

LEITE DE OLIVEIRA

(nomes completos)

Leite de Oliveira

Jaeger Teodoro (CNPQ)

Arques de Brito Neto (UFRR)

AO: Licopeno induz a difere

lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos me
da, e pelo candidato:

julho de 2015

Leite de Oliveira

Arques de Brito Neto

Recebeu em Pampa

Monique de Barros Elias

**LICOPENO INDUZ A DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS B EM PLASMÓCITOS
PRODUTORES DE IGA**

Dissertação de mestrado apresentado em cumprimento parcial às exigências do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Felipe Leite de Oliveira

Rio de Janeiro

2015

Monique de Barros Elias

**LICOPENO INDUZ A DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS B EM PLASMÓCITOS
PRODUTORES DE IGA**

Dissertação de mestrado apresentado em cumprimento parcial às exigências do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Professor Doutor Felipe Leite de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Professor Doutor Anderson Teodoro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Professor Doutor José Brito
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Elias, Monique de Barros

Licopeno induz a diferenciação de linfócitos b em plasmócitos produtores de iga

70f.; 30 cm

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

1. Licopeno. 2. Linfócitos B. 3. Diferenciação celular. 4. IgA.

Dedico este trabalho à minha mãe e minha tia por todo apoio, incentivo e principalmente amor dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Luiz Felipe, por todo amor, carinho, apoio e incentivo. Por estar ao meu lado em qualquer circunstância.

À minha família por estarem sempre por perto, pela dedicação e amor dados a mim, principalmente minha mãe, que apesar de toda força e luta, sempre esteve ao meu lado.

Para as minhas amigas Maryah e Mayra que me apoiaram em todos os momentos, ajudando e incentivando as minhas escolhas.

Ao meu orientador, Felipe Leite de Oliveira, por toda dedicação, paciência, compreensão, e ajuda mesmo nas circunstâncias mais difíceis.

Ao professor Anderson Teodoro, por me acompanhar desde a graduação, sempre me orientando e apoiando meu crescimento.

Ao Prof. Dr. José Brito por toda a ajuda durante o trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição pela oportunidade de realização do mestrado e aos professores da Escola de Nutrição da UNIRIO que fizeram parte da minha formação.

À todos os alunos do Laboratório.

À todos os colegas do mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Medula óssea	3
1.2. Linfócitos B.....	5
1.3 Imunoglobulina M (IgM)	10
1.4 Imunoglobulina A (IgA)	11
1.5. Carotenoides	13
1.6. Licopeno	15
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais.....	20
3.2. Suspensões celulares da medula óssea.....	20
3.3. Licopeno.....	21
3.4. Citometria de fluxo: fenotipagem.....	21
3.5. Citometria de fluxo: avaliação de apoptose.....	22
3.6. Morfologia: citocentrifugado e microscopia óptica.....	22
3.7. Imunocitoquímica	23
3.8. Suplementação in vivo	23
3.9. ELISA: dosagem de imunoglobulinas	24
3.10. Análise Estatística.....	25

4. RESULTADOS	26
4.1. Avaliação da celularidade e fenotípica das células hematopoiéticas estimuladas com licopeno.....	26
4.2. Licopeno interfere com a linfopoiese B <i>in vitro</i>	31
4.3. Análise da ação do licopeno na sobrevivência das células hematopoiéticas	35
4.4. Suplementação com licopeno <i>in vivo</i> induziu a diferenciação de linfócitos B	38
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática dos componentes celulares presentes na medula óssea _____	4
Figura 2. Representação esquemática das etapas de diferenciação dos linfócitos B _____	9
Figura 3. Representação esquemática da mudança de classe para IgA _____	12
Figura 4. Estrutura química dos carotenóides _____	14
Figura 5. Molécula do licopeno _____	16
Figura 6. . Suplementação oral e intraperitoneal _____	24
Figura 7: Número de leucócitos derivados da medula óssea cultivados na presença de licopeno ____	26
Figura 8: Morfologia das células medulares cultivadas na presença de licopeno _____	27
Figura 9: Células CD11b+B220- tratadas com licopeno nas concentrações de 5 e 10 μ M _____	28
Figura 10: Células TCD4 e TCD8 tratadas com licopeno nas concentrações de 5 e 10 μ M _____	29
Figura 11. Linfócitos B220+ tratados com 5 e 10 μ M de licopeno _____	30
Figura 12. Diferenciação de linfócitos B induzida pelo licopeno <i>in vitro</i> _____	31
Figura 13. Ação do licopeno nos diferentes compartimentos de linfócitos B _____	32
Figura 14. Efeito do licopeno na diferenciação de linfócitos B220+ em plasmócitos CD138+ _____	33
Figura 15. Detecção de plasmócitos nas culturas estimuladas com licopeno _____	34
Figura 16. Monitoramento de morte celular por citometria de fluxo _____	36
Figura 17. Efeito do licopeno na apoptose induzida por dexametasona _____	37
Figura 18. Celularidade na medula óssea de animais tratados com licopeno durante 15 dias _____	39

Figura 19. Análise das subpopulações de linfócitos B nos animais tratados com licopeno in vivo _____	41
Figura 20. Dosagem de IgM e IgA no soro induzida com licopeno purificado e extrato de tomate ____	42
Figura 21. Análise fenotípica de linfócitos B no baço de animais estimulados com licopeno _____	43
Figura 22. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na diferenciação de plasmócitos no baço_____	45
Figura 23. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na diferenciação de plasmócitos no baço _____	46
Figura 24. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na distribuição das células peritoneais _____	48
Figura 25. do licopeno e do extrato de tomate na expressão de IgM e IgA nas células B peritoneais ____	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. : Principais marcadores do desenvolvimento de linfócitos B _____	6
Tabela 2. Esquematização da suplementação in vivo.._____	23
Tabela 3 : Avaliação do peso corpóreo após indução in vivo com licopeno_____	38

RESUMO

O processo de produção e diferenciação de linfócitos B ocorre mais especificamente na medula óssea e é caracterizado pelo desenvolvimento dos seus precursores até a geração de células maduras que circulam para órgãos periféricos com suas diferentes funções. Dentre diversos alimentos funcionais que regulam a hematopoese humana e respostas imunológicas, o licopeno tem sido descrito como uma molécula responsável por estimular a maturação de células efectoras. No entanto, como a maioria destes dados em humanos ainda é pouco conclusivo, modelos animais experimentais tem sido utilizados para melhor compreensão dos mecanismos de ação deste produto. Surge então o interesse de novas estratégias de estudos relacionados com a influência direta de licopeno na hematopoese, especificamente na linfopoese B e produção de anticorpos. Recentemente, foi demonstrado que o licopeno regula eventos celulares, tais como apoptose e ciclo celular (mitose) em células cancerosas. No entanto, é pouco compreendido como este produto regula a biologia de células normais. Neste contexto, a hematopoese murina pode ser considerada um excelente modelo experimental para estudar vários eventos e propriedades celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose mediante contato com o licopeno. Neste sentido, o objetivo do trabalho é tratar células obtidas de medula óssea de animais normais com diferentes concentrações de licopeno podendo assim analisar alterações na celularidade, no fenótipo e nas classes de imunoglobulinas, incluindo IgM e IgA. Os resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho indicam uma nova função para o licopeno como molécula imunomoduladora, interferindo com a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e na produção de anticorpos IgA.

Palavras-chave: licopeno; linfócito B; diferenciação celular; ciclo celular

ABSTRACT

B lymphocytes are generated in the bone marrow, where their progenitor cells differentiate into mature cells which circulate to peripheral lymphoid organs to synthesize immunoglobulins. Several functional foods have been described as regulators of human hematopoiesis and immune responses. In this context, lycopene has been described as responsible to stimulate the maturation of effector cells. Considering that the majority of human data are poorly understood, experimental models have been used to investigate the mechanisms of this product on the cell behavior. Then, new strategies have been established to study the influence of lycopene on hematopoiesis, especially in the course of B lymphopoiesis and antibody production. Recently, it has been demonstrated that lycopene regulates cellular events, including apoptosis and cell cycle on tumor cells. However, the exact mechanism is unclear and no evidences were shown in normal cells. Thus, the murine hematopoiesis can be considered an excellent experimental model to study several cellular properties and events, such as proliferation, differentiation and apoptosis after treatment with lycopene. The objective of this work is to treat bone marrow cells of normal mice with distinct concentrations of lycopene and analyze possible disturbs on cellularity, phenotype and immunoglobulin isotypes, including IgM and IgA. The preliminary results suggest a new function to lycopene as immunomodulatory molecule, interfering significantly with B lymphocyte differentiation into plasma cells and antibody production.

Key-words: lycopene; B lymphocytes; cell differentiation; cell cycle

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medula óssea

A medula óssea é um órgão hematopoiético, conhecida como um tecido que preenche a cavidade interna de vários ossos, caracterizada por uma organização histológica complexa que regula a hematopoese. Neste fenômeno ocorre a produção, proliferação e diferenciação das células sanguíneas a partir de células-tronco pluripotentes presentes na região subendosteal da medula óssea adulta (Panaroni and Wu, 2013).

As células-tronco hematopoéticas são capazes de gerar cópias de si mesmas e também células sanguíneas diferenciadas, tais como leucócitos, eritrócitos (hemácias) e plaquetas. A diferenciação das células-tronco hematopoéticas gera células progenitoras comuns às linhagens linfoides e mieloides, distribuídas pela medula óssea de forma organizada em microambientes teciduais, conhecidos como nichos hematopoéticos (Morrison and Scadden, 2014).

Os progenitores mieloides comuns (CMPs – *comum myeloid precursors*) podem gerar eritrócitos, trombócitos, granulócitos, mastócitos, células dendríticas mieloides, monócitos e macrófagos. Em contrapartida, os precursores linfóides comuns (CLPs – *comum lymphoid precursors*) geram linfócitos B, linfócitos T, células NK e células dendríticas linfoides (Ye and Graf, 2007). A medula óssea também abriga os osteoblastos, as células acumuladoras de lipídios e as células reticulares (Figura 1), responsáveis pela sustentação e manutenção dos precursores comuns (Lilly *et al.*, 2011).

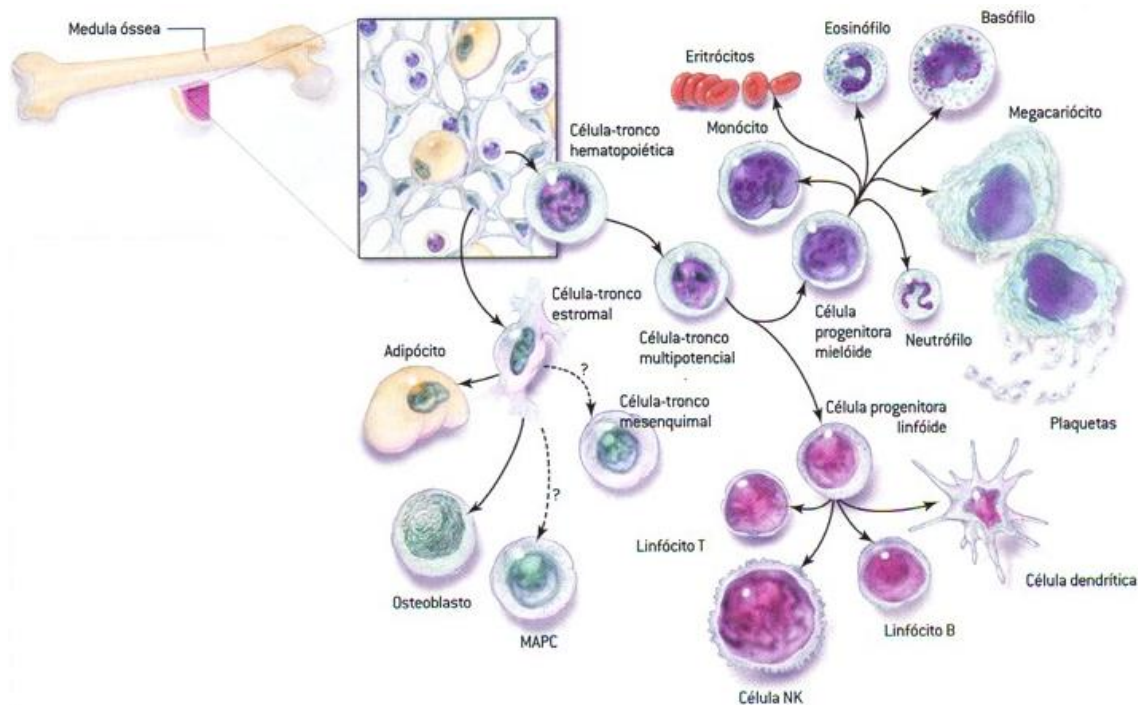


Figura 1: Representação esquemática dos componentes celulares presentes na medula óssea. Na cavidade medular óssea, as células-tronco hematopoéticas interagem com células conjuntivas estromais e trocam sinais biológicos específicos, os quais direcionam as diversas vias de comprometimento, proliferação e diferenciação celular. As células-tronco hematopoéticas são capazes de gerar progenitores mielóides que originam as hemácias, plaquetas e alguns leucócitos (monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Já os progenitores linfóides originam os linfócitos B e T. Adaptado de Scientific American, n.3, 2006, Edição Especial Ciência e Saúde.

Durante a hematopoese, a primeira linha de produção é direcionada para a geração de eritrócitos e megacariócitos (precursores das plaquetas), e posteriormente, tais células-tronco são tendenciadas a gerarem granulócitos e monócitos (precursores dos macrófagos). Por fim, os progenitores hematopoéticos estão sujeitos a diferenciarem em células linfóides B e T (Ye and Graf, 2007). A especificação das células-tronco hematopoéticas, bem como o comprometimento destas células com a geração da linhagem de linfócitos B são amplamente estudados, embora superficialmente entendidos.

1.2 Linfócitos B

Linfócitos B convencionais são gerados através de células-tronco hematopoiéticas derivadas de fígado fetal durante o período embrionário e na medula óssea enquanto adulto (Godin and Cumano, 2002). A linfopoese B em adultos ocorre em microambientes bem definidos na medula óssea, compostos por matriz extracelular e as células do estroma, tais como as células reticulares, adipócitos, células endoteliais, macrófagos e osteoblastos. As células estromais da medula óssea organizam microambientes distintos, conhecidos como nichos hematopoiéticos, que fornecem suporte para a hematopoese e desenvolvimento de linfócitos B (Nagasawa, 2006).

O processo de geração de linfócitos B, denominado linfopoese B, ocorre integralmente na medula óssea onde uma malha celular de sustentação (células estromais) e precursores linfoides comuns interagem de forma específica, resultando na diferenciação de linfócitos B. Vale ressaltar que este processo é caracterizado pelo desenvolvimento dos precursores até a geração de células maduras que circulam para órgãos periféricos. Há um “programa” ordenado de expressão gênica, regulado por fatores de transcrição e uma seleção de clones que não reagem contra antígenos do próprio organismo. Quaisquer falhas nessas etapas podem gerar imunodeficiências por falta de imunoglobulinas (anticorpos), leucemias ou doenças autoimunes (Rolink *et al.*, 2006).

Proteínas de membrana tem sido identificadas como marcadores de diferenciação dos linfócitos B na medula óssea e nos tecidos linfoides secundários, como o baço e os linfonodos, aonde as células chegam às suas fases efectoras (funcionais) completamente maduras. Durante a diferenciação das células B, vários subtipos de linfócitos B foram identificados de acordo com o fenótipo: Precursores Linfoides Comuns ($\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{AA4.1}^+ \text{IL-7R}^+$), Células Pre-Pro-B ($\text{B220}^{\text{low}} \text{CD43}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD19}^- \text{IL-7R}^+ \text{IgM}^- \text{IgD}^-$), células pro-B ($\text{B220}^{\text{low}} \text{CD43}^+ \text{CD19}^{\text{low}} \text{IL-7R}^+ \text{IgM}^- \text{IgD}^-$), células Pre-B ($\text{c-Kit}^+ \text{B220}^{\text{low}} \text{CD43}^- \text{CD19}^{\text{low}}$

IL-7R⁻ c-Kit⁻ IgM⁻ e IgD⁻) e células B imaturas (B220^{high} CD43⁻ CD19^{high} c-Kit⁻ IL-7R⁻ IgM⁺ IgD⁻) (Tobón *et al.*, 2013). Estas células B imaturas movem-se para fora da medula óssea e migram através da corrente sanguínea para os órgãos linfoides secundários, como o baço, onde são ativadas, proliferam (expansão clonal) e se diferenciam em plasmócitos (LeBien and Tedder, 2008). Estas células terminalmente diferenciadas secretam as imunoglobulinas (anticorpos) após reconhecerem antígenos que interagem com as respectivas imunoglobulinas de superfície (ou receptores de antígenos) presentes na membrana destas células (Carrasco and Batista, 2006).

Os principais marcadores fenotípicos que caracterizam as etapas de maturação dos linfócitos B estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: Principais marcadores moleculares característicos do desenvolvimento de linfócitos B.

Pré-pró B	Pró-B	Pré-B	B imatura	B madura	Plasmócito
B220 +	B220 +	B220 +	B220 +	B220 +	B220 -
CD19 -	CD19 +	CD19 +	CD19 +	CD19 +	CD19 -
CD25 -	CD25 -	CD25 +	CD25 +	CD25 +	CD25 -
Rag-1 -	Rag-1 -	Rag-1 +	Rag-1 +	Rag-1 +	Rag-1 -
Rag-2 -	Rag-2 -	Rag-2 +	Rag-2 +	Rag-2 +	Rag-2 -
c-Kit +	c-Kit +	c-Kit -	c-Kit -	c-Kit -	c-Kit -
IL-7R +	IL-7R +	IL-7R +	IL-7R -	IL-7R -	IL-7R -
CD40 -	CD40 -	CD40 -	CD40 -	CD40 -	CD40 -
TdT -	TdT -	TdT +	TdT -	TdT -	TdT -
IgM -	IgM -	IgM -	IgM +	IgM +	IgM (?)
IgD -	IgD -	IgD -	IgD -	IgD +	IgD (?)
CD138 -	CD138 -	CD138 -	CD138 -	CD138 -	CD138 +

Destas proteínas de membrana, as mais relevantes para o desenvolvimento deste trabalho são: B220, CD19, c-Kit, IL-7R, IgM e CD138. B220 é uma proteína que pertence à família dos antígenos comuns aos leucócitos (CD45), sendo essencial para a sinalização mediada por receptores de células B que resulta na ativação destas células. Uma isoforma predominantemente expressa por linfócitos B, denominada CD45RA, tem o peso molecular de 220 kDa e por isso passou a ser chamada comumente de B220. Considerando o fato de outras linhagens celulares também expressarem esta molécula, como por exemplo, células NK, linfócitos T ativados e uma subpopulação de células dendríticas, torna-se necessário avaliar a expressão de outras proteínas de membranas presentes nos linfócitos B para definir o fenótipo correto (Rolink and Melchers, 1996).

CD19 também é uma proteína sintetizada preferencialmente por linfócitos B e em parte das células dendríticas foliculares. Esta molécula está presente na membrana dos linfócitos B desde as primeiras etapas da diferenciação, bem como a molécula B220. Entretanto, sua expressão torna-se reduzida à medida que estas células terminalmente diferenciam em plasmócitos. Nos linfócitos B em desenvolvimento, age como co-receptor em conjunto com outras proteínas de membrana, como CD21 e CD81, favorecendo o processo de ativação destas células (Tedder, 2009). Mutações nestas proteínas estão relacionadas com imunodeficiências e capacidade reduzida de sintetizar anticorpos (van Zelm *et al.*, 2006). A combinação com B220 pode definir algumas das etapas de maturação que ocorre na medula óssea (Tabela 1).

Os marcadores c-Kit (CD117) e o receptor de interleucina-7 (IL-7R) são tipicamente detectados na membrana de progenitores hematopoiéticos, mas quando detectados em conjunto com B220 e CD19, pode-se definir certas etapas da maturação dos linfócitos B (Busslinger, 2004) e (Tabela 1). CD117 age como receptor do fator de crescimento de

células-tronco induzindo a proliferação dos progenitores hematopoiéticos (Wilson *et al.*, 2007).

Quanto a IL-7, esta proteína foi descrita como um fator de crescimento de progenitores de linfócitos B secretado pelas células estromais da medula óssea, e posteriormente, também caracterizada como um regulador da linfopoese T. Como os progenitores de linfócitos B são IL-7R⁺, podem ser estimulados a proliferar imediatamente depois do contato com o seu ligante (IL-7) produzido pelo estroma medular (Ceredig and Rolink, 2012).

Quando os linfócitos B produzem definitivamente seu receptor funcional, o receptor de células B (BCR – *B cell receptor*), significa que estas células passaram a expressar a imunoglobulina M (IgM). E nesta fase, os linfócitos B estão aptos a migrar da medula óssea para os tecidos linfoides secundários, como baço e linfonodos. Contudo, ainda não expressam IgD e são fenotipicamente classificadas como IgM⁺ e IgD⁻ (LeBien and Tedder, 2008). Finalmente, o contato com antígenos induz a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e estas etapas podem ser monitoradas pela perda de expressão gradativa de B220 e CD19, ao passo que as células diferenciando começam a sintetizar CD138, uma molécula de adesão pertencente à família Sindecin (Oracki *et al.*, 2010). Considerando tais marcadores e seus aspectos funcionais, todas as etapas da diferenciação dos linfócitos B podem ser avaliadas por metodologias que permitem localizar e/ou quantificar células que expressem concomitantemente tais moléculas (Figura 2).

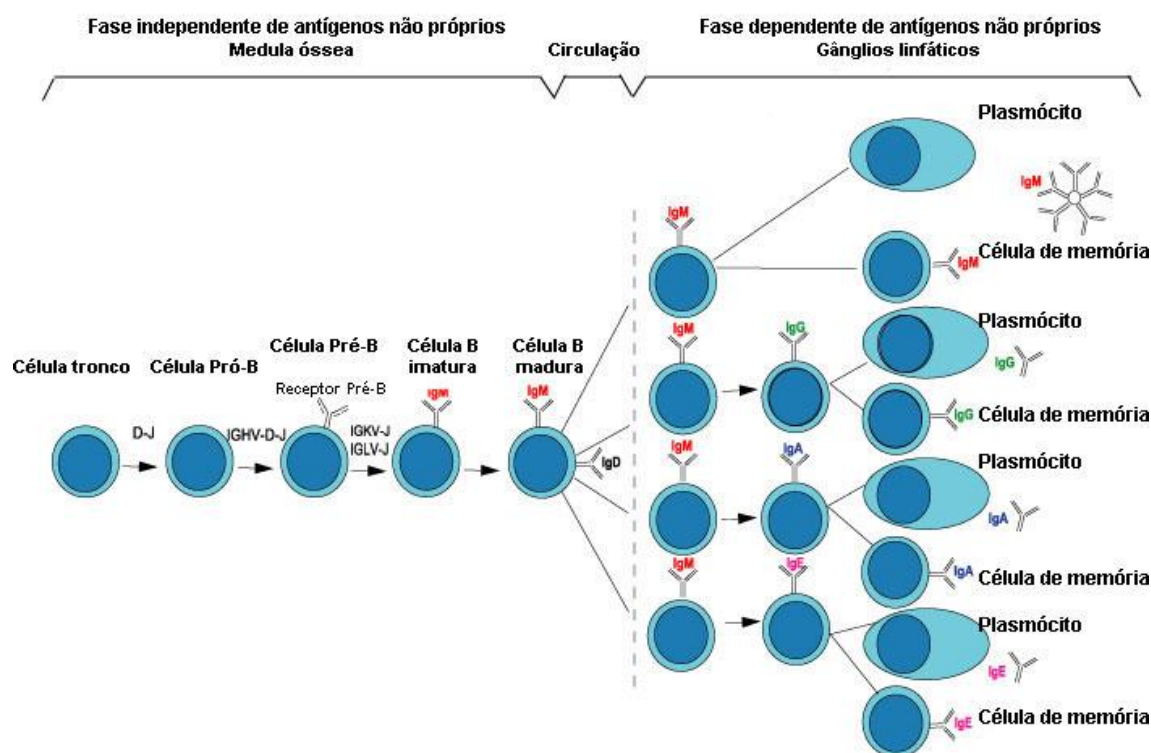


Figura 2: Representação esquemática das etapas de diferenciação dos linfócitos B.

Todas as etapas da diferenciação dos linfócitos B podem ser reguladas por fatores endógenos (Bryder and Jacobsen, 2000; Ye and Graf, 2007) e exógenos, incluindo alimentos funcionais (Chen *et al.*, 2008; Salva *et al.*, 2012). Dentre vários alimentos funcionais, os carotenoides foram descritos como moléculas reguladoras durante a hematopoese humana e respostas imunológicas (Evans, 2005; Collins, 2008). No entanto, a maioria destes dados em humanos ainda é pouco conclusivo e surge o interesse de novas estratégias de estudos relacionados com a influência direta de alimentos funcionais na hematopoese, especificamente na linfopoese B e produção de anticorpos.

1.3 Imunoglobulina M (IgM)

IgM representa aproximadamente 10% do repertório de imunoglobulinas, possui uma estrutura funcional pentamérica, com peso molecular total de 970 KDa. É uma classe de anticorpo predominantemente circulante, sintetizada nas fases iniciais da resposta humoral. Pode ser encontrada na superfície dos linfócitos B nas fases terminais da diferenciação, ainda na forma monomérica, como receptores de antígenos (Klimovich, 2011).

IgM desempenha um papel crítico na proteção contra agentes patogênicos e está relacionado com prevenção de autoimunidade. Embora a sua importância tenha sido demonstrado em muitas condições diferentes, suas origens não são completamente compreendidas. Baço e medula óssea, mas não as cavidades do corpo, são os principais locais de secreção natural IgM. Tais aspectos foram recentemente revisados por Savage e Baumgarth (Savage and Baumgarth, 2015).

Alguns autores tem sugerido o termo “anticorpo natural” para IgM, considerando que IgM pode ser sintetizada por linfócitos B de memória, representantes da primeira linha de defesa contra infecções, contribuindo para a melhoria das funções inatas primitivas. Estas células são geradas por mecanismos independentes de linfócitos T e tais anticorpos tem especificidade contra padrões antigênicos comuns a vários patógenos. O baço é indispensável para a sua manutenção (Capolunghi *et al.*, 2013). IgM reconhece células apoptóticas e potencializam a fagocitose de células mortas, suprimindo vias de sinalização imunes inatas. Geralmente, essa classe “natural” de é produto de clones de linfócitos B1 peritoneais (Gronwall *et al.*, 2012).

1.4 Imunoglobulina A (IgA)

IgA é a imunoglobulina mais abundante nas superfícies mucosas. Sua secreção ocorre em mecanismos dependentes e/ou independentes de células T, e tem um impacto importante na manutenção da homeostase no sistema imune das mucosas (Meyer-Bahlburg, 2015). Este isotipo compõe a primeira linha de defesa para repelir microrganismos patogênicos e garante a sobrevivência de bactérias comensais, principalmente na mucosa intestinal. Esse mecanismo favorece a homeostase permitindo o reconhecimento dos antígenos e evitando a disseminação pelo tecido, revelando suas propriedades anti-inflamatórias na mucosa (Corthesy, 2013).

No trato gastrointestinal, IgA desempenha papéis fundamentais na regulação das comunidades bacterianas no intestino e apresenta propriedades de um agente de neutralização (exclusão imune) que induz respostas imunitárias efectoras num contexto não-inflamatórias, favorável para preservar a homeostase local (Corthesy, 2009). De fato, bactérias comensais são naturalmente revestidas por IgA e são impedidas de interagirem com o epitélio (Mathias *et al.*, 2014).

A síntese de IgA tem início com mudança de classe de IgM para IgA, que ocorre na superfície dos linfócitos B em diferenciação presentes nos tecidos linfoides associados a mucosas, caracterizados pelo fenótipo $\text{IgM}^+ \text{B220}^+ \text{IgA}^+$. Estas células se diferenciam plasmócitos secretores de IgA nos órgãos linfóides associados a mucosas, incluindo baço, tecidos linfoides associados à nasofaringe, folículos linfoides isolados e placas de Peyer (Shikina *et al.*, 2004). A figura 3 representa esquematicamente como ocorre a mudança de classe de IgM para IgA (Figura 3).

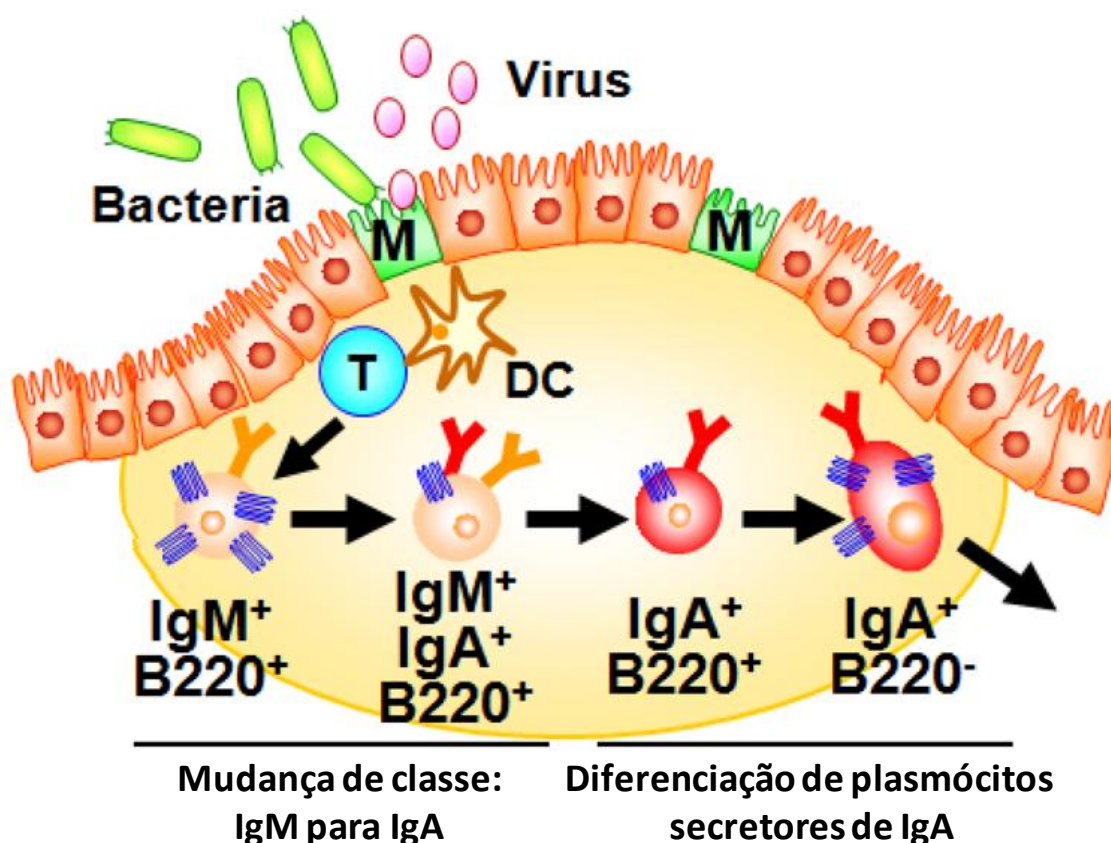


Figura 3: Esquema demonstrando o fenótipo das células B diferenciando em plasmócitos secretores de IgA. Células B IgM⁺IgA⁻ mudam seu fenótipo para IgM⁺IgA⁺ após estímulo específico na mucosa intestinal. Estas células tornam-se IgM⁻IgA⁺ e perdem o marcador B220 quando diferenciam em plasmócitos. Figura adaptada de Kunisawa e colaboradores (Kunisawa and Kiyono, 2012).

IgA interage com distintos tipos de receptores na superfície das células do sistema imunológico, incluindo receptor envolvido no transporte epitelial de IgA/IgM e o recetor Fc de IgA em células mieloides (FcalphaRI ou CD89), como por exemplo neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e células dendríticas (Monteiro and Van De Winkel, 2003).

Dentre vários reguladores da síntese de IgA, o ácido retinóico conduz a uma potente resposta de IgA mucosa e não aumenta a produção de IgM (Seo *et al.*, 2014). O ácido retinoico tem se mostrado mais eficiente que o TGF-β1 na regulação da síntese de IgA, induzindo não só maior secreção de IgA, mas também aumentando a frequência de clones de

linfócitos B IgA⁺ (Seo *et al.*, 2013). As células secretoras de anticorpos na mucosa intestinal são derivadas de linfócitos B ativados que provavelmente surgem em tecidos linfóides associados ao intestino (GALT). Tais células são recrutadas para a mucosa por células dendríticas em mecanismos dependentes de vitamina A, metabólito ácido retinóico, pois elevados níveis estão diretamente relacionados a troca de classe de IgM para IgA (Mora *et al.*, 2006; Mora and von Andrian, 2009).

Recentemente, Guo e colaboradores publicaram uma revisão que explora conceitos importantes na regulação de migração e função de leucócitos controlados por ácido retinóico (Guo *et al.*, 2015). Claramente, a forma ativa da vitamina A, o ácido retinóico, tem uma alta eficiência na quimiotaxia e diferenciação de leucócitos. Além disso, animais com deficiência de vitamina A possuem imunidade comprometida e aumento de suscetibilidade a doenças infecciosas (Guo *et al.*, 2015). Em vegetais, a vitamina A pode ser encontrada na forma de carotenoides (Ruhl, 2013).

1.5 Carotenoides

Os carotenoides são isoprenóides amplamente distribuídos na natureza, tipicamente vistos como pigmentos em frutas, flores, pássaros e crustáceos, responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha. Como não são sintetizados por células animais, dependem da dieta como fonte (Fraser and Bramley, 2004). Recentemente, tem atraído a atenção de pesquisadores em diversas áreas do conhecimento científico, devido ao seu efeito benéfico sobre a saúde humana, especialmente, diminuindo a incidência de câncer e atuando predominantemente como antioxidantes (Jomova and Valko, 2013).

Aproximadamente, na natureza existe 700 carotenoides, destes apenas 40 podem ser absorvidos, metabolizados e utilizados pelo organismo humano. Entretanto, apenas parte destes componentes são encontrados no soro, incluindo α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, licopeno e retinóides (Fernández-García et al., 2012). Os carotenoides podem ser divididos em dois grupos, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são carotenoides compostos por carbono e hidrogênio apenas, como o β -caroteno, α -caroteno e licopeno. Já as xantofilas apresentam grupos substituintes com oxigênio, como a luteína, zeaxantina e, α e β criptoxantina (Stahl and Sies, 2005).

Estruturalmente os carotenoides são tetraterpenóides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula. Esta cadeia pode ter de 3 a 15 ligações conjugadas que determinam o espectro de absorção e, assim, a cor da molécula carotenóide (Stahl and Sies, 2005). A partir desse espectro é possível obter diversas informações sobre a estrutura da molécula de fundamental importância para análise de carotenoides (Melendez-Martinez et al., 2007). A figura 4 sintetiza as formas estruturais dos carotenoides.

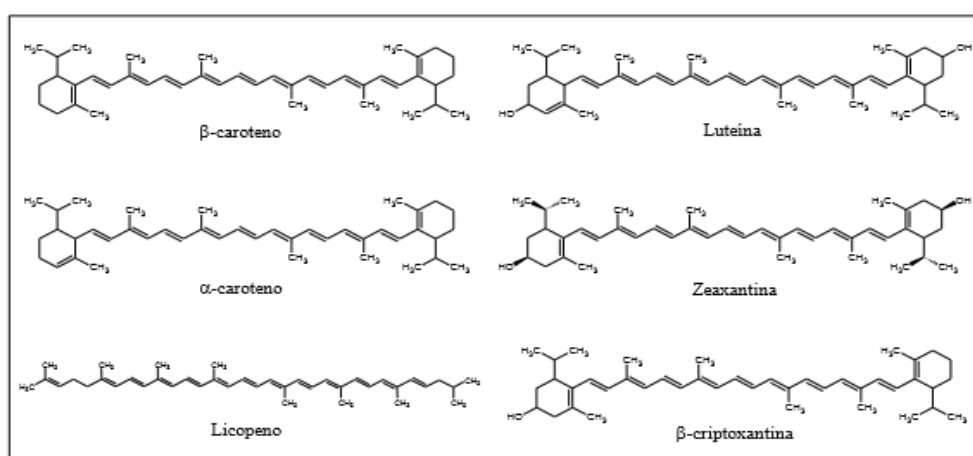


Figura 4: Estrutura química dos carotenóides

Antigamente, as pesquisas sobre carotenoides se baseavam sobre a composição e identificação de carotenoides pró-vitâmicos A em alimentos, isto é, aqueles carotenoides

que quando absorvidos pelo organismo humano são clivados em uma ou duas moléculas de vitamina A, com destaque para o β -caroteno, o carotenoide que possui maior atividade. Atualmente os estudos se encontram direcionados para atividade antioxidante destes compostos, buscando avaliar e quantificar os compostos de maior atividade. Dentre os carotenoides mais amplamente estudados o que possui maior atividade antioxidante é o licopeno (Dias *et al.*, 2008; Ruhl, 2013). Eles podem atuar na desativação de espécies reativas, evitando assim a iniciação de cadeias de oxidação em nível celular que conduz a danos ao ácido desoxiribonucléico (DNA) e peroxidação lipídica (Silva *et al.*, 2001).

A ação dos carotenoides no sistema imunológico tem sido intensamente estudada nas duas últimas décadas. Em modelos experimentais distintos e na prática clínica, dois carotenoides tem sido amplamente estudados: licopeno e β -caroteno (Tanaka *et al.*, 2012). O licopeno tem sido descrito como um produto antitumoral significativo em tipos de células cancerosas diferentes, principalmente regulando eventos celulares, tais como apoptose e ciclo celular (mitose), amplamente envolvidas com progressão do câncer (Teodoro *et al.*, 2012). No entanto, é pouco compreendido se o licopeno regula a biologia de células normais. Neste contexto, a hematopoese murina pode ser considerada um excelente modelo experimental para estudar vários eventos e propriedades celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose mediante contato com tais carotenoides.

1.6 Licopeno

O licopeno (C₄₀H₅₆) pertence ao subgrupo dos carotenoides não oxigenados, é caracterizado por uma estrutura acíclica e simétrica contendo 11 ligações duplas conjugadas (Rao, 2002). Na Figura 5, uma representação da estrutura molecular do licopeno. Sua estrutura é responsável pela coloração vermelho-alaranjada de frutas e vegetais nas quais

está presente no tomate, no mamão, na goiaba vermelha, na pitanga, na melancia entre outros (Krinsky and Johnson, 2005; Rao and Rao, 2007).

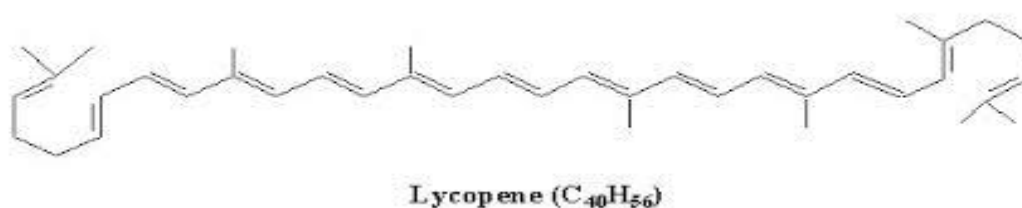


Figura 5. Molécula do licopeno

Podemos encontrar o licopeno no plasma e tecidos humanos com grande variação na sua distribuição. De todos os carotenoides, o licopeno é um dos mais abundantes no corpo humano, sendo sua alta concentração devida, principalmente, ao consumo dos alimentos (Khachik *et al.*, 2002).

Os carotenoides não são sintetizados pelo organismo humano, dessa forma eles são obtidos exclusivamente por meio da dieta alimentar. O licopeno pode ser encontrado em um número limitado de alimentos; o tomate e seus derivados são as melhores contribuições dietéticas. Quanto mais avermelhado for o alimento, maior foi sua concentração de licopeno. A absorção do licopeno é maior quando o alimento em questão é cozido, pois o rompimento das paredes celulares facilita o contato deste com a mucosa intestinal (Bramley, 2000).

Atualmente vários estudos vêm demonstrando uma relação inversa entre o consumo de alimentos fontes de licopeno e risco de câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (Khachik *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2012; Teodoro *et al.*, 2012; Friedman, 2013). Estas propriedades estão diretamente correlacionadas com efeitos antioxidantes, anti-

inflamatórias e anticancerígenas (Astley *et al.*, 2004; Ciccone *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2015).

Considerando suas propriedades antioxidantes, o licopeno pode ser visto como um potente sequestrador do oxigênio, comparativamente mais potente que a maior parte dos outros carotenoides plasmáticos, sendo duas vezes mais potente que o β -caroteno para neutralizar a ação do oxigênio (Di Mascio *et al.*, 1989). Além de proteger contra danos oxidativos, o licopeno pode estimular várias funções celulares do sistema imunológico (Rodrigues *et al.*, 2012).

Alguns autores sugerem que a alternância de ligações duplas e simples presentes na estrutura deste carotenoide gera o deslocamento dos elétrons sobre toda a cadeia poliênica, ocasionando uma alta reatividade química e absorção de luz. O licopeno pode sofrer isomerização geométrica e oxidação devido a sua estrutura, acarretando perda do poder corante e diminuição da atividade antioxidante (Shi and Le Maguer, 2000). Contudo, a oxidação ou quebra da cadeia ocorre em condições extremas de temperatura ou na presença de enzimas, de oxigênio singlete, de radicais livres ou alta concentração de oxigênio (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Existem alguns fatores que podem interferir na biodisponibilidade dos carotenoides, como a forma isomérica do licopeno, quantidade e tipo de gordura dietética, processamento de alimentos fontes, entre outros. Às formas isoméricas do licopeno está diretamente ligada a sua biodisponibilidade, sendo o calor responsável por uma das modificações da sua forma isomérica (Bramley, 2000).

O aproveitamento pelo organismo irá depender da estrutura e a propriedade física e química do licopeno presente nos alimentos (Richelle *et al.*, 2010). Apesar do licopeno estar presente nos alimentos, em sua maioria, na forma de trans-isômero (80% a 97%), parecem

ser os *cis*-isômeros a forma melhor absorvida no corpo humano, devido ao seu comprimento reduzido e sua melhor solubilidade nas micelas. O pH ácido do estômago parece contribuir, em pequena parte, na transformação de *all-trans* para *cis*-isômeros de licopeno. Além disso, os isômeros lineares *all-trans* podem, agregar-se dentro do intestino e formar cristais, reduzindo grandemente sua absorção pelas micelas (Boileau *et al.*, 1999).

O licopeno possui atividade estimuladora em linfócitos provenientes das placas de Peyer (tecidos linfoides associados ao intestino delgado), aumentando a produção de IL-2 e interferon-gama (INF- δ) após tratamento com concanavalina-A, um potente ativador de linfócitos T (Yamaguchi *et al.*, 2010). Em linfócitos B, pouco se sabe como o licopeno influencia nos processos de ativação, proliferação e diferenciação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (anticorpos). Sabe-se que dietas enriquecidas em licopeno e outros carotenoides resultam em um aumento de linfócitos B e elevados níveis de IgG sérica após 7 dias de tratamento, sugerindo que a suplementação alimentar baseada em carotenoides pode aumentar a produção de linfócitos B e a concentração de imunoglobulinas circulantes (Garcia *et al.*, 2003).

Neste trabalho, nós trataremos células obtidas de medula óssea com diferentes concentrações de licopeno e analisaremos a celularidade, o fenótipo e as classes de imunoglobulinas sintetizadas, incluindo IgM e IgA,. De acordo com os resultados preliminares, estamos propondo uma nova função para o licopeno como molécula imunomoduladora, interferindo com a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e na produção de anticorpos. Vale ressaltar que este trabalho faz parte de um projeto de médio/longo prazo que visa identificar alimentos que promovam de forma eficiente a produção de anticorpos, com o intuito de aumentar a eficiência das vacinas através de suplementação alimentar durante campanhas de vacinação. Neste sentido, o licopeno, bem

como outros alimentos funcionais, pode ser estudado como possível adjuvante natural envolvido com a diferenciação dos linfócitos B.

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral:

- Avaliar a ação do licopeno na diferenciação dos linfócitos B em camundongos adultos.

2.2 - Específicos:

- Estabelecer a concentração ótima de licopeno para o cultivo de células hematopoiéticas derivadas da medula óssea;
- Quantificar linfócitos B após o tratamento com licopeno através da citometria de fluxo;
- Analisar a ação do licopeno na proliferação e/ou na sobrevivência dos linfócitos B;
- Investigar se o licopeno modifica a morfologia dos linfócitos por microscopia óptica.
- Monitorar a síntese de imunoglobulinas (anticorpos) por citometria de fluxo (expressão de IgM, IgA, e ELISA (detecção de anticorpos solúveis) após estimulação com licopeno *in vitro* e *in vivo*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos Balb/C machos com idade entre 2 e 4 meses foram obtidos das colônias mantidas na Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil). As manipulações nestes animais foram realizadas de acordo com as normas institucionais específicas para o uso e cuidado de animais de laboratório (protocolo aprovado: DAHEICB 009, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). Na idade experimental, os animais foram sacrificados numa câmara CO₂ apropriada durante 10 segundos. Após banho em solução alcoólica (etanol 70%), foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos necessários para os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Suspensões celulares da medula óssea

Células totais da medula óssea foram obtidas através do “flushing” da cavidade femoral de camundongos Balb/C. Nesta técnica, deve ser feito um movimento de expulsão das células da cavidade óssea com auxílio de agulha e seringa contendo meio de cultura (RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGC, São Paulo, Brasil). As células foram quantificadas por câmara de Neubauer e a celularidade definida na unidade “células/mL”. Quando presentes, as hemácias foram lisadas com uma solução hipotônica: ACK (cloreto de amônio/potássio).

3.3 Licopeno

Para cada experimento, todas as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células em 2 mL de meio de cultura em placas de 6 poços. Licopeno *all-trans* WS (water soluble) 10% fornecido pela Roche (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) dissolvido em água a 50°C foi adicionado aos poços de cultura nas concentrações 5uM e 10uM. Após 5 dias de tratamento com as diferentes concentrações de licopeno, as culturas de células foram analisadas quanto a celularidade, fenótipo, morfologia, ciclo celular, apoptose e imunoglobulinas secretadas. Células não tratadas com licopeno foram consideradas controles experimentais.

3.4 Citometria de fluxo: fenotipagem

Aproximadamente 1×10^6 células cultivadas nas condições supracitadas foram preparadas para citometria de fluxo. Para garantir especificidade dos anticorpos, os receptores Fc presentes na membrana de algumas células de origem hematopoiética devem ser previamente saturados com a fração Fc de IgG. Esta molécula é secretada pelo clone celular 2.4G2, obtido no Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células cultivadas a serem investigadas devem ser incubadas por 10 minutos com o sobrenadante desta linhagem celular, antes de serem marcadas com os anticorpos associados aos fluorocromos. Após centrifugar por 10 minutos a 1200 RPM (260 G), as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais por 30 minutos. Anticorpos não ligados são retirados do sistema após lavagem/centrifugação em PBS. Os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados: anti-Sca-1, anti-Mac-1, anti-IgG, anti-IgE e anti-IgM marcados com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína); anti-CD34, anti-CD19 e anti-IgA marcados com PE (Ficoeritrina); anti-Gr-1 e anti-B220 marcados com PE Cy5.5; anti-B220,

anti-IgD e anti-c-Kit (todos da BD Bioscience, CA, USA). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience) através do programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.9.

3.5 Citometria de fluxo: avaliação de apoptose

O tratamento com licopeno pode variar a quantidade de células hematopoiéticas cultivadas *in vitro*. Para monitorar os efeitos das diferentes concentrações do licopeno na sobrevivência das células cultivadas, as amostras foram incubadas com anexina-V FITC e iodeto de propídio durante 15 minutos, conforme recomendação do fabricante (BD Bioscience), com o intuito de identificar células em apoptose inicial (Anexina-V⁺ PI⁻), apoptose terminal (Anexina-V⁺ PI⁺) ou morte celular não-apoptótica (Anexina-V⁻ PI⁺). As células viáveis são dupla-negativas (Anexina-V⁻ PI⁻). Os controles experimentais foram as células cultivadas apenas com meio de cultura (Soares *et al.*, 2013). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience) através do programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.9.

3.6 Morfologia: citocentrifugado e microscopia óptica

As suspensões celulares devem ser ajustadas para 1.0×10^5 células/ml. Desta suspensão, cada 200uL foram centrifugados a 36 G (aproximadamente 300 RPM) durante 3 min. Posteriormente, o material deverá ser fixado em metanol por 24h. Depois de fixadas, as amostras foram coradas pelo método May-Grunwald & Giemsa (el-Cheikh and Borojevic, 1990). Identificando as principais características histológicas, uma contagem diferencial dos tipos celulares deve ser realizada utilizando objetiva de imersão em microscópio óptico. Um

total de 300 células por lâminas devera ser contado e os valores expressos na forma percentual.

3.7 Imunocitoquímica

Para detecção de plasmócitos na cultura de células da medula óssea, foi realizado um citotrifugado na concentração de 1.0×10^5 células/ml em lâminas revestidas com poli-L-lisina. As amostras foram fixadas durante 30 minutos em metanol à temperatura ambiente. Anticorpos anti-CD138 purificados (BD Bioscience) foram utilizados como primários, que reagem com anticorpos secundários anti-IgG de rato (BD Bioscience). A etapa de permeabilização não foi necessária porque CD138 é uma proteína preferencialmente detectada na membrana celular. Após marcações com anticorpos, as amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e reveladas por peroxidase. As imagens foram adquiridas por microscopia óptica através de uma câmera digital (5.0 MP Evolução RTVColor-Media Cybernetics, Canadá).

3.8 Suplementação de licopeno in vivo

Os camundongos foram separados em quatro grupos de 5 animais em cada. Os animais tratados foram suplementados, durante 2 semanas, por gavagem oral de extrato de tomate ou injeção intraperitoneal de licopeno purificado. O controle recebeu apenas o veículo (água). Na tabela 2, um resumo dos procedimentos.

Tabela 2: esquematização da suplementação *in vivo*.

	Controle	Tratado
Oral (n = 5)	0,3 ml de água morna	0,65g de extrato de tomate em 0,3 ml de água morna
Intraperitoneal (n = 5)	0,3 ml de água morna	0,2 mg de licopeno purificado + 0,3 ml de água morna

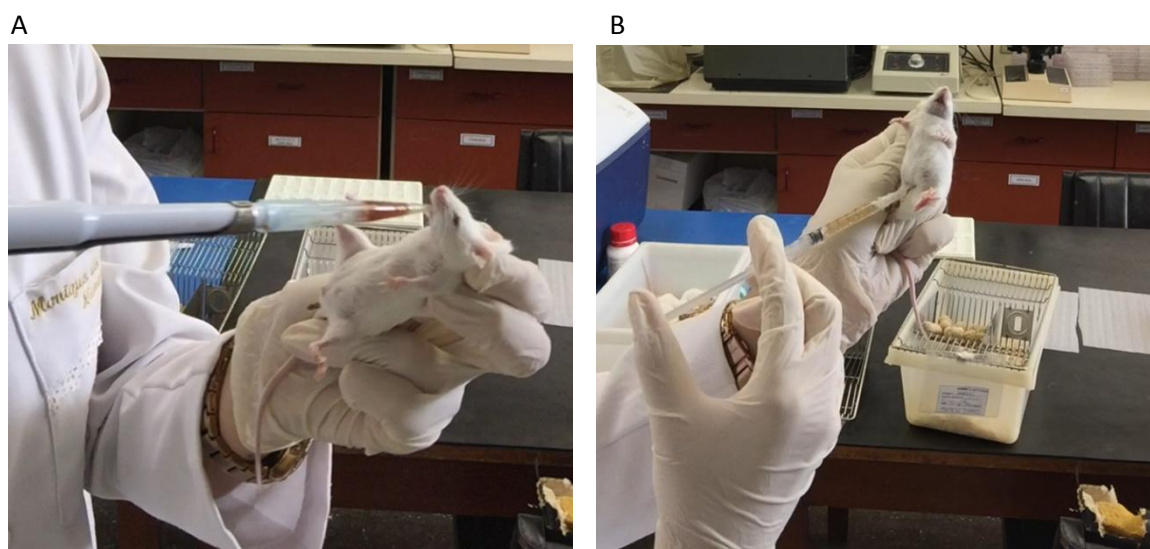


Figura 6. Suplementação *in vivo*. (A) Via oral, 0,3mL de extrato de tomate diluído em água morna. (B) Injeção intraperitoneal, 0,3 mL de licopeno purificado diluído em água morna. n=5 animais por grupo. Controles suplementados com água apenas, seguindo as respectivas vias de administração.

3.9 ELISA: dosagem de imunoglobulinas

Após o período de incubação com as diferentes concentrações de licopeno, as suspensões celulares foram centrifugadas e fase líquida (sobrenadante) deveria ser analisada. As imunoglobulinas IgM e IgA foram quantificadas de forma individual (por placa de cultura). Resumidamente, as placas contendo as células (Corning, NY, USA) foram pré-tratadas anticorpos monoclonais de captura (R35-72, BD Bioscience) diluídos em PBS. A presença de imunoglobulinas foi mensurada pela adição de anti-Ig biotinilada, que foi dosada pela reação com fosfatase alcalina conjugada com biotina (R35-92, BD Bioscience).

As interações entre os anticorpos devem ser determinada pela adição de p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, USA). As amostras foram adquiridas em um leitor de placas de ELISA (BioRad, Boston, USA) usando um filtro de 405nm.

3.10 Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram representados como médias de três experimentos independentes, totalizando 9 animais. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey, através do programa (software) EXCEL. Quando os valores de p forem menores que 0.05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da celularidade, morfologia e fenotipagem das células

hematopoiéticas estimuladas com licopeno

Células hematopoiéticas da medula óssea foram isoladas da medula óssea e submetidas a duas concentrações de licopeno *in vitro*: 5 μ M e 10 μ M. Em relação ao grupo controle (apenas meio de cultura), houve um aumento de aproximadamente 3 vezes no número de células hematopoiéticas cultivadas em meio suplementado com 5 μ M de licopeno, após 5 dias de cultivo. A concentração de 10 μ M de licopeno não modificou a celularidade em relação ao grupo controle (Figura 7).

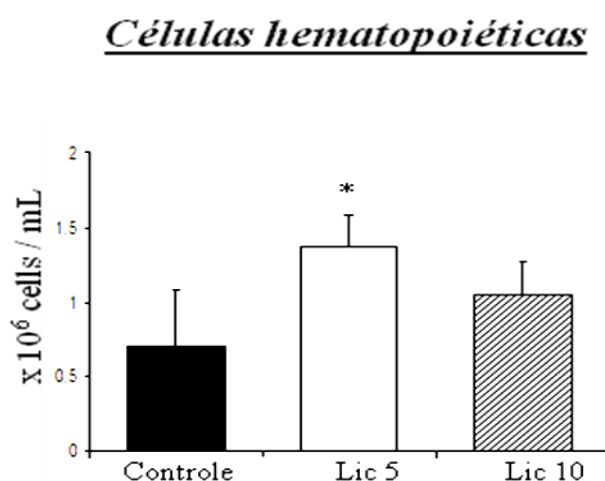


Figura 7: Número de leucócitos derivados da medula óssea cultivados na presença de licopeno. Após 5 dias de cultivo, o licopeno induziu um aumento na celularidade medular. Controle = meio de cultura apenas. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, respectivamente). n = 5 animais. * indica p<0.05.

As células não-aderentes foram recolhidas, citocentrifugadas e coradas para posterior análise por microscopia óptica, na tentativa de identificar os possíveis tipos celulares alterados na suplementação com licopeno. As células do grupo controle apresentaram uma morfologia típica de medula óssea, com predomínio de células mieloides principalmente

granulócitos com núcleo segmentado (Figura 8A). Células cultivadas na presença de licopeno, na concentração de 5 μ M, foram predominantemente mononucleares, embora alguns granulócitos também tenham sido detectados (Figura 8B). Quando cultivadas na concentração de 10 μ M de licopeno, o perfil morfológico das células foi semelhante ao grupo tratado com licopeno 5 μ M, ou seja, maior quantidade de células mononucleares em detrimento aos granulócitos (Figura 8C).

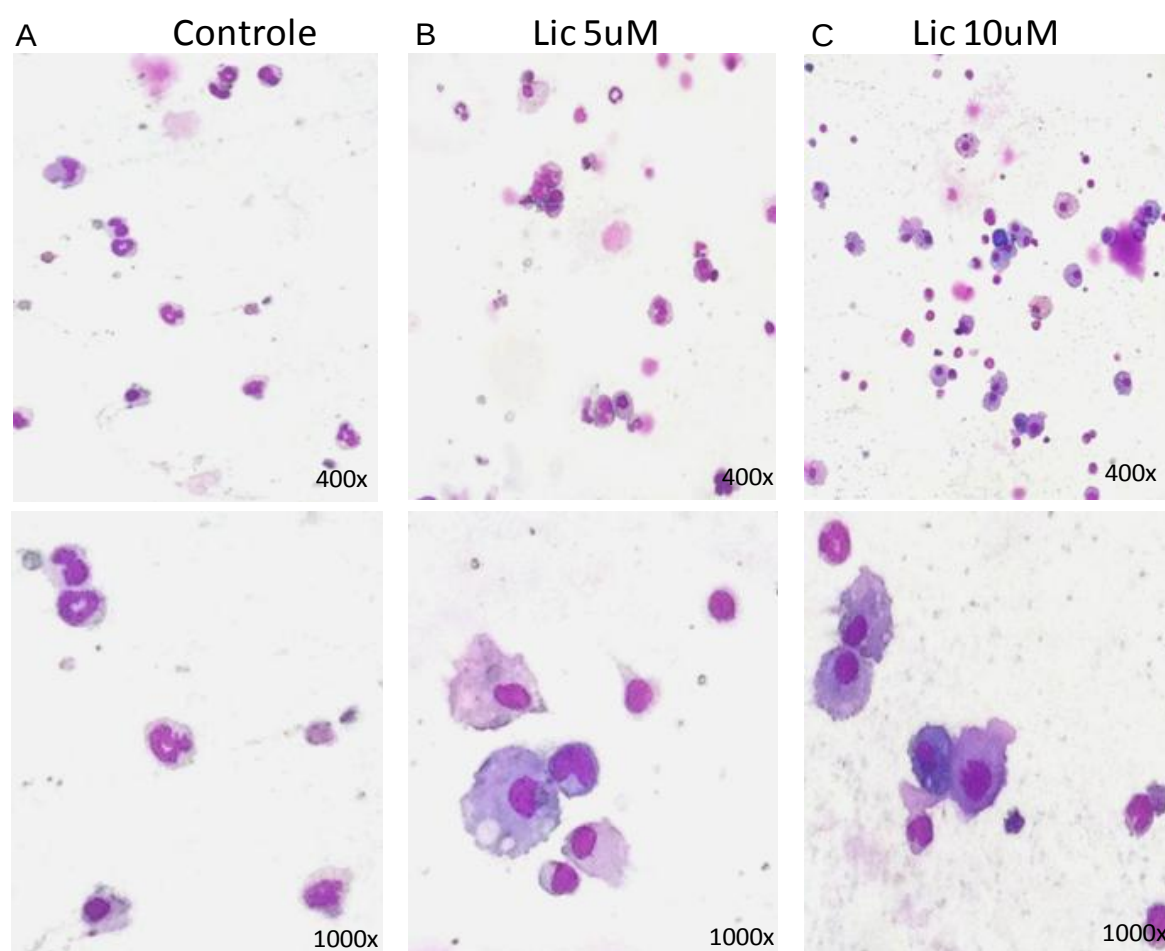


Figura 8. Morfologia das células hematopoiéticas cultivadas na presença de licopeno. As células foram analisadas por microscopia óptica. (A) Grupo controle composto por células cultivadas em meio de cultura apenas. (B) Grupo Lic 5 μ M formado por células cultivadas em meio de cultura suplementado com 5 μ M de licopeno. (C) Grupo Lic 10 μ M formado por células cultivadas em meio de cultura suplementado com 10 μ M de licopeno. n = 5 animais. * indica $p < 0.05$.

Investigando subpopulações de células hematopoiéticas numericamente alteradas pela suplementação com licopeno, análises fenotípicas foram realizadas por citometria de fluxo. Após 5 dias de cultivo na presença de 5 μ M e 10 μ M de licopeno, o número de células mieloides CD11b⁺B220⁻ não apresentou alterações significativas (Figura 9).

Células mieloides CD11b⁺ B220⁻

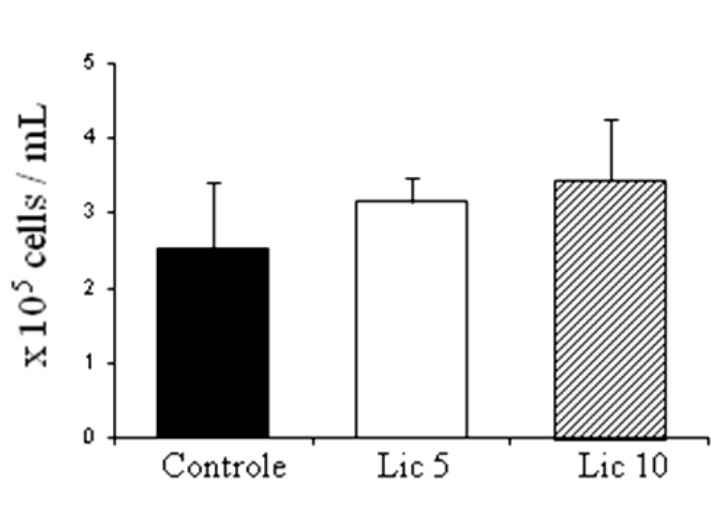


Figura 9: Células CD11b⁺B220⁻ derivadas da medula óssea não responderam à suplementação com licopeno nas concentrações de 5 e 10 μ M. Após 5 dias de cultivo, o licopeno não modificou a quantidade de células hematopoiéticas derivadas da medula óssea *in vitro*. Controle = meio de cultura apenas. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, respectivamente). n = 5 animais. * indica p<0.05.

Quando os linfócitos T foram analisados quanto à expressão de CD4 e CD8, foi observado que o licopeno estimulou um aumento na quantidade de linfócitos T CD4⁺ (Figura 10A), mas não interferiu com a população de linfócitos T CD8⁺ (Figura 10B).

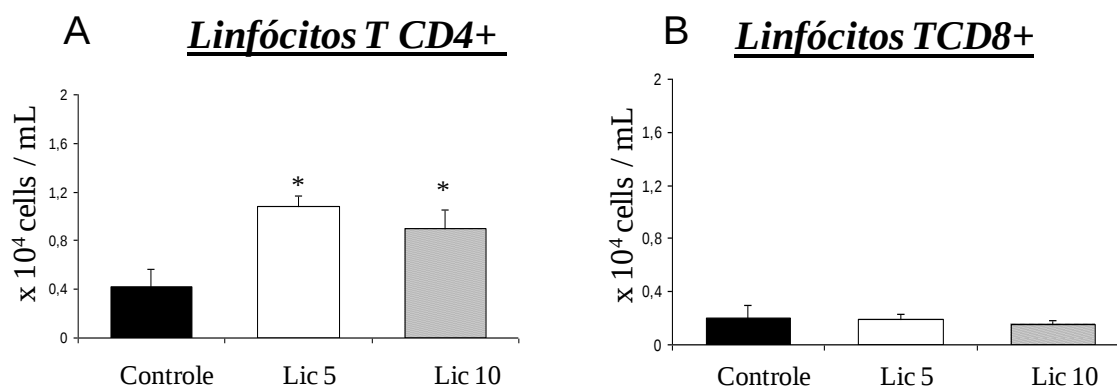


Figura 10: Células TCD4⁺ e TCD8⁺ induzidas por licopeno nas concentrações de 5 e 10 μ M.(A) O licopeno induziu um aumento na população de células T CD4⁺ derivadas da medula óssea após 5 dias de tratamento *in vitro*. (B) O licopeno não interferiu com a população de células T CD8⁺ derivadas da medula óssea. Controle = meio de cultura apenas. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, respectivamente). n = 5 animais. * indica p<0.05.

A população de linfócitos B da medula óssea foi a mais afetada pela suplementação de diferentes concentrações de licopeno na cultura das células hematopoiéticas. Estas células foram quantificadas de acordo com a expressão de B220 na membrana e com a complexidade citoplasmática (Figura 11A). Quando quantificadas, pode-se observar que havia aproximadamente duas vezes mais células B220⁺ nas culturas de células hematopoiéticas da medula óssea suplementadas com licopeno, após 5 dias de cultivo, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M (Figura 11B).

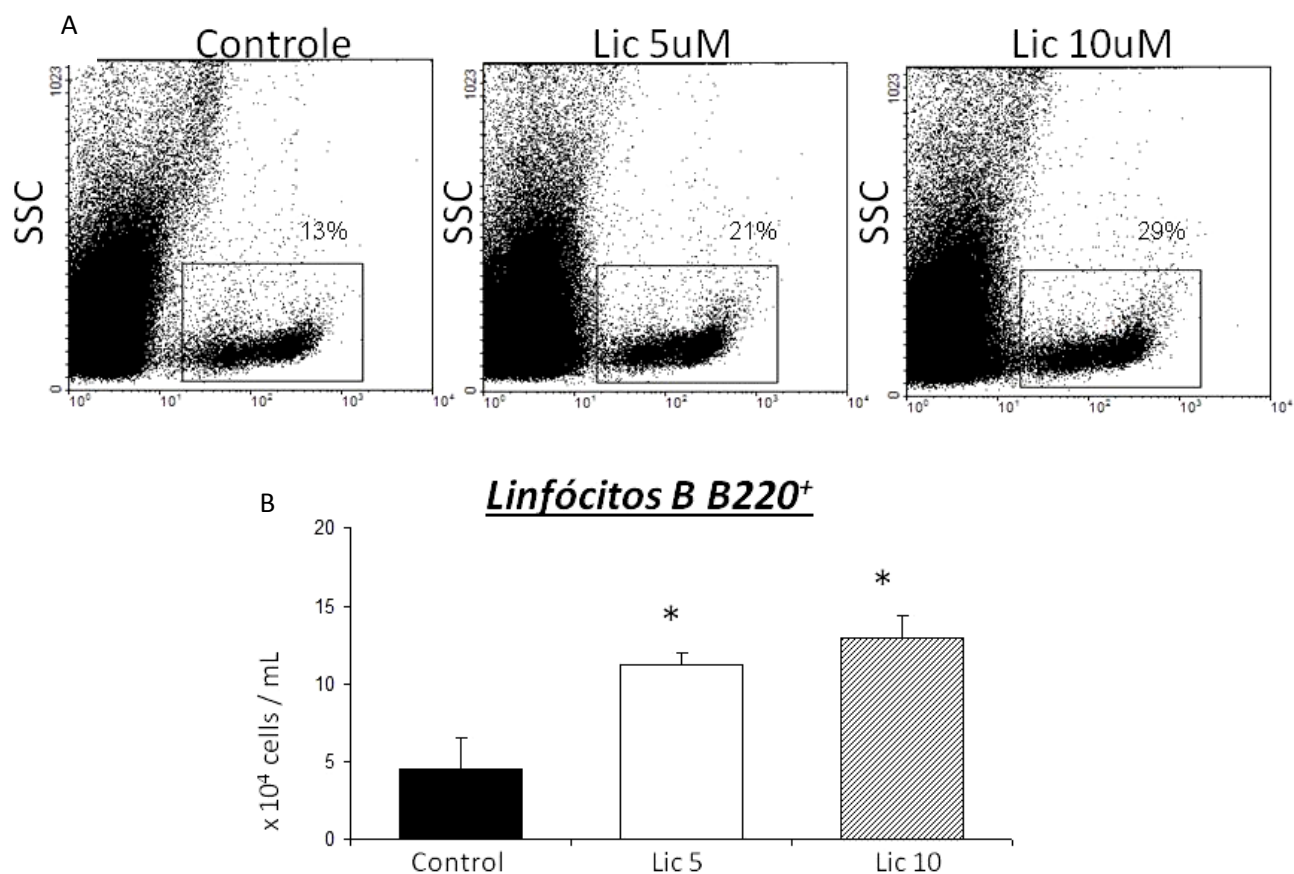


Figura 11. Quantificação de linfócitos B220⁺ após tratamento com 5 e 10 μ M de licopeno. (A) Gráfico de pontos representativos de amostras adquiridas em citômetro de fluxo demonstrando células B220⁺ com baixo sinal SSC (*side scatter*, avaliação de complexidade citoplasmática por citometria de fluxo) selecionadas nos quadrantes e seus respectivos valores percentuais associados. (B) Valores absolutos indicando que o tratamento com licopeno favoreceu o aumento da população de linfócitos B. Controle = meio de cultura apenas. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5uM e 10uM, respectivamente). n = 5 animais. * indica p<0.05.

4.2 Licopeno interfere com a linfopoiese B *in vitro*

Avaliando as subpopulações de linfócitos B, pode-se observar que o percentual das células B mais primitivas ($B220^{Low}IgM^{-}$) aumentou significativamente de aproximadamente 19% na condição controle para próximo de 31% após 5 dias de tratamento com 5 μ M e 10 μ M de licopeno (Figura 12). Já a subpopulação de células $B220^{high}IgM^{-}$, que inclui células progenitoras mais diferenciadas que as células $B220^{Low}IgM^{-}$, estavam reduzidas em termos percentuais quando tratadas com licopeno. Este percentual variou de 51% no grupo controle para 37% e 26% nas condições de suplementação com 5 μ M e 10 μ M respectivamente. As células mais maduras, caracterizadas pelo fenótipo $B220^{+}IgM^{+}$, apresentaram um aumento percentual significativo apenas quando suplementadas com 10 μ M de licopeno, variando de 29% no grupo controle para 41% no grupo induzido com licopeno (Figura 12).

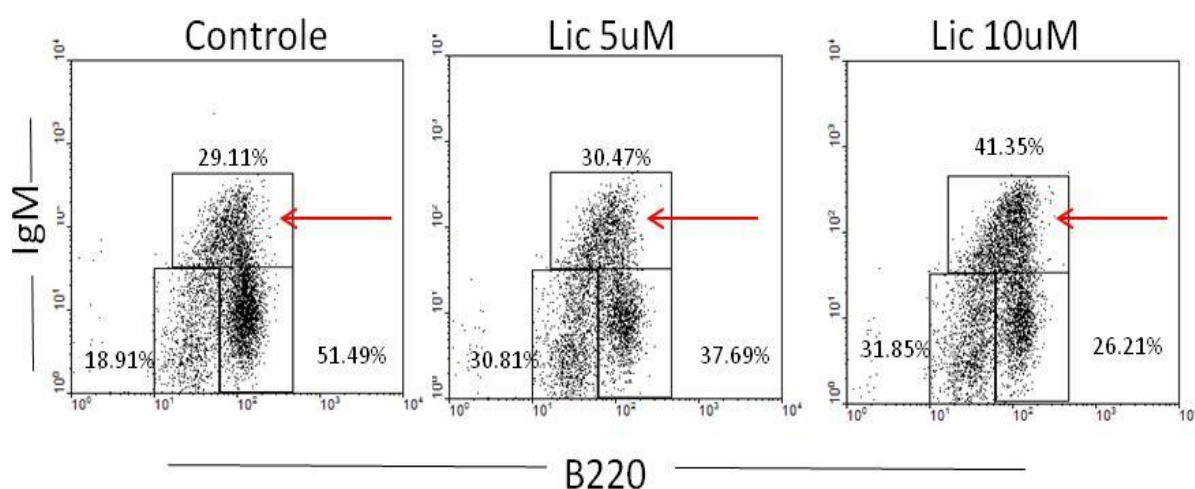


Figura 12. Efeitos da suplementação com licopeno na diferenciação de linfócitos B derivados da medula óssea *in vitro*. Após 5 dias de tratamento com licopeno, foi observado um aumento percentual nas populações primitivas ($B220^{low}IgM^{-}$) e maduras ($B220^{+}IgM^{+}$). Controle = meio de cultura apenas. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, respectivamente). n = 5 animais. Os gráficos de pontos são representativos de cada grupo experimental.

Considerando que o tratamento com licopeno *in vitro* alterou significativamente a celularidade das culturas na concentração de 5 μ M e promoveu uma modificação no perfil da distribuição das subpopulações em termos percentuais, foi necessário quantificar em valores

absolutos estas subpopulações de linfócitos B, amplamente modificadas pelo licopeno. O licopeno teve um efeito indutor em todos os compartimentos de linfócitos B. Os progenitores $B220^{+}/LowCD19^{-}IgM^{-}$ estavam significativamente aumentados em aproximadamente 3 vezes quando estimulados com licopeno e comparados com o grupo controle (Figura 13A). Os progenitores $B220^{+}CD19^{-}IgM^{-}$ aumentaram significativamente quando cultivados em meio suplementado com 5 μ M de licopeno (Figura 13B). Já as células B maduras $B220^{+}CD19^{+}IgM^{+}$ estavam numericamente aumentadas nas duas condições de cultivo celular suplementadas com licopeno (Figura 13C).

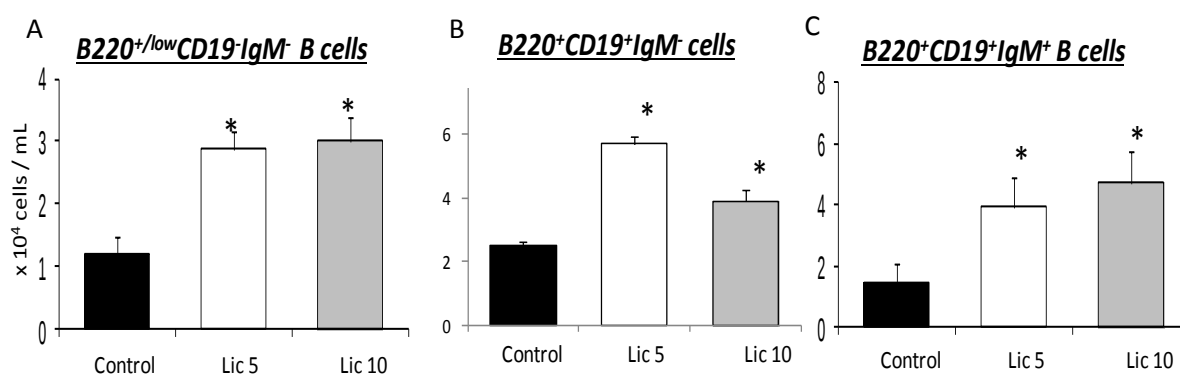


Figura 13. Ação do licopeno na diferenciação de linfócitos B. (A) Progenitores caracterizados pelo fenótipo $B220^{+}/LowCD19^{-}IgM^{-}$. (B) Progenitores mais diferenciados definidos fenotipicamente como $B220^{+}CD19^{-}IgM^{-}$. (C) Linfócitos B maduros caracterizados como $B220^{+}CD19^{+}IgM^{+}$ aptos a saírem da medula óssea em condições normais. Controle = meio de cultura apenas, barra preta. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, barras branca e cinza, respectivamente). n = 5 animais. * indica $p < 0.05$.

O aumento numérico dos linfócitos B maduros $B220^{+}CD19^{+}IgM^{+}$ sugeriu que o licopeno estava induzindo a diferenciação dos linfócitos B *in vitro*. A proteína CD138 (Sindecin-1) tem sido amplamente utilizada como um importante marcador de diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, células secretoras de imunoglobulinas (Shapiro-Shelef *et al.*, 2005).

Por citometria de fluxo, foi observado que as células $B220^{+}IgM^{+}CD138^{+}$ estavam aumentadas nas culturas suplementadas com licopeno, indicando que as duas concentrações de licopeno testadas favoreceram a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos $CD138^{+}$ (Figura 14).

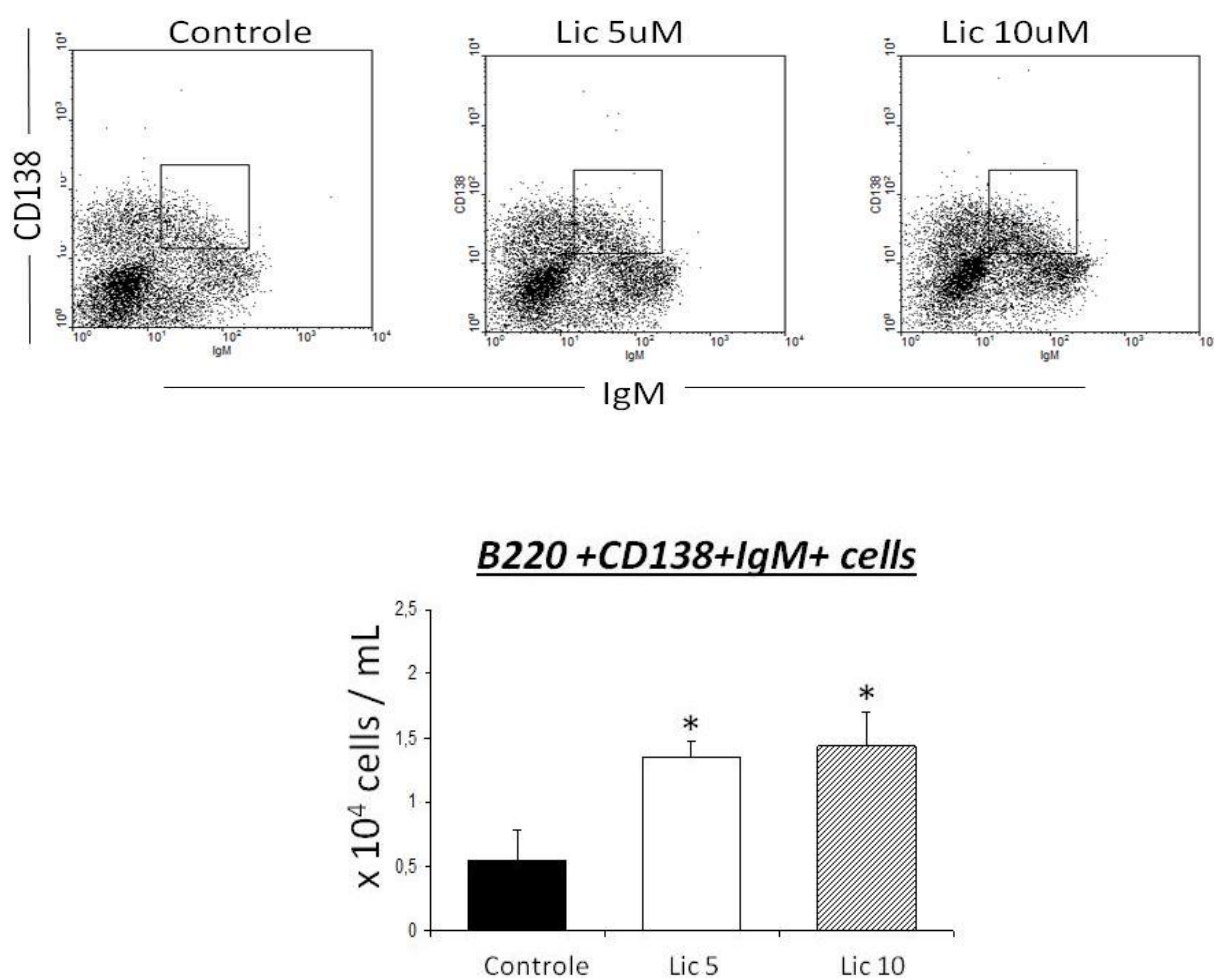


Figura 14. Efeito do licopeno na diferenciação de linfócitos $B220^{+}$ em plasmócitos $CD138^{+}$. Os gráficos de pontos destacam as células duplamente marcadas para IgM e CD138 nas condições controle e suplementação com licopeno. Os gráficos de barras indicam os números absolutos das células B diferenciando em plasmócitos. Controle = meio de cultura apenas, barra preta. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5uM e 10uM, barras branca e cinza, respectivamente). n = 5 animais. * indica $p < 0.05$.

Para comprovar a presença de plasmócitos no cultivo com licopeno, foi realizado um ensaio de imunocitoquímica para detecção de células positivas para CD138 e posterior análise morfológica. As células marcadas, ou seja, positivas para CD138, apresentaram uma morfologia compatível com plasmócitos (Figura 15). Estas células são ovais e possuem uma relação núcleo/citoplasma menor que linfócitos, pois o citoplasma destas células é significativamente maior. No grupo controle (Figura 15A), raríssimas células marcadas foram observadas. Já nas células cultivadas em meio contendo licopeno (5 μ M), algumas destas células estavam nitidamente marcadas, confirmando a presença de plasmócitos CD138⁺ (Figura 15B).

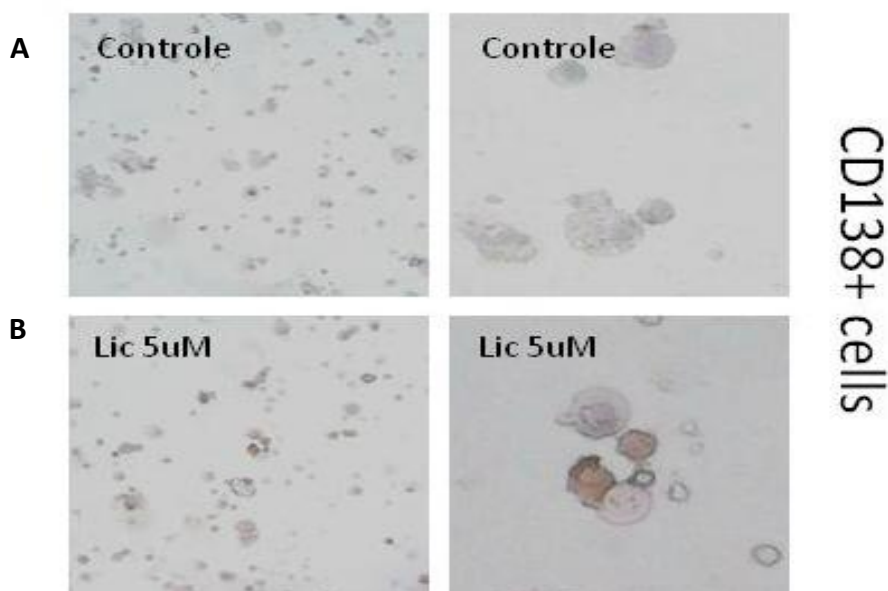


Figura 15. Detecção de plasmócitos nas culturas de células hematopoiéticas estimuladas com licopeno. (A) No grupo controle, raríssimas células marcadas foram detectadas. Aumento de 100x e 400x, respectivamente. (B) Células CD138⁺ marcadas nas culturas suplementadas com 5 μ M de licopeno. Aumento de 100x e 400x, respectivamente. Dados representativos de 5 animais.

4.3 Análise da ação do licopeno na sobrevivência das células hematopoiéticas

Os resultados obtidos indicam que o licopeno está favorecendo a linfopoiese B. Subpopulações de progenitores de linfócitos B, células maduras IgM⁺ e células terminalmente diferenciadas CD138⁺ estão numericamente aumentadas 5 dias após a indução com licopeno. Considerando a maior celularidade em relação aos respectivos grupos controles, o licopeno poderia estar interferindo com o processo de morte celular. Para avaliar o quanto licopeno interfere com a sobrevivência das subpopulações estudadas, as células hematopoiéticas, nas mesmas condições de cultivo, foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídio (PI) para análise de apoptose por citometria de fluxo.

Células hematopoiéticas cultivadas em meio de cultura suplementado com 5 μ M e 10 μ M de licopeno apresentaram percentuais de apoptose semelhantes aos respectivos controles. Após 5 dias de cultivo, aproximadamente 14.1% das células do grupo controle foram duplamente positivas para anexina-V e PI, enquanto as células tratadas com licopeno na concentração de 5 μ M e 10 μ M de licopeno apresentaram percentuais de apoptose equivalentes a 14.6% e 18.9% (Figura 16).

O licopeno, no entanto, foi ligeiramente tóxico para as células hematopoiéticas. Células anexina-V⁺ porém negativas para o PI, que representam células em apoptose inicial, apresentaram percentual semelhante quando comparados os grupos controle e tratados com licopeno 5 μ M (11.8% e 13.2%, respectivamente). Aproximadamente 18.2% das células hematopoiéticas cultivadas em meio suplementado com licopeno 10 μ M apresentaram o fenótipo anexina-V⁺ PI⁺, sendo este percentual estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle (Figura 16). Portanto, somando as populações celulares anexina-V⁺ (PI⁺ ou PI⁻), torna-se evidente que as células cultivadas em meio de cultura apenas e suplementado com 5 μ M de licopeno apresentaram percentuais similares de células

apoptóticas (29.9% e 27.8%, respectivamente). Já as células cultivadas em meio suplementado com licopeno 10 μ M, a soma das populações celulares anexina-V⁺ chegou a 37.1% do total cultivado (Figura 16). Portanto, o licopeno na concentração de 10 μ M parece ligeiramente tóxico quando comparado aos grupos controles e 5 μ M.

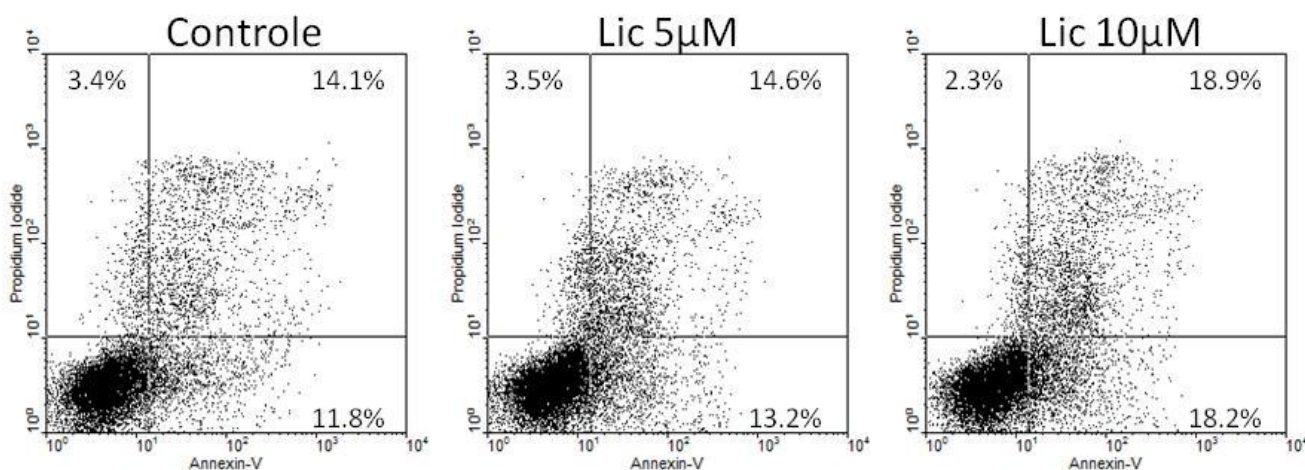


Figura 16. Monitoramento de morte celular por citometria de fluxo. Células anexina⁻ PI⁻ (quadrante inferior esquerdo) são consideradas viáveis, células anexina⁺ PI⁻ (quadrante inferior direito) estão em apoptose inicial, células anexina⁺ PI⁺ (quadrante superior direito) estão em apoptose tardia, e células anexina⁻ PI⁺ (quadrante superior esquerdo) estão mortas por mecanismos diferentes de apoptose. Controle = meio de cultura apenas, barra preta. Lic 5 e Lic 10 = concentrações utilizadas de licopeno (5 μ M e 10 μ M, respectivamente). n = 5 animais. * indica p<0.05.

Para investigar se a concentração de 5 μ M de fato não interfere com a sobrevivência das células hematopoiéticas, tais células foram induzidas a morte celular com Dexametasona nas condições de controle (apenas meio de cultivo) e meio suplementado com licopeno nesta concentração por 24h. Foi necessário este tempo máximo de experimento em razão da rápida indução à morte celular causada pela dexametasona.

Aproximadamente 10% das células cultivadas no grupo controle e com licopeno 5 μ M foram positivas para anexina-V 24h após o início da cultura. Neste mesmo tempo, a dexametasona induziu apoptose em 82% das células. O licopeno 5 μ M não interferiu com

esta indução de morte celular e aproximadamente 85% das células cultivadas foram positivas para anexina-V (Figura 17).

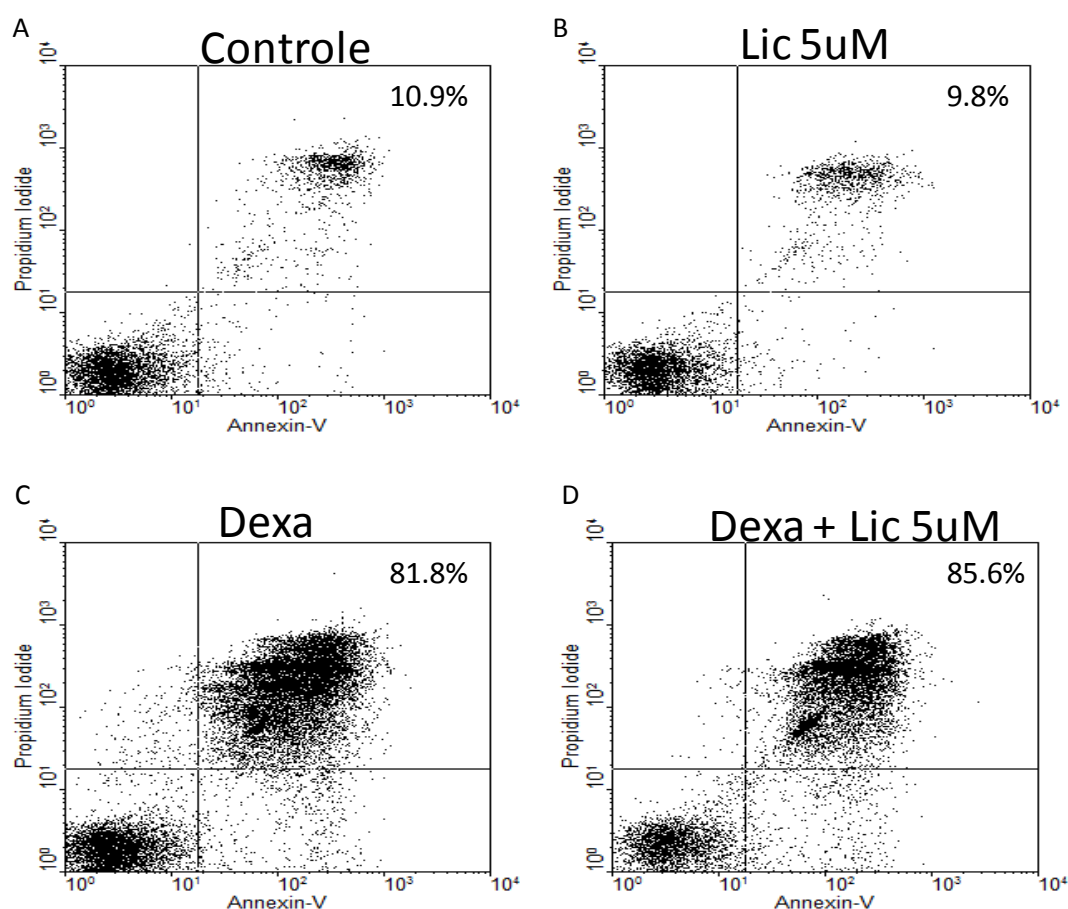


Figura 17. Efeito do licopeno na apoptose induzida por dexametasona. (A) No grupo controle, células hematopoiéticas cultivadas por 24h em meio de cultura apenas. (B) Células cultivadas em meio de cultura suplementado com 5 μ M de licopeno. (C) Células mantidas em meio de cultura e estimuladas com dexametasona. (D) Células estimuladas a apoptose com dexametasona, cultivadas em meio de cultura suplementado com 5 μ M de licopeno. Células apoptóticas são positivas para anexina-V. n = 5 animais. * indica $p < 0.05$.

Considerando que o licopeno não protege as células da medula óssea de sinais pró-apoptóticos relacionados à dexametasona e às próprias condições de cultivo, pode-se inferir que o aumento na celularidade, incluindo linfócitos B220⁺IgM⁺, foi decorrente de um estímulo à proliferação celular.

4.4 Suplementação com licopeno *in vivo* induziu a diferenciação de linfócitos B

Com a finalidade de testar os efeitos do licopeno na linfopoiese B *in vivo*, dois tratamentos foram realizados. Uma injeção diária de licopeno purificado intraperitoneal e suplementação oral, diariamente, com licopeno presente no extrato de tomate. Após 15 dias de tratamento, não houve alteração significativa do peso corpóreo entre os grupos tratados e seus respectivos controles (Tabela 3).

	Oral controle	Oral tratado	Intraperitoneal Controle	Intraperitoneal Tratado
D1 (média)	22,41g ($\pm 3,45$)	26,36g ($\pm 3,32$)	22,86g ($\pm 2,54$)	24,76g ($\pm 3,97$)
D7 (média)	23,46g ($\pm 2,98$)	21,23g ($\pm 4,15$)	24,55g ($\pm 3,11$)	24,09g ($\pm 4,21$)
D14 (média)	23,04g ($\pm 3,12$)	22,12g ($\pm 3,39$)	24,87g ($\pm 3,76$)	23,92g ($\pm 3,19$)

Tabela 3. Avaliação do parâmetro peso corpóreo após indução *in vivo* com licopeno durante 15 dias. n=5 animais por grupo experimental.

A injeção intraperitoneal diária de licopeno purificado não alterou a população total de leucócitos na medula óssea. Contudo, a suplementação de licopeno via oral induziu um aumento significativo de leucócitos na medula óssea dos animais tratados (Figura 18).

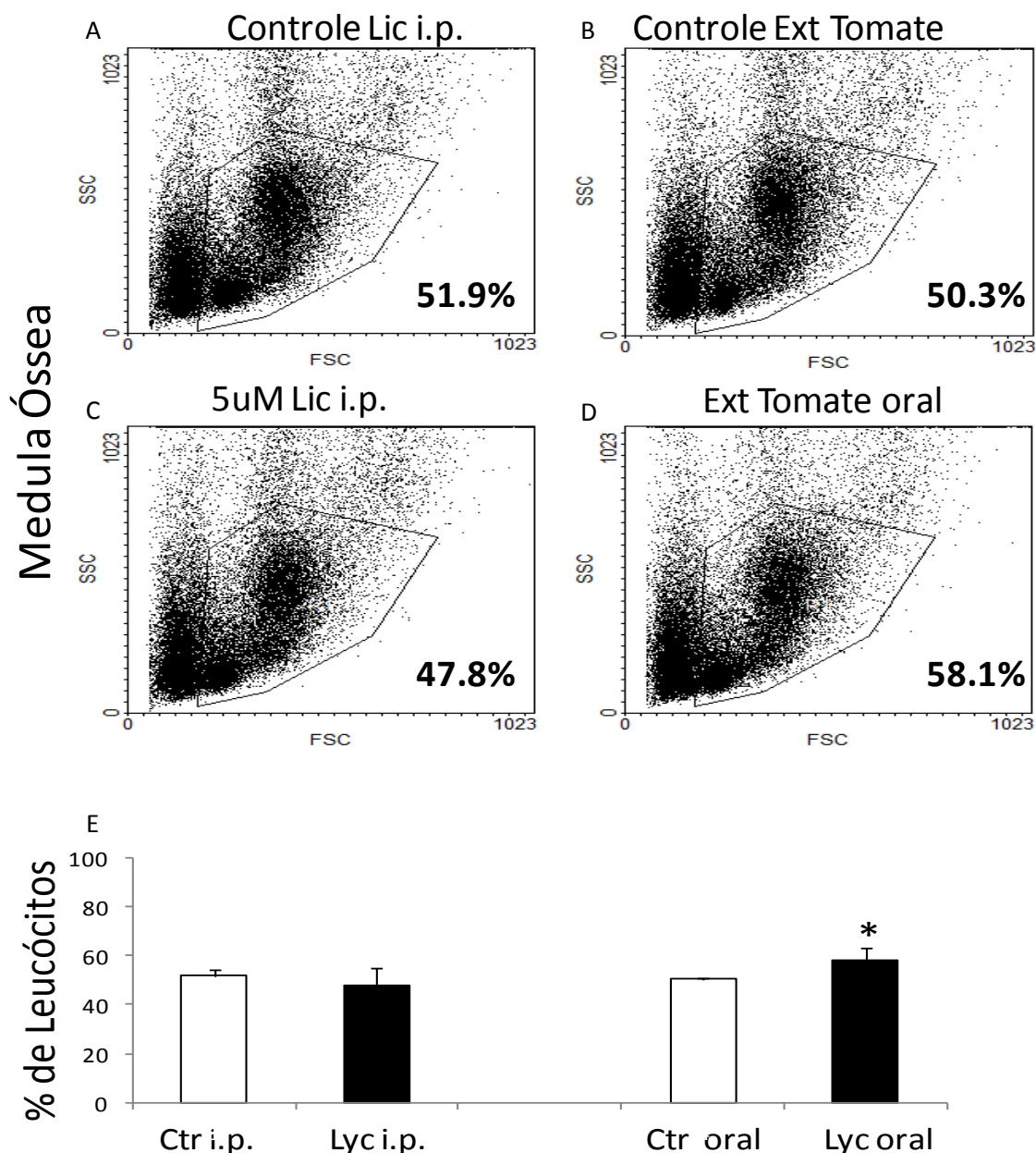


Figura 18. Celularidade na medula óssea de animais tratados com licopeno durante 15 dias. (A) Animais controles foram injetados com água na cavidade peritoneal. (B) Animais controles foram submetidos à ingestão de água. (C) Animais tratados com injeção intraperitoneal diária de licopeno na concentração final de 5 μ M de licopeno. (D) Animais submetidos à suplementação oral de licopeno inserido no extrato de tomate. (E) Gráfico de barras representando os valores percentuais observados em cada grupo de animais. n = 5 animais por grupo experimental.

As subpopulações de linfócitos B foram investigadas nestes dois grupos de animais tratados com licopeno e seus respectivos controles. Os progenitores linfoides B220⁺IgM^{Neg} estavam significativamente aumentados tanto no tratamento com licopeno purificado intraperitoneal quanto por via oral na forma de extrato de tomate (Figura 19A e 19B).

Entretanto, os linfócitos B maduros B220⁺IgM⁺ aumentaram na medula óssea dos animais tratados com licopeno purificado apenas, não variando na medula óssea dos animais tratados com extrato de tomate (Figura 19A e 19B).

Uma vez que os linfócitos B estavam aumentados nos animais tratados com licopeno, tornou-se necessário investigar se este aumento populacional era funcional. Assim, dois isotipos de imunoglobulinas, IgM e IgA, foram dosadas no soro destes animais. Estas imunoglobulinas foram testadas em razão de suas funções, relacionadas com resposta imunológica humoral sistêmica e de mucosa, respectivamente. Após 15 de tratamento, animais tratados com extrato de tomate apresentaram uma redução nos níveis de IgM no soro (Figura 20A), fato não observado nos animais tratados com licopeno purificado. Por outro lado, os animais tratados com extrato de tomate apresentaram maiores níveis de IgA no soro (Figura 20B).

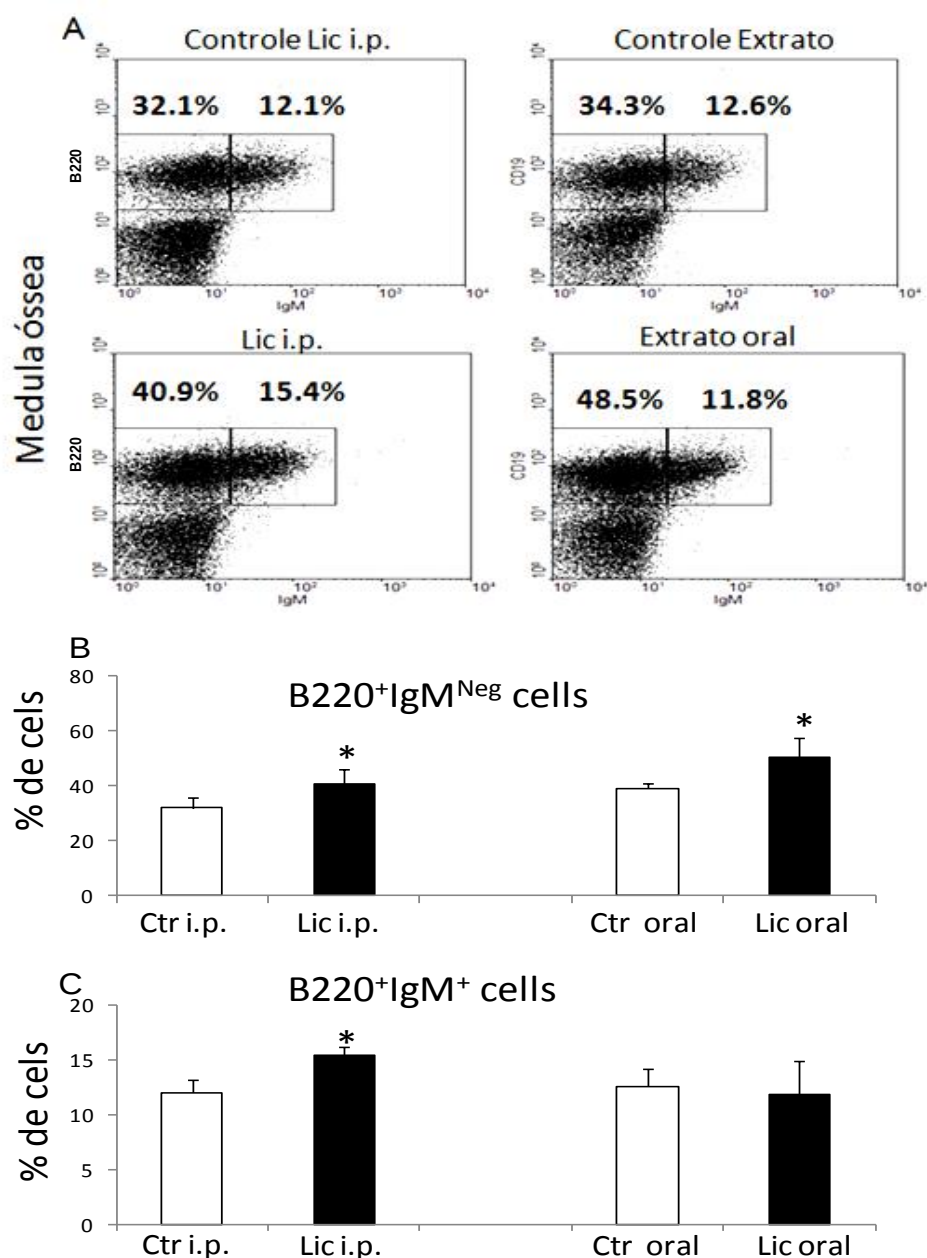


Figura 19. Análise das subpopulações de linfócitos B nos animais tratados com licopeno in vivo. (A) Gráficos de pontos obtidos por citometria de fluxo identificando progenitores de linfócitos B (B220⁺IgM^{Neg}) e linfócitos B maduros (B220⁺IgM⁺). Percentual obtido por média de 5 animais por grupo experimental. Percentual das células B progenitoras (B) e células B maduras (C) nas diferentes condições experimentais. n=5 animais por grupo. * indica p<0,05.

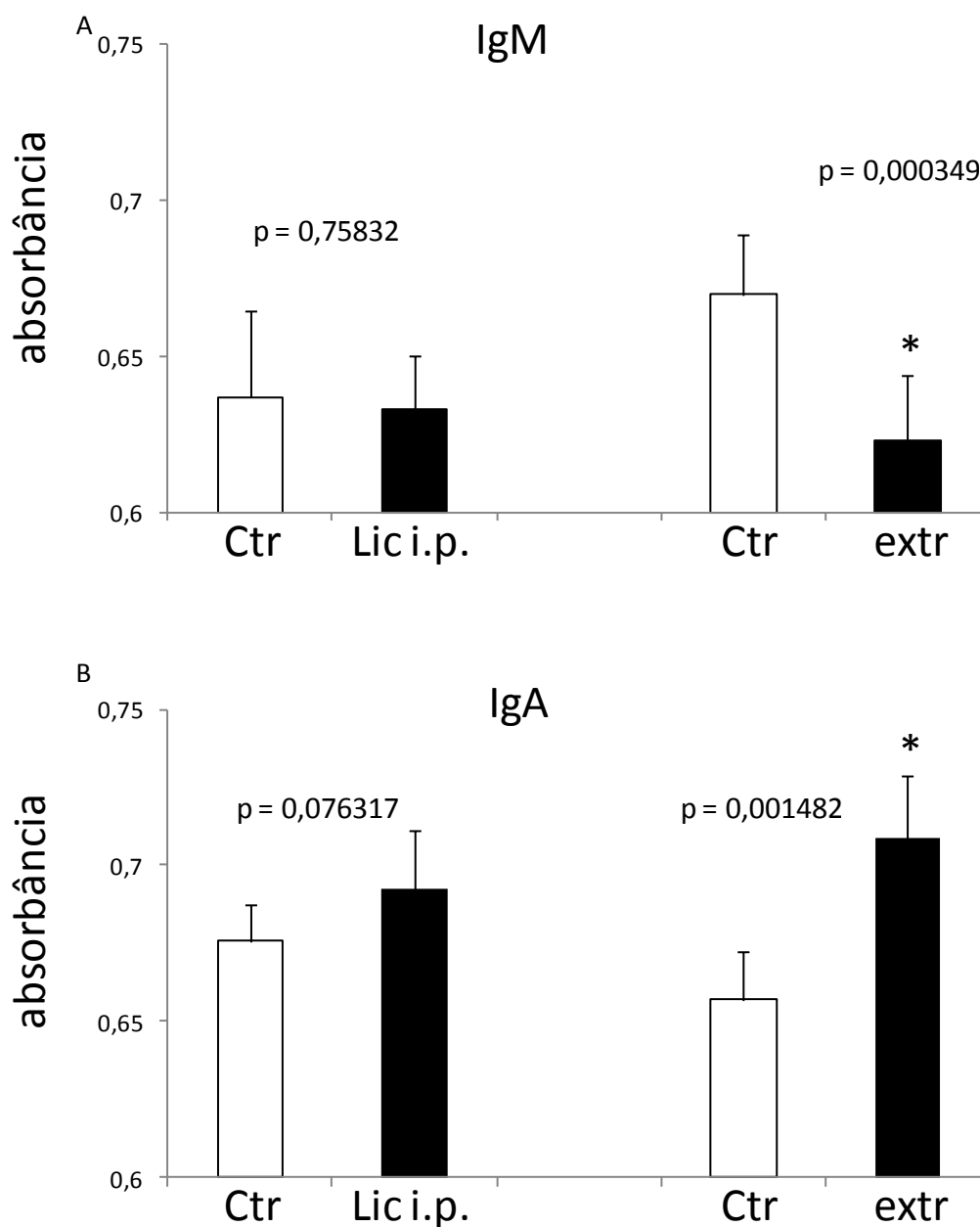


Figura 20. Dosagem de IgM e IgA no soro após tratamento com licopeno purificado e extrato de tomate. (A) Níveis de IgM no soro dos animais tratados e seus controles. (B) Níveis de IgA no soro dos animais tratados e seus controles. Ctr=controle; Lic i.p. = injeção intraperitoneal de licopeno purificado; Extr = Extrato de tomate. n=5 animais por grupo. * indica $p < 0,05$.

A variação na concentração de imunoglobulinas séricas sugere que órgãos linfoides secundários, como o baço, estejam modificados em razão do tratamento experimental. Após 15 dias de tratamento, apenas o licopeno purificado induziu um aumento nas populações de linfócitos B esplênicos (Figura 21).

A

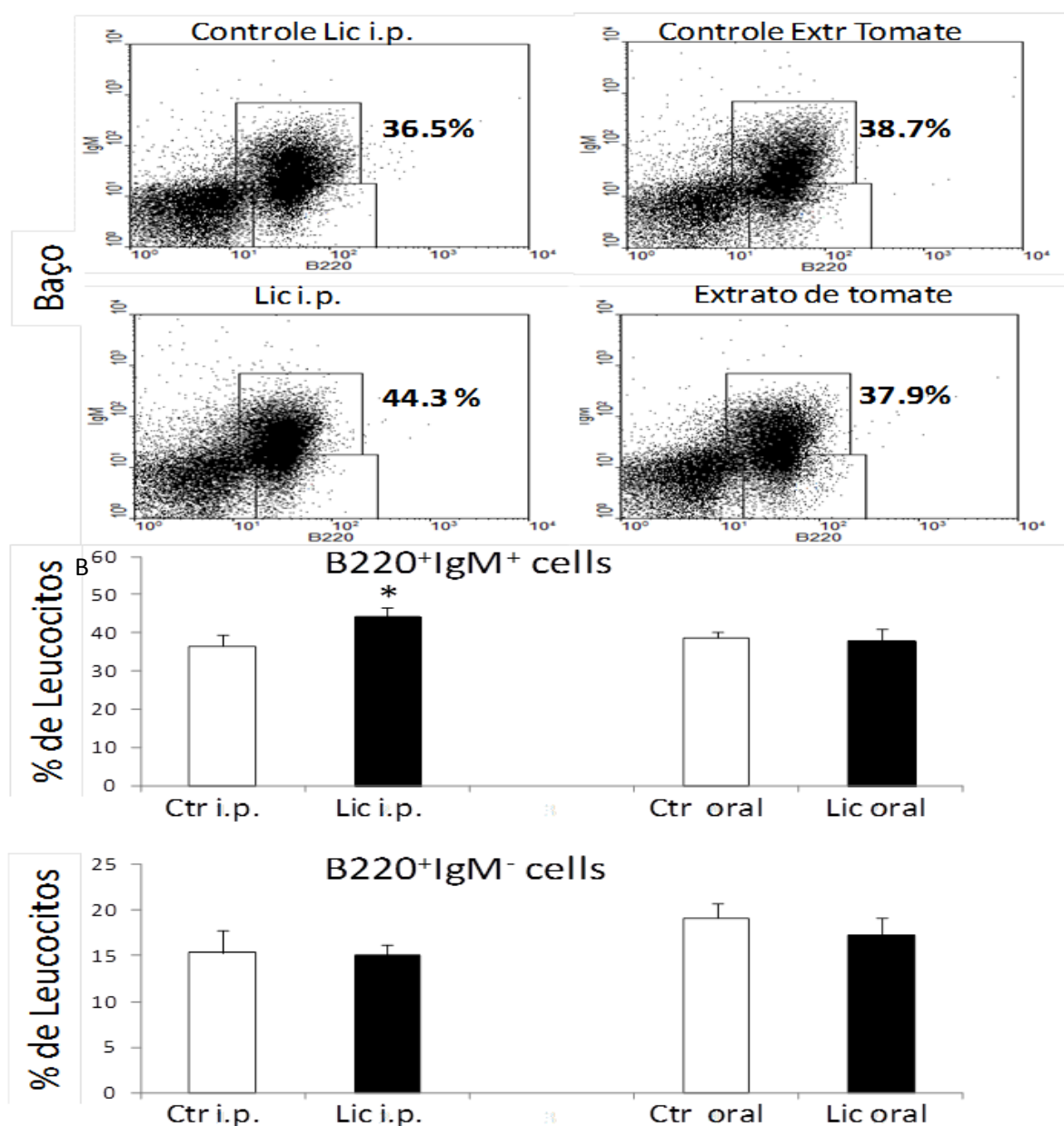


Figura 21. Análise fenotípica de linfócitos B no baço de animais estimulados com licopeno. (A) Gráficos de pontos obtidos por citometria de fluxo identificando progenitores de linfócitos B ($B220^+IgM^{Neg}$) e linfócitos B maduros ($B220^+IgM^+$). (B) Percentual obtido por média de 5 animais por grupo experimental. Células totais de medula óssea foram analisadas nas diferentes condições experimentais. $n=5$ animais por grupo. * indica $p<0,05$.

O maior número de linfócitos B correlacionado com índices elevados de imunoglobulinas no soro indica que plasmócitos estão se diferenciando de forma acelerada. Células $B220^{neg} CD138^+$ (plasmócitos) e Células $B220^+ CD138^+$ (plasmablastos) foram detectadas por citometria de fluxo. De fato, após 15 dias de suplementação *in vivo* foi

detectado um aumento significativo do percentual de plasmócitos e plasmablastos CD138⁺ em ambos os grupos tratados (Figura 22).

Na tentativa de estudar mecanismos de diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos do baço, repetiu-se o protocolo de cultivo de células utilizado para medula óssea. Agora, utilizando células totais de baço, os efeitos do licopeno na diferenciação terminal dos linfócitos B foram testados. Após 5 dias de cultivo, o número de células B220⁺IgM⁺ bem como a quantidade de células B220⁺CD138⁺ não se modificaram após tratamento com licopeno nas concentrações de 5μM e 10μM em relação aos grupos controles (Figura 23).

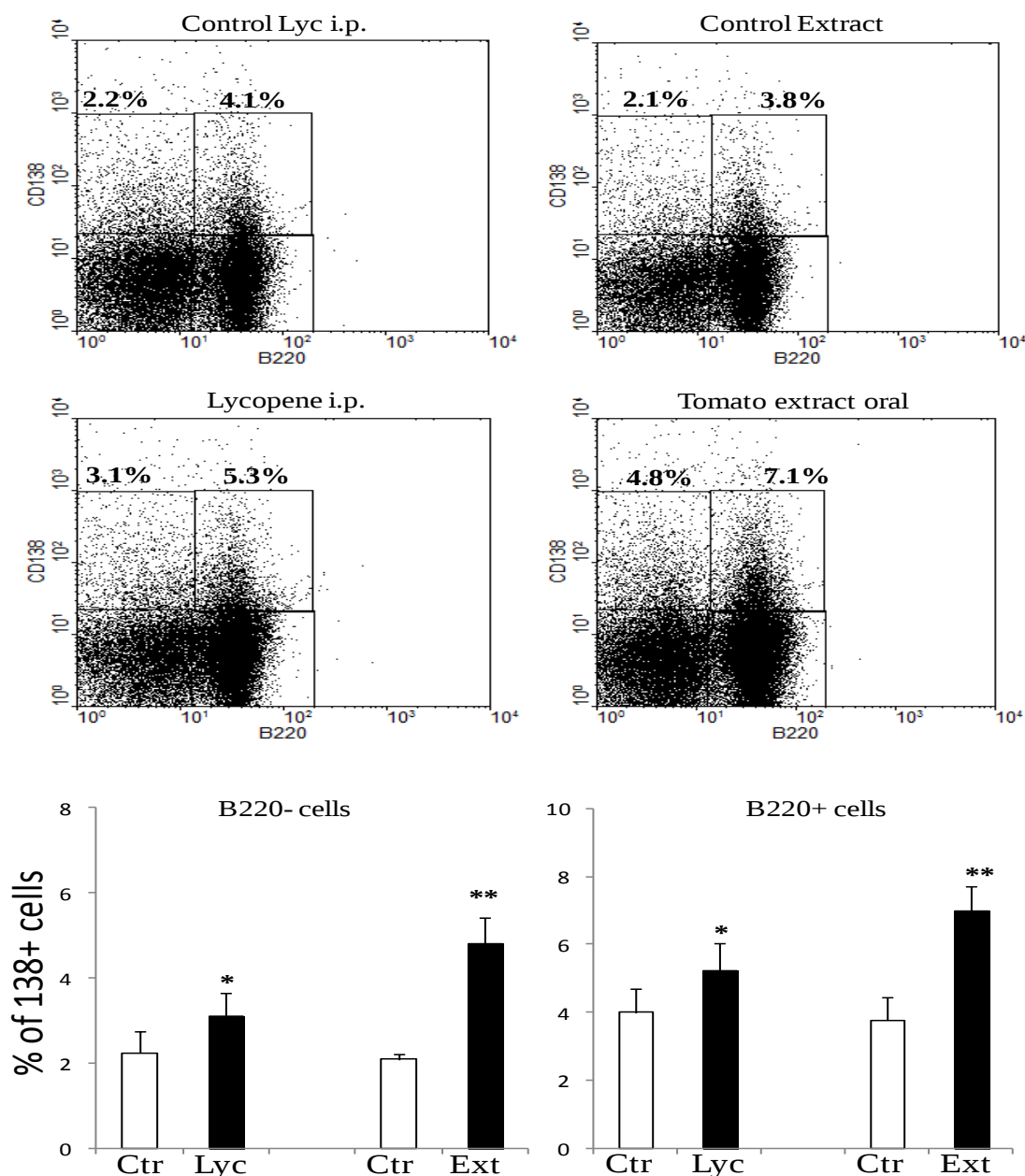


Figura 22. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na diferenciação de plasmócitos no baço. Nos gráficos de pontos, plasmócitos são caracterizados pelo fenótipo B220^{neg}CD138⁺ (plasmócitos), plasmablastos como células B220⁺CD138⁺ e os linfócitos B como B220⁺CD138⁺ por citometria de fluxo. Os gráficos de barras evidenciam os percentuais destas subpopulações de plasmablastos/plasmócitos. n=5 animais por grupo experimental. * indica p<0,05.

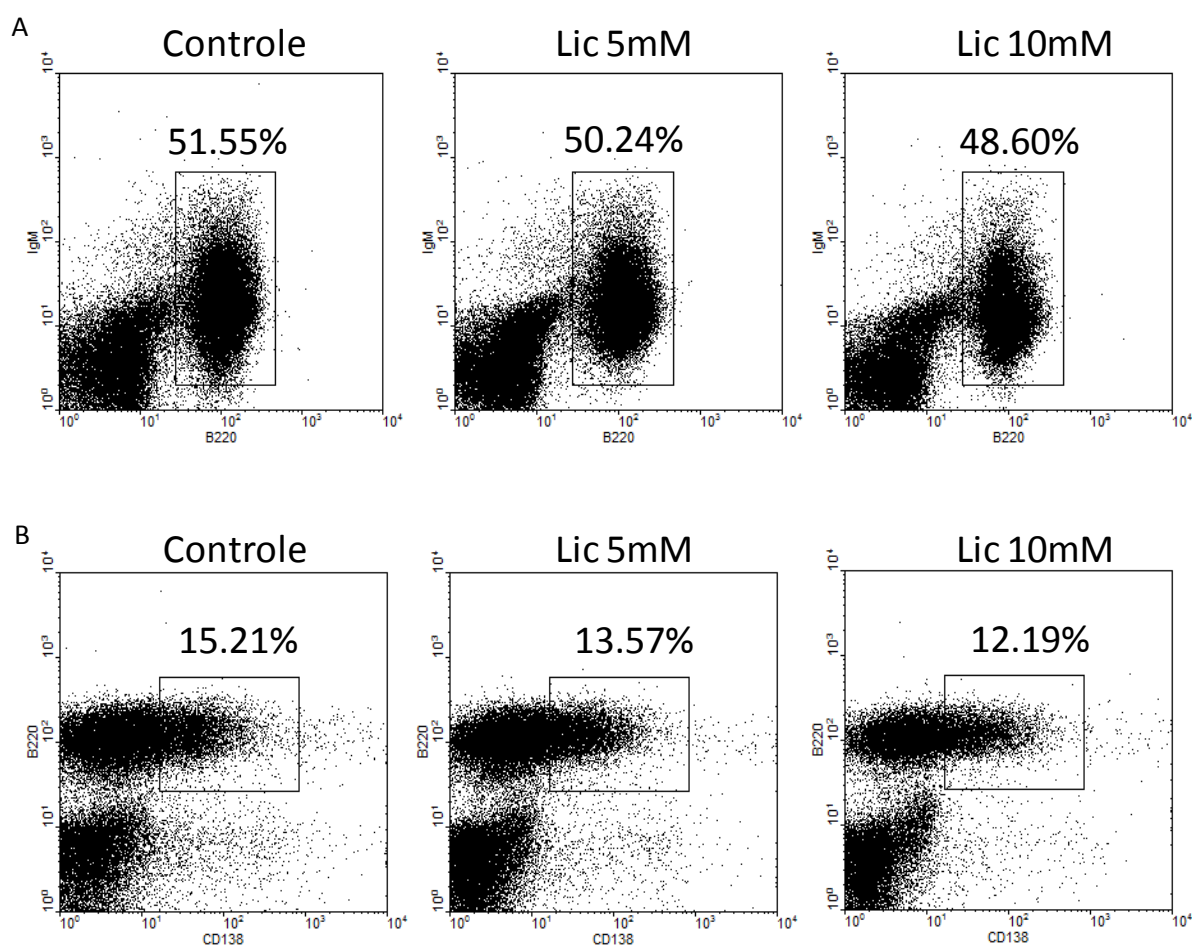


Figura 23. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na diferenciação de plasmócitos no baço. (A) Gráficos de pontos destacando as células B220⁺IgM⁺ (Linfócitos B) dos grupos controle, licopeno 5μM e 10μM, respectivamente. (B) Gráficos de pontos destacando as células B220⁺CD138⁺ (plasmablastos) dos grupos controle, licopeno 5μM e 10μM, respectivamente. n=5 animais por grupo experimental. * indica p<0,05.

A cavidade peritoneal também foi investigada no modelo experimental *in vivo*, tendo em vista que o aumento significativo de IgA no soro poderia ser resultado da ativação de linfócitos B1 peritoneais (Roy *et al.*, 2013). Além disso, embora o licopeno purificado não tenha modificado as concentrações de IgM e IgA no soro, é o sítio de injeção do licopeno purificado.

Após 15 de tratamento, o licopeno purificado injetado resultou em uma redução significativa dos leucócitos peritoneais quando comparados com seus respectivos controles.

Não houve variação significativa quando o grupo tratado com licopeno em extrato foi comparado ao grupo controle (Figura 24). Análise fenotípica revelou que linfócitos B e T estavam reduzidos na cavidade peritoneal dos animais submetidos ao tratamento com licopeno purificado injetado na cavidade peritoneal. Estas células também reduziram de forma significativa na cavidade peritoneal dos animais suplementados com extrato de tomate (Figura 24).

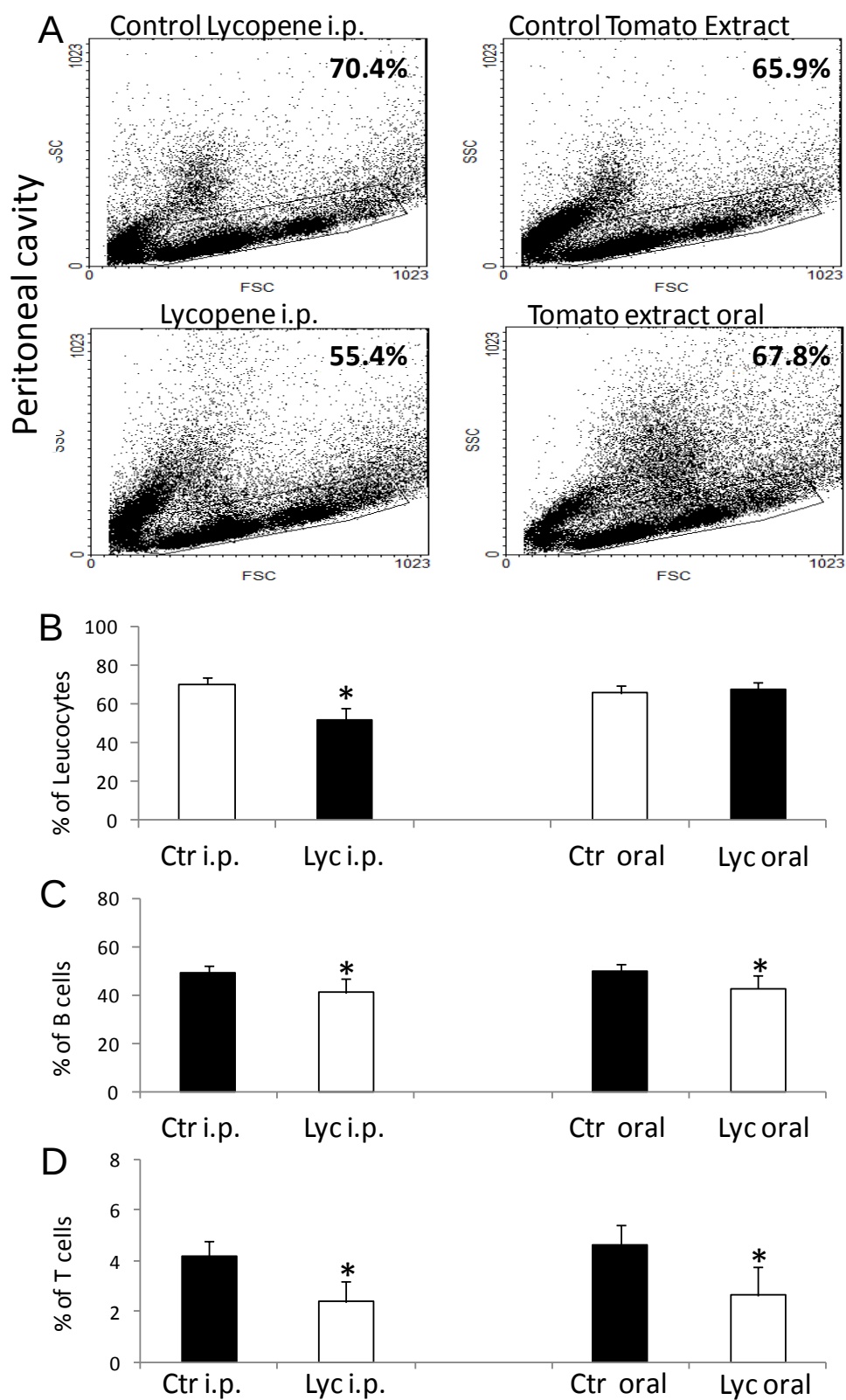


Figura 24. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na distribuição das células peritoneais. (A) Gráficos de pontos destacando as células com tamanho (FSC – Forward scatter) e granulosidade (SSC – side scatter) compatíveis com linfócitos. (B) Percentual de leucócitos. (C) Percentual de linfócitos B e (D) Percentual de linfócitos T peritoneais). n=5 animais por cada grupo.

O passo seguinte foi avaliar se o licopeno intraperitoneal e/ou o extrato via oral estavam interferindo com a diferenciação dos linfócitos B peritoneais. Cerca de 77% das células selecionadas na região de “mononucleares” coexpressavam B220 e IgM nos grupos controle. Os animais tratados com licopeno purificado apresentaram percentuais similares aos controles (Figura 25A). O mesmo aconteceu quando os grupos controles e tratados com extrato via oral, que não alterou o percentual, próximo aos 80% da população mononuclear total (Figura 25B). Entretanto, pode-se observar que a intensidade de fluorescência detectada pelo citômetro foi menor no grupo tratado com o extrato de tomate por 15 dias, em relação ao seu controle (Figura 25B).

Quanto as células positivas para IgA, o licopeno purificado não alterou o padrão observado nas células do grupo controle (Figura 25C). Por outro lado, o extrato induziu um aumento significativo de células IgA⁺ após 15 dias de suplementação *in vivo* (Figura 25D). Nitidamente, o extrato promoveu uma redução na expressão de IgM, embora ainda sejam IgM⁺, e em paralelo, induziu um aumento na expressão de IgA, sugerindo uma mudança de classe de IgM para IgA nas células B peritoneais como consequência do tratamento com o extrato de tomate.

Células B220+IgM+

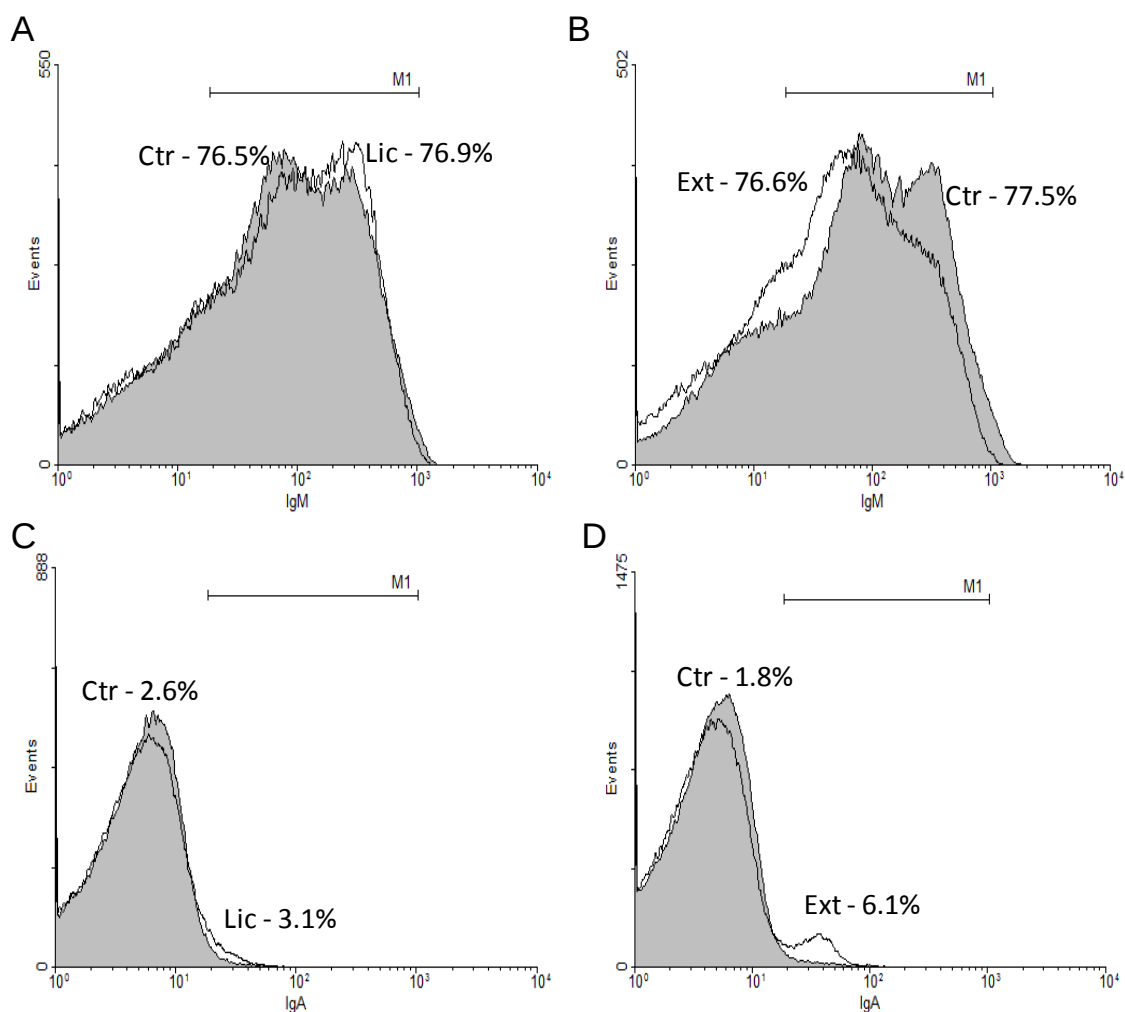


Figura 25. Efeito do licopeno e do extrato de tomate na expressão de IgM e IgA nas células B peritoneais. (A e C) Histogramas representativos dos animais submetidos a injeções diárias de licopeno purificado. (B e D) Histogramas representativos dos animais submetidos a suplementação oral com extrato de tomate. Os grupos tratados com extrato reduziram a expressão de IgM e aumentaram IgA. n=5 animais por cada grupo. Dados plotados como média.

5 DISCUSSÃO

O licopeno tem sido utilizado como um regulador natural de diversas funções celulares, incluindo células saudáveis e tumorais (Teodoro *et al.*, 2009; Teodoro *et al.*, 2012; Haddad *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2015). Um dos grupos pioneiros em analisar os efeitos de carotenoides no sistema imunológico foi Garcia e colaboradores, quando demonstraram que a suplementação com vitamina A e carotenoides afetou favoravelmente o desenvolvimento do sistema imune (Garcia *et al.*, 2003). Neste trabalho, foi demonstrado que as células hematopoiéticas linfoides responderam a suplementação com licopeno *in vitro*, especialmente os linfócitos B diferenciando em células produtoras de IgA.

O licopeno utilizado nos experimentos *in vitro* não modificou a distribuição das células mieloides e pouco alterou a dinâmica dos linfócitos T. Os efeitos do licopeno na diferenciação de linfócitos T foram descritos inicialmente por Kobayashi e colaboradores. Eles trataram camundongos com licopeno e observaram uma alteração na diferenciação intratímica dos linfócitos T, evidenciada no sangue periférico por um aumento na relação CD4/CD8, em razão do aumento no número de células T CD4⁺ circulantes (Kobayashi *et al.*, 1996). Nossos dados corroboraram com este achado, tendo em vista que células hematopoiéticas tratadas com 5µM e 10µM de licopeno também tiveram uma alteração na relação de CD4/CD8 em decorrência do aumento de células TCD4⁺. Embora seja um alvo potencial neste modelo experimental, o timo dos animais estudados não foi analisado.

O licopeno agiu em todos os compartimentos de linfócitos B da medula óssea *in vitro*, incluindo progenitores IgM negativos e células mais diferenciadas positivas para IgM. Na verdade, foi observado que todas as subpopulações de linfócitos B estavam aumentadas 5 dias após o tratamento, sugerindo que o licopeno possa ser um potente fator nutricional agindo na linfopoese B, preferencialmente estimulando a diferenciação em células IgM⁺.

O licopeno sintético parece ser equivalente ao licopeno natural em relação à sua biodisponibilidade, com semelhante conteúdo isomérico (Michael McClain and Bausch, 2003). No qual, segundo um estudo realizado com 12 indivíduos em 3 grupos diferentes por 28 dias com licopeno sintético (15mg), licopeno natural (15mg) ou placebo. A dose administrada resultou no aumento de duas a três vezes mais licopeno no soro, quando comparado ao grupo-placebo. O aumento na quantidade de licopeno foi similar para os grupos suplementados com licopeno sintético e natural, e significativamente menor para o grupo placebo, independentemente do sexo. Corroborando que o licopeno sintético não apresentou modificação na biodisponibilidade, quando comparado ao licopeno natural (Hoppe et al, 2003). Não há uma quantidade específica, mínima ou máxima, prescrita de licopeno que seja considerada segura para ingestão. O consumo entre 5mg e 10mg de licopeno por dia é suficiente para a obtenção dos benefícios desse nutriente (Rao, 2002). Outros autores sugerem a ingestão de 4mg/dia de carotenoides, não excedendo 10mg/dia (Ziegler *et al.*, 1996). Como essas dosagens são sugeridas para a população sadia, talvez seja necessária uma dosagem maior em algumas doenças (Rao and Agarwal, 2000). Há discórdia no que diz respeito às recomendações nutricionais de ingestão de licopeno; dessa forma, necessita-se de mais estudos para que essa recomendação atenda as necessidades humanas.

Neste trabalho, foram testadas as concentrações 1, 5 e 10 μ M de licopeno. Na concentração de 1 μ M, todos os parâmetros analisados foram semelhantes aos grupos “controles” (dados não mostrados). Os dados mais significativos foram obtidos quando as células foram cultivadas na concentração de 5 μ M, embora dados obtidos com 10 μ M de licopeno tivessem sido semelhantes, exceto quando mostrou certa toxicidade. Estes dados foram cruciais para se definir a concentração de 5 μ M de licopeno nos experimentos com licopeno purificado.

A biodisponibilidade dos constituintes do alimento é um processo complexo, que envolve a digestão, a captação intestinal e sua absorção, distribuição para os tecidos e sua utilização (Bramley, 2000). Existem vários fatores que podem interferir na biodisponibilidade dos carotenoides, tais como a matriz alimentar, a forma isomérica do licopeno, a quantidade e o tipo de gordura presente na dieta, o processo de absorção, as interações entre os carotenoides, a presença de fibras alimentares e o processamento dos alimentos (Bramley, 2000; van Het Hof *et al.*, 2000; Boileau *et al.*, 2002).

Estudos recentes indicam que o licopeno suprimiu INF- γ e IL-4 sintetizados por linfócitos e IL-2 e IL-10 humanas secretadas por células mononucleares do sangue em ensaios *in vitro* (Kim *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2010). Além disso, a suplementação de licopeno reprimiu a inflamação das vias aéreas em modelo murino de asma, sugerindo propriedades imunomoduladoras a esta molécula (Hazlewood *et al.*, 2011). Durante a última década, vários autores demonstraram o papel protetor do licopeno e outros carotenoides contra danos oxidativos no DNA de linfócitos (Porrini and Riso, 2000; Astley *et al.*, 2004; Riso *et al.*, 2006; Aydin *et al.*, 2013).

Após os 15 dias de suplementação, os valores obtidos da população B220⁻CD138⁺ aumentaram significativamente nos dois tratamentos diferentes com licopeno, houve o aumento mais expressivo das células quando tratadas com licopeno na forma de extrato. Os resultados para B220⁺CD138⁺, foram bem similar em relação aos plasmócitos maduros (B220⁻CD138⁺), nessa fase intermediária caracterizada em plasmablasto as células aumentaram significativamente em relação ao controle no tratamento intraperitoneal e no tratamento com extrato, também sendo o efeito do extrato mais evidenciado no aumento dessas células. Portanto, ambos os resultados nos indicam que o licopeno intraperitoneal e o extrato induziram a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, segundo o aumento das células plasmablastos e plasmócitos já maduros revelado, reforçando o dado que

encontramos no aumento de IgA no sangue. Esse resultado obtido, provavelmente ocorre devido a uma mudança de classe da imunoglobulina M para a imunoglobulina A.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que o extrato de tomate induziu um aumento significativo de IgA, sugerindo que a passagem do extrato pela mucosa gastrointestinal gera um efeito provavelmente sistêmico e predominante, quando comparado com o efeito local (intraperitoneal) gerado pela injeção do licopeno purificado. De fato, IgA está envolvida com imunologia de mucosa (Cerutti and Rescigno, 2008), sendo o principal anticorpo secretado na saliva, secreções intestinais, fluidos broncoalveolares, urina e outros fluidos que lubrificam as mucosas. Sua produção diária é duas vezes maior do que todas as outras imunoglobulinas juntas, fato que sugere uma importante função imunológica (Corthesy, 2009).

Na mucosa gastrintestinal, IgA reveste bactérias e regula a imunidade adaptativa da própria mucosa (Macpherson *et al.*, 2011). Conceitualmente, também se discute se IgA também não faria parte da imunidade inata das mucosas, tendo em vista o repertório de IgA secretada, com especificidade elevada, moderada e baixa aos antígenos bacterianos, sugerindo especificidade forte e fraca a flora bacteriana intestinal (Fagarasan and Honjo, 2004; Fritz *et al.*, 2012). Esta característica não-inflamatória da ligação de IgA a antígenos é fundamental para a manutenção da integridade das mucosas, especialmente no trato gastrointestinal, onde o indivíduo é exposto a uma grande variedade de antígenos provenientes dos alimentos (Corthesy, 2013).

IgM é a imunoglobulina predominante nas respostas primárias, sendo restrita ao espaço intravascular, conferindo uma resposta imunológica rápida, porém não muito efetiva, com uma duração curta (Gronwall *et al.*, 2012). O tratamento com licopeno induziu uma redução nos níveis séricos de IgM, o que sugere um estudo mais aprofundado na questão

discutida acima, ou seja, o quanto licopeno/extrato de tomate interfere com as respostas imunológicas primárias, dependentes de licopeno.

A mudança de classe de IgM para IgA é um dos eventos que marca a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos associados com as mucosas, sendo relacionados com TGF- β , IL-5 e ácido retinoico (Mora and von Andrian, 2009; Puga *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2013). IgA é o principal anticorpo presente em nossas mucosas e secreções (boca, nariz, garganta, pulmões, trato urinário e genital), confere uma imunidade mais dirigida às bactérias. Funciona como uma espécie de barreira nos locais em que está presente, protegendo nosso organismo das infecções (Mathias *et al.*, 2014).

Os carotenoides tem sido estudados quanto a sua capacidade de induzir a geração de células secretoras de IgA. A suplementação de β -caroteno em recém-nascidos aumentou significativamente as concentrações de IgA no soro e a quantidade de plasmócitos secretores de IgA no jejuno e íleo de camundongos após 14 e 21 dias de tratamento. Estes dados indicam que a suplementação com β -caroteno em camundongos neonatos é eficaz para aumentar a indução de IgA na mucosa intestinal (Nishida *et al.*, 2014). No modelo apresentado neste trabalho, o licopeno purificado não interferiu com os níveis de IgA no soro, mas o extrato de tomate gerou um aumento significativo desta imunoglobulina. Não está claro se o licopeno no extrato foi o responsável, ou se a concentração do licopeno purificado não foi suficiente para tal indução. Uma terceira possibilidade consiste na presença de outro composto bioativo no extrato, como o próprio β -caroteno, a ser devidamente investigado em estudos posteriores.

O fato das células B peritoneais apresentarem alterações fenotípicas que condizem com mudança de classe de IgM para IgA sugere que o licopeno purificado injetado intraperitonealmente teve um efeito local e não sistêmico. Células B IgM⁺ perdendo

intensidade de marcação ao mesmo tempo que células B IgA⁺ surgem na cavidade peritoneal indicam que há ativação intraperitoneal, sugerindo que o licopeno pode ser um alvo molecular importante para ser estudado como um composto alimentar bioativo regulador da diferenciação de linfócitos B peritoneais ou convencionais em plasmócitos secretores de IgA.

6 CONCLUSÃO

O licopeno induziu a diferenciação de linfócitos B IgM⁺ derivadas da medula óssea *in vitro* e o extrato de tomate aumentou os níveis séricos de IgA positivas. O licopeno purificado agiu de forma local induzindo a mudança de classe de IgM para IgA em linfócitos B presentes na cavidade peritoneal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astley, S. B. et al. DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids in vitro and in vivo. **Br J Nutr**, v. 91, n. 1, p. 53-61, Jan 2004. ISSN 0007-1145. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14748938> >.

Aydin, S. et al. The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. **Toxicon**, v. 73, p. 96-103, Oct 2013. ISSN 1879-3150. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867521> >.

Boileau, A. C. et al. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. **J Nutr**, v. 129, n. 6, p. 1176-81, Jun 1999. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166.

Boileau, T. W.; Boileau, A. C.; Erdman, J. W., Jr. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 227, n. 10, p. 914-9, Nov 2002. ISSN 1535-3702 (Print)

1535-3699.

Bramley, P. M. Is lycopene beneficial to human health? **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 233-6, Jun 2000. ISSN 0031-9422 (Print)

0031-9422.

Bryder, D.; Jacobsen, S. E. Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1748-55, Sep 2000. ISSN 0006-4971. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961873> >.

Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 55-79, 2004. ISSN 0732-0582. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032574> >.

Capolunghi, F. et al. Why do we need IgM memory B cells? **Immunol Lett**, v. 152, n. 2, p. 114-20, May 2013. ISSN 0165-2478.

Carrasco, Y. R.; Batista, F. D. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 3, p. 286-91, Jun 2006. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616474> >.

Ceredig, R.; Rolink, A. G. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. **Semin Immunol**, v. 24, n. 3, p. 159-64, Jun 2012. ISSN 1096-3618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421573> >.

Cerutti, A.; Rescigno, M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 740-50, Jun 2008. ISSN 1097-4180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549797> >.

Chen, X. et al. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation. **J Immunol**, v. 180, n. 1, p. 138-45, Jan 2008. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097013> >.

Ciccone, M. M. et al. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 782137, 2013. ISSN 0962-9351.

Collins, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. **Curr Opin Hematol**, v. 15, n. 4, p. 346-51, Jul 2008. ISSN 1531-7048. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18536573> >.

Corthesy, B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 31, n. 2, p. 174-9, Jun 2009. ISSN 0892-3973.

_____. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 6, p. 661-5, Apr 2013. ISSN 1568-9972.

Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**, v. 274, n. 2, p. 532-8, Nov 1989. ISSN 0003-9861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2802626> >.

Dias, M. G.; Camoes, M. F.; Oliveira, L. Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. **Food Chem**, v. 109, n. 4, p. 815-24, Aug 15 2008. ISSN 0308-8146 (Print)

0308-8146.

el-Cheikh, M. C.; Borojevic, R. Extramedullar proliferation of eosinophil granulocytes in chronic schistosomiasis mansoni is mediated by a factor secreted by inflammatory macrophages. **Infect Immun**, v. 58, n. 3, p. 816-21, Mar 1990. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2106496> >.

Evans, T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. **Exp Hematol**, v. 33, n. 9, p. 1055-61, Sep 2005. ISSN 0301-472X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140154> >.

Fagarasan, S.; Honjo, T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 3, p. 277-83, Jun 2004. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915.

Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog Lipid Res**, v. 43, n. 3, p. 228-65, May 2004. ISSN 0163-7827 (Print)

0163-7827.

Friedman, M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, alpha-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 40, p. 9534-50, Oct 9 2013. ISSN 0021-8561.

Fritz, J. H. et al. Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 199-203, Jan 2012. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158124> >.

Garcia, A. L. et al. Retinoid- and carotenoid-enriched diets influence the ontogenesis of the immune system in mice. **Immunology**, v. 110, n. 2, p. 180-7, Oct 2003. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511231> >.

Godin, I.; Cumano, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 8, p. 593-604, Aug 2002. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154378> >.

Gronwall, C.; Vas, J.; Silverman, G. J. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. **Front Immunol**, v. 3, p. 66, 2012. ISSN 1664-3224.

Guo, Y. et al. Leukocyte homing, fate, and function are controlled by retinoic acid. **Physiol Rev**, v. 95, n. 1, p. 125-48, Jan 2015. ISSN 0031-9333.

Haddad, N. F. et al. Lycopene and Beta-Carotene Induce Growth Inhibition and Proapoptotic Effects on ACTH-Secreting Pituitary Adenoma Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62773, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23667519> >.

Hazlewood, L. C. et al. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 1, p. 95-100, Jan 2011. ISSN 1873-4847. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392623> >.

Jomova, K.; Valko, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **Eur J Med Chem**, v. 70, p. 102-10, Dec 2013. ISSN 1768-3254. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141200> >.

Khachik, F. et al. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 227, n. 10, p. 845-51, Nov 2002. ISSN 1535-3702 (Print)

1535-3699.

Kim, G. Y. et al. Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 203-11, Oct 2004. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379981> >.

Klimovich, V. B. IgM and its receptors: structural and functional aspects. **Biochemistry (Mosc)**, v. 76, n. 5, p. 534-49, May 2011. ISSN 0006-2979.

Kobayashi, T. et al. Effects of lycopene, a carotenoid, on intrathymic T cell differentiation and peripheral CD4/CD8 ratio in a high mammary tumor strain of SHN retired mice. **Anticancer Drugs**, v. 7, n. 2, p. 195-8, Feb 1996. ISSN 0959-4973 (Print)

0959-4973.

Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 6, p. 459-516, Dec 2005. ISSN 0098-2997 (Print)

0098-2997.

Kunisawa, J.; Kiyono, H. Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine. **Nutrients**, v. 4, n. 3, p. 154-66, Mar 2012. ISSN 2072-6643.

LeBien, T. W.; Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-80, Sep 2008. ISSN 1528-0020. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725575> >.

Lilly, A. J.; Johnson, W. E.; Bunce, C. M. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. **Stem Cells Int**, v. 2011, p. 274564, 2011. ISSN 1687-9678. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135682> >.

Macpherson, A. J.; Geuking, M. B.; McCoy, K. D. Immunoglobulin A: a bridge between innate and adaptive immunity. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 27, n. 6, p. 529-33, Oct 2011. ISSN 1531-7056. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912248> >.

Mathias, A. et al. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. **Gut Microbes**, v. 5, n. 6, p. 688-95, 2014. ISSN 1949-0976.

Melendez-Martinez, A. J.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Carotenoids, color, and ascorbic acid content of a novel frozen-marketed orange juice. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 4, p. 1347-55, Feb 21 2007. ISSN 0021-8561 (Print)

0021-8561.

Meyer-Bahlburg, A. B-1 cells as a source of IgA. **Ann N Y Acad Sci**, Jun 9 2015. ISSN 0077-8923.

Michael McClain, R.; Bausch, J. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 274-85, Apr 2003. ISSN 0273-2300 (Print)

0273-2300.

Monteiro, R. C.; Van De Winkel, J. G. IgA Fc receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 177-204, 2003. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582.

Mora, J. R. et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. **Science**, v. 314, n. 5802, p. 1157-60, Nov 17 2006. ISSN 0036-8075.

Mora, J. R.; von Andrian, U. H. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. **Semin Immunol**, v. 21, n. 1, p. 28-35, Feb 2009. ISSN 1044-5323 (Print)

1044-5323.

Morrison, S. J.; Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327-34, Jan 2014. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429631> >.

Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 107-16, Feb 2006. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491135> >.

Nishida, K. et al. Effects of supplemental beta-carotene on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of mice after weaning. **Br J Nutr**, v. 111, n. 2, p. 247-53, Jan 28 2014. ISSN 0007-1145.

Oracki, S. A. et al. Plasma cell development and survival. **Immunol Rev**, v. 237, n. 1, p. 140-59, Sep 2010. ISSN 1600-065X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727034> >.

Panaroni, C.; Wu, J. Y. Interactions between B lymphocytes and the osteoblast lineage in bone marrow. **Calcif Tissue Int**, v. 93, n. 3, p. 261-8, Sep 2013. ISSN 1432-0827. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23839529> >.

Porrini, M.; Riso, P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. **J Nutr**, v. 130, n. 2, p. 189-92, Feb 2000. ISSN 0022-3166. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720168> >.

Puga, I.; Cols, M.; Cerutti, A. Innate signals in mucosal immunoglobulin class switching. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 5, p. 889-95; quiz 896-7, Nov 2010. ISSN 1097-6825. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050939> >.

Rao, A. V. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 227, n. 10, p. 908-13, Nov 2002. ISSN 1535-3702. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424333> >.

Rao, A. V.; Agarwal, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **J Am Coll Nutr**, v. 19, n. 5, p. 563-9, Oct 2000. ISSN 0731-5724 (Print)

0731-5724.

Rao, A. V.; Rao, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 3, p. 207-16, Mar 2007. ISSN 1043-6618 (Print)

1043-6618.

Richelle, M. et al. Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. **Br J Nutr**, v. 103, n. 12, p. 1800-7, Jun 2010. ISSN 0007-1145.

Riso, P. et al. Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 7, p. 2563-6, Apr 2006. ISSN 0021-8561. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569044> >.

Rodrigues, E. et al. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxyl radical scavenger capacity: application to carotenoids and structure-activity relationship. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 2103-11, Dec 2012. ISSN 0308-8146. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953962> >.

Rolink, A.; Melchers, F. B-cell development in the mouse. **Immunol Lett**, v. 54, n. 2-3, p. 157-61, Dec 1996. ISSN 0165-2478. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052871> >.

Rolink, A. G. et al. Early lymphocyte development in bone marrow and thymus. **Swiss Med Wkly**, v. 136, n. 43-44, p. 679-83, Oct 2006. ISSN 1424-7860. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183429> >.

Roy, B. et al. An intrinsic propensity of murine peritoneal B1b cells to switch to IgA in presence of TGF-beta and retinoic acid. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82121, 2013. ISSN 1932-6203.

Ruhl, R. Non-pro-vitamin A and pro-vitamin A carotenoids in atopy development. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 161, n. 2, p. 99-115, 2013. ISSN 1018-2438.

Salva, S. et al. Dietary supplementation with probiotics improves hematopoiesis in malnourished mice. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31171, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347448> >.

Savage, H. P.; Baumgarth, N. Characteristics of natural antibody-secreting cells. **Ann N Y Acad Sci**, Jun 23 2015. ISSN 0077-8923.

Seo, G. Y. et al. Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF-beta1 to enhance the overall IgA response. **J Leukoc Biol**, v. 94, n. 2, p. 325-35, Aug 2013. ISSN 0741-5400.

_____. Retinoic acid acts as a selective human IgA switch factor. **Hum Immunol**, v. 75, n. 8, p. 923-9, Aug 2014. ISSN 0198-8859.

Shapiro-Shelef, M. et al. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. **J Exp Med**, v. 202, n. 11, p. 1471-6, Dec 2005. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314438> >.

Shi, J.; Le Maguer, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Crit Rev Biotechnol**, v. 20, n. 4, p. 293-334, 2000. ISSN 0738-8551. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11192026> >.

Shikina, T. et al. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. **J Immunol**, v. 172, n. 10, p. 6259-64, May 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767.

Silva, C. R.; Antunes, L. M.; Bianchi, M. L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol Res**, v. 43, n. 6, p. 561-6, Jun 2001. ISSN 1043-6618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11419966> >.

Soares, N. a. C. et al. Influence of lycopene on cell viability, cell cycle, and apoptosis of human prostate cancer and benign hyperplastic cells. **Nutr Cancer**, v. 65, n. 7, p. 1076-85, Oct 2013. ISSN 1532-7914. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053141> >.

Soares, N. D. et al. Anticancer properties of carotenoids in prostate cancer: A review. In: (Ed.). **Histol Histopathol**, 2015. p.11635. ISBN 1699-5848 (Electronic)

0213-3911 (Linking).

Stahl, W.; Sies, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1740, n. 2, p. 101-7, May 30 2005. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

Tanaka, T.; Shnimizu, M.; Moriwaki, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3202-42, 2012. ISSN 1420-3049. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418926> >.

Tedder, T. F. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 5, n. 10, p. 572-7, Oct 2009. ISSN 1759-4804. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798033> >.

Teodoro, A. J. et al. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. **Cancer Cell Int**, v. 12, n. 1, p. 36, 2012. ISSN 1475-2867. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22866768> >.

_____. Lycopene isomerisation and storage in an in vitro model of murine hepatic stellate cells. **Eur J Nutr**, v. 48, n. 5, p. 261-8, Aug 2009. ISSN 1436-6215. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19533199> >.

Tobón, G. J.; Izquierdo, J. H.; Cañas, C. A. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. **Autoimmune Dis**, v. 2013, p. 827254, 2013. ISSN 2090-0422. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24187614> >.

van Het Hof, K. H. et al. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **J Nutr**, v. 130, n. 3, p. 503-6, Mar 2000. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166.

van Zelm, M. C. et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. **N Engl J Med**, v. 354, n. 18, p. 1901-12, May 2006. ISSN 1533-4406. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672701> >.

Wilson, A. et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1106, p. 64-75, Jun 2007. ISSN 0077-8923. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442778> >.

Yamaguchi, L. F. et al. Lycopene entrapped in human albumin protects 2'-deoxyguanosine against singlet oxygen damage. **Arch Latinoam Nutr**, v. 49, n. 3 Suppl 1, p. 12S-20S, Sep 1999. ISSN 0004-0622. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10971838> >.

Yamaguchi, M. et al. Carotenoids modulate cytokine production in Peyer's patch cells ex vivo. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 15, p. 8566-72, Aug 2010. ISSN 1520-5118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20681644> >.

Ye, M.; Graf, T. Early decisions in lymphoid development. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 2, p. 123-8, Apr 2007. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306518> >.

Ziegler, R. G. et al. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 88, n. 9, p. 612-5, May 1 1996. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874.

