experimentos deste estudo as células foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 2 minutos e foram transferidas para frascos de 75 cm² contendo meio de cultura *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com SFB.

Posteriormente, essas células foram mantidas em frascos de cultura celular de 75 cm² contendo meio DMEM suplementado com 4.5 g/L de glicose, 2 mM L-glutamina, sem piruvato de sódio (código 11965-092, *Life Technologies*, GIBCO);

aditivado com 200 mM de piruvato de sódio (SIGMA-Aldrich); 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (SIGMA-Aldrich); 1 % aminoácidos não essenciais; 25 mM de ácido etanosulfônico 4-2-Hidroetil Piperazina-1 (HEPES, SIGMA-Aldrich) e 20 % de soro fetal bovino (SFB) (*Life Technologies*, GIBCO) inativado a 56°C por 1h, sendo esse meio denominado ao final como DMEM completo.

As culturas de Caco-2 foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade com trocas regulares do meio de cultura 8-10 mL a cada 3 ou 4 dias para frascos de 75 cm². O subcultivo foi realizado quando as culturas atingiam taxa de confluência de 80 %, quando então as células foram descoladas da superfície inferior do frasco utilizando tripsina a 0,05 % contendo 0,53 mM EDTA (*Life Technologies*, GIBCO) por um período de 10 minutos. Posteriormente as células foram semeadas a uma concentração de 5 x 10⁶ células para um novo frasco de 75 cm², sendo a tripsina residual neutralizada com meio DMEM completo em um volume correspondente ao dobro do volume de células tripsinizadas.

Para a realização dos experimentos *in vitro*, as células foram transferidas para placas de cultura de 6 poços de 35 mm de diâmetro, contendo 3 mL de meio DMEM completo e mantidas em cultura por 3 dias, até atingirem 80% de confluência, com trocas regulares de meio. Uma vez atingida a confluência desejada, foi realizada troca para meio DMEM com SFB a 5 %, no intuito de se controlar a taxa de crescimento celular. As culturas celulares foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade por mais 24 h para a realização dos experimentos. É importante salientar que para a realização dos experimentos os meios DMEM utilizados não possuíam as 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, no intuito de que esses antibióticos não causassem qualquer interferência nos resultados dos experimentos.

3.2 PREPARO DOS REAGENTES DE ESTÍMULO

A gliadina utilizada no presente estudo foi a de código G5004 adquirida junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A identidade do peptídeo foi confirmada pela empresa por meio de espectrometria de massas (EM) e cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC), sendo atestada uma pureza ≥ 95 %.

A preparação da gliadina para estudo envolveu a utilização de 1 g de gliadina em 50 mL de etanol 60 %, resultando em uma concentração de 20 mg/mL para a solução estoque. Essa solução foi aquecida a 37 °C por 8 h, 2 mL dessa solução foi diluída em 4 mL de etanol 60 % e, ao fim, foram adicionados mais 4 mL de PBS 1 X, para a obtenção de um volume final de 10 mL. Foram geradas soluções de gliadina nas concentrações de 80 µg/mL, 120 µg/mL e 160 µg/mL em meio DMEM completo para a verificação e seleção da melhor concentração de gliadina para estudo, bem como para análise de viabilidade celular após exposição a esse estímulo.

A silimarina utilizada neste estudo foi a de código S0292, adquirida junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A pureza das flavolignanas presentes na silimarina foi confirmada pela empresa que utilizou metodologia de HPLC, sendo verificada uma pureza de ≥ 30 % do componente silibina. A preparação da silimarina para os experimentos envolveu inicialmente a diluição de 50 mg em 5 mL de DMSO 95 % para a formação da solução estoque. Posteriormente, parte desta solução foi diluída em meio DMEM completo para a obtenção de silimarina nas concentrações de 0,01 mg/poço, 0,14 mg/poço e 1,45 mg/poço para a verificação e seleção da melhor concentração de silimarina para estudo, bem como para a avaliação da viabilidade celular após exposição a esse estímulo. Essas concentrações são relativas às quantidades de 10 µM, 100 µM e 1.000 µM de silimarina por poço de células Caco-2 crescidos de DMEM. Essa quantificação, por sua vez, foi calculada de acordo com o peso molecular apresentado pelo fabricante para o produto silimarina em estudo.

O lipopolissacarídeo (LPS) utilizado neste estudo foi o de código 2880, adquirido junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O LPS é uma endotoxina que compõe constitutivamente as membranas celulares de bactérias gram-negativas, e estão associadas ao disparo de resposta inflamatória quando em contato com células de origens diversas (o que inclui células Caco-2) (78). A exposição a esses lipopolissacarídeos contribuem para desencadeamento da produção de vários metabólicos, dentre eles o óxido nítrico (NO), e regulando a expressão da enzima óxido nítrico sintetase induzível (*iNOS*) por meio da ativação de vias de sinalização sensíveis a ação de *MAPK* e *NFκB* (50). O LPS utilizado neste estudo foi diluído em água ultrapura para obtenção de soluções nas concentrações de 1 µg/mL, 2 µg/mL e 3 µg/mL.

3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a citotoxicidade das soluções de gliadina, silimarina e LPS nas análises *in vitro*, foi utilizado o método colorimétrico de captação do corante Tetrazólio WST-8.

Esse ensaio consiste na capacidade da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, presente somente em células vivas e com suas membranas internas intactas, em clivar o sal monossódico de tetrazólio WST-8 [2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil) 2H-tetrazólio]. Essa clivagem resulta na produção de cristais de formazan violeta que se depositam nas membranas mitocondriais. O número de células vivas é quantificado proporcionalmente à quantidade de formazan aferida em espectrofotometria.

Para a realização do ensaio de citotoxicidade foi utilizado o sistema comercial *Cell Counting kit-8*[®] (Sigma-Aldrich, Saint Louis - EUA) seguindo as instruções do fabricante. As células foram cultivadas em DMEM completo numa concentração de 1×10^5 células por poço em placas de cultura de 96 poços, contendo 200 μ L de meio DMEM completo até atingirem taxa de confluência de 80 %, por um período de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi trocado por 100 μ L de meio DMEM incolor suplementado com 5 % de SFB e 100 μ L de soluções de gliadina, silimarina e LPS nas concentrações avaliadas, totalizando um volume final de 200 μ L por poço. Todas as amostras foram submetidas a testes em triplicata biológica.

Após a adição dos estímulos, as culturas celulares foram homogeneizadas e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições descritas para o crescimento celular. Após 24h, o meio foi descartado e foi acrescentado em cada poço 100 μ L de meio DMEM incolor suplementado com 5% de SFB, em seguida, foi adicionado 10 μ L de WST-8 em cada poço. Como referência de controle positivo de crescimento celular foram utilizadas poços em que as células não foram submetidas a qualquer tratamento específico (NT). Para o controle de morte celular foram avaliados os poços em que as células receberam tratamento com solução DMSO a 95 %. Por fim, para leitura do material sem qualquer célula (branco), foi adicionado meio DMEM incolor em poços sem células. Para a obtenção da viabilidade celular foi calculada a diferença entre o valor da leitura das células do tratamento em avaliação pelo valor da leitura dos poços que não possuíam células (branco).

Esse resultado foi multiplicado por 100 e dividido pela diferença da leitura das células que não receberam tratamento pela leitura do branco. O produto obtido foi apresentado em porcentagem e definido como viabilidade celular. A fórmula aplicada nas células da planilha eletrônica para obtenção desse resultado foi:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}) \times 100}{(\text{absorbância das células não tratadas} - \text{absorbância do branco})}$$

Para avaliar a ausência de interação química entre os estímulos estudados e o reagente do *kit* WST-8, foram colocados em poços sem células as mesmas concentrações dos estímulos e foi adicionado o reagente WST-8. Após 6 horas de incubação com o WST-8, foi aferida a absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

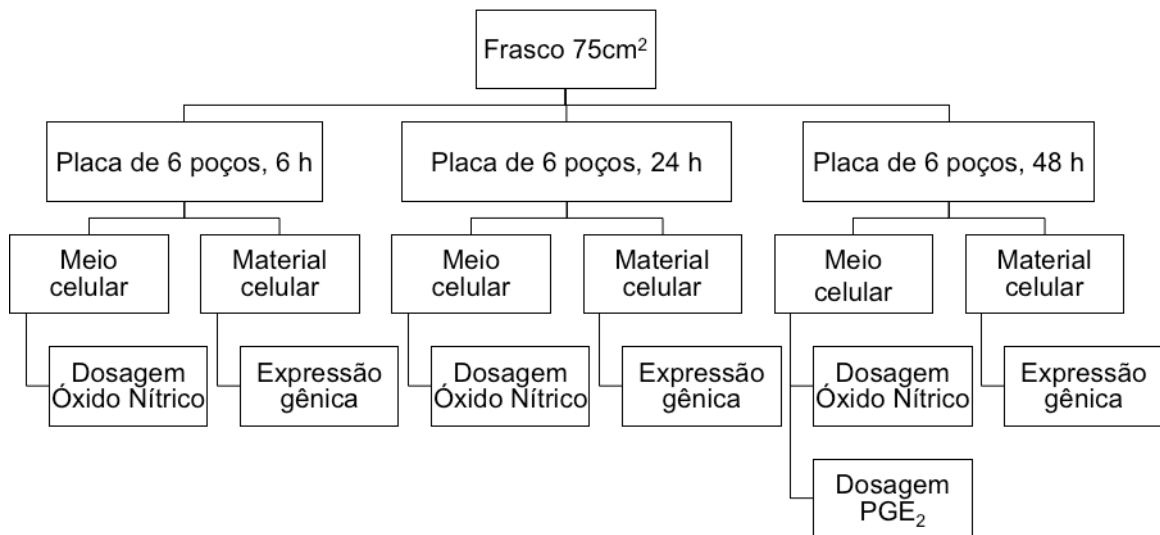
3.4 INTERAÇÃO DAS CÉLULAS CACO-2 COM ESTÍMULOS

Os experimentos foram realizados utilizando-se placas de 6 poços contendo células Caco-2 e DMEM para cada estímulo, sendo que cada placa foi reservada posteriormente para avaliação da interação das células com esses estímulos de interesse, dispostos como representado na tabela 1.

Tabela 1 – Organização esquemática das células Caco-2 nas placas de 6 poços

Poço	Estímulo
1	Não tratadas (NT)
2	Lipopolissacarídeo (LPS)
3	Gliadina (GLI)
4	Silimarina (SIL)
5	Exposição prévia a gliadina e tratamento com silimarina (GLI+SIL)
6	Tratamento prévio com silimarina e exposição a gliadina (SIL+GLI)

O delineamento do estudo envolveu a utilização de placas em triplicata biológica, reservadas para a avaliação em separado de eventos verificáveis no meio celular e no material celular, após exposição das células aos estímulos em análise por intervalos de 6 h, 24 h e 48 h, como apresentado na figura 7.



Fig

ura 7 – Delineamento experimental das triplicatas biológicas

A exposição prévia à gliadina e o tratamento prévio com silimarina consistiram em expor as células a esses estímulos 6 horas antes do início efetivo do experimento. Feito isso, as culturas celulares receberam a adição dos demais estímulos no tempo 0, a partir de quando se aguardou os intervalos de 6 h, 24 h e 48 h de interação dos estímulos com as células.

Esse tempos foram escolhidos visto que a partir de 6 h de exposição a estímulos imunogênicos é possível verificar resposta inflamatória nesse modelo celular, bem como após 48h da exposição as células não apresentam resposta inflamatória relevante quando comparado com o período anterior. Ao fim de cada tempo pré-estabelecido, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e mantidos a - 20 °C para posterior dosagem de óxido nítrico e prostaglandina E₂.

Por fim, foi adicionado 1 mL de Trizol[®] (Ambion, Life Technologies) às células aderidas ao fundo dos poços e esses produtos foram coletados e transferidos para microtubos e guardados a - 20 °C para realização de extração e purificação de RNA.

3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA

Para a extração e purificação do RNA foi utilizado o produto comercial *Kit Direct-zol[®] RNA Miniprep[®]* (código R2051, Zymo Research[®], Irvine, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

As células com o Trizol[®] foram descongeladas à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Após descongeladas, foi adicionado 1 mL de etanol a 95 %, sendo esse conteúdo homogeneizado por 15 segundos em agitador elétrico. Após esse procedimento, 700 µL do conteúdo foram transferidos para uma coluna de sílica do *kit* comercial e centrifugado a 11.000 *g* por 1 min, sendo o filtrado descartado. Esse passo foi repetido até que todo o conteúdo fosse filtrado pela coluna de sílica. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 400 µL de solução de lavagem, e uma nova centrifugação foi realizada a 11.000 *g* por 1 min. A coluna foi então transferida para novo tubo a fim de dar início à purificação do RNA.

Para o processo de purificação do RNA, foram adicionados à coluna 80 µL de enzima DNase (com intuito de eliminar eventuais traços de DNA presentes) aplicado diretamente no filtro e, em seguida, o tubo e coluna foram incubados a 37 °C por 15 min com posterior realização de centrifugação a 12.000 *g* por 30 segundos. No passo seguinte, foram adicionados 400 µL de solução pré-lavagem às colunas e foi realizada nova centrifugação a 12.000 *g* por 1 min. O filtrado foi descartado e esse passo foi repetido novamente, para então serem adicionados à coluna 700 µL de solução de lavagem e nova centrifugação a 12.000 *g* ser realizada por 2 minutos. O filtrado foi descartado e em seguida a coluna foi centrifugada na mesma velocidade e por mesmo tempo do passo anterior. A coluna foi posicionada em novo microtubo livre de RNase e recebeu a adição de 20 µL de água ultrapura diretamente sobre a coluna de sílica. Para a liberação do RNA purificado da coluna de sílica, uma nova centrifugação a 14.000 *g* foi realizada por 2 min. O filtrado final contendo RNA foi coletado do fundo do tubo e transferido para novo tubo de 1,5 mL livre de DNase e RNase, devidamente identificado para verificar pureza, integridade e quantificação do RNA.

3.6 ANÁLISE DA QUALIDADE DO RNA EXTRAÍDO

A quantificação do RNA extraído foi determinada por meio de espectrofotômetro *NanoDrop 2000 Spectrophotometer*[®] (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) que utiliza a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para avaliação do grau de pureza das amostras foi considerada a razão da absorbância em dois comprimentos de onda nas densidades ópticas (DO) $A_{260/280}$ nm (que avalia contaminação com proteínas) e $A_{260/230}$ nm (que avalia contaminação por compostos orgânicos). Quando a razão entre as absorbâncias desses dois comprimentos de onda ($A_{260/A280}$ e $A_{260/A230}$) ficou entre 1,8 e 2,0, o grau de pureza do RNA foi considerado adequado para a realização das análises. As amostras de RNA foram armazenadas a - 80 °C para posterior síntese de DNA complementar (cDNA).

3.7 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o produto *Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Após a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas para a concentração final de 15 ng/ μ L. Essa concentração foi estabelecida para padronizar o volume de 2 μ L de cDNA para cada amostra a ser pipetada, com o objetivo de cada reação de q-PCR ter concentração final de 30 ng/ μ L por reação. Os microtubos com o RNA e reagentes foram colocados em termociclador *BioNeer – My Genie 96 Thermal Block*[®] e submetidos à programação de transcrição reversa (RT). Por fim, os microtubos contendo o cDNA foram armazenados em temperatura de - 20 °C para futuras análises.

3.8 DEFINIÇÃO DOS GENES DE INTERESSE PARA O ESTUDO

Nessa etapa foram selecionados genes de expressão notoriamente associadas à atividade inflamatória. O gene *GAPDH* foi selecionado por se tratar de controle endógeno, ou seja, por ser um gene constitutivo que não altera seu padrão de expressão mesmo quando submetido a diferentes estímulos imunogênicos (27, 28, 40, 79, 80). Os genes interleucina-8 (*IL-8*) e interleucina-15 (*IL-15*) foram selecionados com base em estudos relacionados à resposta imune na DC (13). Já os genes da interleucina-6 (*IL-6*), receptor A da interleucina-15 (*IL-15RA*), *NFκB* e *iNOS* foram selecionados à partir de *GWAS*, tendo em vista o destaque desses genes em estudos relacionados a DC (27, 28, 79, 80). A tabela 2 descreve as sequências dos iniciadores utilizados nas reações de q-PCR, bem como suas origens. Esses iniciadores foram elaborados no programa *Primer Express*[®] (Applied Biosystems[®]) e sintetizados pela *Integrated DNA Technologies*[®] (IDT[®]).

Tabela 2 – Sequência de iniciadores utilizadas

GENE	Iniciador direto	Iniciador reverso	Referência NCBI	Fonte
<i>GAPDH</i>	5' TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G 3'	5' ACA TCG CTC AGA CAC CAT G 3'	NM_002046	Hs.PT.39a.22214836 *
<i>IL-6</i>	5' ATT CGT TCT GAA GAG GTG AGT G 3'	5' CCT TCC CTG CCC CAG TA 3'	NM_000600	HS.PT.58.40139476. g*
<i>IL-8</i>	5' CAT CTT CAC TGA TTC TTG GAT ACC 3'	5' TGT CTG GAC CCC AAG GAA 3'	NM_000584.3	Hs.PT.58.38869678.g *
<i>IL-15</i>	5' AGC CCT GCA CTG AAA CAG 3'	5' CCA CAT TTG AGA AGT ATT TCC ATC C 3'	NR_037840	HS.PT.58.21299580*
<i>IL15RA</i>	5' TTC CAA GTC TTC ATC TCT GCT G 3'	5' CTG GCA TGC TAC CTC AAG T 3'	NM_001243539	Hs.PT.58.20517823*
<i>NFκB</i>	5' AAA CAC TGT GAG GAT GGG ATC TG 3'	5' CGA AGC CGA CCA CCA TGT 3'	XM_006714229.1	(81)
<i>iNOS</i>	5' CCT ACG AGG CGA AGA AGG ACA G 3'	5' CAG TTT GAG AGA GGA GGC TCC G 3'	NM_000625	(82)

* Iniciadores pré-desenhados para expressão gênica obtidos da PrimerTime[®] IDT-DNA.

3.9 PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE qPCR

Os experimentos de q-PCR foram realizados no equipamento StepOne[®] (Applied BioSystems – Life Technologies[®], Carlsbad, EUA). A otimização do protocolo de reação foi realizada para determinar o desempenho da reação de PCR quando comparada com diferentes reações e condições.

Para uma rigorosa avaliação, diversos fatores são levados em consideração para se obter maior precisão e confiança nos resultados: 1 - Precisão: Realização da reação no alvo objeto do estudo. É determinada e passível de ser corrigida quando a reação é feita em triplicata; 2 - Eficiência: Estimada por meio do valor de R^2 , obtido após diluição seriada e indica o quão corretamente um valor está para ser possível prever outro valor, dando uma boa confiança na correlação de dois valores; 3 - Sensibilidade da análise estatística: Quando um grande número de replicatas é necessário para prover significância estatística e não permitir distribuição enviesada.

Para otimizar o protocolo de reação de q-PCR e a quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta Ct$ foram necessários dois experimentos. O primeiro experimento é a matriz dos iniciadores, ou titulação. Nesse procedimento diferentes concentrações dos iniciadores são usadas com a mesma amostra de cDNA, sempre em triplicata. A concentração ideal é aquela que apresenta um maior rendimento, ou seja, menor valor de *threshold cycle* (Ct) e maior ΔRN . Ainda com a titulação, é possível identificar a presença ou ausência de dímeros de iniciadores e a especificidade da reação, apresentando uma única curva de dissociação.

O segundo experimento é o ensaio de eficiência da reação, onde é possível determinar se o protocolo de reação está bem otimizado em relação às concentrações dos componentes e também se os iniciadores foram bem desenhados. Amplitude de variabilidade muito acentuada para esses elementos indicam problemas no experimento ou que os iniciadores não são eficientes. A eficiência da reação garante que os resultados gerados serão precisos e confiáveis quando comparados a outros experimentos.

3.9.1 Titulação dos iniciadores

Foram utilizadas quantidades de 0,1 pM, 1 pM, 10 pM, 20 pM e 30 pM por reação em triplicata para cada gene e o método de *Quantification – Relative Standard Curve*. Dessa forma, utilizando a mesma quantidade de amostras foram feitas reações com a combinação de três diferentes concentrações de cada iniciador (direto e reverso).

A concentração ótima foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct e Δ RN maior que 1 e que não apresentasse formação de dímeros. A melhor quantidade de iniciador por reação para os genes aqui em estudo foi de 20 pM.

3.9.2 Ensaio de eficiência

O ensaio de eficiência necessita de grandes quantidade de cDNA de uma mesma amostra para ser diluída de 1:2 em 6 pontos para ser realizado. No presente estudo, foram selecionadas as seguintes quantidades: 100 ng; 50 ng; 25 ng; 12,5 ng; 6,25 ng e 3;125 ng. Todas as reações foram feitas em triplicata por gene e o método utilizado foi *Quantification – Relative Standard Curve*.

A tabela 3 apresenta os valores obtidos dos testes de eficiência dos iniciadores deste estudo. Os valores relacionados à inclinação da curva padrão (*Slope*) devem ficar entre -3,1 e -3,6 para serem considerados adequados, ao passo que o valor de R^2 deve ser o mais próximo possível de 1. Já o valor de eficiência é dado em porcentagem, sendo que uma eficiência ideal para o conjunto de iniciadores deve ficar em torno de 90-110 %.

Tabela 3 – Parâmetros de eficiência dos iniciadores

GENE	Slope	R ²	Eficiência (%)
<i>GAPDH</i>	-3,224	0,999	104
<i>IL-6</i>	-3,174	0,994	106
<i>IL-8</i>	-3,196	0,991	105
<i>IL-15</i>	-3,185	0,992	106
<i>IL15RA</i>	-3,184	0,993	106
<i>NFκB</i>	-3,356	0,996	98
<i>iNOS</i>	-3,407	0,990	96

3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUALITATIVA EM TEMPO REAL

Os ensaios de amplificação foram realizados em placas de 96 poços e reação utilizando *SYBR Green Maxima SYBR Green/Rox q-PCR mastermix*[®] (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) que contém molécula fluorescente que se intercala à fita dupla de cDNA. A detecção da expressão gênica por q-PCR foi feita pelo sistema *StepOne*[®] *Real-Time PCR System* (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, EUA) que detecta em cada ciclo de amplificação a fluorescência da molécula *SYBR Green*.

Por reação de q-PCR foi utilizado 10 µL de *SYBR Master Mix*[®] (2x); 2 µL de iniciador direto; 2 µL de iniciador reverso; 2 µL de cDNA (30 ng/reação) e quantidade suficiente de água (*q.s.p.*) ultrapura (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) para completar 20 µL de reação. A amplificação constituiu de estágio a 95 °C por 10 min para ativação da enzima, seguido de ciclos de aquecimento a 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg, repetidos por 40 ciclos.

As reações foram realizadas em triplicata para cada gene, sendo que o gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno (gene normalizador) e como controle negativo foram utilizados poços com água substituindo o cDNA. A quantidade relativa de cada gene foi calculada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). A curva de dissociação foi analisada como controle de qualidade dos produtos da amplificação.

Para a validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de quantificação relativa é necessário realizar o ensaio de eficiência da reação que garante que os resultados gerados são precisos e confiáveis quando comparados a outros experimentos. A eficiência de amplificação é expressa em porcentagem gerada a partir da amplificação de uma diluição seriada de cDNA. Se um *amplicon* dobra em quantidade durante a fase geométrica de amplificação, então a eficiência dessa reação é de 100 %.

Uma eficiência de 100 % garante o aumento em 10-fold *change* de *amplicon* a cada 3.32 ciclos, durante fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3.3219$). Para um experimento de quantificação relativa ser válido, a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência (endógeno) precisam ser aproximadamente iguais, apresentando valores de eficiência entre 90 e 110 % o que indica o quão bom um valor é em prever outro valor, conferindo uma boa confiança na correlação de dois valores.

Os valores de Ct foram determinados a partir do estabelecimento do *Base line* e *threshold* para cada gene a fim de calcular a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{Tratamento Alvo}} - \Delta Ct_{\text{NT Alvo}})_{\text{tempo x}}$.

Uma vez realizado o experimento, o aparelho irá produzir um valor de Ct para cada replicata (são três replicatas por amostra). Dessa forma é preciso calcular a média e o desvio padrão (Sd) dos Cts (valores gerados pelo aparelho), então $\Delta Ct = (\text{média } Ct_{\text{Tratamento gene Alvo}} - \text{média } Ct_{\text{Tratamento gene Endógeno}})_{\text{tempo x}}$ e desvio padrão $Sd = \sqrt{Sd_{\text{Alvo}}^2 + Sd_{\text{Endógeno}}^2}$, para então calcular $2^{-(\Delta Ct \pm Sd)}$. Esse método foi calculado usando programa GraphPad Prism[®] 7 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

3.11 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) decompõe-se em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) no meio de cultura e, tendo em vista que a produção de NO_2^- pelas células pode ser dosada por ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess[®], é possível inferir a dosagem de óxido nítrico a partir das concentrações NO_2^- verificadas. Para esse teste foram preparadas duas soluções: dicloridrato de N-1(1-naftil) etilenodiamina (NEED) a 0,2 % em água e Sulfanilamida a 2 % em H_3PO_4 a 5 %, que quando misturadas em proporções v/v para serem utilizadas no ensaio, formam o reagente de Griess[®] (83).

A curva de referência foi preparada, fazendo uma diluição seriada de nitrito de sódio nas seguintes concentrações: 100 μM ; 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM ; 3,13 μM e 1,56 μM . Foram colocados em todos os poços 50 μL de meio DMEM com 5 % de SFB incolor. Aos poços da curva de referência foram adicionados, em triplicata, 100 μL da diluição de nitrito de sódio em cada uma das concentrações. Aos poços restantes foram adicionados 100 μL do sobrenadante de cada amostra com seus respectivos tratamentos.

Para se chegar à concentração de NO_2^- produzido, e posterior inferência das concentrações de NO secretados pelas células, foram adicionados a cada sobrenadante da cultura 100 μL do reagente de Griess[®]. Para o controle negativo, foram separados poços contendo apenas meio DMEM com 5 % de SFB, sem amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro empregando filtro de 450 nm.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de NO_2^- comparando a densidade óptica (DO) obtida com a DO da curva padrão de NO_2^- por meio de regressão linear.

3.12 DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E₂

A dosagem da prostaglandina E₂ (PGE₂) foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático de competição, seguindo as recomendações do fabricante (Cayman Chemical Company[®], código 514010, Ann Arbor, Michigan, EUA). Nesse ensaio, foram utilizados os sobrenadantes das células Caco-2 após os tratamentos em estudo.

A placa contida no produto para detecção de PGE₂ veio com o tratamento de anticorpos policlonais anti-IgG aderidos à sua superfície interna inferior bloqueados com uma formulação própria de proteínas, para evitar reações inespecíficas. Após o preparo de todos os reagentes, 100 μL do EIA buffer foi adicionado nos poços com NSB (ligante não específico) e 50 μL nos poços B₀ (ligante máximo), em seguida 50 μL da curva padrão foi adicionada de acordo com cada concentração (padrões 1-8, cuja concentração varia de 25.000 a 39 pg/mL) em duplicata e em seguida 50 μL de cada amostra foram adicionados em triplicata nos respectivos poços, de acordo com cada tratamento avaliado, seja o tratamento anterior ou posterior à exposição a gliadina, iniciando pelos controles negativo (célula não tratadas) e, em seguida, pelo positivo (células estimuladas com gliadina).

Na sequência, 50 μL da enzima acetilcolinesterase ligada à prostaglandina (*tracer*) foi adicionada aos poços com a única exceção dos TA (atividade total) e do Blk (branco) e, por último, 50 μL do anticorpo monoclonal de prostaglandina E₂ foi adicionado aos poços com exceção do TA, NSB e Blk. A placa foi coberta por material plástico do tipo parafilme e incubada por 18 horas a temperatura de 4 °C. Após esse período, foi retirado o plástico parafilme e a placa foi então direcionada para o equipamento BEST 2000[®] para o realização do processamento automatizado do ensaio. A placa foi inicialmente aspirada para remoção da solução de preparação inicial e, em seguida, foi lavada, por 5 vezes com o *Wash Buffer*.

Após este processo, foram pipetados 200 μL do reagente de Ellman's em todos os poços e 5 μL de *tracer* no TA. Posteriormente, a placa foi incubada sob

agitação orbital com cobertura plana e ausência de luz, por 90 minutos. Finalmente, a leitura da placa foi realizada empregando um comprimento de onda de 405 nm.

O ensaio de PGE₂ é baseado na competição entre PGE₂ e a PGE₂ conjugada à acetilcolinesterase, a uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal de PGE₂. Como a concentração de PGE₂ conjugada é constante, e a da amostra de PGE₂ varia, a quantidade de PGE₂ conjugada é capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal de PGE₂, o qual é inversamente proporcional a concentração de PGE₂ na amostra pesquisada. Esse complexo entre o anticorpo-PGE₂ se liga ao anticorpo policlonal anti-IgG que previamente revestia a superfície inferior interna da placa. A placa então passa pelo processo de lavagem para remoção dos compostos não ligados, quando então é adicionado novamente o reagente de Ellman's aos poços.

O produto final dessa reação enzimática apresenta uma coloração amarelada, conforme descrito na bula do produto. A análise da intensidade dessa coloração é determinada por espectrofotometria e os resultados são avaliados de forma inversa à intensidade do sinal da absorbância obtido, ou seja, quanto maior for a concentração de PGE₂ na amostra testada, menor será a ligação de PGE₂ conjugada à acetilcolinesterase e menor será a absorbância, e vice-versa.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes estatísticos realizados neste estudo foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism[®] versões 7.0 para Windows e 4.0 para Mac (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

O teste de análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way* ANOVA) com pós-teste de Dunnett foi aplicado para visualizar a variação da expressão gênica nas células desafiadas pelos estímulos em estudo para cada um dos grupos testados e nos três tempos em análise, tendo-se por objetivo a comparação do observado nas células expostas ao peptídeo gliadina com o que se observa nos demais grupos experimentais expostos a silimarina, exposição prévia à gliadina e tratamento com silimarina e exposição prévia à silimarina e tratamento com gliadina.

Também foi utilizado o teste ANOVA de duas vias (*two-way ANOVA*) com pós-teste de Bonferroni em cada grupo em estudo com o objetivo de avaliar se o tempo de interação com peptídeo gliadina influenciava ou não na expressão do *fold-change* observado.

Assim, buscou-se comparar o observado entre si em todos os grupos experimentais avaliados neste estudo. Por fim, foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando p valor calculado foi menor do que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Para a realização do estudo, foi necessário padronizar a quantidade de células por poço para o melhor desempenho das análises que seriam realizadas a posteriori. Neste sentido, foram selecionadas duas concentrações de células Caco-2 para avaliação de desempenho e seleção para estudo: 5×10^5 e 5×10^6 por poço.

O primeiro experimento consistiu em expor as células Caco-2 aos estímulos gliadina e LPS nas concentrações de 80 $\mu\text{g/mL}$ de meio e 1 $\mu\text{g/mL}$ de meio, respectivamente. Foi utilizada a metodologia de espectrofotometria para a dosagem de óxido nítrico, tendo sido as células expostas aos estímulos e acompanhados por 6 h, 24 h e 48 h.

Os resultados apresentados na figura 8 mostram que as células na concentração de 5×10^5 por poço responderam de maneira mais previsível aos estímulos. As células em concentração de 5×10^6 por poço cresceram acima das taxas de confluência normais (verificado em microscopia), ao ponto de se desprenderem do fundo dos poços.

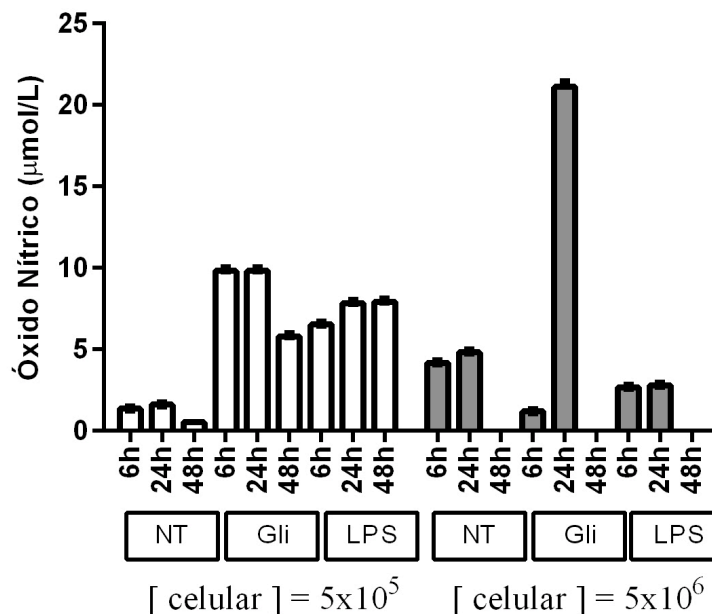


Figura 8 – Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células Caco-2 nas concentrações celulares de 5×10^5 e 5×10^6 células por poço nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h, após estímulo com gliadina (GLI) e lipopolissacarídeo (LPS)

Os níveis de óxido nítrico produzidos pelas células na concentração 5×10^5 por poço após receberem estímulos de gliadina ($80 \mu\text{g/mL}$) e LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), revelaram que a gliadina apresenta comportamento inflamatório semelhante ao produzido pelo LPS durante a cinética de tempo, ao passo que em 5×10^6 por poço os resultados verificados demonstraram comportamento errático das células, também verificado pela leitura de níveis variáveis de óxido nítrico ou mesmo com a leitura de valores nulos para os tempos de 48 h.

Posteriormente, com a finalidade de confirmar a concentração de células para estudo foi realizada a extração de RNA das mesmas. A figura 9 mostra que o grupo de células nas concentrações de 5×10^5 por poço apresentou boa quantidade de RNA final, ao passo que as células em concentração de 5×10^6 por poço apresentou menor quantidade de RNA, tendo inclusive não apresentado qualquer quantidade de RNA para os poços de 48 h. Assim, para todo o estudo foi utilizada a concentração celular de 5×10^5 por poço.

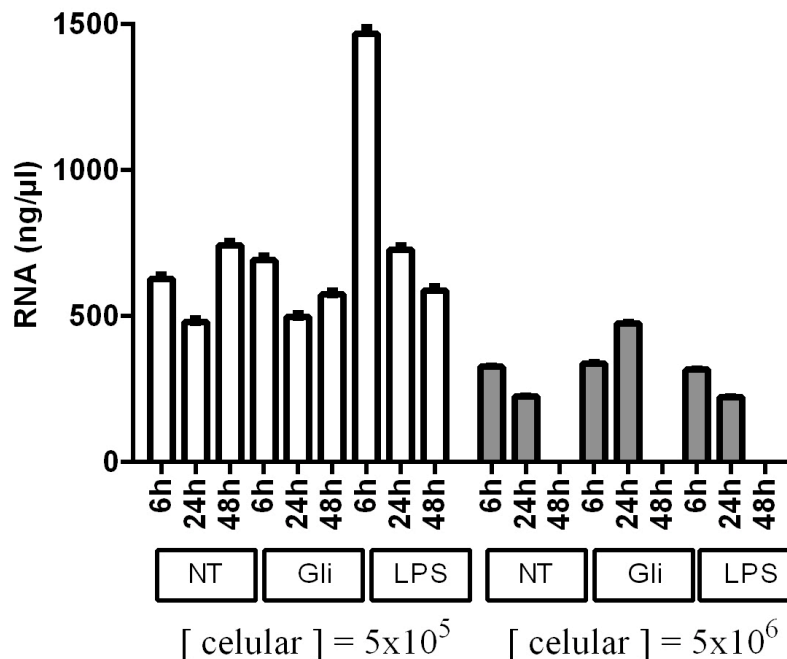


Figura 9 – Concentração de RNA extraído de células Caco-2 nas concentrações celulares de 5×10^5 e 5×10^6 células por poço nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

4.2 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LPS

Para certificação de que a concentração de LPS não influenciava a produção de óxido nítrico pelas células Caco-2 na concentração 5×10^5 , portanto não seria dose-dependente com variações nos tempos de estudo indesejadas, foi realizado experimento para comprovação.

Na seleção da concentração de LPS foram escolhidas as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ (58), 2 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$. A figura 10 apresenta que o LPS em concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de meio foi a mais eficaz em causar aumento relevante na dosagem de óxido nítrico nos tempos avaliados, sendo esta a concentração utilizada para os experimentos posteriores. Entretanto, quando empregamos o dobro ou o triplo da concentração de LPS, observamos uma redução progressiva nos níveis de óxido nítrico produzido ao longo da cinética de tempo do estudo, o que torna o estímulo inadequado para produção de inflamação, que é o objetivo do experimento.

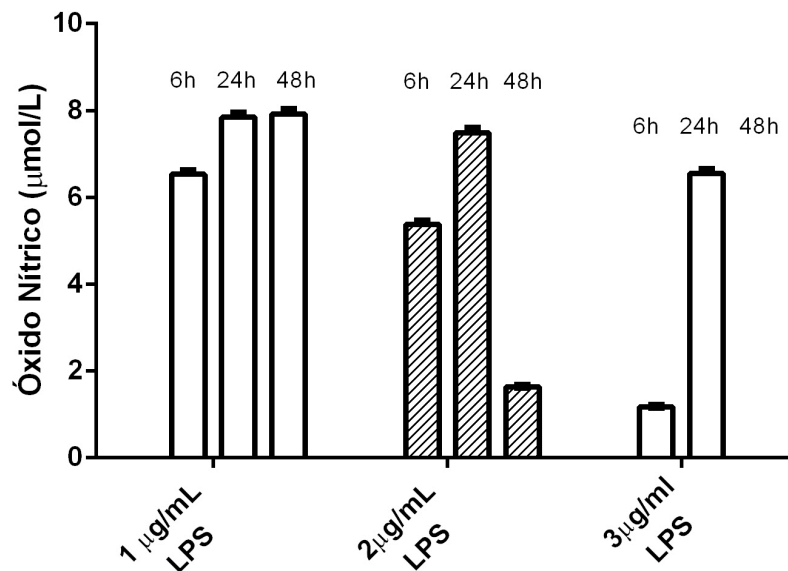


Figura 10 – Dosagem de óxido nítrico em células Caco-2 na concentração 5×10^5 células por poço expostas a 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

4.3 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLIADINA

Selecionada a concentração de células para estudo, foi realizada a avaliação da concentração de gliadina a ser utilizada. Inicialmente, foram escolhidas as concentrações de 80 $\mu\text{g/mL}$, 120 $\mu\text{g/mL}$ e 160 $\mu\text{g/mL}$ de gliadina (37). A figura 11 demonstra que a gliadina em concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais eficaz em causar um aumento relevante na produção de óxido nítrico nos tempos avaliados, sendo esta a concentração utilizada para os experimentos posteriores. As concentrações de 120 $\mu\text{g/mL}$ e 160 $\mu\text{g/mL}$ de gliadina reduziram a produção de NO ao longo da cinética de tempo, não sendo adequadas para causar um estímulo inflamatório desejado.

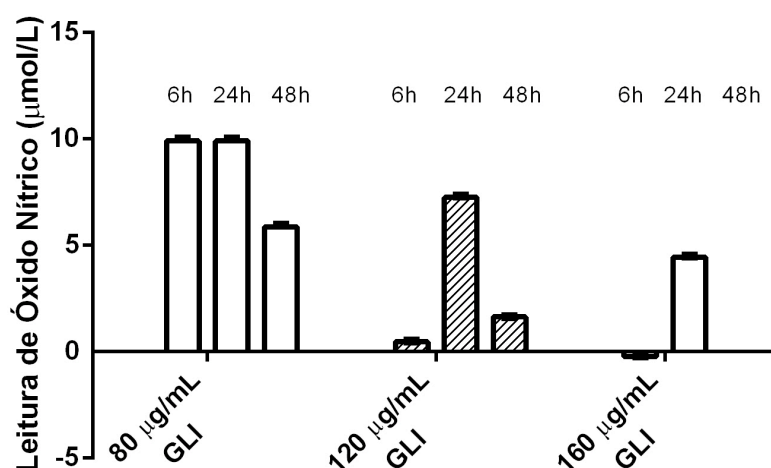


Figura 11 – Dosagem de óxido nítrico em células Caco-2 na concentração 5×10^5 células por poço estimuladas com 80 $\mu\text{g/mL}$, 120 $\mu\text{g/mL}$ e 160 $\mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI) nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

4.4 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SILIMARINA

Para definição da concentração ideal de silimarina a ser empregada no tratamento das células, foram avaliadas as concentrações: 10 μM , 100 μM e 1.000 μM de silimarina (84) em comparação ao observado e células não tratadas.

Para avaliar a capacidade anti-inflamatória da silimarina, células Caco-2 na concentração 5×10^5 foram previamente estimuladas com LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ por 48 h e posteriormente foram tratadas com as concentrações de silimarina descritas acima, para avaliar em que concentração a silimarina apresentava maior capacidade de reduzir a expressão do gene *NFκB*.

A figura 12 mostra que as concentrações de $100 \mu\text{M}$ e $1.000 \mu\text{M}$ apresentaram capacidade estatisticamente similar de reduzir a expressão de transcritos de RNA do gene *NFκB* nas células estimuladas com LPS, por isso, dentre essas duas concentrações foi selecionada a dosagem de silimarina de menor concentração, ratificando o encontrado na literatura (84).

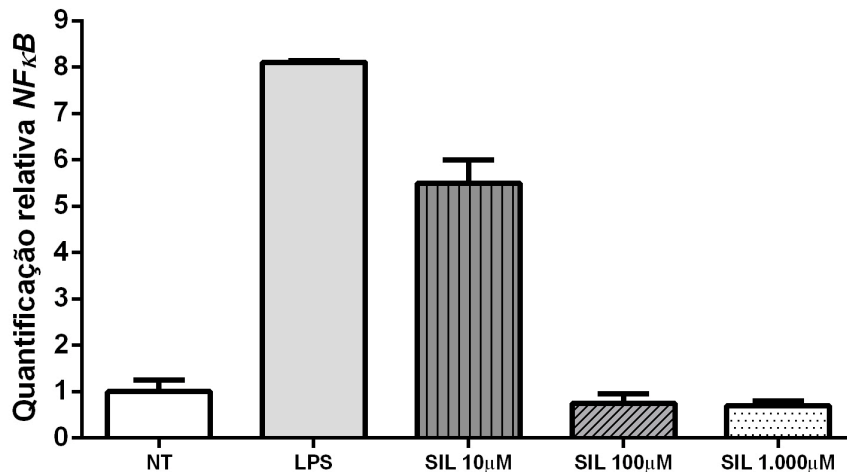


Figura 12 – Quantificação relativa de transcritos do gene *NFκB* em células Caco-2 na concentração 5×10^5 por poço estimuladas com $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) h e tratadas com $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ e $1.000 \mu\text{M}$ de silimarina (SIL) após 48 h

Após definidas todas as concentrações a serem empregadas dos reagentes gliadina ($80 \mu\text{g/mL}$), LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) e silimarina ($100 \mu\text{M}$), foram realizados experimentos para certificar que essas concentrações não eram capazes de, por si, induzir morte celular na concentração de 5×10^5 de células Caco-2 por poço, o que foi confirmado pelo ensaio de WST-8 realizado.

4.5 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO QUÍMICA ENTRE OS REAGENTES

Com o objetivo de comprovar a inexistência de interação química cruzada entre os reagentes utilizados neste estudo e o reagente WST-8, foi realizado ensaio prévio sem células e apenas na presença de meio puro (branco) e em meio com gliadina, LPS e silimarina nas concentrações previamente estabelecidas e do reagente WST-8. A figura 13 mostra que os meios expostos aos reagentes apresentaram densidade óptica (DO_{450}) similar a observada no valor do branco. Por essa razão, foi possível inferir que não houve interação química relevante entre os reagentes a ponto de gerar-se uma resposta inespecífica.

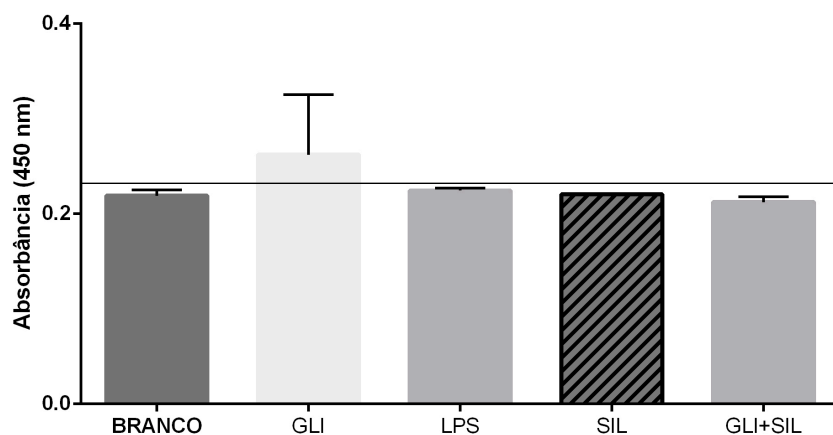


Figura 13 – Teste de interação química do reagente WST-8 com lipopolissacarídeo (LPS), gliadina (GLI) e silimarina (SIL), e gliadina + silimarina (GLI+SIL) nas concentrações pré-estabelecidas

4.6 VIABILIDADE CELULAR

Uma vez estabelecido que não houve interação dos reagentes em estudo e o WST-8, para a avaliação da existência de possíveis efeitos citotóxicos causados diretamente pela ação de gliadina, LPS e silimarina nas células Caco-2 na concentração 5×10^5 foi realizado ensaio de viabilidade celular.

Para esse teste foram utilizadas as concentrações de gliadina, LPS e silimarina pré-estipuladas e calculada a viabilidade celular em porcentagem. Os resultados apresentados na figura 14 sugerem que gliadina, LPS e silimarina nas concentrações selecionadas não reduziram a viabilidade celular das Caco-2 tratadas, demonstrando que não há efeito citotóxico para as concentrações empregadas de gliadina, LPS e silimarina neste estudo.

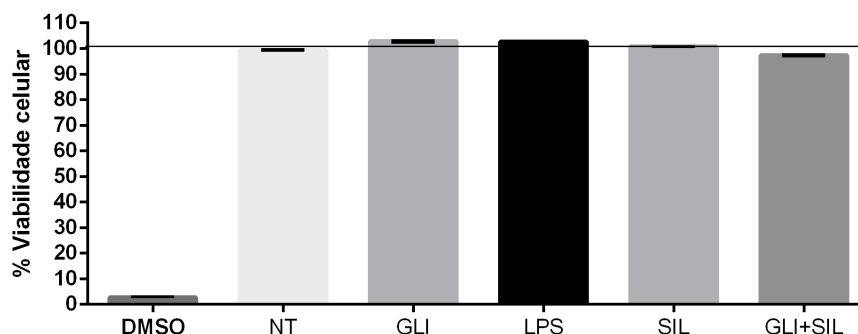


Figura 14 – Teste de viabilidade celular pelo método WST-8. Interação entre células Caco-2 na concentração 5×10^5 por poço após 48 h, na presença de $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS), $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), $100 \mu\text{M}$ silimarina (SIL) e $80 \mu\text{g/mL}$ de gliadina + $100 \mu\text{M}$ silimarina (GLI + SIL)

4.7 EXPRESSÃO GÊNICA

Com o objetivo de analisar a modulação gênica de fatores relacionados ao processo inflamatório das células Caco-2 na presença dos estímulos em estudo, a expressão gênica foi avaliada por meio da quantificação relativa dos transcritos de RNA dos genes *GAPDH*, *NFκB*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, *IL-15RA* e *iNOS*.

4.7.1 Comparação da expressão gênica de transcritos de RNA após estímulo por gliadina e LPS

Inicialmente foi comparado se a expressão gênica estimulada por gliadina e LPS induziram respostas inflamatórias similares entre si. A figura 15 apresenta quantificação relativa de transcritos de RNA das células tratadas de acordo com o descrito na tabela 1 e nas concentrações determinadas nos itens 3.1, 3.2 e 3.3.

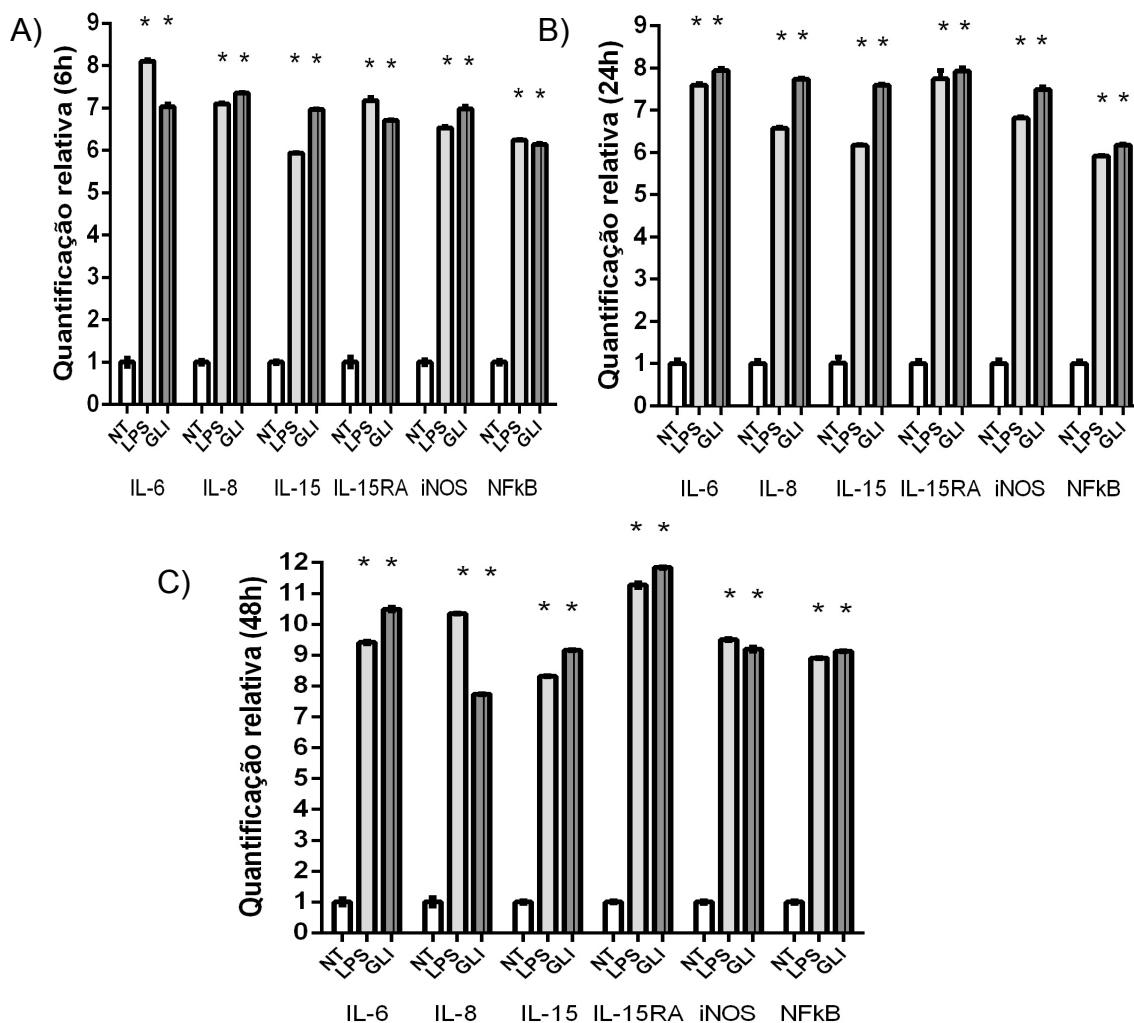


Figura 15 – Modulação gênica das células Caco-2 estimuladas com lipolissacarídeo (LPS) em concentração de 1µg/mL e gliadina (GLI) em concentração de 80 µg/mL, comparados com células não tratadas (NT). A) Quantificação relativa dos genes em 6 h, B) Quantificação relativa dos genes em 24 h, C) Quantificação relativa dos genes em 48 h. Os valores observados para as exposições a lipopolissacarídeo e gliadina não apresentaram diferença estatística significativa entre si nos tempos estudados. Contudo, para cada tempo em teste, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das leituras de gliadina e lipopolissacarídeo quando comparados com as células não tratadas. A análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett's apresentaram um $* p < 0,0001$ para todos os genes

4.7.2 Quantificação relativa dos transcritos do gene *NFkB*

A quantificação relativa de transcritos de RNA do gene *NFkB* das células expostas aos estímulos em estudo mostrou que, na presença de GLI, foram obtidos níveis significativamente maiores de transcritos comparados aos demais grupos.

A figura 16 mostra que este comportamento se manteve nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h e que houve diferença estatística entre os grupos comparados à GLI, o que demonstra redução da atividade inflamatória após os tratamentos SIL, GLI+SIL e SIL+GLI, e é crucial para o entendimento dos demais genes selecionados para o estudo.

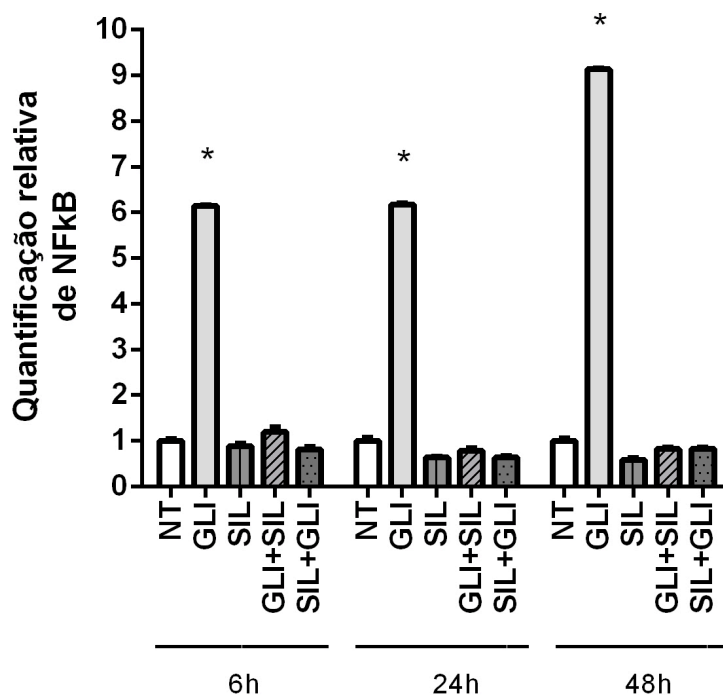


Figura 16 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *NFκB* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM silimarina (SIL), expostas a 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e expostas a 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h. Os valores observados após estímulo com GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores dos demais grupos. A análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett's apresentaram um * $p < 0,0001$

4.7.3 Quantificação relativa dos transcritos do gene *IL-6*

Após exposição aos estímulos em estudo, as células coletadas foram submetidas a procedimento de extração de RNA, produção de cDNA e realização de q-PCR. Por meio da metodologia de quantificação relativa, foi observado que na presença de gliadina os níveis de expressão de transcritos de RNA de *IL-6*

apresentaram aumento significativo quando comparado com os níveis observados nas células não tratadas.

Foi observado ainda que os níveis de expressão de transcritos desse gene nos tratamentos com silimarina, gliadina + silimarina (GLI+SIL) e silimarina + gliadina (SIL+GLI) não foram estatisticamente significativos quando comparados às células não tratadas, e nem quando comparados à silimarina.

É possível observar ainda que o estímulo com gliadina seguida pelo tratamento com a silimarina (GLI+SIL) apresentou melhor redução no número de transcritos do RNA do gene *IL-6* do que o tratamento preventivo quando as células foram tratadas com silimarina e estimuladas com gliadina (SIL+GLI), principalmente nos tempos de 6 h e 24 h, indicando que o efeito anti-inflamatório da silimarina parece mais efetivo que seu efeito protetor.

Na figura 17 esse padrão de expressão ocorreu de maneira similar nas células coletadas após 6 h, 24 h e 48 h do tempo zero do experimento.

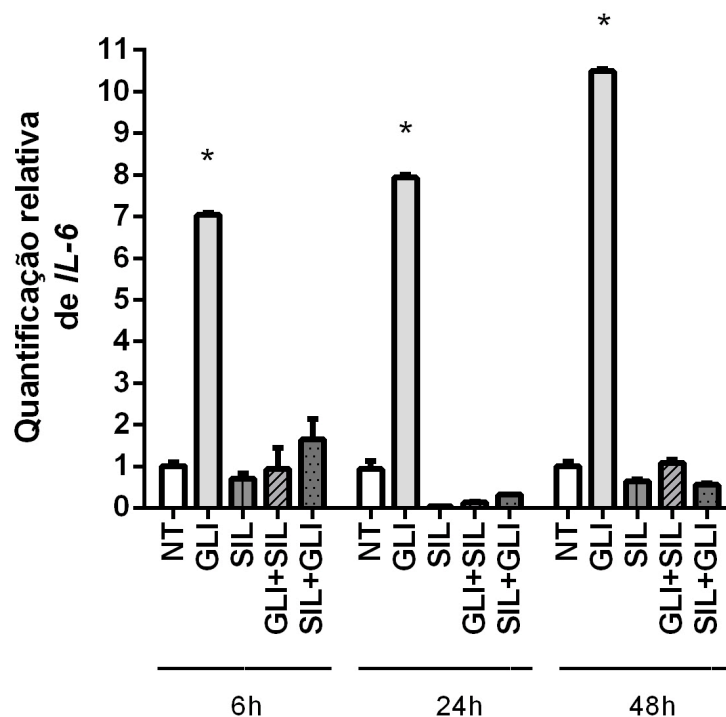


Figura 17 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-6* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM silimarina (SIL), expostas a 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e expostas a 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h. Os valores observados após estímulo com GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores de todos os grupos. A análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett's apresentaram um * $p < 0,0001$ para todos os grupos avaliados em relação a GLI

4.7.4 Quantificação relativa dos transcritos do gene *IL-8*

A quantificação relativa de transcritos de RNA do gene *IL-8* apresentou aumento significativo nas células estimuladas com gliadina quando comparado com os demais tratamentos. A figura 18 apresenta que esse padrão de expressão se repetiu nas células após 6 h, 24 h e 48 h.

O tratamento realizado com silimarina, GLI+SIL e SIL+GLI foi capaz de reduzir o número de transcritos significativamente, quando comparados à gliadina, evidenciando o papel anti-inflamatório exercido por esse composto.

Observa-se ainda na figura 18 que, exceto para o tempo de 6 h, todos os grupos silimarina, GLI+SIL e SIL+GLI nos demais tempos 24 h e 48 h apresentaram uma redução no número de transcritos de RNA do gene de *IL-8* abaixo dos níveis das células não tratadas, evidenciando novamente a atividade anti-inflamatória.

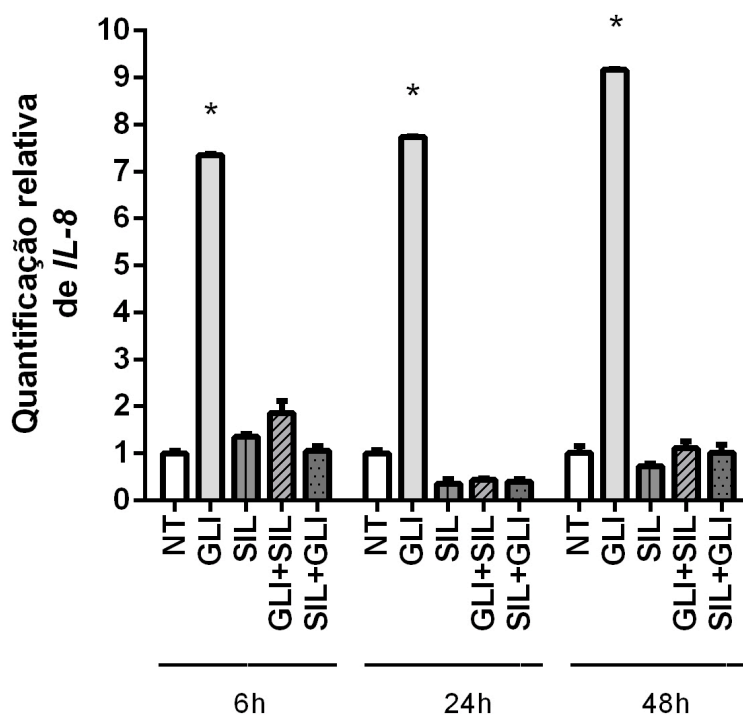


Figura 18 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-8* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM silimarina (SIL), expostas a 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e expostas a 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h. Os valores observados nas exposições a GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores de todos os grupos. A análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett's apresentaram um * $p < 0,0001$ para todos os grupos comparados com a GLI

4.7.5 Quantificação relativa dos transcritos do gene *IL-15*

Em relação à quantificação relativa de transcritos de RNA do gene *IL-15*, foi verificado aumento nos grupos estimulados com GLI quando comparado com os demais grupos. Na figura 19 esse padrão de expressão se repetiu após 6 h, 24 h e 48 h, e esse níveis de expressão apresentaram relevância estatística quando comparada às células estimuladas com GLI. A figura 19 apresenta ainda que o nível observado no tratamento SIL+GLI e GLI+SIL nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h, comparado às células que não receberam tratamento (NT) não conseguiu reduzir o número de transcritos para os níveis próximos dos observados em NT ou em SIL como havia ocorrido para os genes *IL-6* e *IL-8*.

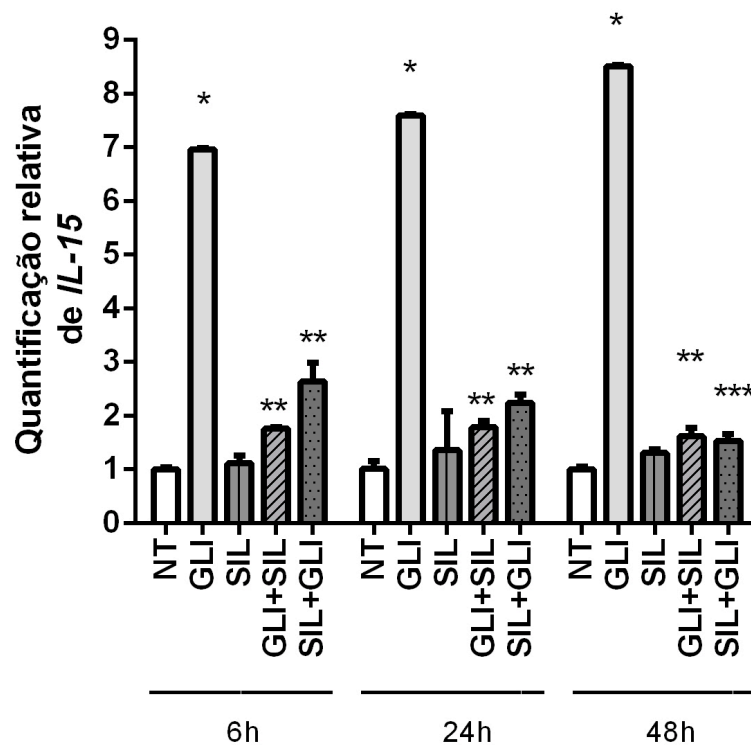


Figura 19 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-15* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com 100 μM silimarina (SIL), expostas a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GLI e tratadas com 100 μM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 μM de SIL e expostas a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h. Os valores observados após estímulo com GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com todos os grupos. A análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett's apresentaram um $* < 0,0001$ em comparação com a GLI. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste Bonferoni apresentou um valor $** p < 0,0001$ quando comparado NT com os grupos GLI+SIL, SIL+GLI dos tempos 6 h e 24 h e para 48 h no grupo GLI+SIL comparado ao NT, e $*** p < 0,01$ para o grupo SIL+GLI comparado ao NT

Ao invés disso os grupos GLI+SIL e SIL+GLI apresentaram um aumento nos números de transcritos de RNA do gene *IL-15* comparado ao observado para o NT ou para a SIL. Entretanto, quando comparado ao NT, observa-se que GLI+SIL e SIL+GLI apresentaram uma redução nos níveis de transcritos do gene *IL-15*, com diferença estatisticamente significativa, demonstrando que nas células Caco-2 estimuladas com GLI e tratadas com SIL houve uma redução no efeito anti-inflamatório, concomitantemente, o tratamento prévio com SIL seguido do estímulo com GLI (SIL+GLI) também sugere uma redução no efeito protetor esperado.

4.7.6 Quantificação relativa dos transcritos do gene *IL-15RA*

A quantificação de transcritos de RNA da subunidade A do receptor de IL-15 (*IL-15RA*) demonstrou aumento nos níveis de expressão nas células estimuladas com gliadina quando comparados com os demais tratamentos (figura 20).

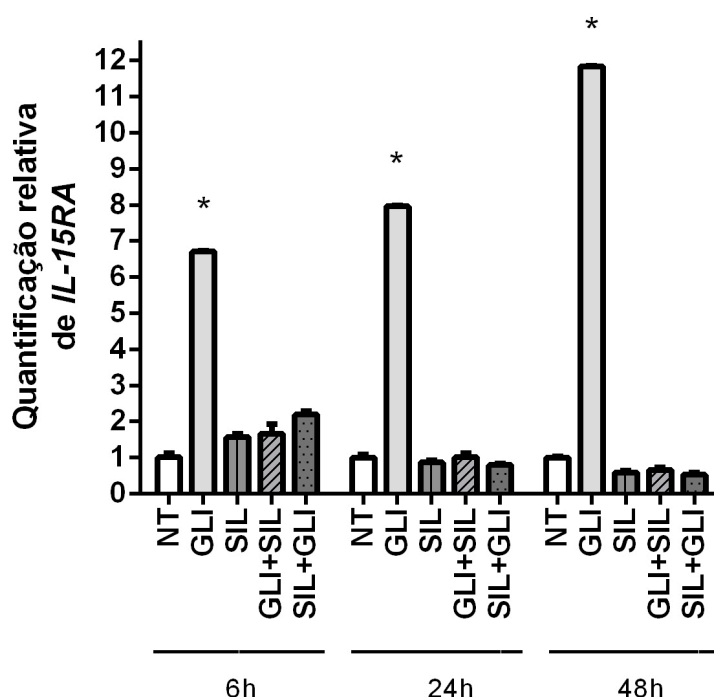


Figura 20 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *IL-15RA* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM silimarina (SIL), expostas a 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e expostas a 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h. Os valores observados nas exposições a GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores das células NT e tratadas com SIL. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett's apresentaram um $*p < 0,0001$

Verifica-se ainda que não houve diferença significativa de expressão quando comparadas as células não tratadas e as células submetidas aos demais tratamentos.

4.7.7 Quantificação relativa dos transcritos do gene *iNOS*

Foi observado que na presença de gliadina os níveis de expressão de transcritos de RNA do gene que expressa a enzima óxido nítrico sintetase induzível (*iNOS*) aumentaram de maneira significativa quando comparados aos níveis observados nas células não tratadas. Foi possível verificar que os níveis de expressão desse gene não apresentaram diferença significativa nos demais tratamentos após exposição por 6 h, 24 h e 48 h (figura 21).

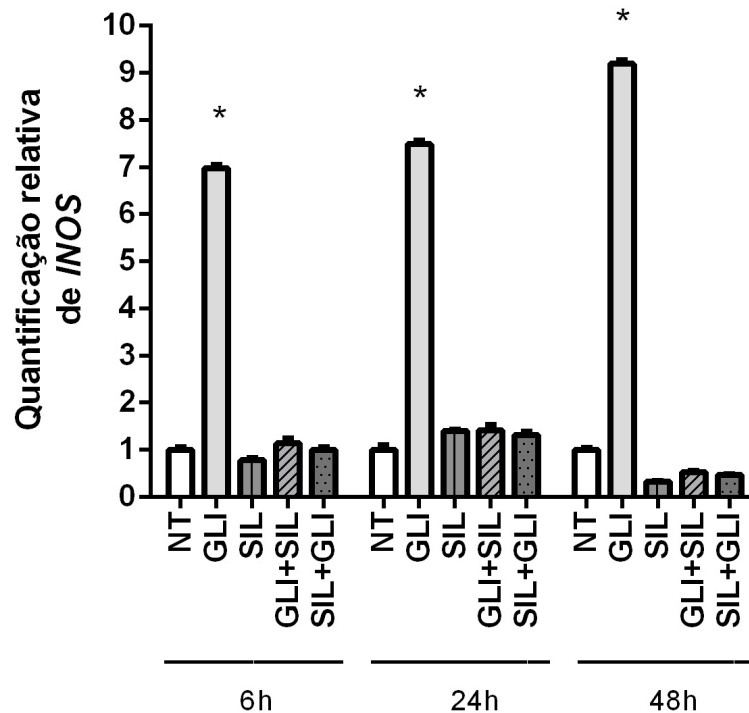


Figura 21 – Quantificação relativa da modulação gênica de transcritos do gene *iNOS* das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL de gliadina (GLI), tratadas com 100 µM silimarina (SIL), expostas a 80 µg/mL de GLI e tratadas com 100 µM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e expostas a GLI 80 µg/mL (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Os valores observados nas exposições a GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores das células NT e tratadas com SIL. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett's apresentaram um $*p < 0,0001$

4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico no sobrenadante das células foi mensurada para avaliar a atividade pró-inflamatória e/ou anti-inflamatória da silimarina em comparação ao observado com os estímulos de GLI e LPS e as células NT.

As células foram estimuladas com GLI 6 horas antes de serem tratadas com SIL (GLI + SIL), bem como foram previamente tratadas com SIL 6 horas antes de serem estimuladas com GLI (SIL+GLI). O sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO nos intervalos de 6, 24 e 48 horas. Os resultados apresentados na figura 22 demonstram que tanto o tratamento com SIL, o tratamento posterior ao estímulo com GLI, bem como anterior ao estímulo com GLI foram capazes de reduzir a produção NO a níveis inferiores a 2 $\mu\text{mol/L}$.

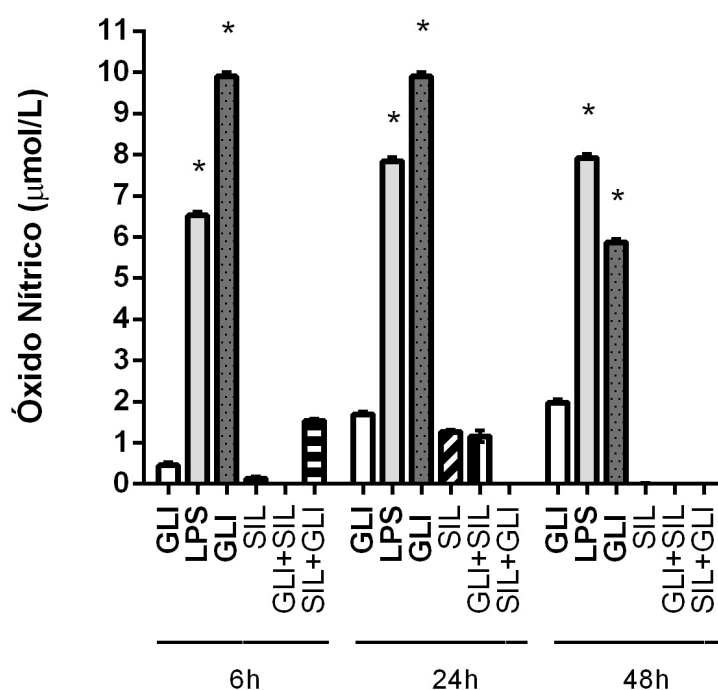


Figura 22 – Dosagem de óxido nítrico (NO) nas células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS), expostas a 80 $\mu\text{g/mL}$ de gliadina (GLI), tratadas com 100 μM silimarina (SIL), expostas a 80 $\mu\text{g/mL}$ de GLI e tratadas com 100 μM de SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 μM de SIL e expostas a 80 $\mu\text{g/mL}$ de GLI (SIL+GLI), nos tempos de 6 h, 24 h e 48 h

Os valores observados para as exposições à GLI e LPS não apresentaram diferença estatística significativa entre si para cada tempo testado. Contudo, para cada tempo em teste, foram observadas diferenças significativas entre os resultados das leituras de GLI e LPS quando comparados aos tratamentos SIL, GLI+SIL e SIL+GLI. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett's apresentaram um * $p < 0,0001$

Esses dados confirmam que os tratamentos com silimarina reduziram a produção de NO na presença de GLI e reforçam a atividade anti-inflamatória da silimarina, confirmando os dados obtidos na expressão gênica do estudo. Os resultados também sugerem uma atuação da silimarina impedindo a translocação do NFκB para o núcleo, embora esse mecanismo ainda não esteja claro.

4.9 DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E₂

A produção de prostaglandina do tipo E₂ (PGE₂) foi verificada nas células que não receberam tratamento, nas células estimuladas com GLI, nas células tratadas com SIL, nas células estimuladas com GLI e tratadas com SIL (GLI+SIL) e nas células tratadas com SIL e estimuladas com GLI (SIL+GLI). Posteriormente, as concentrações de prostaglandinas foram mensurados nos sobrenadantes da cultura de células após o período de 48 horas (figura 23).

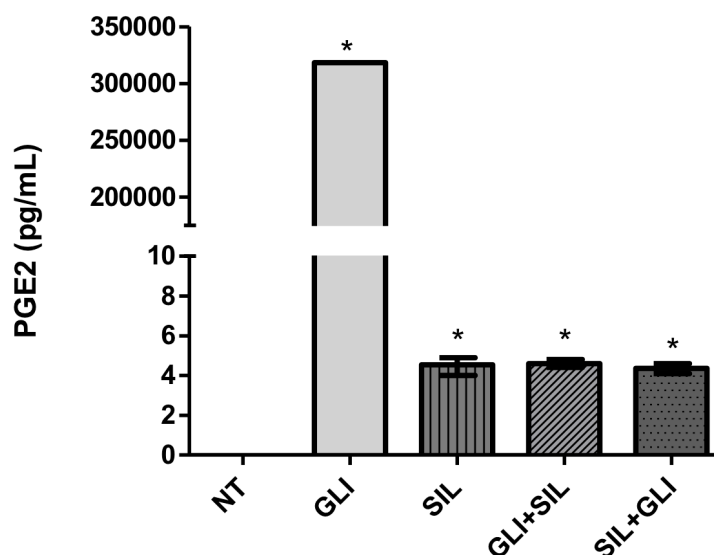


Figura 23 – Dosagem de prostaglandina E₂ (PGE₂) presente no sobrenadante das células Caco-2 não tratadas (NT), expostas a 80 µg/mL gliadina (GLI), tratadas com 100 µM de silimarina (SIL), estimuladas com 80 µg/mL GLI e tratadas com 100 µM SIL (GLI+SIL) e tratadas com 100 µM de SIL e estimuladas com 80 µg/mL de GLI (SIL+GLI), após 48 h de exposição

Os valores observados nas exposições a GLI foram estatisticamente diferentes quando comparados com os valores das células NT e demais tratamentos. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett's apresentaram um * $p < 0,0001$. Os resultados de PGE₂ foram expressos em pg/mL

Foi demonstrado que os níveis de PGE₂ observados nas células estimuladas com GLI foram significativamente maiores que os níveis observados nos grupos de células não tratadas, células tratadas com SIL, células estimuladas com GLI e tratadas com SIL (GLI+SIL), bem como nas células tratadas com SIL e estimuladas com GLI (SIL+GLI).

A redução dos níveis PGE₂ reforça os dados encontrados na transcrição gênica e novamente apontam o efeito realçado pela silimarina no impedimento da translocação do gene *NFκB* para o núcleo com uma consequente redução dos níveis de prostaglandina E₂, o que reforça a atuação da silimarina por mais de uma via, seja pela via das citocinas, do óxido nítrico ou das prostaglandinas.

5 DISCUSSÃO

A doença celíaca é uma desordem intestinal provocada pelo consumo de gliadina por indivíduos geneticamente pré-dispostos, sendo caracterizada, dentre outros fatores, por inflamação crônica no intestino delgado (85, 86). A inflamação intestinal observada nos pacientes celíacos pode variar desde apenas alguns linfócitos infiltrados entre os enterócitos até a grave destruição da camada subepitelial de porções intestinais, com grave atrofia de vilosidades e hiperplasia de criptas (87, 88).

A inflamação é um processo biológico complexo, finamente regulado, que se apresenta como defesa do organismo frente a agressões de natureza física, química ou biológica (89-91). Quando esse processo desenvolve-se em proporção adequada para a contenção do dano que o provocou, a resposta inflamatória transcorre de maneira benigna, reestabelecendo a homeostase orgânica, com a recuperação dos tecidos afetados (92, 93). Contudo, não raro são observadas situações em que a resposta inflamatória exacerbada contribui para a debilidade funcional do órgão ou tecido inicialmente afetado, tornando-se, *per se*, um evento nocivo (94).

Na doença celíaca se observa uma exacerbação da resposta inflamatória do organismo contra a presença de peptídeos do glúten, como a gliadina, no intestino durante sua digestão. Esta resposta desproporcional pode ser verificada quando diferentes vias imune-inflamatórias se sobrepõem e, ao invés de controlarem o estímulo lesivo, acabam por se retroalimentar positivamente, transformando a resposta inflamatória inicial em inflamação crônica (92, 95).

Portanto, o presente estudo buscou avaliar em modelo experimental de células intestinais humanas a ação de produto antioxidante de origem vegetal, com o intuito de verificar a sua capacidade de controlar mediadores químicos envolvidos com o processo inflamatório na presença do peptídeo gliadina e comparado com substância de origem bacteriana ao potencial de produção de resposta inflamatória clássica, este último utilizado apenas como controle positivo inflamatório inespecífico.

5.1 GLIADINA E LPS

Inicialmente, com o objetivo de analisar o comportamento pró-inflamatório da gliadina, sua capacidade de provocar expressão de mediadores químicos de atividade inflamatória foi comparada com a capacidade observada durante exposição ao lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS). O LPS é uma endotoxina de origem bacteriana que, uma vez apresentada a células humanas como a Caco-2, estimula o desenvolvimento de processo inflamatório inespecífico (96). A literatura apresenta que o LPS estimula a produção de NO, bem como está demonstrado que sua inibição pode modular os níveis de mediadores inflamatórios para padrões não inflamatórios (52, 97).

No presente estudo, foi verificado que os níveis de expressão dos genes associados ao processo inflamatório e avaliados neste estudo nas células expostas à gliadina foram estatisticamente similares aos níveis observados nas células Caco-2 expostas ao LPS, evento que se manteve constante em todos os tempos de tratamento avaliados neste trabalho (figura 15). Desta maneira, e nas condições de estudo do presente trabalho, foi possível verificar que a gliadina foi tão competente quanto o LPS em provocar aumento significativo nos níveis de expressão dos genes *NFκB*, *IL-6*, *IL-8*, *IL15*, *IL-15RA* e *iNOS*.

No teste de dosagem de óxido nítrico, após exposição celular à gliadina e ao LPS, também foi verificada a capacidade da gliadina de provocar resposta inflamatória considerável, tendo sido observado aumento nos níveis de produção de óxido nítrico para níveis semelhantes aos observados após exposição ao LPS (figura 22). Portanto, esse resultado reforça o potencial da gliadina em induzir processo inflamatório semelhante ao induzido pelo LPS.

5.2 NFκB

O fator de transcrição nuclear kappa de tipo B (*NFκB*) foi descrito inicialmente em linfócitos T como elemento regulador da transcrição da cadeia leve κ da imunoglobulina (98). Esse fator de transcrição se caracteriza estruturalmente pela

presença de uma porção N-terminal bem conservada, que se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra região de domínio de dimerização. A região C-terminal apresenta diferenças relativas a cada subunidade existente na família do NFκB, sendo possível observar a presença de cinco subunidades, quais sejam: p65, cRel, RelB, p50 e p52 (99). Estas subunidades podem estar configuradas em homodímeros ou heterodímeros, com atividade ativadora ou repressora do NFκB (100).

Quando não estão em formatação ativadora, o NFκB se encontra ligado a proteínas inibitórias kappa B, (IκB) (101). Quando ativo, NFκB se desloca do citoplasma para o núcleo celular, onde por meio de seu domínio de ligação ao DNA, pode ativar vias distintas de resposta inflamatória: ativa a expressão de citocinas inflamatórias (*IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, dentre outras), de genes envolvidos com mediadores oxigênio-reativos como óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e com genes relacionados a mediadores lipídicos via ciclooxigenases (102).

Já foi demonstrado que substâncias com capacidade de ligar-se ao NFκB e inibir sua translocação para o núcleo ou que inibiam sua capacidade de ativação nuclear podem ser utilizadas como agentes anti-inflamatórios (103). Também foi observado que um desbalanço entre as concentrações intracelulares de NFκB e suas proteínas inibidoras podem provocar distúrbios, bem como podem ser acompanhadas de uma menor capacidade de NFκB acionar vias inflamatórias quando em concentrações menores (104).

No presente trabalho ficou demonstrado que, na presença de gliadina e após tratamento com silimarina, os níveis de expressão dos transcritos de NFκB foram reduzidos a patamares observados em células que não receberam estímulos inflamatórios (figura 16). Foi possível observar também que tanto o tratamento prévio com silimarina quanto o tratamento posterior à exposição à gliadina foram bem sucedidos no sentido de se restabelecer os níveis de expressão de transcritos de *NFκB* aos verificados em células não tratadas com estímulos inflamatórios, quadro confirmado em todos os tempos avaliados. Portanto, é possível inferir que a silimarina possui ação anti-inflamatória quando na presença de gliadina, embora não esteja esclarecido com os dados demonstrados no presente estudo quais são especificamente os receptores ou as vias metabólicas que iniciam ou impedem essa translocação do NFκB para o núcleo, reduzindo a atividade inflamatória dela decorrente.

5.3 INTERLEUCINA 6

A IL-6 é uma citocina com atividade pró-inflamatória, sendo dosada em níveis basais quando o indivíduo está saudável, ao passo que, na presença de processos patológicos, os níveis dessa interleucina aumentam significativamente. Foi descrito que na presença de estímulos pró-inflamatórios como LPS, viroses, IL-1 e TNF- α , é observado um aumento nos níveis de expressão de RNA mensageiro da *IL-6* (105).

Estudos *in vivo* descreveram que indivíduos portadores de DC ou sensíveis à glúten apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-6 quando expostos à gliadina (106), sugerindo papel dessa citocina na DC. Estudos *in vitro*, utilizando células Caco-2 como modelo experimental, demonstraram que quando Caco-2 são expostas a estímulos inflamatórios estas são capazes de expressar IL-6 em quantidades superiores às observadas em células não expostas à gliadina, em concordância com o que se observa *in vivo* (107, 108).

Também foi verificado que os níveis de IL-6 quantificados a partir de culturas de células de biópsia de pacientes celíacos estavam significativamente aumentados quando comparados com os observados em células oriundas de indivíduos não celíacos (109).

A atividade de flavonoides, grupo de substâncias naturais de interesse terapêutico em que a silimarina se enquadra, na modulação de citocinas inflamatórias, dentre elas a IL-6, já foi descrita em experimentos *in vitro* (110). A ação da silimarina na diminuição dos níveis de expressão de transcritos de IL-6 também foi demonstrada em células mononucleares de circulação periféricas em comparação com a ação de floretina, hesperidina e resveratrol, sendo a silimarina a substância mais eficiente nesse processo (111).

O presente estudo demonstrou que, na presença de silimarina, os níveis de expressão de transcritos de IL-6 foram estatisticamente similares aos observados nas células que não receberam tratamento, níveis estes menores que os observados para as células expostas à gliadina e ao LPS (figura 17).

5.4 INTERLEUCINA 8

A interleucina 8 (também nomeada quimiocina 8, ou CXCL8) é produzida por macrófagos, células epiteliais, células endoteliais, dentre outras. Sua atividade biológica está relacionada com a sinalização celular durante o processo de quimiotaxia de granulócitos e neutrófilos para locais em que estejam se desenvolvendo eventos de natureza inflamatória (112).

A presença da gliadina, bem como de seus fragmentos, foi descrita como capaz de causar aumento nos níveis de expressão de transcritos do gene IL-8 em monócitos de pacientes com doença celíaca (113). Estudo *in vitro* demonstrou que células expostas à LPS tiveram seus níveis de expressão de IL-8 aumentados (114). Nesse sentido, verifica-se que células capazes de expressar IL-8 são sensíveis a estímulos inflamatórios como gliadina e LPS, circunstâncias em se que observa aumento desse gene.

No estudo em tela, foi observado que as células expostas à gliadina obtiveram aumento nos níveis de expressão de IL-8. Foi verificado ainda que as células expostas à gliadina e tratadas com silimarina tiveram um nível de expressão estatisticamente similar ao verificado nas células não tratadas. As células tratadas com silimarina e posteriormente expostas à gliadina também obtiveram redução dos níveis de expressão comparáveis aos observados nas células não tratadas. Esse eventos foram observados nos testes realizados nas células reservadas para extração de RNA no períodos de 6 h, 24 h e 48 h de avaliação (figura 18).

5.5 INTERLEUCINA 15

A interleucina 15 desempenha várias funções durante o processo de instalação da doença celíaca, momento em que essa citocina é expressa em abundância tanto pelos enterócitos quanto pelas células da lâmina própria (115). A expressão da IL-15 nos enterócitos está associada à instalação da resposta imune inata, estimulando a ação de macrófagos e células dendríticas para deslocarem-se e atuarem nas regiões de inflamação (116).

Verifica-se que as células que secretam interleucina-15 estimulam linfócitos citotóxicos que induzem o aumento da apoptose e da permeabilidade epitelial para as APC (117). Também é possível verificar que IL-15 estimula células do tipo TH1 a amplificarem os danos citotóxicos nos enterócitos, atacando sua constituição estrutural, gerando destruição celular (118).

Os resultados obtidos por este trabalho (figura 19) demonstraram que as células expostas à gliadina tiveram um aumento significativo em seus níveis de expressão de IL-15. Os tratamentos com silimarina reduziram significativamente essa expressão. Contudo, foi observado que as células tratadas previamente com silimarina e expostas à gliadina por um período de 6 h tiveram uma redução menor nos níveis de expressão da IL-15 quando comparado com as células submetidas previamente à exposição à gliadina e tratadas com silimarina no mesmo período de 6 h.

É possível que outros estímulos concomitantes ao processo inflamatório ativem a expressão de transcritos de IL-15, principalmente durante o início da inflamação, como por exemplo a instalação da resposta imune intra-epitelial inata provocada por IL-15 em células T (119). Outro evento que pode contribuir para esse quadro é capacidade da IL-15 de estimular positivamente o receptor IL-15RA, em um processo de retroalimentação positiva, observado por meio da dosagem em grandes concentrações de IL-15 ligadas à IL-15RA nas células de pacientes celíacos que se alimentaram com glúten e mesmo nas células de pacientes em dieta completamente livre de glúten, o que sugere uma grande capacidade de conservação desse padrão de resposta biológica (35).

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a silimarina foi capaz de reduzir os níveis de expressão de IL-15, com a atuação da substância após a exposição das Caco-2 sendo mais assertiva nesse processo do que o tratamento prévio com silimarina.

5.6 RECEPTOR ALFA DA INTERLEUCINA 15 (IL-15RA)

Em estudo realizado com pacientes celíacos foi verificado que, independente desses pacientes estarem em dieta completamente livre de glúten ou se

alimentando com glúten, os níveis de expressão da IL-15RA se apresentaram aumentados quando comparados com os níveis verificados em indivíduos não celíacos (120). Em estudo com Caco-2 e com células de enterócitos de criptas de biópsias de pacientes celíacos foi observado que, na presença de gliadina e seus peptídeos digeridos, os níveis de transcritos de IL-15RA foram consideravelmente mais altos, com aumento verificado da presença desse receptor na superfície dos enterócitos (121).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os níveis de expressão de IL-15RA se apresentaram mais elevados quando expostos à gliadina do que quando comparados com os níveis das células não tratadas (figura 20). Ao longo do tempo, esses níveis foram aumentando, sugerindo que o estímulo provocado por gliadina manteve-se ao longo das 48 h avaliadas. Foi observado ainda que na presença da silimarina, tanto adicionada previamente à exposição de gliadina, quando em tratamento posterior à gliadina, foi verificada uma redução significativa dos níveis de expressão dos transcritos de IL-15RA, reforçando as características anti-inflamatórias dessa substância.

5.7 iNOS

A isoforma induzível da óxido nítrico sintetase (iNOS) tem seus níveis de expressão aumentados na presença de gliadina em monócitos de camundongos, bem como em monócitos humanos (122-126). Proteínas relacionadas à homeostase do trato gastrointestinal estão presentes em níveis elevados em pacientes com doença celíaca, e esse aumento está correlacionado ao aumento da expressão de enzimas iNOS, bem como com ao aumento da produção de óxido nítrico (127).

A utilização de anti-inflamatórios naturais como licopeno, quercetina e tirosol em monócitos de camundongo expostos à gliadina resultou na inibição da expressão de iNOS, contribuindo para a redução do quadro inflamatório (128). O presente estudo demonstrou que na presença de gliadina durante a exposição 6 h, 24 h e 48 h as Caco-2 expressaram níveis maiores que os observados em células não tratadas de transcritos de iNOS.

Foi observado também que a utilização da silimarina foi eficiente em produzir a redução da expressão desses transcritos para níveis observados nas células-controle que não receberam tratamento (figura 21).

5.8 ÓXIDO NÍTRICO

A síntese de óxido nítrico e sua dosagem em níveis altos é reconhecidamente um fator mediador de respostas inflamatórias (129). A produção de óxido nítrico em grandes proporções é observada em eventos inflamatórios, sendo que sua redução, mesmo provocada farmacologicamente, pode contribuir para o controle da inflamação, contribuindo também para o reestabelecimento da homeostase original (130). Níveis altos de óxido nítrico vêm sendo descritos em pacientes com doença celíaca quando ingerem alimentos com glúten (131), bem como níveis aumentados desse marcador químico podem ser dosados na urina desses pacientes (132).

A utilização de produtos que demonstrem capacidade de diminuir a produção de óxido nítrico representa alternativa para a elaboração de agentes anti-inflamatórios, bem como se apresentam como agentes anti-oxidantes eficazes na medida em que conseguem bloquear a produção e/ou acúmulo das espécies reativas de oxigênio (133). O presente estudo demonstrou que, assim como observado para a expressão de iNOS, a silimarina foi competente em reduzir os níveis de óxido nítrico livres no sobrenadante das células Caco-2 expostas à gliadina em todos os tempos estudados, ressaltando o efeito antioxidante da silimarina (figura 22).

5.9 PROSTAGLANDINA

Durante o processo de inflamação é possível verificar a mobilização de eventos relacionados à produção de mediadores como a ativação do sistema complemento, quimiocinas, citocinas e eicosanoides, dentre estas últimas as prostaglandinas (134).

As prostaglandinas são produzidas por macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos, em ressonância à resposta imune-inflamatória disparada por eventos como os presentes na doença celíaca (135). A migração de células dendríticas no epitélio intestinal de indivíduos celíacos quando estimulada por fragmentos de gliadina está bem descrita na literatura como fisiologicamente relacionada à preparação do organismo para resposta imune-inflamatória em formação (136). Também é possível observar que em pacientes celíacos que ingeriram gliadina há aumento nos níveis de prostaglandina secretados (137), demonstrando a importância desse mediador lipídico na resposta inflamatória de celíacos expostos à gliadina.

Nesse estudo, ficou demonstrado que na presença de gliadina estimulando a expressão de prostaglandinas por 48 horas os níveis dosados foram superiores a 300 mil pg/mL, valor similar ao observado em inflamações agudas. Assim, com a utilização de silimarina seja em tratamento prévio a gliadina, seja em tratamento posterior a gliadina, foi observada uma redução drástica desses níveis para dosagens de aproximadamente 4 pg/mL, o que demonstra a excelência da silimarina em reduzir síntese de prostaglandina E₂ e, eventualmente, a resposta inflamatória em que possa estar envolvida essa síntese (figura 23).

5.10 VIABILIDADE DO USO DA SILIMARINA

A silimarina é extraída de uma tradicional erva medicinal de origem europeia, a *Silybum marianum*, cujos efeitos hepatoprotetores e usos terapêuticos são conhecidos há milênios. O extrato das sementes dessa planta é constituído em maior escala por flavonoides, grupo de substâncias polifenólicas muitas vezes presentes na dieta humana, com consumo diário verificado em aproximadamente 1g. É possível encontrar flavonoides em frutas, verduras, extratos de plantas, dentre outras preparações de origem vegetal (138). Portanto, a utilização de flavonoides, dentre eles os que compõem a silimarina, é considerada segura devido a sua baixa interferência com a farmacocinética de outros fármacos quando utilizadas em doses de até 5 g/dia (139).

Em estudos farmacológicos prévios foi descrito que a silimarina, utilizada isoladamente, não é tóxica, mesmo quando utilizada em doses mais altas (140). Desta maneira, é possível concluir que a utilização da silimarina não apresenta riscos para a saúde de quem ingere essa substância com finalidades terapêuticas, posto este uso não estar associado a eventos adversos graves. Verifica-se que a substância é segura para uso isolado ou associado com outros fármacos, sem que isso implique interações medicamentosas cruzadas indesejadas. Os resultados obtidos reforçam esse achados, tendo em vista a silimarina não influenciar negativamente na viabilidade das Caco-2 expostas a esse flavonoide (figura 14).

No entanto, é muito importante que seja compreendido que os resultados aqui apresentados estão associados tão somente a experimento laboratorial de natureza científico-acadêmica, conduzido em condições específicas e controladas. De maneira alguma esses resultados devem incentivar a utilização indiscriminada e/ou não supervisionada por profissional competente da silimarina com o objetivo de se controlar a resposta inflamatória em seres humanos com doença celíaca. É preciso asseverar que são necessários mais estudos pré-clínicos para que possa ser aventada a possibilidade de realização de pesquisas clínicas sobre a utilização da silimarina em seres humanos com doença celíaca.

Alerta-se ainda para o fato de que todos os estudos sobre a utilização de substâncias com efeitos farmacológicos candidatas a atuarem como medicamentos comercializáveis devem ser submetidos à avaliação de órgãos de controle ético em pesquisa com seres humanos, bem como órgãos reguladores da atividade industrial farmacêutica. No Brasil, estes órgãos são o sistema CEP-CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP – que atua revisando a avaliação de Comitês de Ética em Pesquisa – CEP – próximos ao estudo) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (141, 142). Qualquer iniciativa de se avaliar os efeitos da silimarina em seres humanos com a finalidade de tratamento da doença celíaca deve se submeter a avaliação e aprovação pelo sistema CEP/CONEP, bem como qualquer interesse de comercialização para tal fim deve se submeter à avaliação e autorização da ANVISA.

Não respeitados esses procedimentos, eventuais usuários da silimarina para controle da doença celíaca podem estar se expondo ao risco de apresentarem eventos adversos ainda não avaliados.

Profissionais de saúde que, eventualmente, prescrevam a silimarina para o controle da doença celíaca podem responder pela utilização de fármaco em não conformidade com o previsto em bula, conduta esta não autorizada pela ANVISA. Esse comportamento pode acarretar a responsabilização desses profissionais, com possibilidade de aplicação de sanções de natureza administrativa, cível e/ou penal (143).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados produzidos por este estudo foi possível concluir que a silimarina foi competente em reduzir todas as variáveis analisadas relativas ao processo inflamatório em células Caco-2 expostas à gliadina, após estímulo por 6 h, 24 h e 48 h de interação.

Especificamente foi possível verificar que a silimarina reduziu os níveis de transcritos dos genes *NFκB*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-15*, *IL-15RA* e *iNOS* após intervalos de 6 h, 24 h e 48 h quando as células foram tratadas previamente com silimarina, bem como quando foram tratadas, posteriormente, à exposição à gliadina.

A dosagem de óxido nítrico do sobrenadante das células tratadas com silimarina, nos períodos de 6 h, 24 h e 48 h de exposição, demonstrou que a silimarina reduziu a produção desse mediador químico nas células tratadas de maneira protetiva à gliadina, assim como nas células tratadas com silimarina após exposição à gliadina.

Por fim, foi verificado que os níveis de prostaglandina nas células expostas à gliadina se apresentaram muito elevados, com níveis típicos de processo inflamatório agudo, ao passo que nas células tratadas com silimarina após estímulo com gliadina, bem como nas células estimuladas com gliadina e tratadas posteriormente com silimarina, esses níveis foram drasticamente reduzidos.

Desse modo, os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a silimarina reduz a expressão dos transcritos de genes relacionados à resposta inflamatória provocada em células Caco-2 quando expostas à gliadina, bem como reduz o óxido nítrico produzido e a prostaglandina do tipo E2. Esses dados sugerem que essa substância pode ser candidata a agente terapêutico no tratamento da doença celíaca. Contudo, para tal, são necessários mais estudos pré-clínicos e clínicos para eventual futura atualização clínica segura, eficaz e eficiente da silimarina em pacientes com doença celíaca.

7 BIBLIOGRAFIA

- (1) SOLLID LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. 2002. *Nature Reviews Immunology*. 2:647-655.
- (2) Di SABATINO A, CORAZZA GR. Coeliac Disease. 2009. *Lancet*. 373:1480-1493.
- (3) ABADIE V, SOLLID LM, BARREIRO LB, JABRI B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. 2011. *Annual Review of Immunology*. 29:493-526.
- (4) LIONETTI E, CATASSI C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations and Treatment. 2011. *International Reviews of Immunology*. 30:219-231.
- (5) HUSBY S. *et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. 2012. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 54:136-160.
- (6) HOPPER AD. *et al.* Adult coeliac disease. 2007. *British Medical Journal*. 335:558-562.
- (7) FREEMAN HJ. Adult celiac disease in the elderly. 2008. *World Journal of Gastroenterology*. 14(45):6911-6914.
- (8) PETERS U, ASKLING J, GRIDLEY G, EKBOM A, LINET M. Causes of death in patients with celiac disease in a population-based Swedish cohort. 2003. *Archives of Internal Medicine*. 163(13):1566-1572.
- (9) CATASSI C, FASANO A. Celiac Disease. 2008. *Gastroenterology*. 24(6):687-691.
- (10) GUANDALINI S, ASSIRI A. Celiac Disease: a review. 2014. *Journal of the American Medical Association Pediatrics*. 168(3):272-278.

- (11) TACK GJ. *et al.* The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. 2010. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 7:204-213.
- (12) TEKINER H. Aretaeus of Cappadocia and His Treatises on Diseases. 2015. *Turkish Neurosurgery*. 25(3):508-512.
- (13) TOMMASINI A. *et al.* Ages of celiac disease: from changing environment to improved diagnostics. 2011. *World Journal of Gastroenterology*. 17(32):3665-3671.
- (14) LOSOWSKY MS. A history of coeliac disease. 2008. *Digestive Diseases*. 26:112-120.
- (15) AURICCHIO S, TRONCONE R. History of coeliac disease. 1996. *European Journal of Pediatrics*. 155:427-428.
- (16) VAN HEEL DA, WEST J. Recent advances in coeliac disease. 2006. *Gut*. 55:1037-1046.
- (17) MYLEUS A. *et al.* Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. 2009. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 49:170-176.
- (18) MUSTALAHTI K. *et al.* The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. 2010. *Annals of Medicine*. 42:587-595.
- (19) MELO SBC, FERNANDES MI, PERES LC, TRONCON LE, GALVAO LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. *Digestive Disease and Sciences*. 51:1020-1025.
- (20) OLIVEIRA RP, SDEPANIAN VL, BARRETO JA. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue

transglutaminase antibody. 2007. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 19:43-49.

(21) PEREIRA MA. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. 2006. *World Journal of Gastroenterology*. 12:6546-6550.

(22) PRATESI R, GANDOLFI L, GARCIA SG, MODELLI IC, LOPES DE ALMEIDA P, BOCCA AL, CATASSI C. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. 2003. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 38:747-750.

(23) GANDOLFI L, PRATESI R, CORDOBA JC, TAUIL PL, GASPARIN M, CATASSI C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. 2000. *The American Journal of Gastroenterology*. 95:689-692.

(24) ALMEIDA LM. Análise do risco genético associado à presença de alelos HLA-DQ em pacientes com Doença Celíaca. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] Universidade de Brasília, 2016.

(25) VOLTA U, CAIO G, BOSCHETTI E, GIANCOLA F, RHODEN KJ. Seronegative celiac disease: Shedding light on an obscure clinical entity. 2016. *Digestive and Liver Disease*. 48(9):1018-1022.

(26) KUJA-HALKOLA R, LEBWOHL B, HALFVARSON J, WIJMENGA C, MAGNUSSON PK, LUDVIGSSON JF. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. 2016. *Gut*. 59(3):311-319.

(27) TRYNKA G, HUNT KA, BOCKETT NA, ROMANOS J, MISTRY V, SZPERL A. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. 2011. *Nature Genetics*. 43:1193-201.

(28) DUBOIS PC. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. 2010. *Nature Genetics*. 42:295-302.

- (29) TOSI P, GRITSCH CS, HE J, SHEWRY PR. Distribution of gluten proteins in bread wheat (*Triticum aestivum*) grain. 2011. *Annals of Botany*. 108(1):23-35.
- (30) DE RE V, CAGGIARI L, TABUSO M, CANNIZZARO R. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. 2013. *Clinical Biochemistry*. 46(6):552-560.
- (31) ANG S, KOGULANATHAN J, MORRIS GA, KÖK MS, SHEWRY PR, TATHAM AS, ADAMS GG, ROWE AJ, HARDING SE. Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation. 2010. *European Biophysics Journal*. 39(2):255-261.
- (32) HEYMAN M. Pathways of gliadin transport in celiac disease. 2009. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1165:274-278.
- (33) FASANO A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. 2011. *The American Physiological Society*. 91:151-175.
- (34) MATYSIAK-BUDNIK T, MOURA IC, ARCOS-FAJARDO M, LEBRETON C. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via transferring receptor in celiac disease. 2008. *The Journal of Experimental Medicine*. 205(1):143-154.
- (35) BARONE MV, ZIMMER KP. Endocytosis and transcytosis of gliadin peptides. 2016. *Molecular and Cellular Pediatrics*. 3(1):1-8.
- (36) AGGARWAL S, LEBWOHL B, GREEN PHR. Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. 2012 *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 5(1):37-47.
- (37) SHAN L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. 2002. *Science*. 297:2275-2279.

- (38) CAPUTO I, BARONE MV, MARTUCCIELLO S, LEPRETTI M, ESPOSITO C. Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies *Amino Acids*. 2009. *Amino Acids*. 36:693-699.
- (39) FERRETTI G, BACCHETTI T, MASCIANGELO S, SATURNI L. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. 2012. *Nutrients*. 4(4):243-257.
- (40) QIAO SW, SOLLID LM, BLUMBERG RS. Antigen presentation in celiac disease. 2009. *Current Opinion in Immunology*. 21(1):111-117.
- (41) IENTILE R, CACCAMO D, GRIFFIN M. Tissue transglutaminase and the stress response. 2007. *Amino Acids*. 33:385-394.
- (42) DI SABATINO A, PICKARD KM, GORDON JN, SALVATI V, MAZZARELLA G, BEATTIE RM, VOSENKAEMER A, ROVEDATTI L, LEAKEY NA, CROFT NM, TRONCONE R, CORAZZA GR, STAGG AJ, MONTELEONE G, MACDONALD TT. Evidence for the role of interferon-alpha production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. 2007. *Gastroenterology*. 133(4):1175-1187.
- (43) LUCIANI A, VILLELLA VR, VASATURO A, GIARDINO I, PETTOELLO-MANTOVANI M, GUIDO S, CEXUS ON, PEAKE N, LONDEI M, QUARATINO S, MAIURI L. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR gamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. 2010. *Gut*. 59(3):311-319.
- (44) CHIURCHIÙ V, MACCARRONE M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. 2011. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15(9):2605-2641.
- (45) VOLP ACP, ALFENAS RCG, COSTA NMB, MINIM VPR, STRINGUETA PC, BRESSAN J. Inflammation Biomarkers Capacity in predicting the Metabolic Syndrome. 2008. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 52(3):537-549.

- (46) FRANCO DG. Nuclear transcription factor kappa b in the central nervous system: from physiological to pathological. 2010. *Revista da biologia*. 4:35-39.
- (47) XIAO W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. 2004. *Cellular & Molecular Immunology*. 1:425-433.
- (48) YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. 2004. *Trends in Biochemical Sciences*. 29:72-79.
- (49) LIU S, CHEN Z. Expanding role of ubiquitination in NF-kB signaling. 2011. *Cell Research*. 21:6-21.
- (50) SCHESCHOWITSCH K. Translocação nuclear de NF- κ B e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas: envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito. Dissertação (mestrado em Farmacologia) – *Universidade Federal de Santa Catarina*. Florianópolis, 2011.
- (51) COLEMAN JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. 2001. *International Immunopharmacology*. 1:1397-1406.
- (52) VINCENTINI O, QUARANTA MG, VIORA M, AGOSTONI C, SILANOM. Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. 2011. *Clinical Nutrition*. 30(4):541-546.
- (53) KORHONEN R. Nitric oxide production and signaling in inflammation. 2005. *Current drug targets - Inflammation and allergy*. 4(4):471-479.
- (54) AKTAN F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. 2004. *Life Sciences*. 75(6):639-653.
- (55) SOROKIN A. Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Pathways: A Complex Interplay in Cellular Signaling. 2016. *Current Medicinal Chemistry*. 23(24):2559-2578.

- (56) TSATSANIS C, ANDROULIDAKI A, VENIHAKI M, MARGIORIS AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. 2006. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38(10):1654-1661.
- (57) FANNING L, BOYCE JA. Lipid Mediators. 2013. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 111(3):155-162.
- (58) KAWAHARA K, HOHJOH H, INAZUMI T, TSUCHIYA S, SUGIMOTO Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. 2015. *Biochimica et Biophysica Acta*. 4:414-421.
- (59) CAPASSO F, GAGINELLA TS, GRANDOLINI G, IZZO AA. Phytotherapy: A quick reference to herbal medicine. Springer Verlag; 2003.
- (60) SALLER R, BRIGNOLI R, MELZER J, MEIER R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. 2008. *Forsch Komplementmed*. 15(1):9-20.
- (61) SALEHI M, HASANLOO T, MEHRABIAN S, FARAHMAND S. Effects of Silybum marianum (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi in vitro compare to clotrimazol. 2011. *Pharmaceutical Sciences*. 16(4):203-210.
- (62) SAYYAH M, BOOSTANIA H, PAKSERESHT S, MALAYERI A. Comparison of Silybum marianum (L.) Gaertn. with fluoxetine in the treatment of Obsessive-Compulsive Disorder. 2010. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 34(2):362-365.
- (63) SURAI PF. Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. 2015. *Antioxidants*. 4(1):204-247.
- (64) BIEDERMANN D, VAVŘÍKOVÁ E, CVAK L, KŘEN V. Chemistry of silybin. 2014. *Natural Product Reports*. 31(9):1138-1157.

- (65) CSUPOR D, CSORBA A, HOHMANN J. Recent advances in the analysis of flavonolignans of *Silybum marianum*. 2016. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 130:301-317.
- (66) BINDOLI A, CAVALLINI L, SILIPRANDI N. Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. 1977. *Biochemical Pharmacology*, 26(24):2405-2409.
- (67) SANGEETHA N, ARANGANATHAN S, NALINI N. Silibinin ameliorates oxidative stress induced aberrant crypt foci and lipid peroxidation in 1, 2 dimethylhydrazine induced rat colon cancer. 2010. *Investigational New Drugs*. 28(3):225-233.
- (68) KANG JS, JEON YJ, KIM HM, HAN SH, YANG KH. Inhibition of Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression by Silymarin in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. 2002. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302:138-144.
- (69) GAZAK R, WALTEROVA D, KREN V. Silybin and Silymarin – New and Emerging Applications in Medicine. 2007. *Current Medicinal Chemistry*. 14:315-338.
- (70) KORNEYCHUK N, MERESSE B, CERF-BENSUSSAN N. Lessons from rodent models in celiac disease. 2015. *Mucosal Immunology*. 1:18-28.
- (71) MCCARVILLE JL, NISEMBLAT Y, GALIPEAU HJ, JURY J, TABAKMAN R, COHEN A, VERDU EF. BL-7010 Demonstrates Specific Binding to Gliadin and Reduces Gluten-Associated Pathology in a Chronic Mouse Model of Gliadin Sensitivity. 2014. *PLoS ONE*. 9(11)e109972.
- (72) STOVEN S, MURRAY JA, MARIETTA EV. Latest In vitro and in vivo models of celiac disease. 2013. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 8(4):445-457.
- (73) ATCC, 2013. *American Type Culture Collection*. [Online] Disponível em: <http://www.atcc.org> [Acesso em 2013].

(74) ZWEINBAUM A. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. 1983. *International Journal of Cancer*. 32:407-412.

(75) BOLT G. Specific interaction of food proteins with apical membranes of the human intestinal cell lines Caco-2 and T84. 1998. *Clinica Chimica Acta*. 270:151-167.

(76) LINDFORS K. In vitro models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. 2012. *Experimental biology and medicine*. 237:119-125.

(77) FDA, 2013. *The United States Food and Drug Administration*. [Online] Disponível no endereço eletrônico: <http://www.fda.gov>. [Acesso em 2013].

(78) CRUZ-MACHADO SS. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. 2010. *Revista da biologia*. 4:40-43.

(79) VAN HEEL DA, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. 2007. *Nature Genetics*. 39:827-829.

(80) HUNT KA, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. 2008. *Nature Genetics*. 40:395-402.

(81) SOUSA E SILVA T, LONGUI CA, ROCHA MN, FARIA CD, MELO MR, FARIA TG, DE SOUZA JA, RIZZO LV. Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes. 2010. *Hormone Research in Paediatrics*. 74(1):6-14.

(82) HU P, CHEN W, BAO J, JIANG L, WU L. Cordycepin modulates inflammatory and catabolic gene expression in interleukin-1 beta-induced human chondrocytes from advanced-stage osteoarthritis: an in vitro study. 2014. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 7(10):6575-6584.

- (83) GREEN LC, LUZURIAGA KR, WAGNER DA, RAND W, ISTFAN N, YOUNG VR, TANNENBAUM SR. Nitrate biosynthesis in man. 1981. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78(12):7764-7768.
- (84) DOEHMER J, TEWES B, KLEIN KA, GRITZKO K, MUSCHICK H, MENGES U. Assessment of drug–drug interaction for silymarin. 2008. *Toxicology in Vitro*. 22:610-617.
- (85) BAO F, GREEN PH, BHAGAT G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. 2012. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 136(7):735-745.
- (86) PRESUTTI RJ, CANGEMI JR, CASSIDY HD, HILL DA. Celiac disease. 2007. *American Family Physician*. 76(12):1795-1802.
- (87) SCHUPPAN D, JUNKER Y, BARISANI D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. 2009. *Gastroenterology*. 137(6):1912-1933.
- (88) TJON JM, VAN BERGEN J, KONING F. Celiac disease: how complicated can it get? 2010. *Immunogenetics*. 62(10):641-651.
- (89) LEE M, LEE J, SEO C. Anti-inflammatory activity of *angelica dahurica* ethanolic extract on raw264.7 cells via upregulation of heme oxygenase-1. 2011. *Food and Chemical Toxicology*. 49(5):1047-1055.
- (90) CLARK AK, OLD EA, MALCANGIO M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. 2013. *Journal of Pain Research*. 6:803-814.
- (91) LAVETI D, KUMAR M, HEMALATHA R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. 2013. *Inflammation and Allergy-Drug Targets*. 12(5):349-361.
- (92) KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Eds. *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 29-73, 2013.

(93) FREIRE MO, VAN DYKE TE. Natural resolution of inflammation. 2013. *Periodontol.* 63(1):149-164.

(94) LAWRENCE T, WILLOUGHBY DA, GILROY DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. 2002. *Nature Reviews Immunology.* 2:787-795.

(95) PERKINS JA. Acute and chronic inflammation. In: Perkins JA, Ed. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. 43-77, 2010.

(96) TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. 2010. *Cell.* 140:805-820.

(97) MANCINO A, LAWRENCE T. Nuclear Factor- κ B and Tumor-Associated Macrophages. 2010. *Clinical Cancer Research.* 16(3):784-789.

(98) NABEL GJ, GORKA C, BALTIMORE D. T-cell-specific expression of interleukin 2: evidence for a negative regulatory site. 1988. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 85(9):2934-2938.

(99) FRANCO DG. Nuclear transcription factor kappa b in the central nervous system: from physiological to pathological. 2010. *Revista da biologia.* (4):35-39.

(100) MEFFERT MK, BALTIMORE D. Physiological functions for brain NF- κ B. 2005. *Trends in Neurosciences.* (28):27-43.

(101) MALEK R, BOROWICZ KK, JARGIELO ME, CZUCZWAR SJ. Role of nuclear factor κ B in the central nervous system. 2007. *Pharmacological Reports.* (59):25-33.

(102) MARKS-KONCZALIK J, CHU SC, MOSS J. Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B-binding Sites. 1998. *The Journal of Biological Chemistry.* 273(35):22201-22208.

- (103) JUNG HW, YOON KM, HAN HS, PARK Y. Hexane fraction of Zingiberis Rhizoma Crudus extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. 2009. *Food and chemical toxicology*. (47):1190-1197.
- (104) SUN XF, ZHANG H. NFκB and NFκBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. 2007. *Histology and Histopathology*. (22):1387-1398.
- (105) WOLF J, ROSE-JOHN S, GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. 2014. *Cytokine*. 70(1):11-20.
- (106) SAPONE A, LAMMERS KM, CASOLARO V, CAMMAROTA M, GIULIANO MT, DE ROSA M, STEFANILE R, MAZZARELLA G, TOLONE C, RUSSO MI, ESPOSITO P, FERRARACCIO F, CARTENÌ M, RIEGLER G, DE MAGISTRIS L, FASANO A. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. 2011. *BMC Medicine*. 9(9):23.
- (107) VITKUS SJ, HANIFIN SA, MCGEE DW. Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion. 1998. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 34(8):660-664.
- (108) PARIKH A, SALZMAN AL, KANE CD, FISCHER JE, HASSELGREN POJ. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. 1997. *Journal of Surgical Research*. 69(1):139-144.
- (109) DI SABATINO A, GIUFFRIDA P, FORNASE G, SALVATORE C, VANOLI A, NAVIGLIO S, DE LEO L, PASINI A, DE AMICI M, ALVISI C, NOT T, RESCIGNO M, CORAZZA GR. Innate and adaptive immunity in self-reported nonceliac gluten sensitivity versus celiac disease. 2016. *Digestive and Liver Disease*. 48(7):745-752.

- (110) LEYVA-LÓPEZ N, GUTIERREZ-GRIJALVA EP, AMBRIZ-PEREZ DL, HEREDIA JB. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. 2016. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(6):921.
- (111) FORDHAM JB, NAQVI AR, NARES S. Leukocyte Production of Inflammatory Mediators Is Inhibited by the Antioxidants Phloretin, Silymarin, Hesperetin, and Resveratrol. 2014. *Mediators of Inflammation*. 1-11.
- (112) WOLFF B, BURNS AR, MIDDLETON J, ROT A. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. 1998. *Journal of Experimental Medicine*. 188(9):1757-1762.
- (113) PALOVÁ-JELÍNKOVÁ L, ROZKOVÁ D, PECHAROVÁ B, BÁRTOVÁ J, SEDIVÁ A, TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H, SPÍSEK R, TUCKOVÁ L.J. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. 2005. *Annual Review of Immunology*. 175(10):7038-7045.
- (114) TU J, XU Y, XU J, LING Y, CAI Y. Chitosan nanoparticles reduce LPS-induced inflammatory reaction via inhibition of NF- κ B pathway in Caco-2 cells. 2016. *International Journal of Biological Macromolecules*. 86:848-856.
- (115) MURCH S. Recent Advances in Celiac Disease. 2016. *Indian Journal of Pediatrics*. 17(18):2259-2272.
- (116) ABADIE V, JABRI B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. 2014. *Immunological Reviews*. 260(1):221-234.
- (117) KUPFER SS, JABRI B. Celiac Disease Pathophysiology. 2012. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. 22(4):1:28.
- (118) JABRI B, ABADIE V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. 2015. *Nature Reviews Immunology*. 15(12):771-783.

(119) ETTERSBERGER J, MONTCUQUET N, MALAMUT G, GUEGAN N, LOPEZ-LASTRA S, GAYRAUD S, REIMANN C, VIDAL E, CAGNARD N, VILLARESE P, ANDRE-SCHMUTZ I, GOMES DOMINGUES R, GODINHO-SILVA C, VEIGA-FERNANDES H, LHERMITTE L, ASNAFI V, MACINTYRE E, CELLIER C, BELDJORD K, DI SANTO JP, CERF-BENSUSSAN N, MERESSE B. Interleukin 15-Dependent T Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. 2016. *Immunity*. 45(3):610-625.

(120) BERNARDO D, GARROTE JA, ALLEGRETTI Y, LEÓN A, GÓMEZ E, BERMEJO-MARTIN JF, CALVO C, Riestra S, FERNÁNDEZ-SALAZAR L, BLANCO-QUIRÓS A, CHIRDO F, ARRANZ E. Higher constitutive IL15R alpha expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. 2008. *Clinical & Experimental Immunology*. 154(1):64-73.

(121) BARONE MV, ZANZI D, MAGLIO M, NANAYAKKARA M, SANTAGATA S, LANIA G, MIELE E, RIBECCO MT, MAURANO F, AURICCHIO R, GIANFRANI C, FERRINI S, TRONCONE R, AURICCHIO S. Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. 2011. *PLoS One*. 6(2):e17039.

(122) BARILLI A, ROTOLI BM, VISIGALLI R, DALL'ASTA V. Gliadin activates arginase pathway in RAW264.7 cells and in human monocytes. 2014. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1842(9):1364-1371.

(123) DE STEFANO D, MAIURI MC, IOVINE B, IALENTI A, BEVILACQUA MA, CARNUCCIO R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1 alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. 2006. *Journal of Molecular Medicine*. 84(1):65-74.

(124) DANIELS I, CAVILL D, MURRAY IA, LONG RG. Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. 2005. *Clinica Chimica Acta*. 356(1-2):134-142.

(125) MAIURI MC, DE STEFANO D, MELE G, IOVINE B, BEVILACQUA MA, GRECO L, AURICCHIO S, CARNUCCIO R. Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B. 2003. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 368(1):63-71.

(126) MURRAY IA, DANIELS I, COUPLAND K, SMITH JA, LONG RG. Increased activity and expression of iNOS in human duodenal enterocytes from patients with celiac disease. 2002. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 283(2):319-326.

(127) ESPOSITO G, CIRILLO C, SARNELLI G, DE FILIPPIS D, D'ARMIENTO FP, ROCCO A, NARDONE G, PETRUZZELLI R, GROSSO M, IZZO P, IUVONE T, CUOMO R. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. 2007. *Gastroenterology*. 133(3):918-925.

(128) DE STEFANO D, MAIURI MC, SIMEON V, GRASSIA G, SOSCIA A, CINELLI MP, CARNUCCIO R. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. 2007. *European Journal of Pharmacology*. 566(1-3):192-199.

(129) TONG L, CHEN T, CHEN Z, ZHANG P, PI H, RUAN H, WU J. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from *Radix Toddaliae Asiaticae*. 2014. *Journal of Ethnopharmacology*. 155(3):1553-1560.

(130) KORHONEN R, LAHTI A, KANKAANRANTA H, MOILANEN E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. 2005. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. 4(4):471-479.

(131) USPENSKAYA ID, ERZUTOVA MV, KORKOTASHVILI LV, KOLESOV SA, SHIROKOVA NY. The significance of increased levels of end nitric oxide metabolites in blood serum of children with celiac disease. 2014. *Bratislava Medical Journal*. 115(11):712-717.

(132) HÖGBERG L, WEBB C, FÄLTH-MAGNUSSON K, FORSLUND T, MAGNUSSON KE, DANIELSSON L, IVARSSON A, SANDSTRÖM O, SUNDQVIST T. Children with screening-detected coeliac disease show increased levels of nitric oxide products in urine. 2016. *Acta Paediatrica*. 100(7):1023-1027.

(133) KIM HK, CHEON BS, KIM YH, KIM SY, KIM HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. 1999. *Biochemical Pharmacology*. (58):759–765.

(134) LAWRENCE T, WILLOUGHBY DA, GILROY DW. Anti-inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. 2002. *Nature Reviews*, 2(10):787-795.

(135) BUCKLEY CD, NAYAR SB, CAAMAÑO JC. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. 2015. *Annual Review of Immunology*. (22):715-745.

(136) CHLADKOVA B, KAMANOVA J, PALOVA-JELINKOVA L, CINOVA J, SEBO P, TUCKOVA L. Gliadin fragments promote migration of dendritic cells. 2011. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 15(4):938-948.

(137) FRIIS S, ANTHONSEN D, NORÉN O, SJÖSTRÖM H. Gamma-type gliadins cause secretion of prostaglandin E2 in patients with coeliac disease. 1994. *Clinica Chimica Acta*. 231(2):173-183.

(138) AHERNE SA, O'BRIEN NM. Dietary flavonols, chemistry, food content, and metabolism. 2002. *Nutrition*. (18):75-81.

(139) GURLEY BJ, GARDNER SF, HUBBARD MA, WILLIAMS DK, GENTRY WB, CARRIER J, KHAN IA, EDWARDS DJ, SHAH A. In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes, *Citrus aurantium*, *Echinacea purpurea*, milk thistle, and saw palmetto. 2004. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 76:428-440. Errata em: *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005; 77:456.

(140) FERENCI P, DRAGOSICS B, DITTRICH H, FRANK H, BENDA L, LOCHS H, MERYN S, BASE W, SCHNEIDER B. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. 1989. *Journal of Hepatology*. (9):105-113.

(141) Comissões CNS-CONEP, BRASIL. 2016. Atribuições da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. [Online] Disponível no endereço eletrônico: http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/conep/atribuicoes.html. [Acesso em 2016].

(142) Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL. Regularização de Produtos – Medicamentos. Registro de Medicamentos Novos. [Online] Disponível no endereço eletrônico: [Online] Disponível no endereço eletrônico: http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/conep/atribuicoes.html. [Acesso em 2016].

(143) Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL. Registro de Medicamentos. Como a Anvisa vê o uso *off label* de medicamentos. [Online] Disponível no endereço eletrônico: [Online] Disponível no endereço eletrônico: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/registro_offlabel.htm. [Acesso em 2016].