UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

JEFFERSON LUIZ DA SILVA

EFEITOS DA INFLAMAÇÃO CONTINUADA E DO TRATAMENTO IMUNOMODULADOR COM ANTI-TNF NO CONTROLE DA COLITE EXPERIMENTAL

Ribeirão Preto – SP
2018

JEFFERSON LUIZ DA SILVA

EFEITOS DA INFLAMAÇÃO CONTINUADA E DO TRATAMENTO IMUNOMODULADOR COM ANTI-TNF NO CONTROLE DA COLITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção de grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação da Profª. Drª. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

Ribeirão Preto – SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação de publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Silva, Jefferson Luiz

Efeitos da inflamação continuada e do tratamento imunomodulador com anti-TNF no controle da colite experimental
Ribeirão Preto, 2018.
111 f.: II.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/FMRP/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profª. Drª. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

1.Mucosa intestinal; 2. Disbiose; 3.Infliximab; 4.Doença inflatória intestinal

Nome: Jefferson Luiz da Silva

Título: **Efeitos da inflamação continuada e do tratamento imunomodulador com anti-TNF no controle da colite experimental**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção de grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª. Drª. Cristina Ribeiro de Barro Cardoso Instituição: FCFRP/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no *Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR)* do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que, por sua infinita misericórdia, tem me ajudado e não tem me desamparado.

Aos meus pais Eduardo e Sueli, provas vivas da minha dedicação, competência e empenho, pelo eterno e inigualável amor e pelos conselhos dados.

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo nessa jornada.

A minha avó Benedita, pelo amor, carinho, conselhos e palavras de sabedoria vinda da parte de Deus e pelos anos vividos.

Aos professores Cristina Ribeiro e Auro Nomizo pelo carinho, paciência e ensinamentos ao longo desses dois anos.

Aos anjos que Deus colocou em meu caminho, me ajudando para a minha formação acadêmica, profissional e humana, além das horas de ouvidos a postos: **Nathalia, Kevin, Lia, Camila, Larissa, Nádia,Vivi, Iris, Cássia, e ao grupo PET Bio Pontal.**

A todos os meus demais familiares e amigos...

...meu eterno amor e gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pelo amor, carinho, compaixão, ensinamentos por sempre ter me confortado com a graça da fé. Agradeço por me fazer refletir sobre meus erros e ser humilde com as minhas conquistas que Ele me tem proporcionado. Tudo que consegui foi graças a Ele e pela fé do tamanho de um grão de mostarda a qual move montanhas.

À Profª. Drª. Cristina Ribeiro de Barro Cardoso pela paciência, pela orientação, ensino, educação científica, confiança e acolhimento em seu laboratório de pesquisa. Agradeço pela segunda mãe que tem sido ao longo desse tempo.

Ao Profº. Drº. Auro Nomizo, que além de colaborar com as mais diversas questões desse trabalho, tem também me ensinado e aconselhado da melhor forma de como fazer pesquisa e também pelo amor, humanização e imenso coração que tem com todos do laboratório.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) por ter me proporcionado o mais alto nível do conhecimento e a oportunidade para a progressão profissional e acadêmica.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) que forneceu toda a estrutura e apoio necessário para o desenvolvimento desse pesquisa.

Aos meus amigos e colaboradores do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR), Lia, Camila, Vivi, Larissa, Iris, D'júlio e Cássia, pela verdadeira amizade, apoio em todos os assuntos e horas de dedicação em meus experimentos, sem a ajuda de vocês nada disso poderia ter sido construído.

Às minhas amigas e ex-orientadoras Karine Rezende e Gabriela Lícia pela amizade, pelos ensinamentos e por serem duas mães durante a minha graduação.

Aos meus amigos Nathalia, Kevin e Sandro por todo apoio carinho, dedicação, amizade e amor com que tem me proporcionado todos esses dias. Agradeço por não terem deixado eu desanimar nem desistir para o término desse projeto de pesquisa. À vocês três, meus imenso amor e carinho.

Aos meus pais Eduardo e Sueli por todo o suporte, carinho, amor e conselhos que tem me dado, por sempre me elogiarem, ouvirem minhas reclamações, minhas tristezas e alegrias, nesse momento agradeço a Deus por terem vocês dois como meus pais.

Às agências financiadoras FAPESP, CAPES, CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste e de outros trabalhos de nosso laboratório.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo."
Albert Einstein

Meu sonho (o mais caro). Seria, sem
tema Fazer um poema Como um dia
claro.

E vê-lo, fantástico No papel pautado
Ser parte e teclado Poético e plástico.

Com rima ou sem rima Livre ou
metrificado – Contanto que exprima
O impropositado.

E que (o impossível Talvez desejado)
Não fosse passível
De ser declamado.

Vinícius de Moraes

RESUMO

SILVA, J.L. **Efeitos da inflamação continuada e do tratamento imunomodulador com anti-TNF no controle da colite experimental.** 2018 111f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, são resultados de uma resposta imune desregulada no intestino de indivíduos geneticamente suscetíveis apresentando disbiose intestinal. Essas doenças geralmente são tratadas com anticorpos monoclonais, como o anti-TNF, Infliximab (IFX). No entanto, pouco se sabe como o bloqueio do TNF afeta a resposta do hospedeiro quando ocorre uma nova quebra da homeostase intestinal, durante a recidiva da doença. Neste estudo, avaliamos os efeitos tardios do tratamento com IFX na colite experimental com um novo desafio de disbiose. Camundongos tratados com IFX tiveram remissão da colite. No entanto, o tratamento não protegeu contra a recidiva da doença, o que resultou no aumento de células mononucleares circulantes e diminuição de neutrófilos, em contraste com a redução da atividade de macrófagos e aumento da infiltrado de neutrófilos no cólon após o desafio. Esses animais também apresentaram diminuição da barreira linfocitária epitelial e aumento de linfócitos na lâmina própria do cólon, que também continha elevado número de células dendríticas inflamatórias $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{-}$. O tratamento da colite com IFX seguido de um desafio de microbiota levou à redução de linfócitos TCD4, TCD8 e γδ intraepiteliais, com acúmulo de células T ativadas, memória residentes e efetoras na lâmina própria, em comparação com o número reduzido desses linfócitos na ausência de tratamento com IFX. Além disso, o bloqueio do TNF reduziu a expressão de IL-1β e IL-6 e aumentou a expressão de CYP11B1, uma enzima esteroidogênica responsável pela produção de cortisol anti-inflamatório. Porém o desafio antigênico elevou significativamente a expressão de IL-13, mas reduziu a expressão das enzimas esteroidogênicas, CYP11A1 e CYP11B1O. O mais interessante é que a permeabilidade intestinal foi aumentada, assim como a atividade de proliferação das células nos linfonodos mesentéricos. Esses dados sugerem que, embora o IFX possa controlar a inflamação na colite aguda, seus efeitos tardios comprometem a capacidade do hospedeiro de lidar com um novo desafio, como uma disbiose intestinal que ocorre durante a recaída da doença.

Palavras-chave: Mucosa intestinal; Disbiose; Infliximab; Doença Inflamatória Intestinal.

ABSTRACT

SILVA, J.L. **Effects of sustained inflammation and immunomodulatory treatment with anti-TNF in the control of experimental colitis.** 2018 111f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Inflammatory Bowel Diseases (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, are the result of a dysregulated immune response in the intestine of genetically susceptible individuals presenting with intestinal dysbiosis. These diseases are usually treated with monoclonal antibodies, such as anti-TNF, Infliximab (IFX). However, little is known about how TNF blockade affects host response when a new break in intestinal homeostasis occurs during relapse of the disease. In this study, we evaluated the late effects of IFX treatment in experimental colitis with a new challenge of dysbiosis. Mice treated with IFX had remission of colitis. However, the treatment did not protect against disease recurrence, which resulted in increased circulating mononuclear cells and decreased neutrophils, in contrast to reduced macrophage activity and increased neutrophil infiltrate in the colon after challenge. These animals also had a decrease in the lymphocyte epithelial barrier and increased lymphocytes in the lamina propria of the colon, which also contained a high number of inflammatory dendritic cells $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{-}$. Treatment of IFX colitis followed by a microbiota challenge led to reduction of intraepithelial TCD4, TCD8 and γδ lymphocytes with accumulation of activated T cells, resident and effector memory in the lamina propria, compared to the reduced number of these lymphocytes in the absence of treatment with IFX. In addition, TNF blockade reduced IL-1β and IL-6 expression and increased expression of CYP11B1, a steroidogenic enzyme responsible for the production of anti-inflammatory cortisol. However, antigen challenge significantly elevated IL-13 expression, but reduced expression of steroidogenic enzymes, CYP11A1 and CYP11B1. Interestingly, the intestinal permeability was increased, as was the proliferation activity of the cells in the mesenteric lymph nodes. These data suggest that although IFX can control inflammation in acute colitis, its late effects compromise the host's ability to cope with a new challenge, such as intestinal dysbiosis that occurs during relapse of the disease.

Key words: Intestinal Mucosa; Dysbiosis; Infliximab, Inflammatory Bowel Disease

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Avaliação do peso, escore clínico e expressão relativa de DNA de bactéria presentes microbiota de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias.

Figura 2: Avaliação do peso, escore clínico e expressão relativa de DNA de bactéria presentes microbiota de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias.

Figura 3: Avaliação do peso e escore clínico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 4: Contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados com microbiota (MB) em disbiose

Figura 5: Quantificação de leucócitos no baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 6: Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 7: Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose

Figura 8: Avaliação a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) no colón de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 9: Dosagem de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*) no colón de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose

Figura 10: Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 11: Avaliação do peso e escore clínico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 12: Quantificação de leucócitos do sangue periférico e contagem diferencial das subpopulações de leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 13: Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 14: Cultura *ex vivo* de células de baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados com ou não com infliximab (IFX).

Figura 15: Detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A), N-acetilglicosaminidase (NAG) (B) e eosinófilo-peroxidase (EPO) (C) no colón de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 16: Imunofenotipagem de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 17: Imunofenotipagem de linfócitos da lâmina própria (LP) do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 18: Imunofenotipagem de linfócitos ativados e de memória residentes na lâmina própria (LP) do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX.)

Figura 19: Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (LIE) de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 20: Avaliação da expressão de quimiocinas do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 21: Avaliação da expressão de quimiocinas do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 22: Avaliação da expressão de enzimas precursoras de corticosterona no cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 23: Avaliação da expressão das tight juntions no cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 24: Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 25: Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 7 dias e tratados ou não com infliximab (IFX).

Figura 26: Avaliação do peso e escore clínico de animais expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 7 dias, tratados com Infliximab (IFX) e desafiados ao 13º dia com MB em disbiose. A eutanásia dos animais tratados ou não com IFX foi realizado 24 horas após o desafio com MB em disbiose.

Figura 27: Quantificação de leucócitos do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose

Figura 28: Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 29: Cultura ex vivo de células de baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados com infliximab (IFX).

Figura 30: Detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A), N-acetilglicosaminidase (NAG) (B) e eosinófilo-peroxidase (EPO) (C) no colón de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose

Figura 31: Imunofenotipagem de leucócitos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 32: Imunofenotipagem de linfócitos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 33: Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (LIE) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose.

Figura 34: Avaliação da expressão de quimiocinas presentes no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose

Figura 35: Avaliação da expressão de citocinas presentes no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose.

Figura 36: Avaliação da expressão de enzimas precursoras de corticosterona no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose.

Figura 37: Avaliação da expressão das proteínas de *tight juntions* no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose.

Figura 38: Avaliação da permeabilidade intestinal pela quantificação de FITC-Dextran presente no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

Figura 39: Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX)) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de anticorpos conjugados a fluoroforos utilizados para imunofenotipagem no estudo da inflamação intestinal

Tabela 2: Relação de primers utilizados par a determinação de citocinas, *tight junctions*, quimiocinas e enzimas importantes no estudo da inflamação intestinal

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ºC – Graus Celsius.

Δ – Variação.

µL – Microlitro.

µm – Micrômetro.

ANOVA – Análise de variância simples.

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos, do inglês "*antigen presenting cells*".

BrdU –Bromodeoxiuridina

BSA – Fração V da albumina sérica bovina, do inglês "*bovine serum albumin*".

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CCL – Quimiocina com motivos C-C, do inglês "*chemokine".*

CD – Doença de Crohn, do inglês "*Crohn's disease*".

cDNA – DNA complementar, do inglês "*complementary DNA*".

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais.

CO_2 – Dióxido de carbono.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

ConA – Concanavalina A.

cm – Centímetro.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CTLA-4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, do inglês "*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4".*

CX_3CR1 - Receptor 1 da quimiocina CX_3C, do inglês "*Chemokine (C-X-C motif) ligand".*

DCs – Células Dendritícas, do inglês *"dendritic cells".*

DII – Doença(s) Inflamatória(s) Intestinal(is).

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês "*deoxyribonucleic acid"*.

DO – Densidade óptica.

DSS – Dextran Sulfato de Sódio.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês "*ethylenediaminetetraacetic acid"*.

ELISA – Imunoensaio enzimático, do inglês "*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay".*

EPO – Eosinófilo-peroxidase (enzima).

FACS – Separação de células ativada por fluorescência, do inglês "*Fluorescence-activated Cell Sorting".*

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Fas-L (CD178; TNFSR6) – Faz ligante.

FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

FOXP3$^+$ - do inglês "*Forkhead box P3".*

g – Gramas.

GATA – 3 - Proteína de Ligação GATA -3, do inglês "*GATA binding protein 3".*

GITR – Membro da superfamília do receptor de TNF induzido por glicocorticoides, do inglês "*glucocorticoid-induced TNF receptors Family".*

H&E – Hematoxilina e eosina.

H_2O – Água.

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico.

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks, do inglês "*Hank's balanced salt solution".*

HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico.

HCL – Ácido clorídrico.

HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio.

IEC – Células epiteliais intestinais, do inglês "*intestinal epithelial cells".*

i.p – intraperitoneal.

IFN-γ – Interferon gama.

IFX – Infliximab.

IgG – Imunoglobulina G.

IL – Interleucina.

ILC – Células linfoides inatas.

Kg – Quilograma.

$KHCO_3$ – Carbonato de potássio.

KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico.

LIE – Linfócitos intraepiteliais.

LIR – Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação.

LP – Lâmina Própria.

LPS – Lipopolissacarídio.

LTB4 – Leucotrieno B4

M – Molar.

MB – Microbiota

MBN – Microbiota normal

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócito.

mg – Miligrama.

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio.

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal.

mL - Mililitros

MLN – Linfonodos mesentéricos.

mM – Milimolar.

MPO – Mieloperoxidase (enzima).

Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio dibásico.

NaCl – Cloreto de sódio.

$NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio.

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas.

NF-κB – Fator nuclear κB.

NH_4Cl – Cloreto de amônio.

NK – Exterminadora natural (célula), do inglês "*natural killer".*

NLRs – Receptores do tipo NOD, do inglês "*NOD-like receptors".*

nm – Nanômetro.

nM – Nanomolar.

NO – Óxido nítrico.

NOD – Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos.

OPD – Dicloridrato de o-fenilenediamina.

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos.

PBS – Solução salina tamponada com fosfato.

PD-1 – Proteína de morte celular programada 1.

Pg – Picograma.

pH – Potencial hidrogeniônico.

PI – Iodeto de propídio.

PP – Placas de Peyer.

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão.

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa.

RNA – Ácido ribonucleico.

RNAm – RNA mensageiro.

RPMI – Meio de cultura RPMI 1640.

SFB – Soro Fetal Bovino.

SPF – Livre de patógenos específicos.

T CD4$^+$ - Linfócito T CD4$^+$.

T CD8$^+$ - Linfócito T CD8$^+$.

T–bet – Fator de transcrição específico de linfócitos Th1.

TCR - Receptor de células T.

TGF-β – Fator de transformação e crescimento beta.

Th – Linfócitos T auxiliar.

TLR – Receptores Tipo *Toll*.

TMB – 3, 3',5, 5'-tetrametilbenzidina.

TNBS – Ácido 2,4,-trinitrobenzenosulfônico.

TNF – Fator de necrose tumoral.

Treg(s) – Linfócito(s) T reguladore(s).

UC – Colite Ulcerativa.

USP – Universidade de São Paulo.

WT – Camundongos do tipo selvagem, do inglês "*wild type".*

Sumário

Resumo 9
Abstract 10
Legendas das Figuras 11
Lista das tabelas 16
Lista de abreviaturas e siglas 17
1. Introdução 24
1.1 Doença Inflamatória Intestinal 25
1.2 Epidemiologia 26
1.3 Colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio 26
1.4 Resposta imune na doença inflamatória intestinal 27
1.5 O papel da microbiota intestinal 30
1.6 Tratamentos na doença inflamatória intestinal 32
1.7 Tratamento com o imunobiológico anti-TNF 33
1.8 Justificativa 34
2. Objetivo 34
2.1 Objetivo geral 35
2.2 Objetivo específico 35
3. Metodologia 36
3.1 Animais. 37
3.2 Purificação da Imunoglobulina G humana (IgG) e cromatografia de afinidade 37
3.3 Indução de inflamação intestinal experimental e tratamento 38
3.4 Desafios com microbiota em disbiose 39
3.5 Avaliação do escore clínico 40
3.6 Transplante de microbiota intestinal 40
3.7 Coleta das amostras e análises subsequentes 40
3.8 Contagem total e diferencial de leucócitos e separação do soro 40
3.9 Análise Histopatológica. 41
3.10 Ensaio da mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG). 42
3.11 Separação de leucócitos e citometria de fluxo. 43
3.12 Imunofenotipagem de células do baço, MLN, linfócitos intraepiteliais e da

lâmina própria 44
3.13 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real 46
3.14 Quantificação de citocinas por ELISA. 48
3.15 Ensaio de permeabilidade intestinal por FITC-Dextran 49
3.16 Cytometric Bead Array (CBA) 49
3.17 Dosagem de LPS no soro 50
3.18 Proliferação com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD) 50
3. 19 Análise estatística 50
4. Resultados capítulo 1 51
4.1. Avaliação do perfil imunológico de camundongos submetidos à uma nova disbiose 51
4.1.1 Avaliação clínica da inflamação intestinal induzida experimentalmente e da competência imunológica de camundongos após o desafio com microbiota em disbiose (MB) 52
4.1.2 Quantificação de leucócitos circulantes e em órgãos linfoides secundários após o desafio 54
4.1.3 Perfil fenotípico de leucócitos presentes no baço e nos linfonodos mesentéricos (MLN) após nova disbiose em camundongos submetidos a colite experimental 55
4.1.4 Quantificação de mieloperoxidase, N-acetilglicosaminidase e eosinófilo-peroxidase no intestino 57
4.1.5 Influência do desafio com microbiota em disbiose na produção de citocinas no intestino 58
4.1.6 Quantificação de Lipopolissacarideo (LPS) bacteriano no sangue após desafio com microbiota em disbiose em animais submetidos à colite experimental 59
4. Resultados capítulo 2 61
4.2 - Impactos do tratamento com anti-TNF em camundongos submetidos à colite experimental 61
4.2.1 Efeitos do anti-TNF na atividade clínica da inflamação intestinal induzida experimentalmente de camundongos submetidos à colite experimental 62
4.2.2 Influência do tratamento com anti-TNF nos leucócitos totais e na contagem diferencial do sangue periférico 64
4.2.3 Perfil fenotípico de leucócitos presentes em diferentes órgãos após tratamento com anti-TNF 65

4.2.4 Cultura *ex vivo* de esplenócitos e células dos linfonodos mesentéricos de camundongos tratados com infliximab 67
4.2.5 Quantificação de mieloperoxidase, N-acetilglicosaminidase e eosinófilo-peroxidase após a terapia com anti-TNF 68
4.2.6 Perfil fenotípico de leucócitos presentes em diferentes órgãos após tratamento com anti-TNF 69
4.2.7 Efeito do tratamento com infliximab (IFX) na expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no cólon de camundongos submetidos à colite experimental 72
4.2.8 Influência do tratamento com anti-TNF na expressão de citocinas intestinais 75
4.2.9 Avaliação do tratamento com anti-TNF na expressão de enzimas envolvidas na produção de corticosterona de camundongos expostos ao DSS 3% 75
4.2.10 Avaliação da expressão das moléculas de adesão *tight junctions* em camundongos tratados com infliximab (IFX) após exposição à água contendo DSS 3% 76
4.2.11 Efeitos da terapia com anti-TNF na permeabilidade intestinal 78
4. Resultados capítulo 3 80
4.3 - Impactos do tratamento com anti-TNF em camundongos submetidos à colite experimental após nova disbiose 80
4.3.1 Efeitos do anti-TNF na recidiva da doença após nova disbiose em camundongos submetidos a colite experimental 81
4.3.2. Investigação dos mecanismos de recaída da doença após tratamento com IFX 82
5. Discussões 94
6. Conclusão 102
7. Referências 104
8. Anexo I 111

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

O sistema imunológico lida, frequentemente, com diversos microorganismos infecciosos, de modo a controlar as invasões e restaurar a homeostase dos tecidos. Nas barreiras epiteliais, onde há constante exposição microbiana, a imunidade efetiva requer componentes estruturais, bem definidos, que proporcionam a segregação espacial da microbiota e a manutenção da função do órgão, assegurando o equilíbrio entre a tolerância a antígenos ambientais e imunidade protetora[1].

Doenças inflamatórias que afetam os sítios de barreira desenvolvem-se como resultado de uma variação na homeostase do tecido e subsequente falha na regulação das respostas imunes contra antígenos ambientais ou microbianos[1]. Neste contexto, um conjunto específico de enfermidades que afetam os tecidos do trato gastrintestinal, chamado de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), caracteriza-se por condições imuno-mediadas, acompanhadas por inflamação crônica do cólon e/ou do intestino delgado. As DII englobam dois tipos principais; a Colite Ulcerativa (UC) e a Doença de Crohn (CD)[2].

A UC e CD partilham manifestações clínicas semelhantes, como dores abdominais, diarreias recorrentes, sangue nas fezes, febre em alguns casos, diminuição do apetite nos períodos de exacerbação da doença e risco aumentado para desenvolvimento de câncer de cólon[3]. Entretanto, diferem-se em alguns pontos como a localização da inflamação; na CD esta pode ser observada ao longo de todo o trato gastrointestinal, comprometendo toda a parede do intestino, enquanto que na UC é restrita ao intestino grosso[4].

A UC é também caracterizada por repetitivos episódios de inflamação limitada à camada mucosa do cólon, com presença de sangramento intestinal, dores abdominais, fadiga devido à anemia e perda de peso. As manifestações físicas incluem irritação perianal, hemorroidas, fissuras e abscessos[5]. Por outro lado, na CD há envolvimento transmural, lesões e granulomas que podem provocar fibrose, obstrução intestinal e fístulas. Há dores abdominais na CD, com má absorção de nutrientes, aumento da fadiga e, como consequência, perda de peso e anorexia [6]. As manifestações clínicas incluem também irritação perianal além de inchaço abdominal e pélvico[5]. Sendo assim, é notável o grande impacto que as DII possuem na qualidade de vida dos pacientes, principalmente devido ao início precoce, curso da doença e a falta de cura ou controle adequado para grande parte dos indivíduos afetados. Além disso, os tratamentos

atualmente disponíveis e mais eficazes para CD e UC apresentam altos custos, o que traz, também, consequências sócio-econômicas para o sistema de saúde envolvido e seus usuários [7].

1.2 Epidemiologia

A prevalência das DII pode variar conforme as regiões geográficas. Países desenvolvidos como os do continente europeu apresentaram um dos maiores índices da doença, tanto para a UC, quanto para CD[8]. Dados tem revelado que na Europa cerca de 286 a cada 100.00 pessoas são diagnosticadas com UC por ano e aproximadamente 7 a cada 100.000 no continente asiático e no oriente médio, enquanto que na América do norte, a incidência anual chega a 319 para cada 100.000 indivíduos diagnosticados anualmente[8, 9].

Nos Estados Unidos, onde o número de indivíduos acometidos chega a um milhão de enfermos, estima-se que os gastos se aproximem de US$ 6 milhões e, no Canadá que possui menor taxa de indivíduos acometidos com a doença, cerca de 200.000 pessoas, o governo tem um gasto de aproximadamente US$ 920 milhões anuais[10, 11]. No continente europeu estima-se um total de 2-3 milhões de enfermos, com despesas de aproximadamente € 6 bilhões por ano em saúde pública destinada para os tratamentos indivíduos. Tais gastos citados estão relacionados a cirurgias, internações, medicamentos, cuidados ambulatoriais e investimentos em imunobiológicos[7, 12].

Embora a grande incidência seja majoritariamente em países desenvolvidos, nota-se que na última década, tem-se observado um aumento relevante nos países em desenvolvimento como os da Ásia e da América do Sul. Alguns estudos epidemiológicos apontam que esse crescimento está ligado com os processos de urbanização, juntamente com mudanças de hábitos de vida que contribuem para o aumento da incidência[13].

Estudos realizados no Brasil revelaram, no estado de São Paulo, uma incidência entre 3,5 - 4,48 para cada 100.000 indivíduos com UC, enquanto que as taxas da CD são de aproximadamente 5,65 - 14,81 para cada 100.000 pessoas. No Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP os casos atendidos giram em torno de 35 a 40 por semana, exigindo assim, um acompanhamento constante de agências de saúde pública e estudos precisos para a determinação da necessidade de intervenção terapêutica[4].

1.3 Colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio

Vários modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais tem sido utilizados para se estudar as alterações imunológicas no trato gastrointestinal. Esses estudos podem ser

classificados de acordo com o desenvolvimento da colite, que podem ser espontânea, colite induzida ou por transferência adotiva de células[14]. Os modelos mais utilizados são os colitogênicos químicos como por exemplo o dextran sulfato de sódio (DSS), oxazolona e o ácido trinitrobenzeno (TNBS) devido a facilidade de indução e controle sobre o início, duração e intensidade da doença. Estes são meios experimentais já bem estabelecidos e utilizados há alguns anos em estudos pré-clínicos para averiguar a patogênese das DII[15]. Dentre estes três modelos citados, o mais vantajoso tem sido a colite induzida por DSS, pois induz dano tecidual, desenvolver colite aguda e/ou crônica, através de mudanças na concentração utilizada e na frequência em que os animais são expostos[6, 16].

O DSS é um polissacarídeo sulfatado solúvel em água, com peso molecular que pode variar entre 5 à 1400 kDa. Para a indução da colite em camundongos é necessário a administração de aproximadamente 35 kD misturados em água potável. Esse agente colitogênico não induz diretamente a inflamação intestinal, porém, age como uma toxina química atingindo o cólon, o que resulta em lesão tecidual[16]. Estudos tem demonstrado que o composto compromete a integridade da barreira epitelial, redistribuição das proteínas que compõem as *tight junctions*, como ocludina, zonula occludens – 1 (ZO-1), claudinas, além do aumento da apoptose das células intestinais. Com o comprometimento da barreira epitelial, ocorre o aumento da translocação bacteriana e dos antígenos associados à mucosa, disparando uma resposta pró-inflamatória, degradação de mucinas, degeneração tecidual e aumento do infiltrado de neutrófilos[17, 18].

1.4 Resposta imune na doença inflamatória intestinal

Como as DII caracterizam-se por inflamação crônica e recorrente da mucosa intestinal, é bem estabelecido que tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa desempenham um papel importante na patogênese da doença, juntamente a outros fatores descritos anteriormente. Sabe-se que essas doenças são resultantes da resposta imune de mucosa desregulada, com o envolvimento de bactérias da microbiota intestinal e susceptibilidade genética[7]. A homeostase do intestino baseia-se, inicialmente, no funcionamento adequado de componentes da imunidade inata, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas existentes na mucosa intestinal. Tais células expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os *Toll Like Receptors* (TLR) e receptores tipo NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*). Estes reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) que possuem em sua parede celular substâncias como lipopolissacarídeos, lipoproteínas, flagelinas, dentre outras[19, 20]. Uma vez que

os PRRs reconhecem os PAMPs, há ativação de fatores de transcrição tanto das células de Paneth, que liberam defensinas, como nos macrófagos e células dendríticas, que levam à produção de citocinas, ativando a resposta inflamatória local e a diferenciação de células T[21].

As mucinas produzidas pelas células caliciformes, bem como as defensinas produzidas como peptídeos anti-microbianos, auxiliam no controle da disbiose intestinal e da doença, possivelmente contribuindo para o balanço da imunidade local. Sabe-se, por exemplo, que camundongos com colite induzida experimentalmente possuem elevada expressão de MUC4 e da defensina Reg3β, enquanto que camundongos geneticamente deficientes para MUC2 apresentam danos no cólon distal após quatro semanas de indução da colite. Estes fatores estão relacionados à diminuição da expressão dos receptores TLR2 e TLR5, da resposta anti-inflamatória e das células T reguladoras[19].

Já é bem descrito na literatura que pacientes com UC possuem resposta imune descontrolada de perfil T_H2, com produção das citocinas IL-4 e IL-5, além de IL-13, que tem importante papel no desenvolvimento das lesões. A IL-13 produzida pelos linfócitos T $CD4^+$ e pelas células linfoides inatas tem efeito direto na barreira epitelial, pois promove a apoptose das células epiteliais, comprometendo as junções celulares e fazendo com que a permeabilidade paracelular aumente[22, 23]. Em camundongos geneticamente deficientes em IL-13 expostos ao DSS há menor grau de intensidade da doença, menor expressão de claudina-2 e consequentemente diminuição da permeabilidade intestinal[24, 25]. Está bem elucidado na literatura que durante a inflamação intestinal as ocludinas e ZO-1 são internalizadas, enquanto que, claudina-2 é altamente expressa[25]. Esse aumento leva à formação de poros na membrana celular permitindo a passagem de Ca^+ e consequentemente maior permeabilidade intestinal com translocação bacteriana. Assim, tanto em pacientes quanto em modelos experimentais a expressão aumentada de claudina-2, pode facilitar os quadros de diarreia[22, 24, 25]

Em contrapartida, os pacientes com CD, possuem perfil de resposta T_H1 exacerbado. Os linfócitos T $CD4^+$ naive respondem às sinalizações das citocinas IFN-γ e IL-12, ativando fatores de transcrição T-bet, STAT4 e STAT1. Estes estimulam a diferenciação de células T_H1, enquanto que a citocina IFN-γ produzida por essas células tem ação autócrina, amplificando este perfil de resposta imune. Em adição, IL-12 e IL-18 intensificam a inflamação na mucosa e o TNF-α amplifica a deterioração da lâmina própria intestinal[22].

De fato, pacientes com CD produzem TNF-α e IFN-γ de forma exacerbada, o que leva à expressão de proteínas relacionadas com a apoptose das células epiteliais (caspase-1, 3 e 7) e inibição de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-X_L, o que resulta em apoptose induzida

do epitélio intestinal. A morte dessas células implica na perda da capacidade de absorção de nutrientes pelo intestino, bem como no aumento da disbiose intestinal e destruição do tecido, comprometendo a saúde destes indivíduos[21].

O perfil de resposta T_H17 também pode contribuir para a patogênese das DII, uma vez que há elevada expressão de IL-17 em lesões intestinais de pacientes com UC e CD[26]. A IL-17A age no endotélio vascular intestinal, promovendo o aumento da expressão das quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL5, que são quimioatraentes para neutrófilos. Uma vez recrutados para os sítios inflamatórios, há ativação do fator de transcrição NF-κB, indução da resposta pró-inflamatória com produção de espécies reativas de oxigênio, morte celular e comprometimento da função da barreira epitelial. Além disso, a IL-17A também age sobre os macrófagos, estimulando a produção de mediadores inflamatórios, como o TNF-α[27, 28].

A inflamação intestinal exacerbada que ocorre devido à ativação das células T, muitas vezes está relacionada com falhas na regulação da resposta imune, sendo que as células T reguladoras exercem importante papel neste contexto, auxiliando na homeostasia da mucosa. A frequência da população de células $FoxP3^+$ no tecido inflamado dos pacientes com DII é superior àquela de indivíduos controles, sugerindo que o acúmulo de Tregs nesses tecidos deve estar relacionado à tentativa de controle da inflamação local[29].

As Tregs expressam os receptores inibitórios CTLA-4, PD-1, GITR, TIGIT (análogo ao CTLA-4), CD39, dentre outro, além de citocinas imunomoduladoras como IL-10, TGF-β [30]. Estes mecanismos por sua vez, podem regular a ativação das células Th1 e Th17, tornando-se fundamental o equilíbrio entre esses perfis de respostas para o controle das DII. O butirato, um importante ácido graxo que fornece energia para colonócitos, regula a ação das células Th17 pelo aumento dos níveis das células Tregs no sangue periférico, controlando a inflamação[30, 31]. Por outro lado, o tecido intestinal inflamado possui elevada expressão da molécula Tl1A (tumor necrosis factor-like ligand 1A) que inibe as funções das células Tregs, levando a falhas na regulação dos linfócitos T efetores, o que culmina no agravamento da doença[32]. Contudo, a regulação negativa do Tl1A melhora a colite murina e pode promover o aumento de células T reguladoras, diminuindo a ativação das células T[33]. Já a upregulação do fator de transcrição ThPOK pode aumentar a expressão de células $FoxP3^+$ durante a inflamação intestinal, intensificando a função supressora das Tregs e das $CD4_{IELS}$, diminuindo o infiltrado celular e controlando a atividade da doença[34].

1.5 O papel da microbiota intestinal

Além da resposta imune descontrolada, que pode ser facilitada por fatores genéticos, ambientais e alterações no sistema imune, a microbiota compõe um elemento chave que contribui para a patogênese da doença[35]. Já está descrito muito bem na literatura que pacientes com DII apresentam disbiose intestinal contribui para o desenvolvimento da doença e agravamento dos quadros de inflamação e recidiva[35, 36]. As bactérias comensais, por exemplo, ajudam na manutenção da homeostasia em resposta às moléculas que são produzidas pelos enterócitos, macrófagos e células dendríticas, juntamente com os linfócitos T e B. Essa relação de comensalismo entre as células imunes e não imunes da mucosa é parcialmente mediada por receptores do tipo *toll* e pode ser determinante para a manutenção da homeostasia, saúde e doença do paciente[37, 38]. Pesquisas recentes mostraram que um reconhecimento defeituoso do receptor TLR1, que reconhece peptídeoglicanos e lipoproteínas bacterianas no epitélio intestinal, pode comprometer a homeostasia local diminuindo a produção de muco, destruir as células de Paneth e aumentar o infiltrado inflamatório. Portanto a ativação de receptores do tipo *toll* 1 pode fornecer sinais que regulam a homeostasia intestinal, diminuindo os quadros inflamatórios[37]. A modulação de determinadas populações bacterianas pode estar associada à piora em pacientes com DII, levando à perda da diversidade bacteriana responsável pela normobiose[39].

No contexto de disbiose intestinal, há por exemplo, redução das bactérias anaeróbicas comumente encontradas no cólon, tais como *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Firmicutes* [40, 41]. Nos indivíduos com CD, observa-se menos bactérias *Firmicutes*, *Clostridium* e *Faecalibacterium*, com aumento do grupo das *Proteobacterias* e *Bacteriodetes.* Nos indivíduos com CD ileal pode haver *Escherichia coli* invasiva (AIEC), contribuindo para o aumento de *Proteobacterias*. Já os pacientes com UC apresentam menor quantidade de *Bacteroidetes* e maior incidência do grupo *Enterobacteriaceae sp.* Estas bactérias, por sua vez, invadem o epitélio intestinal e replicam-se dentro dos enterócitos, causando inflamação[40, 41, 42].

A microbiota intestinal é essencial para numerosos processos fisiológicos, incluindo a digestão de alimentos, desenvolvimento do sistema imunológico do intestino e proteção a microrganismos patogênicos. Contudo, a ruptura da homeostase da barreira epitelial, pode levar ao desenvolvimento de várias perturbações locais, como o aumento da secreção de muco, infecções por patógenos, exacerbação da inflamação e possível aumento da atividade da doença [43, 44]. Além disso, a recidiva dos pacientes com DII pode ser desencadeada por diversos fatores como estresse, cigarro, bem como a própria composição da microbiota intestinal[45, 46]. Esta, por exemplo, pode influenciar na diminuição de células $FoxP3^+$ e aumentar o infiltrado celular

inflamatório, danificando assim, o tecido intestinal e intensificando a atividade da doença[34]. Durante a recidiva da colite experimental em camundongos tem-se observado o crescimento de certas bactérias *Clostridiales,* relacionadas à expansão de células T $CD4^{+}FoxP3^{-}RORyt^{+}$, que por sua vez produzem IFN-γ e IL17A, indicando assim, a influência da microbiota sobre a inflamação intestinal[47]. Além disso, foi observado a microbiota intestinal de pacientes com DII pode contribuir para a recidiva da doença após a interrupção do tratamento. Estudos apontam que a retirada do uso continuo do anti-TNF pode reduzir a população de *Firmicutes* e *Bacteroidetes,* e contribuir para a recaída da doença nestes pacientes[48, 49].

1.6 Tratamentos na doença inflamatória intestinal

A patogênese da DII envolve a ativação dos leucócitos com alta produção de mediadores inflamatórios, que culminam em lesão tecidual. Neste sentido, um dos principais objetivos das terapias para CD e UC é bloquear a ação do sistema imune pela inibição das citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores da resposta que podem estar envolvidos na exacerbação da inflamação e do dano tecidual [50]. De forma geral, o tratamento é escolhido com base na extensão e grau de severidade da doença, resposta a terapias prévias e hábitos de cada paciente. A redução dos processos inflamatórios juntamente com o controle da sintomatologia clínica da doença é possível devido à utilização de terapia farmacológica, tanto para UC como para CD [51]. Existem dois métodos terapêuticos até o momento, o *step-up* e/ou *top-down*. A primeira é uma abordagem clássica, na qual o nível de tratamento aumenta de acordo com a gravidade da doença. Por outro lado, a segunda inicia-se de forma mais intensa, utilizando os imunobiológicos, como um método rápido para conter a inflamação. Em conjuntos essas estratégias terapêuticas visam evitar futuras complicações e/ou recidivas da doença[52].

Desse modo, o tratamento das DII depende do equilíbrio entre a eficácia e os efeitos colaterais dos fármacos utilizados, além da frequência de recidiva da doença, extensão, gravidade da inflamação e presença de manifestações extra-intestinais, o que indica complicações graves. Atualmente, várias terapias farmacológicas têm sido majoritariamente indicadas para as DII, como os aminosalicilatos, antibióticos, tiopurinas, antagonistas do ácido fólico[51, 52]. Em adição, existem outras abordagens terapêuticas como por exemplo, o uso de células mesenquimais, células tronco hematopoiéticas e anticorpos que neutralizam a ação de citocinas de perfil inflamatório, como os imunobiológicos[51, 53].

1.7 Tratamento com o imunobiológico anti-TNF

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina que desempenha importante papel na patogênese da DII, bem como em outras doenças imunológicas tais como a artrite reumatóide, espondilite anquilosante e psoríase. Assim, o tratamento com o imunobiológico anti-TNF, que tem por base anticorpos monoclonais, pode ser altamente eficaz no controle da CD[54].

Diferentes anticorpos anti-TNF já foram desenvolvidos e um dos mais utilizados é o Infliximab (IFX). O IFX é um anticorpo monoclonal quimérico, em que toda a porção Fc e as cadeias constantes da Fab são formadas por regiões de origem humana, enquanto que as cadeias variáveis presentes na porção Fab são de origem murina[55]. Este fármaco, por sua vez, interage com o sítio de ligação do TNF de membrana plasmática, principalmente em células da imunidade inata e ativa as caspases 3, 8 e 9, que aumentam a expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak, regulando a resposta imune de mucosa[56, 57].

Outra função do anti-TNF-α é controlar a ativação das populações de células T. Tem-se observado a partir de amostras de sangue periférico de pacientes tratados com IFX, um significativo aumento das populações $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ e $CD4^{+}CD25^{-}Foxp3^{+}$, sugerindo que o IFX estimula a função das Tregs pela inibição das células T efetoras, mostrando a eficácia deste imunobiológico no tratamento das DII (. Além disso, o IFX pode regular negativamente a expressão de CD25 das células T efetoras, acarretando na supressão das populações $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$, diminuindo a ativação das T efetoras, secreção de citocinas pró-inflamatórias, melhorando o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes[58].

Já é amplamente descrita a utilização do IFX em modelos experimentais de colite, nos quais estes anticorpos atuam por meio da ligação ao TNF e diminuição da atividade da doença em camundongos. Logo, esta melhora é devido ao efeito direto que o IFX exerce sobre o TNF–α solúvel e também sobre a citocina de membrana presente nas células da mucosa intestinal, do sistema imunológico, fibroblastos e enterócitos. Portanto, mesmo sendo um anticorpo quimérico destinado ao uso humano, o IFX tem mostrado resultados favoráveis em modelos murinos de colite, sugerindo que a melhora dos camundongos está relacionado com a utilização deste fármaco, quando comparados aos animais tratados com outras drogas. De fato não há dúvidas de que o IFX modula a resposta imune e que os efeitos deste fármaco vão além de apenas antagonizar a citocina TNF[55, 56, 59]. Porém, estudos anteriores relataram que alguns pacientes não respondem a terapia ou recaem após a resposta inicial ao anti-TNF, cerca de 10,53% dos pacientes com CD e 25% com UC sofrem recidiva após 22 semanas de tratamento [49, 60].

De forma geral, as DII afetam milhares de pessoas globalmente, causando sinais e sintomas como dor abdominal, diarréia, sangramento retal, perda de peso, febre e fadiga, além de obstrução intestinal e fístulas. A inflamação grave pode causar danos prolongados e irreversíveis na função e estrutura gastrintestinal, além de desencadear o desenvolvimento de outras doenças como câncer cólon-retal. Sendo assim, tendo em vista o exposto acima, é de extrema relevância avaliar como o sistema imune é afetado pela inflamação intestinal exacerbada, assim como as consequências destes danos teciduais frente a novos desafios antigênicos. Além disso, ainda não se sabe como as principais terapias para essas doenças, como o anti-TNF, atuariam no controle da inflamação exacerbada e de suas possíveis sequelas na imunidade dos indivíduos com DII.

1.8 Justificativa

As doenças inflamatórias intestinais (DII) podem desencadear importantes alterações na mucosa intestinal, além de comprometer o sistema imunológico e causar grande debilidade nos pacientes. Tal alterações no sistema imunológico acarreta em dores abdominais, sangramento retal, perda de peso, má absorção de nutrientes, dentre outros sinais e sintomas em indivíduos com colite ulcerativa ou doença de Crohn. Portanto, é de extrema relevância a avaliação dos impactos da inflamação intestinal exacerbada na competência imunológica dos indivíduos afetados, durante e após a ruptura da normobiose intestinal.

Até o momento, não se sabe como o tratamento com anti-TNF pode impactar as respostas imunológicas frente à recidiva da doença e a futuros desafios infecciosos. Dessa forma, estudos sobre inflamação exacerbada, consequências teciduais a longo prazo, tratamento com os imunobiológicos e a resposta a futuros desafios antigênicos contribuem para o melhor conhecimento da etiologia das DII.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os impactos da inflamação intestinal e da atividade imunomoduladora do tratamento com anti-TNF na competência imunológica pós-colite experimental

2.2 Objetivos específicos

Avaliar como a disbiose intestinal poderá influenciar na recidiva da doença pós-colite experimental.

Analisar os efeitos do tratamento com IFX na resposta inflamatória e nas lesões teciduais de camundongos submetidos à colite experimental.

Averiguar os efeitos imunomoduladores do anti-TNF frente à recaída da doença induzida por nova disbiose intestinal.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais.

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, selvagens, de idade entre 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) *Campus* de Ribeirão Preto, ambientados em microisoladores no Biotério do *Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR)*, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: grupo I, camundongos controles, naives; grupo II, camundongos expostos ao DSS; grupo III, camundongos expostos ao DSS e desafiados com microbiota em disbiose no 16º dia experimental; grupo IV, camundongos expostos ao DSS e tratados com anti-TNF; grupo V, camundongos expostos ao DSS, tratados com anti-TNF e desafiados com transplante de microbiota em disbiose no 13º dia experimental; grupo VI, camundongos expostos ao DSS e tratados com IgG; grupo VII, camundongos expostos ao DSS, tratados com IgG e desafiados com microbiota em disbiose; grupo VIII, camundongos expostos ao DSS por 10 dias, não tratados e doadores de microbiota em disbiose. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCFRP/USP.

3.2 Purificação da Imunoglobulina G humana (IgG) e cromatografia de afinidade

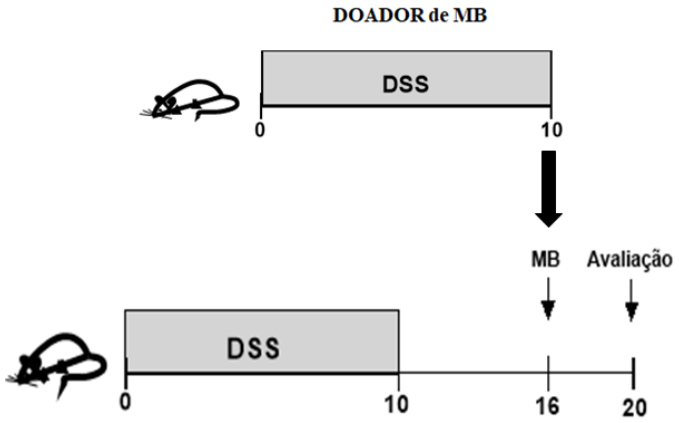
Primeiramente foi coletado o sangue de uma doadora do gênero feminino e colocado em um tubo contendo coagulante aguardando-se 10 minutos para que o mesmo fosse coagulado e centrifugado a 9000 xg por 15 min. O soro foi coletado e adiciou-se 50% do volume total de soro obtido com sulfato de amônia deixando sob agitação lente à 4º C *overnight* para precipitação das proteínas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 26000 xg por 1 (uma) hora. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 20 mL de PBS 1x com pH = 8,0. O sobrenadante foi colocado em um saco de diálise prendendo as duas extremidades e deixado em água destilada por 5 minutos. Posteriormente, o saco contendo a amostra foi deixado em PBS 1x durante 48 horas e de 4 em 4 horas o PBS foi trocado. Passadas as 48 horas, o saco de diálise foi adicionado em becker contendo 500 gramas de glicose D. anidra (P.A A.C.S [Synth]), para a concentração da solução de IgG e então centrifugado por 5000 rpm à 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para realização da cromatografia por afinidade em resina de sepharose G (Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden).

A cromatografia foi realizada por um coluna de sepharose G armazenada e conservada em PBS 0,02% de azida. Antes de colocar a amostra, a coluna foi lavada por 10 vezes com 0,1M de acetado de sódio, adicionando o reagente lentamente para não descompactar a coluna. Após as lavagens, foi colocado o sobrenadante do passo anterior. Ao esperar todo o líquido vazar pela extremidade da coluna, foi adicionado tampão glicina e o líquido oriundo dessa separação contendo a proteína foi guardado em diferentes tubos de 2 mL para posterior leitura no espectrofotômetro à 280 nm (Double Beam spectrophotometer U-2900/2910).

Após a leitura e quantificação da IgG, foi realizada a dosagem da proteína a partir do kit DC^{TM} Protein Assay Reagent (BIO-RAD, EUA. Cat. #500) seguindo as especificações do fabricante. Foi realizada uma curva padrão com diluição seriada e concentrações conhecidas (1,41 mg/mL; 0,94 mg/mL e sucessivamente). Ao final da dosagem, a concentração da amostra foi ajustada para 4,62 mg/mL. Para a administração nos animais controles, foi utilizado uma concentração de 5mg/mL via intraperitoneal (i.p).

3.3 Indução de inflamação intestinal experimental e tratamentos. A colite foi induzida com um único ciclo de administração exclusiva de água contendo Dextran Sulfato de Sódio (DSS) 3%, disponibilizado aos camundongos durante 10 ou 7 dias consecutivos. Os animais que foram expostos durante 10 dias foram desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose após 6 dias de retirada do agente colitogênico. Os animais que beberam água contendo DSS 3% por 7 dias, foram tratados ou não com o inibidor de TNF (anti-TNF, Remicade Infliximab IFX, Cilag AG, Suíça), diluído em solução salina, por via intraperitoneal (i.p.) a 5 mg/kg, dose única. Os grupos controles receberam IgG (i.p) a 5mg/Kg, dose única. Os animais doadores de MB em disbiose foram expostos ao agente colitogênico por 10 dias (Figura 1).

A



B

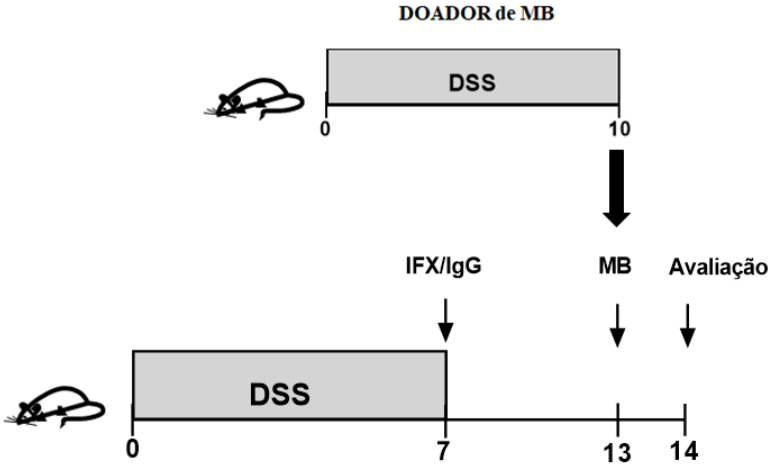


Figura 1: Desenho experimental de indução de colite, avaliação clínica e eutanásia dos camundongos C57BL/6 Animais foram tratados com dextran sulfato de sódio (DSS) por 10 dias no qual o agente indutor foi retirado. O reparo tecidual foi realizado por seis dias e no 16º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose provenientes de camundongos doadores expostos ao DSS por 10 dias. Quatro dias após o desafio os animais foram eutanasiados. **B-** Animais recebedores ou não de MB em disbiose, foram expostos ao DSS por 7 dias e tratados ou não com infliximab (IFX). Após 6 dias de reparo tecidual, os animais receberam a MB em disbiose do grupo doador, e após 24 horas foram eutanasiados para a realização dos experimentos. A administração de IFX (5mg/kg) ou IgG foi realizada por via intraperitoneal (i.p). O desafio foi realizado via gavagem, com 200 µL de suspensão fecal.

3.4 Desafios com microbiota em disbiose. Foram realizados dois protocolos experimentais, o primeiro consistia de expor os animais ao DSS 3% por 10 dias e após esse período retirar o agente indutor, aguardando 6 dias para o reparo tecidual. Ao 16º dia os camundongos foram desafiados com MB em disbiose provenientes de outros animais doares de MB que foi exposto ao DSS por 10 dias consecutivos. Esperado 4 dias, os animais foram eutanasiados e coletada as amostras. O segundo protocolo experimental consistia de expor os animais ao DSS por 7 dias, retirar o agente colitogênico e tratar ou não os animais com IFX, aguardando também 6 dias para o reparo tecidual. Ao 13º dia experimental os animais foram desafiados com MB em disbiose e eutanasiados 24 horas após o desafio os mesmos foram eutanasiados e colhido as

amostras para análise. Para os animais controles, sem desafio, eles receberam salina 0,9% via gavagem.

3.5 Avaliação do escore clínico. A presença de sinais da colite foi avaliada diariamente para efetuar o cálculo do escore clínico. Os parâmetros avaliados foram perda de peso, ânus molhado, diarreia, sangue nas fezes, pús, hipoatividade e piloereção.

3.6 Transplante de microbiota intestinal. Como doadores de microbiota, foram utilizados 3-5 camundongos C57BL/6 machos, expostos por 10 dias consecutivos à água contendo DSS 3%. Ao término desse período, eles foram eutanasiados e, após abertura da cavidade abdominal, foram realizados dois cortes, sendo um na altura da junção gastroduodenal e outro próximo ao reto. Assim, praticamente todo o intestino foi coletado e o ambiente do ceco preservado (sem contato com o ambiente externo). Após a coleta, o intestino de cada doador foi transferido para um tubo de fundo cônico de 50mL contendo 10mL de PBS estéril. A ponta do ceco de cada intestino foi cortada e, com a ajuda de uma pinça, o conteúdo fecal de todos os doadores foi transferido para um novo tubo contendo 40mL de PBS estéril. Essa suspensão foi homogeneizada por agitação vigorosa e em seguida filtrada para um novo tubo de fundo cônico, utilizando cell strainer de 70µm (BD Biosciences, procedência). O conteúdo fecal dos doadores foi mantido em gelo até o momento da transferência de microbiota. Com uma seringa de 1mL e uma agulha de gavagem estéril, 200uL do conteúdo fecal filtrado foi transferido por gavagem para cada receptor.

3.7 Coleta das amostras e análises subsequentes.

Em ambos os protocolos experimentais citados acima, foi coletado o sangue, intestino, baço e linfonodos mesentéricos (MLN) para as avaliações imunológicas e de inflamação tecidual.

3.8 Contagem total e diferencial de leucócitos e separação do soro

A contagem global de células foi realizada pela diluição de sangue total em solução de Turk na proporção 1:20. A concentração foi expressa por mL de sangue.

O esfregaço sanguíneo foi corado com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), que se utiliza do princípio de coloração hematológica de Romanowsky e examinado em microscópio (DM750, Leica, Wetzlar, Alemanha) com objetiva de 40x. A contagem foi

realizada na parte mais fina da extensão contando-se um total de 100 células. A contagem foi feita anotando-se separadamente cada tipo de leucócito identificado (neutrófilos, células mononucleares, eosinófilos e basófilos). O número relativo de leucócitos foi determinado de acordo com a frequência (%) encontrada nas respectivas populações celulares. Já a quantidade absoluta foi calculada multiplicando-se a frequência relativa dos leucócitos pelo número total de células obtido na contagem no hemocitômetro. O produto resultante foi dividido por 100 e expresso como número de células por mL de sangue.

O soro foi obtido pela centrifugação do sangue total a 5000 xg por 10 minutos, após um período de descanso de 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir a formação do coágulo. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e armazenado a -70°C para as análises posteriores.

3.9 Análise Histopatológica.

Para avaliar a morfologia e as alterações patológicas no intestino, os fragmentos do cólon coletados foram fixados em tampão fosfato (PBS 1X) contendo formol 10% por 24 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados através de sucessivas incubações com etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 95%) e colocados em incubação em uma mistura contendo álcool etílico absoluto e xilol em proporção 1:1. Na sequência, os tecidos foram submetidos a 3 incubações sucessivas em xilol e colocados em 2 banhos sucessivos de parafina líquida, antes de serem finalmente incluídos na parafina com auxílio de suportes apropriados. Com a utilização de um micrótomo (RM2125 RTS - Leica, Wetzlar, Alemanha), as secções dos tecidos foram realizadas em espessura de 5µm, dispostas em lâminas de microscopia e, posteriormente, incubadas em estufa a 60°C para fixação. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas em 2 banhos sucessivos de xilol para retirar o excesso de parafina e reidratadas com concentrações decrescentes de etanol absoluto. Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina (H&E), novamente desidratados com concentrações crescentes de álcool (de 70% ao absoluto) e diafanizados com xilol. Finalmente, lamínulas foram adicionadas às lâminas com auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). Após o preparo das lâminas, a análise das mesmas foi realizada visando a observação da presença e extensão de infiltrados inflamatórios, arquitetura dos tecidos e espessura da lâmina própria e submucosa. As imagens obtidas foram fotografadas usando-se uma câmera acoplada ao microscópio.

3.10 Ensaio da mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-

acetilglicosaminidase (NAG).

A quantificação indireta da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no cólon foi realizada pela determinação da atividade de enzimas características dessas populações celulares, como mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente.

Para as análises de MPO e NAG, após a pesagem dos fragmentos intestinais, as amostras foram trituradas em 400µL de tampão fosfato 0,02M, contendo NaCl 0,1M e EDTA 1,015M (pH 4,7). O homogenato de intestino foi centrifugado a 3000 xg por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 400µL de tampão fosfato 0,02M, contendo NaCl 0,1M e EDTA 1,015M (pH 4,7) por agitação em vórtex e, em seguida, adicionado 400µL de NaCl 0,2% gelado, deixando-se incubar por 30 segundos em temperatura ambiente para a lise de hemácias. Posteriormente, adicionou-se 400µL de solução NaCl 1,6% com glicose 5%, gelada e as amostras foram novamente centrifugadas a 5000 xg por 15 minutos à 4°C. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 200µL de tampão fosfato 0,05M contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide; pH 5,4), por agitação em vórtex. Para lise completa das células remanescentes, as amostras foram então congeladas e descongeladas 3 vezes em ciclos de nitrogênio líquido (- 196°C) e banho-maria a 37°C, respectivamente. As amostras foram centrifugadas a 21000 xg por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante foi coletado para as dosagens das respectivas enzimas. As atividades de MPO e NAG foram medidas no sobrenadante do extrato celular obtido.

Para dosagem de MPO, 50µL do sobrenadante foram incubados com 50µL do 42eagent substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) em placa de 96 poços, por 15 minutos a 37°C e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 25µL de H_2SO_4 4M e a leitura feita em espectrofotômetro a 450nm (BioTek ELx808; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para dosagem de NAG, foram utilizados 25µL do mesmo sobrenadante, que foram incubados com 25µL do substrato p-nitrofenil-2-acetamida-β-D-glicopiranosideo 2,24mM (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA) e 100µL de tampão citrato 50mM, pH 4,5. Após incubação à 37°C por 60 minutos, a reação foi interrompida com 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,4 e a leitura feita em espectrofotômetro a 405nm.

Para a determinação de EPO, os segmentos intestinais foram triturados na presença de 400µL de tampão HBSS (solução salina balanceada de Hanks) contendo ácido N-2-

hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES) 10mM, pH 7,4, e centrifugados a 3000 xg por 15 minutos. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 1mL de PBS 1x e passado para tubos cônicos de 15 mL. Em seguida foram adicionados 3mL de água destilada para o choque hipotônico e lise de hemácias, seguido por homogeneização e deixado reagir por 40 segundos. Em sequência, adicionou-se 1mL de solução NaCl 3,5% e, após homogeneização em vórtex, adicionou-se 5mL de PBS 1x. As amostras foram centrifugadas a 3000 xg por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 200µL de tampão HBSS contendo 14mM de HTAB (pH7,4) e então congelado e descongelado 3 vezes em ciclos de nitrogênio líquido (-196°C) e banho-maria à 37°C, respectivamente, para lise completa das células. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 21000 xg durante 10 minutos à 4°C e 50µL do sobrenadante foram colocados em reação com 50µL do substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD - o- phenylenediamine dihydrochloride; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA) por 30 minutos à 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com adição de 25µL de H_2SO_4 4M e a leitura realizada em espectrofotômetro a 492nm.

Todos os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) corrigidos pelo peso do tecido em gramas (g).

3.11 Separação de leucócitos e citometria de fluxo.

Em experimentos independentes, após a eutanásia dos camundongos, amostras do cólon, baço e MLN foram imersos em meio de cultura RPMI contendo 5% de soro bovino fetal (SBF) para citometria de fluxo. As amostras de baço e MLN foram maceradas com auxílio de um filtro (Cell Strainer, 70µm, BD Biosciences) e mantidas em gelo até o termino da coleta.

Em seguida, ambos os macerados (de baço e MLN) foram centrifugados (3000g, 10 minutos, 4º C) e os pelletes resultantes ressuspendidos em RPMI com 5% de SBF para contagem em câmara de Neubauer com azul de Tripan (0,2%). Em relação ao pellet do baço, as hemácias foram previamente lisadas através de tampão de lise (155 mM de NH_4Cl; 10 mM de $NaHCO_3$ e 0,1 mM de EDTA).

Para obtenção de células da lâmina própria (LP) e de linfócitos intraepiteliais (LIE), uma sequência de procedimentos foi realizada. Primeiro, o intestino grosso foi coletado e lavado com PBS 1X para remoção do conteúdo do lúmen intestinal. Em seguida, o mesmo foi aberto longitudinalmente e raspado com uma pinça para remoção preliminar dos LIE. Por fim, o intestino residual foi fragmentado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e esses colocados

em RPMI com 10% de SBF para serem centrifugados (3000g, 10 minutos, 4º C). O pellet ressuspendido em meio RPMI com 10% de SBF e 1 mM de DTT (ditiotreitol) foi mantido sob agitação vigorosa por 15 minutos. Após isso, uma nova centrifugação foi realizada (3000g, 10 minutos, 4º C) e o pellet foi ressuspendido em PBS 1X com 10% de SFB. Os fragmentos foram filtrados (Cell Strainer, 70µm, BD Biosciences) e macerados suavemente para separação dos LIE da LP.

A suspensão celular filtrada contendo os LIE foi centrifugada (3000g, 10 minutos, 4º C) e o pellet ressuspendido em meio RPMI com 10% de SBF. Após isso, as células mononucleares foram separadas por Ficoll-Paque, a temperatura ambiente, na proporção de 2:1 (suspensão celular : Ficoll-Paque). Em seguida, os leucócitos que permanecem na interface do Ficoll-Paque foram coletados, transferidos para outro tubo contendo meio RPMI com 10 % de SBF e centrifugados (3000g, 10 minutos, 4º C). Após isso, o pellet de células mononucleares foi ressuspendido para contagem em câmara de Neubauer com azul de Tripan (0,2%).

Os fragmentos retidos no filtro (Cell Strainer, 70µm, BD Biosciences) foram transferidos para um tubo contendo PBS 1X com 3 mM EDTA e mantidos por 20 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Após agitação, as amostras foram centrifugadas (3000g, 10 minutos, 4º C), ressuspendidas em meio RPMI com 1% de SBF contendo 1 mM de EDTA e 1,5 mM de $MgCl_2$ e agitadas no vortex por 30 minutos.

Decorrido esse tempo e após uma nova centrifugação, os pelletes foram incubados com Liberase TL (50 µg/mL) a 37°C por 60 minutos sob agitação vigorosa.

A ação da Liberase TL foi interrompida com RPMI com 10% de SBF e o tecido digerido da LP foi macerado delicadamente e filtrado (Cell Strainer, 70µm, BD Biosciences) para obtenção das células.

Essas células foram lisadas com o uso de tampão de lise para se realizar a contagem de células de viáveis em câmara de Neubauer com azul de Tripan (0,2%).

3.12 Imunofenotipagem de células do baço, MLN, linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria

Para caracterização fenotípica da população de macrófagos, células dendríticas, T CD4 e T CD8 de baço e linfonodos mesentéricos dos animais controles e com colite induzida, foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD11b, CD11c, CD3, CD4, CD8 e CD49b.

Na caracterização fenotípica dos linfócitos intraepiteliais foram utilizados anticorpos

contra os antígenos de superfície CD45, CD3, CD4, CD8 e TCRγδ. Na fenotipagem de células da lâmina própria foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD3, CD4, CD8, CD45, CD62L, CD44 e CD69 para os linfócitos e CD11b, CD11c, CD103, Ly6C, Ly6G, CD45, F4/80 e GR1 para monócitos/granulócitos. Os anticorpos usados eram conjugados a um dos fluorocromos FITC, PE, PeCy5 BV510, BV515, BV421, APC Cy7, APC ou PERCP (BD PharmigenTM, San Diego, EUA), incluindo os respectivos isotipos controles (BD Pharmigen TM, San Diego, EUA), conforme tabela 1.

Para a imunomarcação de superfície, as células mononucleares foram divididas em tubos específicos e incubadas com 50 µl de PBS molico 1%, por 20 minutos à 4C, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas, seguido pela adição dos anticorpos fluorescentes de superfície, com incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células com PBS 1X, fixação com PBS/formaldeído 1% e posterior leitura em citômetro de fluxo.

Tabela 1: Relação de anticorpos conjugados a fluoroforos utilizados para imunofenotipagem no estudo da inflamação intestinal

Lista de anticorpos	
Marcadores	**Fluoróforos**
CD45	APCcy-7
CD3	FITC/PE
CD4	PERCP
CD8	PECY-7
CD69	BV421
CD44	BV510
CD62L	APC
TCR γδ	FITC
CD49b	FITC
CD11b	FITC
CD11c	PE
F4/80	BV421
Ly6G	PECY-7
Ly6C	PERCP CY 5.5
GR1 (Ly6G-Ly6C)	BV510
CD103	APC

3.13 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

O RNA foi extraído a partir dos fragmentos do colon (qPCR). A extração foi realizada utilizando-se TRIzol® (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguido por etapas de purificação com uso do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções dos fabricantes. Em seguida, determinou-se a quantidade, pureza e qualidade do RNA obtido com o uso de um espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O RNA purificado foi utilizado para a confecção do DNA complementar (cDNA) com o sistema de transcrição reversa High-capacity (Applied Biosystems, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi utilizado 1µg de RNA total incubado com 0,5µg de oligo (dT) e água livre de nuclease em quantidade suficiente para se obter 5uL de volume final. A reação ocorreu a 70°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas a 4°C por 5 minutos e 15µL de uma solução contendo: MgCl2 3mM, dNTP Mix 0,5mM, 1µL da transcriptase reversa ImProm-IITM, tampão de reação ImProm-IITM 1x e água livre de nuclease em quantidade suficiente para um volume final de 15 µL foi adicionada aos tubos contendo RNA (20µL de volume final de reação). As amostras foram incubadas a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos em termociclador (Mastercycler pro®, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Em seguida, as amostras contendo cDNA foram diluídas 10x em água livre de nuclease e estocadas a -20°C até a análise.

A expressão quantitativa dos genes de quimiocinas/receptores, citocinas, *tight juntctions* e enzimas precursoras de corticosterona (tabela 2), foi realizada por meio da reação de qPCR com o sistema de detecção GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA). As sequências inerentes a cada primer bem como suas concentrações, foram descritas na Tabela 2. Cinco microlitros das amostras contendo cDNA foram colocados para reagir em placas de PCR de 96 poços (MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate - Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), com uma solução contendo GoTaq®, oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e anti-senso e água livre de nuclease em quantidade suficiente para 10µL de solução (15µL de volume final de reação). Em seguida, as placas foram seladas (MicroAmp optical adhesive film - Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), rapidamente centrifugadas e a reação realizada em aparelho StepOnePlusTM (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para esse fim, os ciclos utilizados foram 2 minutos a 50ºC, 2 minutos a 95ºC, seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC, 30 segundos a 58ºC e 30 segundos a 72°C, além de um ciclo final com temperatura crescente de 60 a 95ºC para a obtenção da curva de dissociação.

Todos os primers foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, EUA). Os resultados foram corrigidos pela β-actina, para normalizar os níveis de expressão dos genes alvos, e analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*).

A expressão das citocinas IL-13, Il-21 e IL-1β (tabela 2), foi realizado pelo protocolo TaqMan® Gene Expression Assay (AB, aplplied biosystemns, by life technolies), seguindo as especificações do fabricante. Em resumo foram utilizados 10 µL de TaqMan Fast advanced master mix, 1,0 µL do TaqMan assay, 7,0 µL de H_2O nuclease free e por mim adicionado 2 µL de cDNA. Os eppendorfs contendo o mix foram homogeneizados manualmente e rapidamente centrifugados e a reação realizada em aparelho StepOnePlusTM (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para esse fim, os ciclos utilizados foram 2 minutos a 50ºC, 2 mintutos a 95ºC, seguida por 40 ciclos de 1 segundos a 95ºC e 20 segundos a 60ºC. Todos os primers deste protocolo foram obtidos da companhia (AB, aplplied biosystemns, by life technolies). Os resultados foram corrigidos pela GAPDH, para normalizar os níveis de expressão dos genes alvos, e analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*).

O resultado foi calculado pela fórmula ΔΔCt = ΔCt amostra – ΔCt controle calibrador (animais controles, sem indução de DII), onde ΔCt = Ct gene estudado – Ct β-actina. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro (RNAm) comparado com o controle foi definido pela fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como já estabelecido na literatura.

Tabela 2: Relação de primers utilizados par a determinação de citocinas, *tight junctions*, quimiocinas e enzimas importantes no estudo da inflamação intestinal

	Lista de Primers	
Gene alvo	**Sequência senso (5'-3')**	**Sequência anti-senso (3'-5')**
β- actina	AACGAGCGGTTCCGATG	GGATTCCATACCCAAGAAGGA
IL-1β	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC	TTGGAAGCAGCCCTTCATCT
IL-13	CCACTACGGTCTCTCCAG	GGCGAAACAGTTGCTT
IL-6	CCCAATTTCCAATGCTCTCC	TGAATTGGATGGTCTTGGTCC
IL-21	CCTGTTTTCAGAAGGCCAAA	CCACGAGGTCAATGAATG
IL-4	AAGAGCATCATGCAAATGA	TTAAAGCATGGTGGCTCAGTAG
Claudina-1	CTTCTCTGGGATGGATCG	GGGTTGCCTGCAAAGTACTGT
Ocludina	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
ZO-1	TTCAAAGTCTGCAGAGACAATAGC	TCACATTGCTTAGTCCAGTTCC
CCL2	GATGATCCCAATGAGTAGGC	TCTTGAGCTTGGTGACAAAA
CCL6	ACTTTTATCTGCGGAACCTG	GGAATCCCAGATACTTGGTG
CCL3	CCTGGGTCCAAGAATACATC	CTCCAAGACTCTCAGGCATT
CXCL9	GGAGATCAAACCTGCCTAGA	TTTGGCTGATCTTCTTTTCC
CCR1	CTCAGCAAAGGATGGAGATT	AGTGGAGTCCCCATAGTCAA
CCR4	GGTCTGTTTGGAAATTCTGTTG	TACACGTCCGTCATGGACTT
CXCR2	AAGCTGATCAAGGAGACCTG	AGGCATAGATGATGGGGTTA
CXCR2	AAGCTGATCAAGGAGACCTG	AGGCATAGATGATGGGGTTA
CYP11A1	CCAGCCCAACATTACCGAGAT	GACTTCAGCCCGCAGCAT
CYP11B1	CAATAGAAGCTAGCCACTTTGT	AGGGTGTGGAGGAACTTCAG

3.14 Quantificação de citocinas por ELISA.

O perfil de citocinas no intestino dos camundongos com ou sem indução de colite, tratados ou não IFX, foi também determinado por ELISA. Assim, os fragmentos intestinais foram pesados e triturados em 500 µL de tampão contendo inibidor de protease (Complete ® -

Roche, Pharmaceuticals, Mannheim, Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados a 5000 xg por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as reações de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BD PharmigenTM, San Diego, USA). Foram utilizadas placas com 96 poços, onde as amostras foram incubadas com os anticorpos de captura e de detecção para IL-6, IL-17, IL-12, IFN-γ e TNF-α de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences - San Jose, CA, EUA). As reações foram reveladas pela adição de TMB e interrompidas pela adição de H_2SO_4 4M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. O resultado final da concentração foi normalizado pelo peso do fragmento do intestino utilizado para o ensaio.

3.15 Ensaio de permeabilidade intestinal por FITC-Dextran

O ensaio de permeabilidade intestinal foi realizado para avaliar a função da barreira pela quantificação de FITC-dextran presente no soro dos animais submetidos a colite experimental, tratados com o anti-TNF e desafiados ou não com MB em disbiose. Em resumo, os alimentos e água foram retirados 24 horas antes da eutanásia dos animais, cerca de 4 horas antes da eutanásia, foi administrado via gavagem FITC-dextran (PM 4000; FD4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na concentração de 44 mg / 100g peso corporal. Após esse período o sangue foi coletado e centrifugado a 5000 xg por 30 minutos e coletado o soro. A intensidade de fluorescência foi determinada pela leitura da absorbância das amostras por espectrofotometria (excitação, 492 nm; emissão, 525 nm). As concentrações de FITC-dextran no soro foram determinadas usando uma curva padrão gerada por diluição em série de FITC-dextran, variando de 35,937 a 0,0701 µg / mL.

3.16 Cytometric Bead Array (CBA)

O intestino dos animais submetidos ao primeiro protocolo já descrito foi coletado e triturado na presença de inibidor enzimático, Complete Tablets *EASYpack* (Roche, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 10 minutos a 4ºC e o sobrenadante coletado. Foram quantificadas as citocinas IFN-γ, IL-6, TNF, IL-17A, IL-10 e IL-12p40 pelo teste BD Cytometric Bead Array (CBA) mouse TH1/TH2/TH17 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante. As beads foram levadas para leitura em citômetro de fluxo (FACS CantoTMII – BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) e as análises foram realizadas no software FCAP Array 3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.17 Dosagem de LPS no soro

A dosagem sérica de LPS foi realizada pelo kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000TM (LONZA, Walkersvilles, MD, USA), de acordo com as especificações do fabricante, para aferir prováveis translocações bacterianas durante a colite experimental, tratamento e desafio com MB em disbiose.

3.18 Proliferação com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD)

Para a extração e obtenção de leucócitos do baço e células dos linfonodos mesentéricos, foi realizado o mesmo procedimento experimental realizado na metodologia 3.10. Os passos subsequentes consistiram na marcação das células com Violet Proliferation Dye 450 (VPD – BD Horizon^{TM}) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a marcação com VPD, as células foram estimuladas com o mitógeno Concanavalina A (ConA) a uma concentração de 3 µg/mL por poço. As células foram deixadas em cultura por 72 horas à 37ºC em estufa contendo 5% de CO_2. Após o tempo de cultura os poços foram homogeneizados com uma pipeta de 200uL e foi coletada toda a suspensão de células, que foram colocadas em tubos FACS. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min à 4ºC e o sobrenadante coletado para dosagem de citocinas. O *pellet* resultante foi ressuspendido com 150 µL de PBS-Formol 1% e levado para leitura em citômetro de fluxo.

3. 19 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizados com auxílio do software Graphpad Prism® 6 (versão 6.0). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foi utilizado teste paramétrico ANOVA com pós-teste de Tukey para três ou mais grupos ou teste T de Student para 2 grupos. Os resultados foram expressos em média ± SEM (erro padrão da média). Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana utilizou-se teste não paramétrico ANOVA Kruskal Wallis com pós-teste de Dunns no caso de três ou mais grupos ou teste Mann-Whitney para 2 grupos. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

4. Resultados Capítulo 1

4.1 - Avaliação do perfil imunológico de camundongos submetidos a uma nova disbiose.

4.1.1 Avaliação clínica da inflamação intestinal induzida experimentalmente e da competência imunológica de camundongos após o desafio com microbiota em disbiose (MB)

Pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são frequentemente tratados com anticorpos monoclonais direcionados ao controle das respostas inflamatórias exacerbadas. Porém, embora esses tratamentos sejam eficazes, há recidivas da doença, o que pode estar relacionado à presença de nova disbiose, dentre outros fatores.

Sendo assim, para inicialmente validarmos o nosso modelo de estudo, induzimos colite em camundongos C57BL/6 submetidos à administração contínua de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS), seguido por um período de reparo tecidual e posterior desafio com uma microbiota em disbiose. Para tal, foi realizado transplante fecal de camundongos doadores com inflamação intestinal grave (10 dias de exposição ao DSS), que apresentavam notável perda de peso e elevado escore clínico da doença (Figuras 2A e B, respectivamente). A microbiota transferida para os camundongos receptores (desafiados no dia experimental 16), era constituída, principalmente, pelos filos *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e, em especial, *Proteobacteria*, conforme demonstrado nas Figuras 2C e 2D.

Logo, considerando o protocolo experimental a ser validado, com indução de colite e recaída após nova disbiose, os resultados mostraram perda de peso e aumento do escore clínico da doença durante o período de exposição ao DSS (dias 0-10) com reversão parcial deste quadro clínico de colite após retirada do agente agressor, entre os dias 11 e 16 (Figuras 3A e 3B, respectivamente). Conforme esperado, os animais desafiados com a microbiota em disbiose no dia 16 tiveram acentuada perda de peso e aumento do escore clínico já 24 horas após o desafio, além de levarem maior tempo para se recuperarem da recidiva da doença (Figuras 3A-D). Estes dados validaram nossa proposta de estudo, que visa, a seguir, entender os mecanismos de modulação da resposta pelo imunobiológico IFX, frente à quebra da normobiose intestinal.

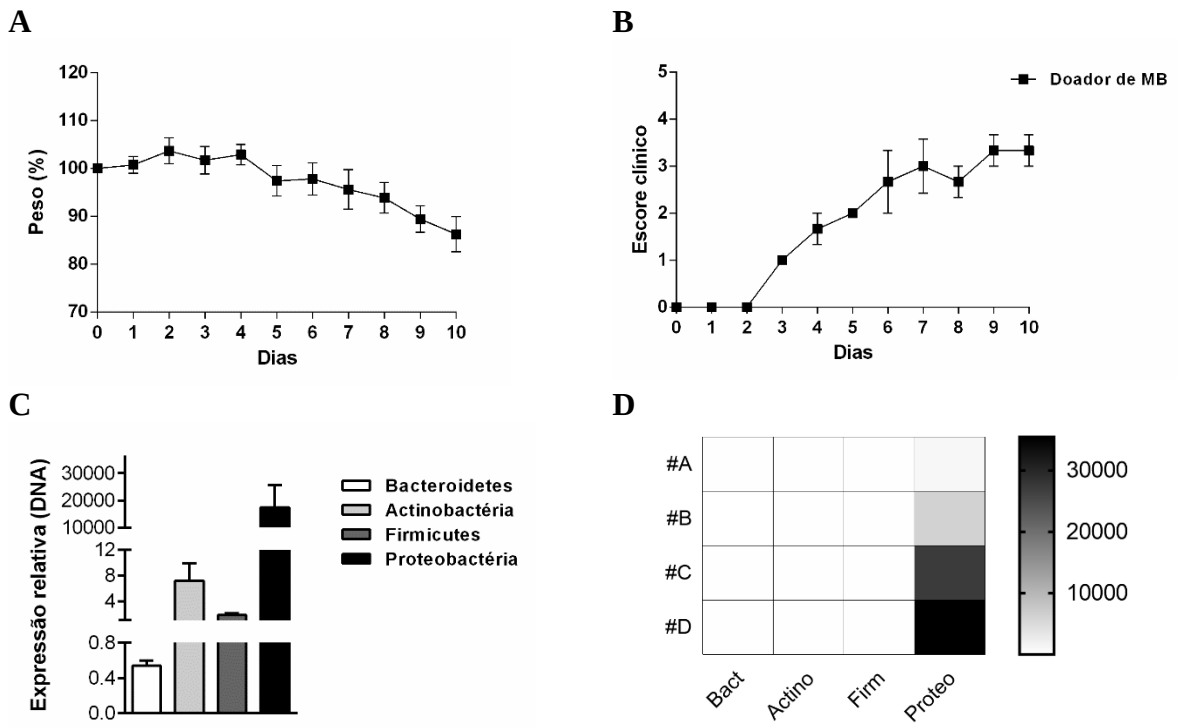


Figura 2. Avaliação do peso, escore clínico e expressão relativa de DNA de bactéria presentes microbiota de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias. Os animais foram expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias, a qual foi realizado o acompanhamento clínico durante a colite experimental. Ao décima dia de exposição, os animais foram eutanasiados e coletado o conteúdo fecal presente no ceco e diluídos em 10 mL de salina 0,9%. Para avaliação da expressão de DNA bacteriano, o DNA foi extraído e realizado o PCR em tempo real das amostras. O número de vezes de expressão diferencial de DNA foi calculado pela formula matemática 2^-ΔΔcT. **A –** Variação da porcentagem da perda de peso em relação ao dia zero. **B –** Variação do escore clínico. **C –** Expressão relativa de DNA bacteriano de bacteroidetes, actinobactéria, firmicutes e proteobactérias. **D –** Heat map da expressão de DNA de bactérias presentes nas fezes do grupo doador de MB em disbiose.

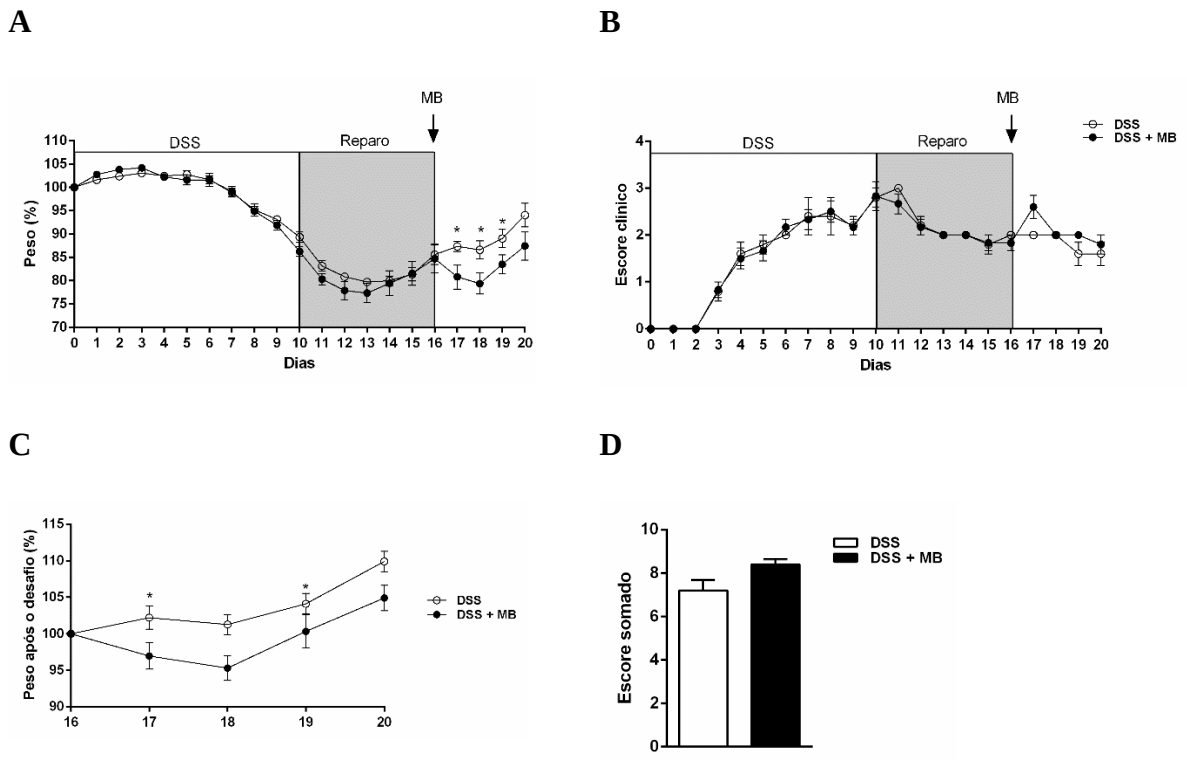


Figura 3. Avaliação do peso e escore clínico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose. A – Variação da porcentagem do peso em relação ao dia 0, início da colite. **B** – Variação do escore clínico. **C** – Variação da porcentagem do peso em relação ao dia do desafio MB. **D** – Escore total após o desafio com MB. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes* $p < 0.05$.

4.1.2 Quantificação de leucócitos circulantes e em órgãos linfoides secundários após o desafio

Uma vez que o modelo experimental proposto mostrou recaída clínica da doença após nova disbiose, buscamos avaliar, no dia 20, os parâmetros imunológicos que poderiam ter sido alterados após o transplante fecal.

As contagens diferenciais das subpopulações leucocitárias revelaram diminuição na frequência de neutrófilos (Figura 4A) e aumento de células mononucleares (Figura 4B) do sangue periférico, enquanto que não houve diferenças na frequência de basófilos e eosinófilos entre os grupos avaliados (Figuras 4C e D, respectivamente).

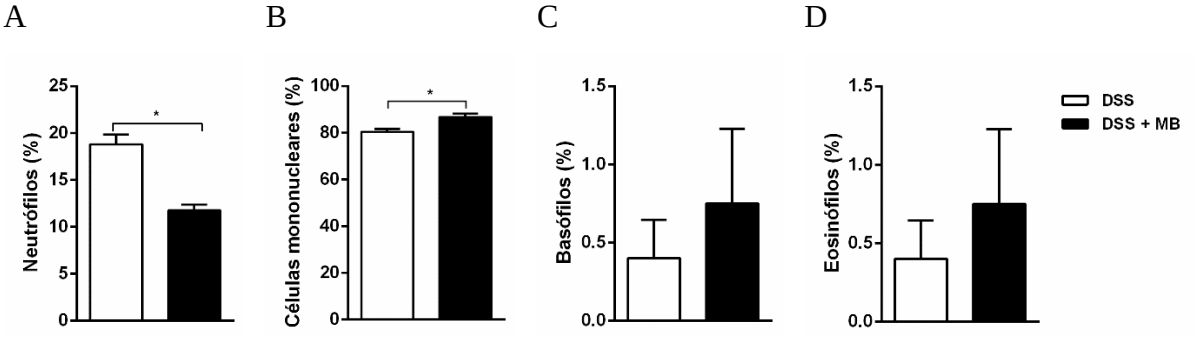


Figura 4. Contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Os camundongos foram tratados com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias na água de beber e após 6 dias o DSS foi retirado para o reparo tecidual. No 16º dia os animais foram desafiados com MB em disbiose. Quatro dias do desafio os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para a realização do esfregaço sanguíneo. **A-D –** Frequência (%) de neutrófilos, células mononucleares, basófilos e eosinófilos foi determinada de acordo com o número das subpopulações de leucócitos computados em 100 células identificadas em microscópio. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

Considerando os órgãos linfoides secundários, observou-se que o desafio com microbiota em disbiose levou ao aumento significativo de leucócitos presentes no baço e nos MLN, em comparação aos camundongos previamente expostos ao DSS e não desafiados durante o reparo tecidual (Figuras 5A e B, respectivamente).

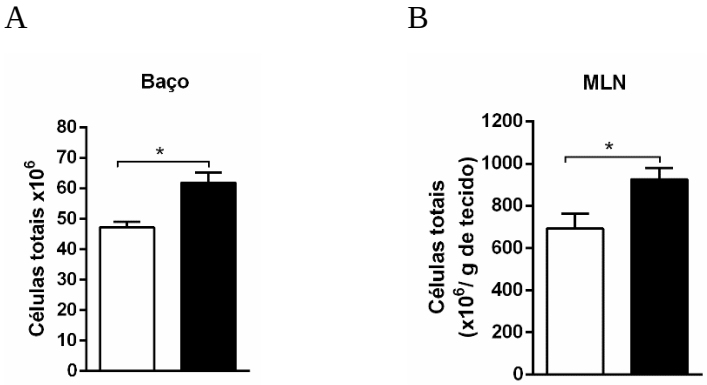


Figura 5. Quantificação de leucócitos no baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram tratados com DSS 3% por 10 dias na água de beber e após 6 dias o DSS foi retirado para o reparo tecidual. No 16º dia os animais foram desafiados com MB em disbiose. Quatro dias após o desafio os animais foram eutanasiados e as células extraídas e quantificadas em hemocitômetro. **A** – Contagem total de leucócitos do baço; resultados expressos em número de células. **B -** Contagem total de leucócitos nos linfonodos mesentéricos; resultados expressos em número de células por mL corrigido pelo peso do tecido em gramas (g). Os resultados são representativos de um único experimentos. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.1.3 Perfil fenotípico de leucócitos presentes no baço e nos linfonodos mesentéricos (MLN) após nova disbiose em camundongos submetidos a colite experimental

Em seguida, com o intuito de caracterizar as células acumuladas no baço e MLN, realizamos a imunofenotipagem das subpopulações presentes nestes órgãos linfoides.

Conforme estratégias de *gating* e análises demonstradas nas Figura 6A e 7A, não houve diferença significativa na frequência de células dendríticas, macrófagos, linfócitos T, NK ou NKT entre os grupos avaliados, com exceção de tendência ao aumento na porcentagem de células dendríticas $CD11b^{-}$ $CD11c^{+}$ nos MLN e maior acúmulo de linfóciots T CD8 no baço de camundongos expostos ao DSS e desafiados com MB em disbiose (Figuras 6F e 7F, respectivamente).

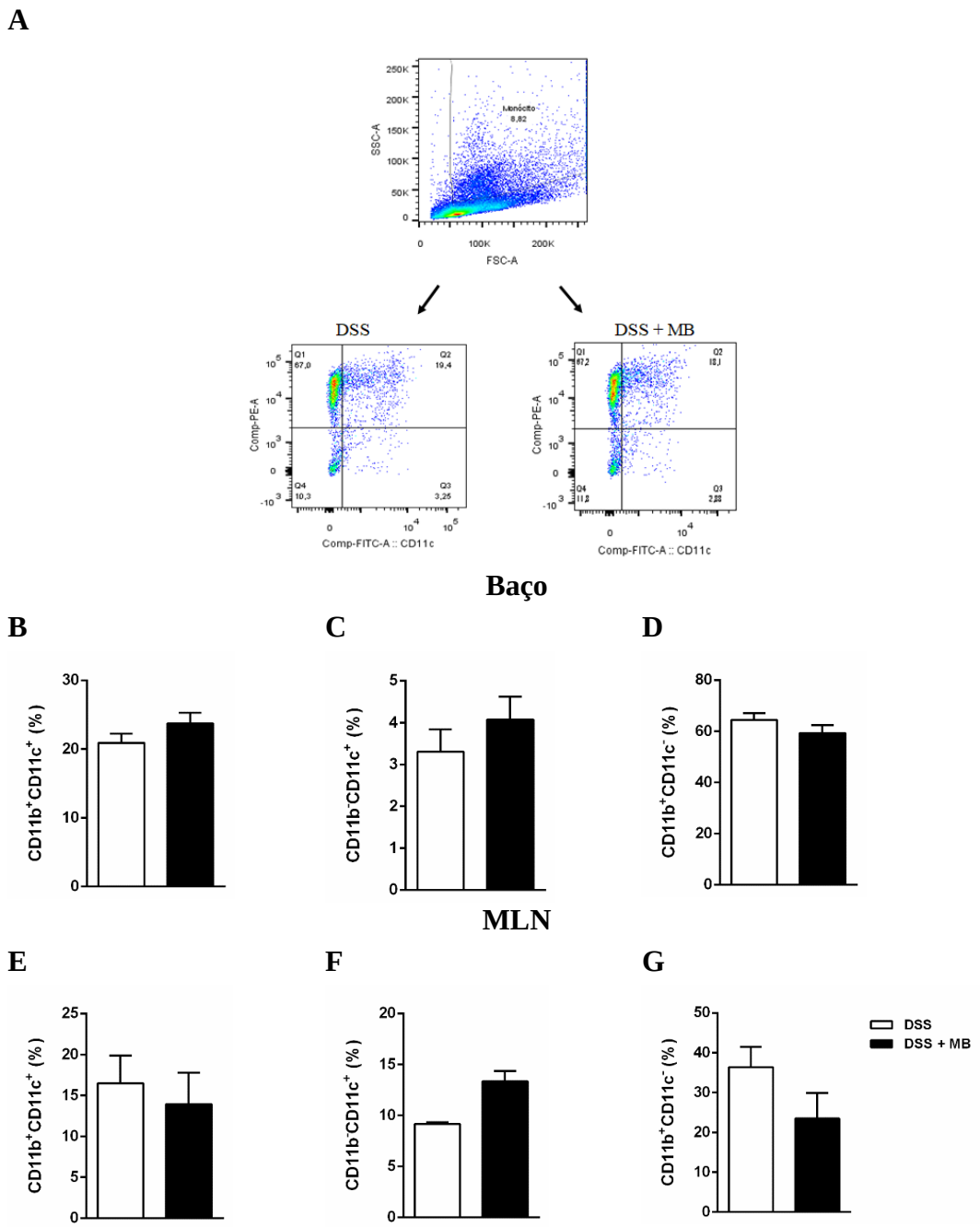


Figura 6. Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose. O baço e linfonodos mesentéricos (LNM) foram coletados no vigésimo dia após o início do protocolo experimental e processados para extração dos leucócitos, os quais foram marcados com anticorpos específicos de interesse. A porcentagem de células foi determinada pela porcentagem dentro da *gate*, dividida pelo número de células obtidas na contagem na câmara de Neubauer multiplicado por 100. A - Estratégia de *gate* analisada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **B–D-** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD11b^-CD11c^+$, respectivamente, presentes no baço. **E–G-** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$ e $CD11b^-$ $CD11c^+$, respectivamente, presentes nos MLN. Estes dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

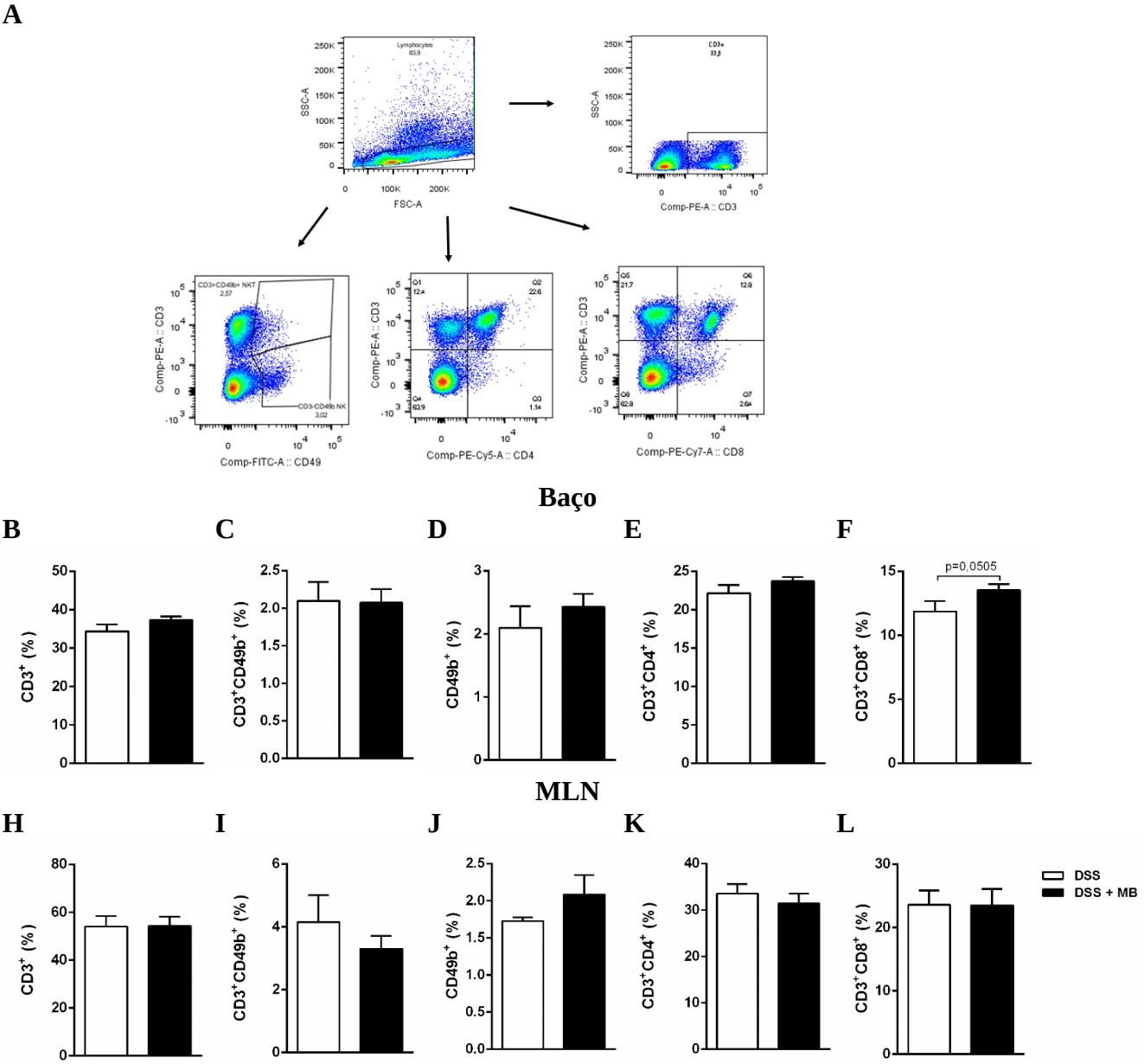


Figura 7. Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 10 dias e desafiados no 16º dia com microbiota (MB) em disbiose. Baço e linfonodos mesentéricos (LNM) foram removidos no vigésimo dia após o início do protocolo experimental e processados para extração dos leucócitos os quais foram marcados com anticorpos específicos de interesse. A porcentagem de células foi determinada pela porcentagem dentro da *gate*, dividido pelo número de células obtidas na contagem na câmara de Neubauer multiplicado por 100 . A,- Estratégia de *gate* analisada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo.. **B–F-** Frequência de leucócitos $CD3^+$,$CD3^+CD49^+$, $CD49^+$, $CD3^+CD4^+$,$CD3^+CD8^+$.

4.1.4 Quantificação de mieloperoxidase, N-acetilglicosaminidase e eosinófilo-peroxidase no intestino

Uma vez que foi observada piora dos sinais clínicos dos animais desafiados, alterações de número de leucócitos nos órgãos linfoides secundários e mudanças a frequência de células no sangue circulante, buscou-se avaliar se o desafio com microbiota em disbiose poderia

influenciar no infiltrado leucocitário local; ou seja no intestino diretamente exposto aos agentes agressores. Para isso, a presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos foi analisada de forma indireta através de ensaios de atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO), respectivamente.

As atividades enzimáticas de MPO e EPO, não foram diferentes entre os grupos avaliados (Figuras 8A e 8C). Porém, as análises da atividade enzimática dos macrófagos revelaram aumento significativo de NAG após o desafio com microbiota em disbiose, quando comparado ao grupo não desafiado (Figura 8B).

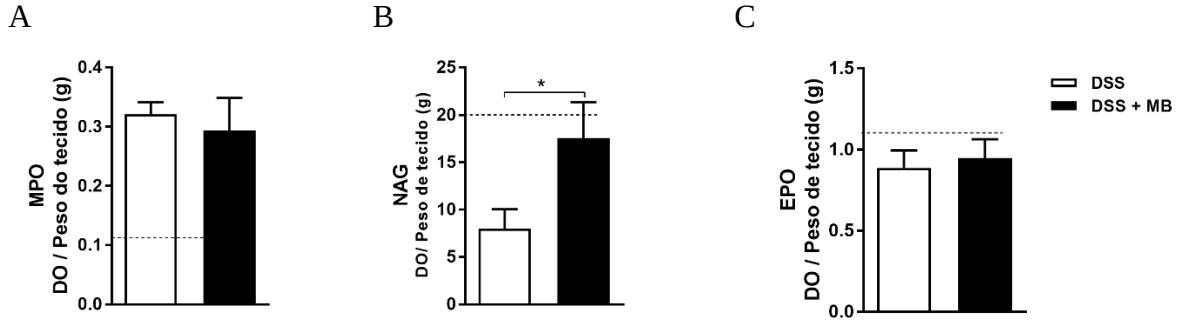


Figura 8. Avaliação a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) no colón de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose. Os camundongos foram tratados com DSS 3% por 10 dias na água de beber e após 6 dias o DSS foi retirado para o reparo tecidual. No 16º dia os animais foram desafiados com MB em disbiose. Quatro dias do desafio os animais foram eutanásiados e o intestino grosso foi coletado para a detecção da atividade das enzimas MPO em **A,** NAG em **B** e EPO em **C**. Os resultados são mostrados em densidade ótica (DO) e normalizados pelo peso do tecido, em gramas (g). N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.1.5 Influência do desafio com microbiota em disbiose na produção de citocinas no intestino

Uma vez que os tipos e a intensidade das respostas inflamatórias são principalmente coordenadas pela ação de citocinas, procurou-se avaliar como os animais submetidos à colite experimental e desafiados ao 16º com MB modulavam a expressão de citocinas (IL-17A, TNF, IFN-γ e IL-6), utilizando amostras do colón coletados no 20º dia de experimento e processadas para a realização da técnica *Cytometric Bead Array* (CBA).

Os resultados mostraram que a nova disbiose aumentou a produção das citocinas IL-17A (Figura 9A) e TNF (Figura 9B), em contraste à diminuição de interferon- γ (IFN- γ) (Figura 9C) no cólon dos camundongos submetidos a colite experimental. Entretanto, não houve diferença na detecção de interleucina-6 (IL-6), conforme observado na Figura 9D.

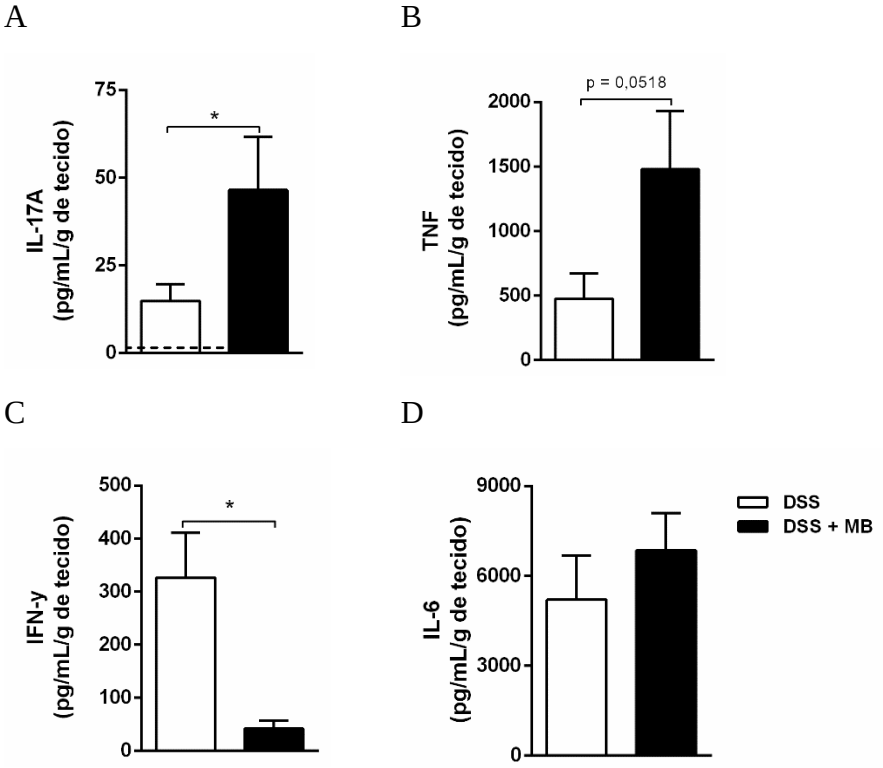


Figura 9. Dosagem de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*) no colón de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose. Os camundongos foram tratados com DSS 3% por 10 dias água de beber e após 6 dias o DSS foi retirado para o reparo tecidual. No 16º dia os animais foram desafiados com MB em disbiose. Quatro dias do desafio os animais foram eutanásiados e o intestino grosso foi coletado para avaliação das citocinas no homogenato intestinal. **A –** IL-17A (pg/mL/g de tecido). **B –** TNF (pg/mL/g de tecido). **C –** IFN-γ (pg/mL/g de tecido). **D –** IL-6 (pg/mL/g de tecido). Os resultados obtidos são mostrados em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas (g). N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.1.6 Quantificação de Lipopolissacarideo (LPS) bacteriano no sangue após desafio com microbiota em disbiose em animais submetidos à colite experimental

Em seguida, buscamos avaliar se essa nova disbiose intestinal poderia influenciar na translocação bacteriana do intestino para o sangue circulante dos animais, no 20º dia experimental. Os dados mostraram que não houve diferenças dos níveis de LPS circulante entre os grupos avaliados (Figura 10). Ainda que o desafio com MB em disbiose seja um indicativo para a recaída dos camundongos após a colite experimental, esses dados indicam que após 4 dias de desafio, possivelmente já houve fechamento da barreira epitelial e controle das bactérias teciduais.

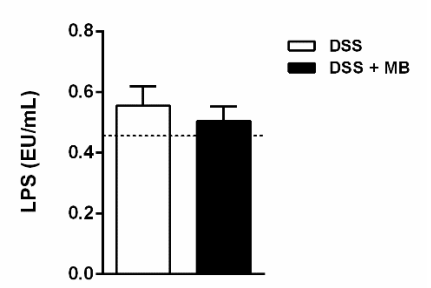


Figura 10. Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e desafiados ou não com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram tratados com DSS 3% por 10 dias na água de beber e após 6 dias o DSS foi retirado para o reparo tecidual. No 16º dia os animais foram desafiados com MB em disbiose. Quatro dias após o desafio os animais foram eutanásiados e o sangue foi coletado para avaliação do produto bacteriano no soro. Os resultados foram expressos em unidade de endotoxina (EU/mL) no soro dos animais. Dados representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

Em conjunto, esses dados iniciais sugerem que uma nova disbiose intestinal pode acarretar no retorno da inflamação local e recidiva da doença durante o período de remissão da colite experimental. A partir desses experimentos, fizemos o segundo delineamento experimental, na qual foi utilizado o anti-TNF para avaliar seus efeitos na inflamação induzida por DSS.

4. Resultados Capítulo 2

4.2 - Impactos do tratamento com anti-TNF em camundongos submetidos à colite experimental.

4.2.1 Efeitos do anti-TNF na atividade clínica da inflamação intestinal induzida experimentalmente de camundongos submetidos à colite experimental

Neste segundo delineamento experimental, a colite foi induzida nos camundongos C57BL/6 por 7 dias a partir da exposição ao dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. Neste momento os animais estão na fase da inflamação intestinal moderada, com aumento da perda de peso e do escore clínico. Então, no sétimo dia o agente indutor da colite foi retirado e os animais foram com Infliximab (IFX) ou IgG controle.

Os resultados mostraram que os camundongos doentes tratados com IFX tiveram melhora da atividade clínica da doença, com ganho de peso e diminuição do escore clínico diário (Figuras 11A-B), assim como do escore total somado a partir do dia de tratamento (Figura 11C), sendo notada essa diferença inicialmente três dias após a administração do medicamento.

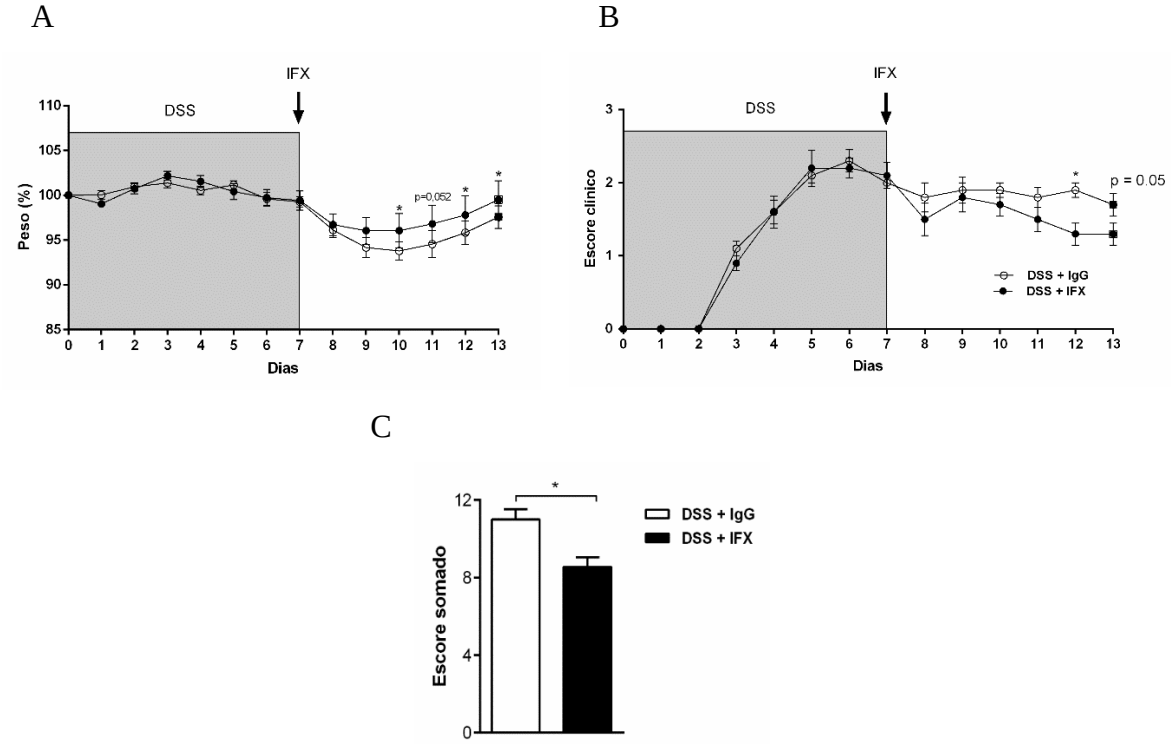


Figura 11. Avaliação do peso e escore clínico de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Após 6 dias todos os animais dos grupos experimentais foram separados em caixas individuai. **A** - Variação da porcentagem do peso em relação ao dia zero dos animais tratados ou não com IFX. **B** – Escore clínico. **C** – Soma do escore clínico após tratamento com IFX, do 8º ao 13º dia. A concentração. N=10 animais por grupo. *p < 0.05.

4.2.2 Influência do tratamento com anti-TNF nos leucócitos totais e na contagem diferencial do sangue periférico

Além de avaliar o efeito da terapia com anti-TNF sobre a atividade clínica da doença, procurou-se também observar se o uso de IFX influenciava na frequência e quantidade de leucócitos totais do sangue periférico, bem como na contagem diferencial dos mesmos. Observou-se que após o uso do imunobiológico, o número de leucócitos circulantes foi significativamente elevado (Figura 12A), com aumento da frequência e número de neutrófilos circulantes (Figuras 12B e E, respectivamente). Por outro lado, a utilização do IFX reduziu significativamente a frequência e aumentou o número de células mononucleares (Figuras 12C e F, respectivamente), enquanto que a subpopulação de eosinófilos não foi alterada (Figuras 12D e G).

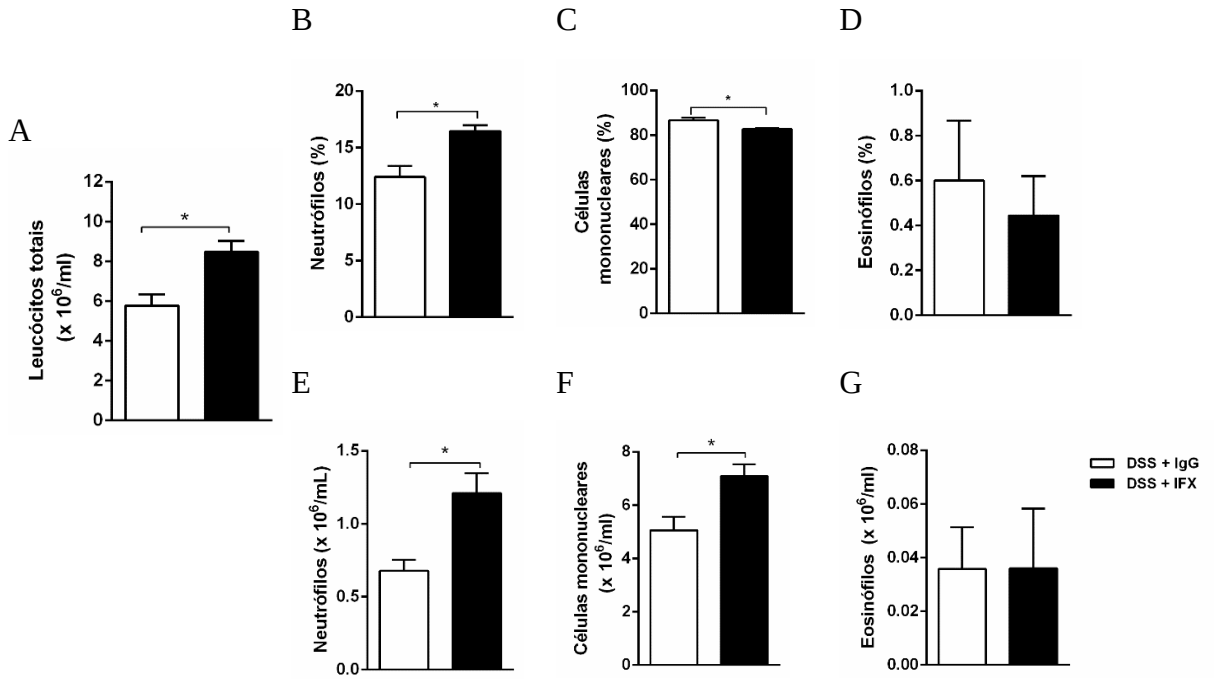


Figura 12. Quantificação de leucócitos do sangue periférico e contagem diferencial das subpopulações de leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9 %. Após 24 horas os animais foram eutanasiados tiveram seu sangue coletado para a quantificação celular em hemocitômetro e realização do esfregaço sanguíneo. A coloração das lâminas de esfregaço foi realizada usando coloração com panótico. **A-** Contagem total de leucócitos do sangue. **B-D** – Frequência de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos do sangue periférico **E-F –** Número de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos do sangue periférico do sangue periférico. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.2.3 Perfil fenotípico de leucócitos presentes em diferentes órgãos após tratamento com anti-TNF

Em sequência, foi realizada a imunofenotipagem das subpopulações presentes nos órgãos linfoides secundários (baço e MLN) e no cólon. Para isso, as células foram extraídas dos órgãos citados e marcadas com anticorpos específicos acoplados a fluorocromos, para análise por citometria de fluxo.

A quantificação das células totais do baço e do MLN não revelou diferenças entre os grupos (Figuras 13B e G, respectivamente). Porém, a análise fenotípica mostrou diminuição significativa da população supostamente de macrófagos $CD11b^{+}CD11c^{-}$ e de linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}$ no baço, após o tratamento (Figuras 13D-E). Não houve diferença na frequência das demais populações avaliadas, no baço ou MLN (Figura 13).

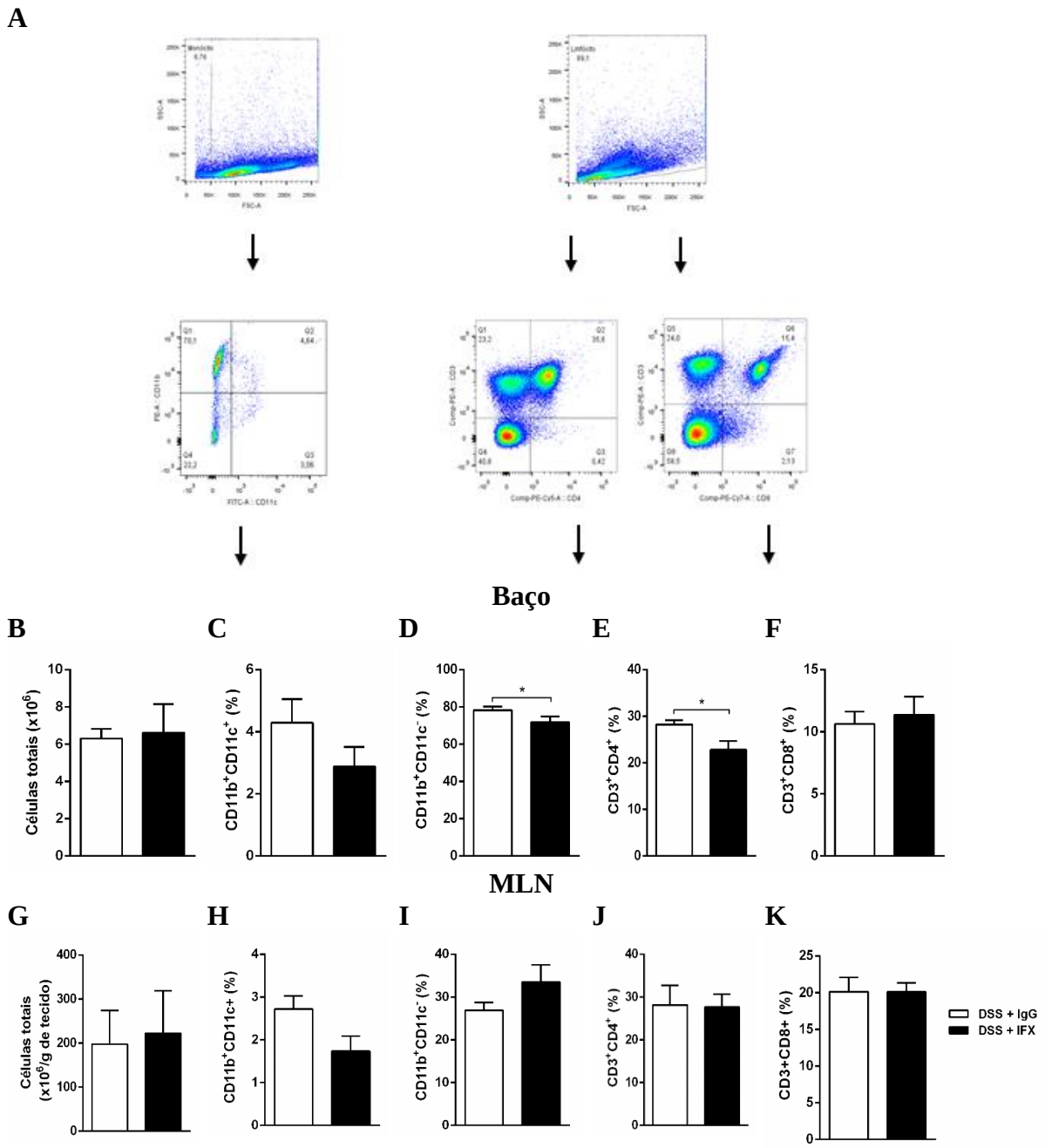


Figura 13. Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9% baço e linfonodos mesentéricos (LNM) foram coletados no décimo quarto dia e processados para extração dos leucócitos que foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A –** Estratégia de *gate*. **B –** Contagem total de células totais do baço; resultados expressos em número ($x10^6$) **C–F -** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ presentes no baço. **F–I -** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ presentes nos MLN. Estes dados são representativos de dois experimentos independentes. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

4.2.4 Cultura *ex vivo* de esplenócitos e células dos linfonodos mesentéricos de camundongos tratados com infliximab

De modo a caracterizar o comportamento funcional dos leucócitos de animais tratados *in vivo* com IFX, células de baço e dos linfonodos mesentéricos de camundongos expostos ao DSS 3% e tratados com o imunobiológico foram reestimuladas por 72 horas em cultura, para avaliação da proliferação celular por citometria de fluxo, conforme estratégias de *gating* descritas na Figura 14A.

As análises mostraram que as células do baço replicaram-se de forma muito semelhante em ambos os grupos (Figura 14A). Porém, as células dos MLN provenientes de animais tratados com o anti-TNF apresentaram redução significativa da capacidade proliferativa *in vitro*, quando estimuladas com ConA (Figura 14C).

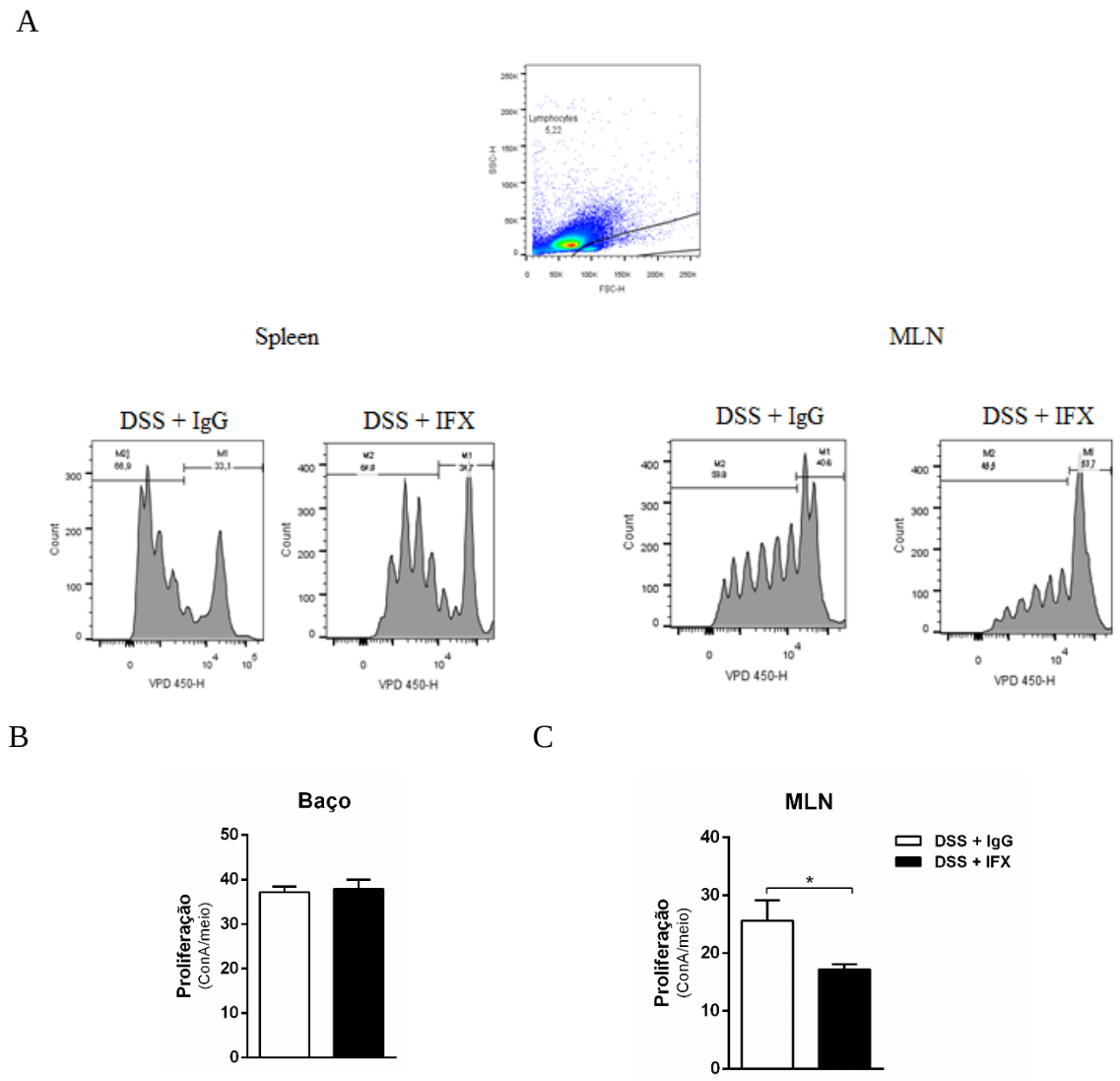


Figura 14. Cultura *ex vivo* de células de baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados com ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9 % baço e linfonodos mesentéricos (LNM) foram coletados no décimo quarto dia e processados para extração dos leucócitos. Os leucócitos foram marcados com Violet proliferation dye (VPD) e reestimulados com concanavalina A (ConA) por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. **A –** *Gate* e histograma de proliferação celular. **B –** Frequência de proliferação de esplenócitos. **C –** Frequência de proliferação de células do MLN. Esses dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

4.2.5 Quantificação de mieloperoxidase, N-acetilglicosaminidase e eosinófilo-peroxidase após a terapia com anti-TNF

Uma vez que foi observada a melhora clínica dos animais e que a terapia com IFX causou alterações nos leucócitos circulantes, buscou-se avaliar se este tratamento poderia influenciar na resposta inflamatória intestinal.

Neste sentido, a quantificação de MPO no tecido intestinal dos animais submetidos à terapia com IFX mostrou aumento desta enzima quando comparados ao controle IgG (Figura

15A). Em contrapartida a análise do NAG apresentou uma tendência para o aumento da atividade celular de macrófagos, mas a atividade de eosinófilos não mostrou diferenças entre os grupos avaliados (Figuras 15B-C).

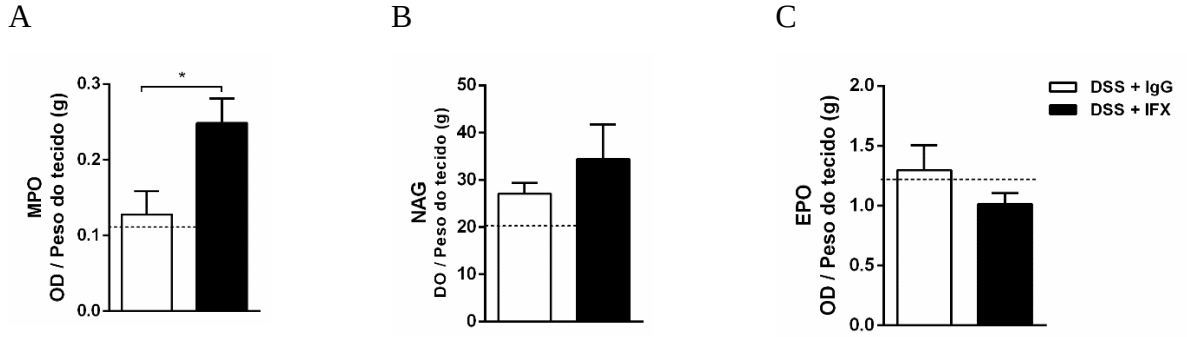


Figura 15. Detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A), N-acetilglicosaminidase (NAG) (B) e eosinófilo-peroxidase (EPO) (C) no colón de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para os referidos ensaios enzimáticos. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) e corrigidos pelo peso do tecido em gramas (g). As linhas pontilhadas referem-se ao grupo controle saudável. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

4.2.6 Perfil fenotípico de leucócitos presentes em diferentes órgãos após tratamento com anti-TNF

A contagem de leucócitos totais da lâmina própria (LP) não revelou diferenças na quantidade de células entre os grupos tratados e controles (Figura 16B). Porém, ao avaliar especificamente a população granulocítica (Figura 16A), observou-se que o tratamento com IFX levou ao acúmulo de células $Ly6G^+$, possivelmente neutrófilos, no intestino dos camundongos que receberam este imunobiológico (Figura 16C), confirmando os resultados de MPO. Estes resultados foram acompanhados da redução significativa de macrófagos totais $CD11b^-F4/80^+$ (Figura 16H) e aumento de células dendríticas $CD11b^+CD11c^+$, especialmente daquelas com ausência de expressão do marcador CD103 (Figuras 16J e L, respectivamente).

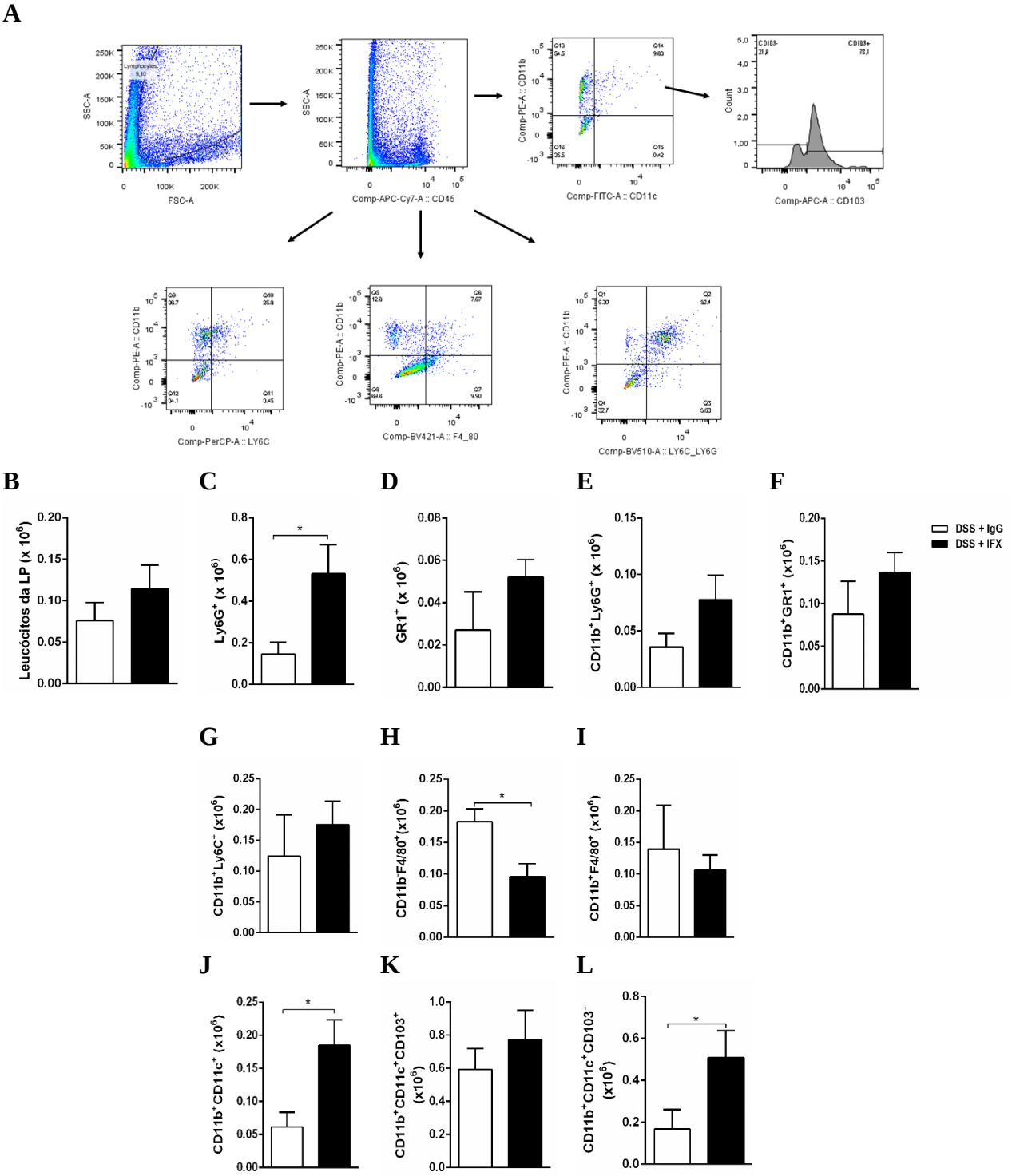


Figura 16. Imunofenotipagem de neutrófilos, células dendríticas e macrófagos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para purificação de células da LP. Os leucócitos foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A-** Estratégia de *gate* **B–F–** Número absoluto de células $CD45^+Ly6G^+$; $CD45^+GR1^+$. $CD45^+CD11b^+Ly6G^+$; $CD45^+CD11b^+GR1^+$. **G-H–** Número asoluto de células $CD45^+CD11b^+Ly6C^+$; $CD45^+CD11b^-F4/80^+$; $CD45^+CD11b^-F4/80^+$; **J-L-** Número absoluto de células $CD11b^+CD11c^+$; $CD11b^+CD11c^+CD103^+$; $CD11b^+CD11c^+CD103^-$. Resultados expressos em número de células ($x10^6$). Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

Posteriormente, avaliou-se se o tratamento com IFX influenciaria as subpopulações de linfócitos na lâmina própria. As análises realizadas conforme estratégia de *gating* da Figura 17A não revelaram diferenças no número de células T totais, naives, de memória central, efetoras, ativadas ou de memória residente após o tratamento (Figuras 17B-L). Entretanto, observou-se redução da frequência de células T ativadas e T residentes de memória, incluindo TCD4, na lâmina própria dos camundongos que receberam IFX (Figura 18 A-D). Além disso, não houve alterações no número de linfócitos intraepiteliais, seja T CD4, TCD8 ou gama delta entre os dois grupos estudados (Figura 19 A-E).

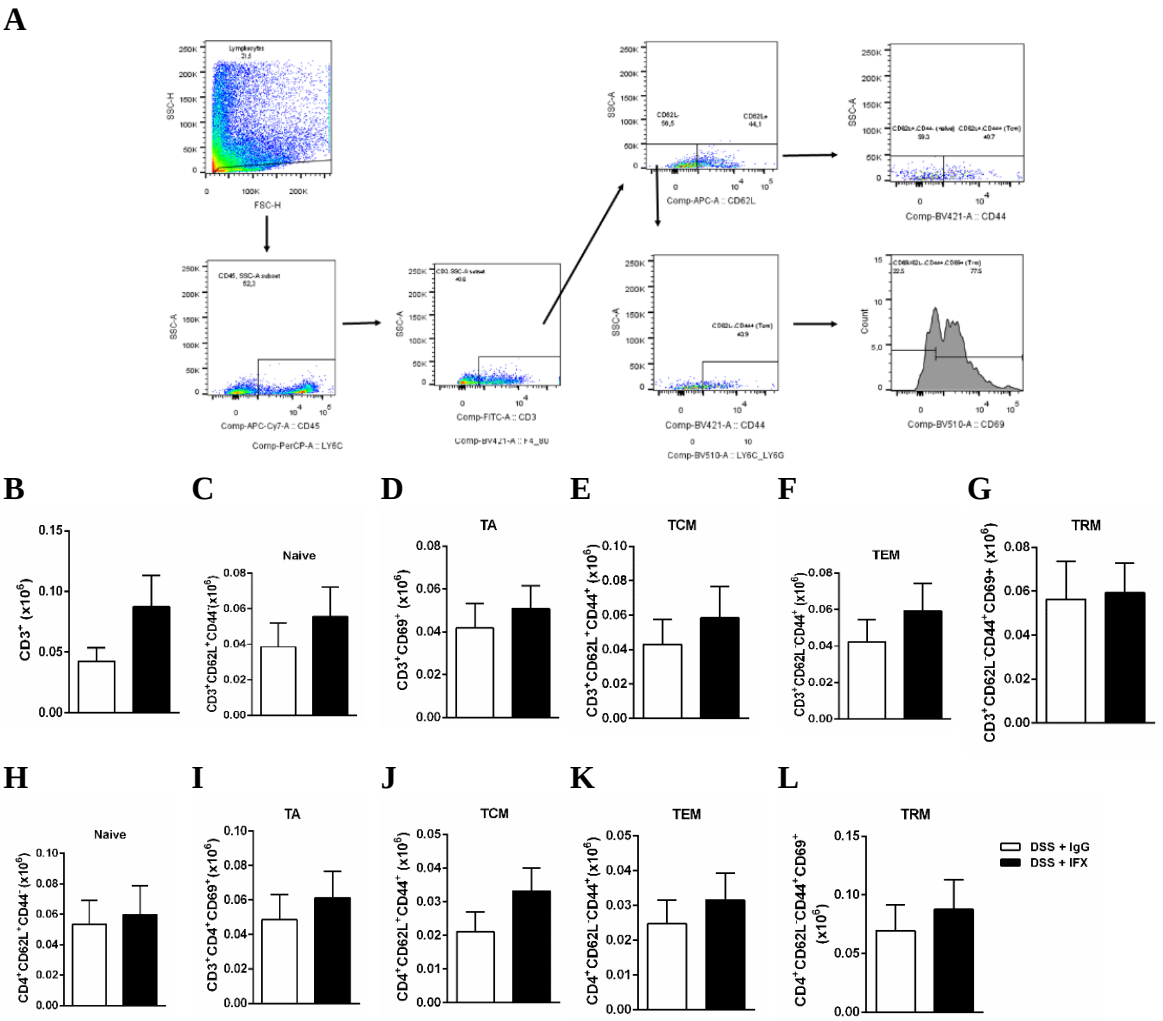


Figura 17. Imunofenotipagem de linfócitos da lâmina própria (LP) do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para purificação de linfócitos da LP. Os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo **A-** Estratégia de *gate*. **B-G –** Número absoluto da população de linfócitos $CD3^+$; $CD3^+CD62L^+CD44^-$; $CD3^+CD69^+$; $CD3^+CD62L^+CD44^+$; $CD3^+CD62L^-CD44^+$; $CD3^+CD62L^-CD44^+CD69^+$; **H-L –** Número absoluto da subpopulação de linfócitos $CD4^+CD62L^+CD44^-$; $CD3^+CD4^+CD69^+$; $CD4^+CD62L^+CD44^+$; $CD4^+CD62L^-CD44^+$ e $CD4^+CD62L^-CD44^+CD69^+$. TA: Linfócitos T ativado; TCM: Linfócitos T de memória central; TEM: Linfócitos T de memória efetora; TRM: Linfócitos T de memória residente. Resultados expressos em número de células $x10^6$ Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

Diminuição no cólon dos animais submetidos a terapia com anti-TNF (Figura 17C e D).

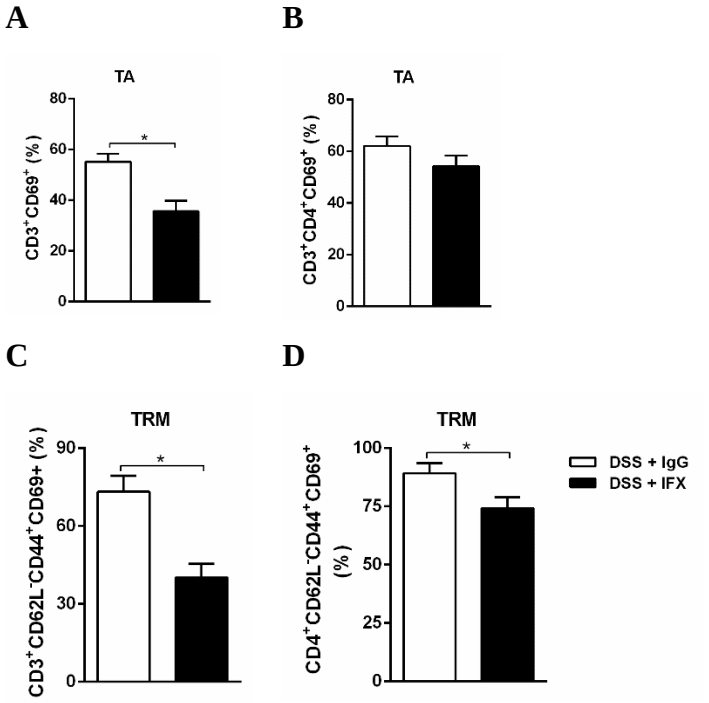


Figura 18. Imunofenotipagem de linfócitos ativados e de memória residentes na lâmina própria (LP) do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX.) Os camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para purificação de linfócitos da LP. Os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A-D** – Frequência de células $CD3^+CD69^+$; $CD3^+CD4^+CD69^+$; $CD3^+CD62L^-CD44^+CD69^+$; $CD4^+CD62L^-CD44^+CD69^+$. TA: Linfócitos T ativado; TRM: Linfócitos T de memória residente. Resultados expressos em número de células $x10^6$ Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. $*p < 0.05$.

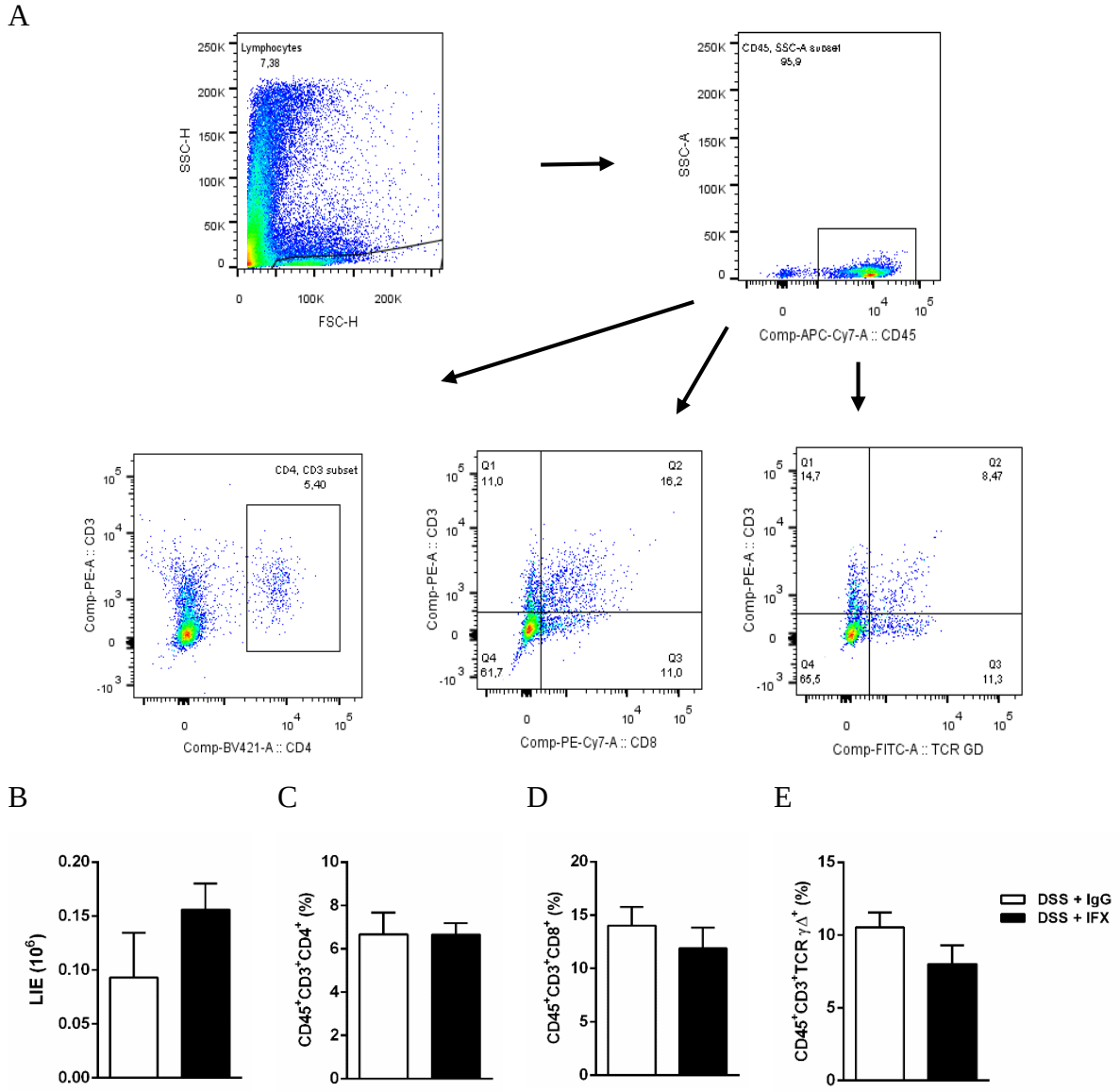


Figura 19. Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (LIE) de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg porvia intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para purificação de LIE. Os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A-** Estratégia de *gate* **B** Contagem total de linfócitos intraepiteliais; resultados expressos em número de células ($x10^6$) **C-E -** Frequência de linfócitos $CD45^+CD3^+CD4^+$ **(B),** $CD45^+CD3^+CD8^+$ **(C)** e $CD45^+CD3^+TCR\gamma\Delta^+$ **(D).** Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *p < 0.05.

4.2.7 Efeito do tratamento com infliximab (IFX) na expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas no cólon de camundongos submetidos à colite experimental

Visto que algumas populações celulares na lâmina própria são alteradas após o tratamento com anti-TNF, buscou-se avaliar se tal terapia poderia influenciar na expressão de quimiocinas e receptores no cólon dos animais expostos à água contendo DSS 3%.

Dentre as quimiocinas analisadas por PCR em tempo real, notou-se diminuição significativa de expressão de CCL6 e de CXCL9 no cólon após o tratamento com IFX (Figuras 20C e D, respectivamente), enquanto as demais quimiocinas CCL2, CCL3 e os receptores CCR1, CCR4 e CXCR2 não foram alterados (Figuras 20A, B, E, F, G, respectivamente).

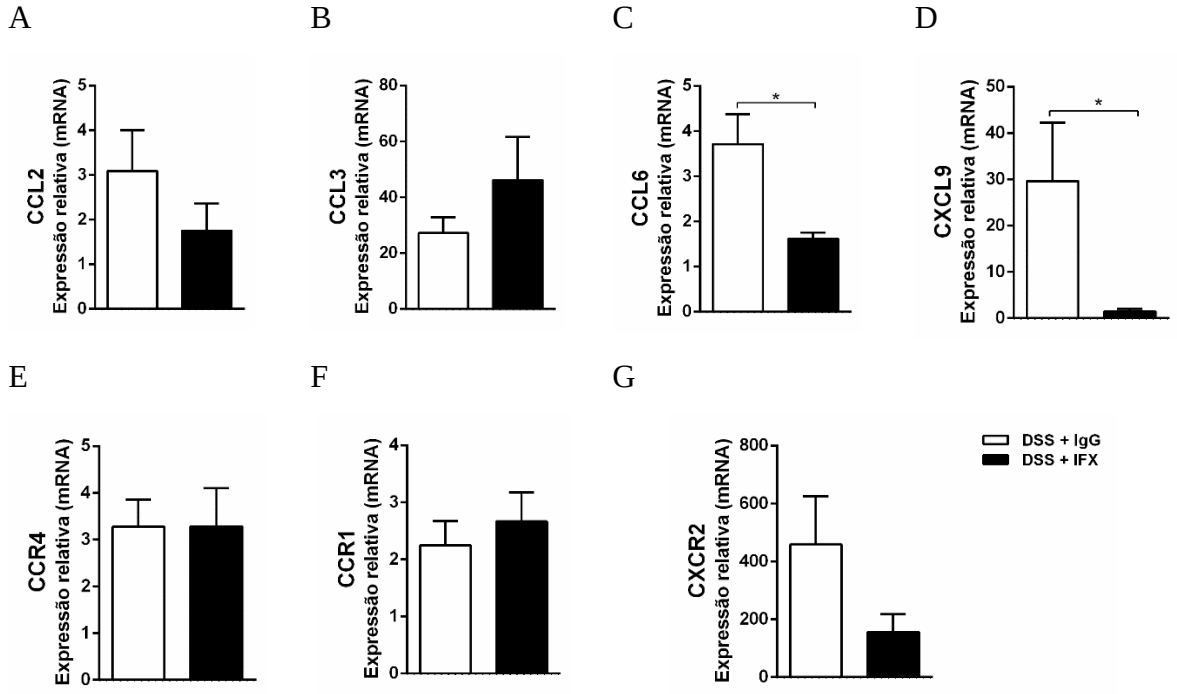


Figura 20. Avaliação da expressão de quimiocinas do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão β-actina... **A –** Expressão relativa de RNAm de CCL2. **B –** Expressão relativa de RNAm de CCL3. **C –** Expressão relativa de RNAm de CCL6. **D** - Expressão relativa de RNAm de CCR1. **E** - Expressão relativa de RNAm de CCR4. **F -** Expressão relativa de RNAm de CXCL9. **G** - Expressão relativa de RNAm de CXCR2. Os dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

4.2.8 Influência do tratamento com anti-TNF na expressão de citocinas intestinais

Um vez tendo sido observadas alterações no infiltrado inflamatório e quimiocinas no cólon dos animais tratados com IFX, procurou-se avaliar se a terapia com anti-TNF poderia influenciar também a expressão de citocinas relacionadas à resposta local. Para isso foi

realizado o PCR em tempo real das amostras de tecido. As análises revelaram que o uso do anti-TNF reduziu significativamente a expressão de IL-6 e IL-21 (Figuras 21A e B, respectivamente), com tendência à diminuição da expressão relativa de IL-1β e IL-13 no cólon (Figuras 21 C e D, respectivamente).

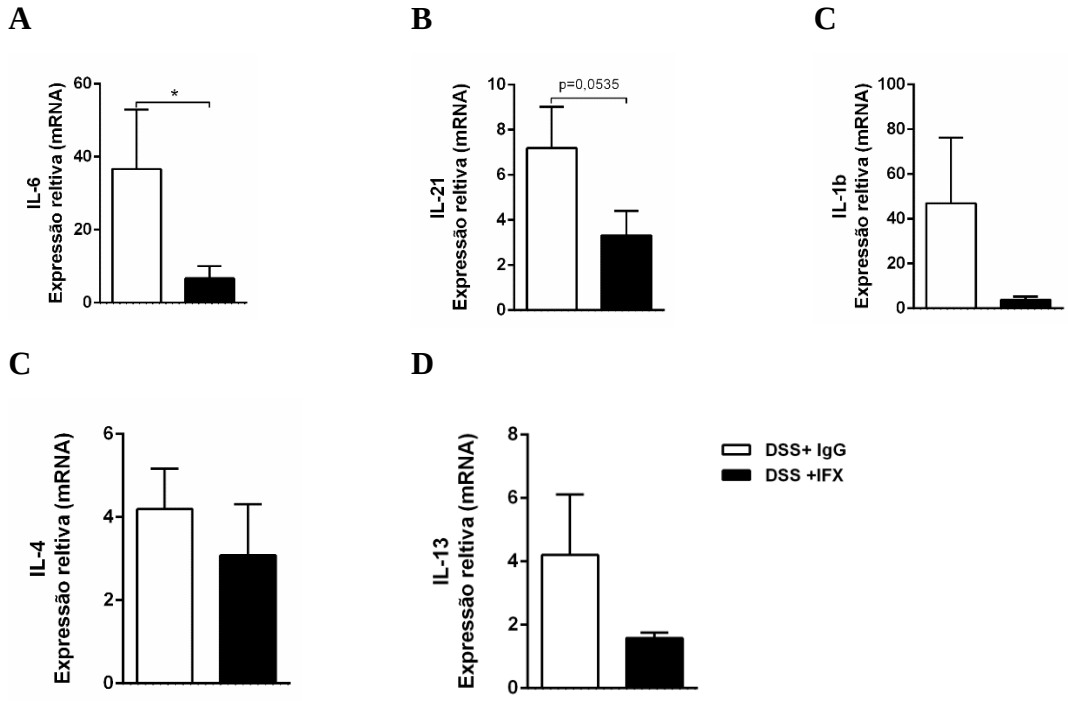


Figura 21. Avaliação da expressão de quimiocinas do cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão de β-actina (IL-6 e IL4) e GAPDH (IL-1β, IL-21 e IL13). **A –** Expressão relativa de RNAm de IL-6. **B –** Expressão relativa de RNAm de IL-21. **C –** Expressão relativa de RNAm de IL-1 β. **D -** Expressão relativa de RNAm de IL-4. **E -** Expressão relativa de RNAm de IL-13. Os dados são representativos de dois experimento independentes. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

4.2.9 Avaliação do tratamento com anti-TNF na expressão de enzimas envolvidas na produção de corticosterona de camundongos expostos ao DSS 3%

Em sequência, buscamos avaliar se o tratamento com anti-TNF estaria influenciando a via de conversão do colesterol em corticosterona, hormônio responsável pela regulação das respostas inflamatórias. Neste sentido, não foram observadas diferenças na expressão, por PCR em tempo real, de CYP11A1, enzima responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona estimulada pelas gonadotropinas hipofisárias através de um receptor acoplado à proteína G na célula superfície (Figura 22A). Entretanto, notou-se elevado aumento na expressão de CYP11B1, enzima responsável pela conversão do 11-desoxicortisol em cortisol e também da 11-deoxicorticosterona em corticosterona. Tais processos são desencadeados pela

liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária, localizado na base do cérebro. Assim, a utilização anti-TNF, indica provavel aumento nos níveis de corticosterona intestinal nesses animais (Figura 22B).

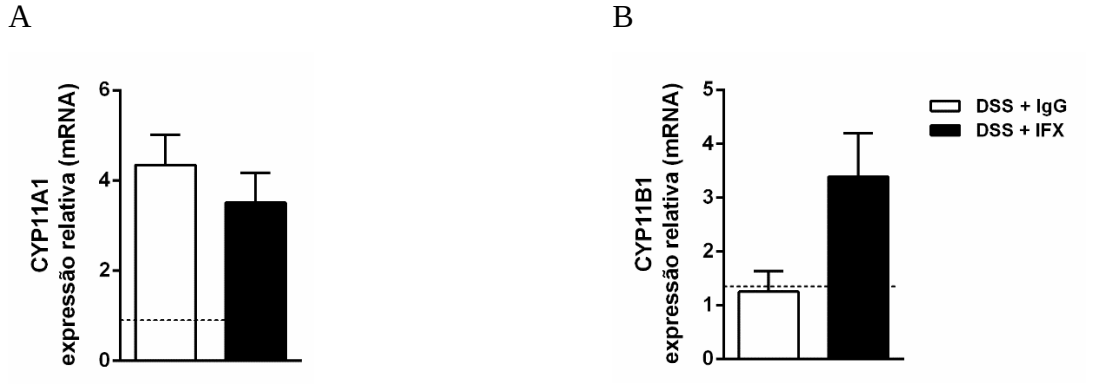


Figura 22. Avaliação da expressão de enzimas precursoras de corticosterona no cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo diao agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9% Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão de β-actina**. A –** Expressão relativa de RNAm de CYP11A1. **B –** Expressão relativa de RNAm de CYP11B1. Os dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

4.2.10 Avaliação da expressão das moléculas de adesão *tight junctions* em camundongos tratados com infliximab (IFX) após exposição à água contendo DSS 3%

Com o intuito de analisar se o tratamento com anti-TNF poderia influenciar na expressão das *tight juntions* no epitélio intestinal, foi realizada a análise de PCR em tempo real para claudina-1 (Figura 22A), ocludina (Figura 3B) e ZO-1 (Figura 3C) nas amostras de cólon coletadas. Porém, não houve diferenças entre os grupos avaliados.

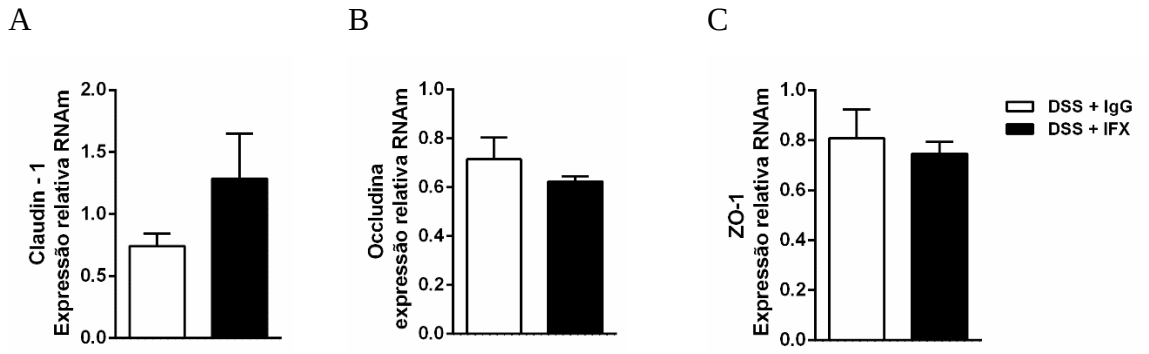


Figura 23. Avaliação da expressão das tight juntions no cólon de camundongos submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia o agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão de β-actina**. A –** Expressão relativa de RNAm de claudina-1. **B –** Expressão relativa de RNAm de ocludina. **C –** Expressão relativa de RNAm de ZO-1. Os dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

4.2.11 Efeitos da terapia com anti-TNF na permeabilidade intestinal

Visto que o grupo tratado com o IFX apresenta melhora da atividade clínica e que o tratamento altera células circulantes e atividade do infiltrado inflamatório no intestino, procurou-se investigar se o fármaco pode alterar a integridade intestinal dos camundongos. Para isso, foi realizada a quantificação de FITC-Dextran no soro dos animais tratados ou não com o IFX. O dextran é uma molécula utilizada em ensaios de permeabilidade tecidual e está acoplada a um fluoróforo FITC. Quanto maior for a quantidade presente no soro dos animais maior será a permeabilidade intestinal, uma vez que os camundongos receberam FITC-Dextran por gavagem. Entretanto, corroborando o resultado anterior de integridade de barreira, não houve diferenças na quantificação de FITC-Dextran entre os grupos avaliados (Figura 23).

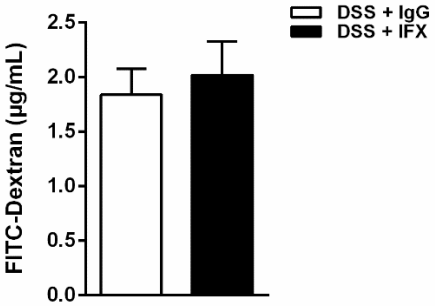


Figura 24. Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX). Camundongos foram tratados por 7 dias com água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3%. No sétimo dia agente redutor foi retirado e realizado o tratamento com anti-TNF (IFX 5mg/Kg por via intraperitoneal) ou apenas IgG controle. Foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação do produto bacteriano no soro. Os resultados foram expressos em unidade de endotoxina (EU/mL) no soro dos animais. Estes dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

De forma similar, a determinação do LPS circulante dos animais tratados no sétimo dia durante a exposição ao agente colitogênico não mostrou diferenças entre o grupo controle tratado com IgG e aquele com IFX (Figura 24).

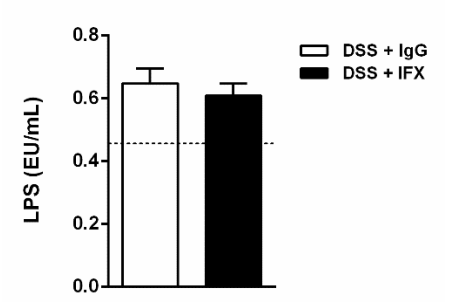


Figura 25. Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental com dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 7 dias e tratados ou não com infliximab (IFX). Os animais foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% a qual foram ou não tratados com infliximab (IFX) ou IgG para os controles, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais receberam salina 0,9%. Após 24 horas os animais foram eutanasiados coletado o sangue para avaliação do produto bacteriano no soro. Os resultados foram expressos em unidade de endotoxina (EU/mL) no soro dos animais. Estes dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

4. Resultados Capítulo 3

4.3 - Impactos do tratamento com anti-TNF em camundongos submetidos à colite experimental após nova disbiose.

4.3.1 Efeitos do anti-TNF na recidiva da doença após nova disbiose em camundongos submetidos a colite experimental

Com base nos resultados observados até aqui, foi estabelecido um terceiro delineamento experimental com o objetivo de avaliar a recaída da doença após o tratamento com o anti-TNF em camundongos submetidos à colite experimental e desafiados com microbiota em disbiose.

Como visto anteriormente, o tratamento com IFX melhorou a atividade clínica da doença. A microbiota em disbiose para realização do desafio foi proveniente de animais expostos ao agente colitogênico por 10 dias, conforme descrito na Figura 10. Os resultados mostraram que independentemente do tratamento com IFX, os camundongos que sofreram esta nova disbiose apresentaram recaída da doença, 24h após o desafio (Figuras 26A-B) e 4% deles morreram frente à nova disbiose (dados não mostrados). Resumidamente, esses dados sugerem que a terapia com o anti-TNF não impede a recidiva da doença após nova disbiose.

A B

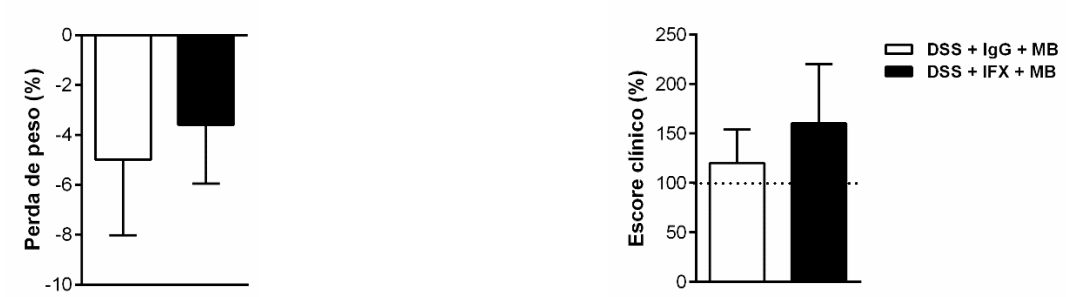


Figura 26. Avaliação do peso e escore clínico de animais expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) 3% durante 7 dias, tratados com Infliximab (IFX) e desafiados ao 13º dia com MB em disbiose. A eutanásia dos animais tratados ou não com IFX foi realizado 24 horas após o desafio com MB em disbiose. Os animais foram expostos à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias e colhido a microbiota intestinal em disbiose e diluído com 10 mL de salina 0,9%. Os animais expostos ao DSS 3% por 7 dias foram tratados com infliximab (IFX) e o agente indutor retirado. Após 6 dia que sucedeu o tratamento os camundongos foram desafiados com microbiota em disbiose (MB). Então 24 horas do desafio, os animais foram eutanasiados. **A** – Frequência do peso em relação ao dia do desafio dos animais tratados ou não com IFX. **B** – Escore clínico após o desafio. A concentração do IFX foi de 5mg/Kg via intraperitoneal (i.p*)*. O desafio foi realizado via gavagem contendo 200uL de MB em disbiose. N=5 animais por grupo. *p < 0.05.

4.3.2. Investigação dos mecanismos de recaída da doença após tratamento com IFX

Com o intuito de melhor investigar as razões pelas quais o tratamento da inflamação intestinal com o imunobiológico não protege da recaída da doença, realizamos as análises já previamente feitas nos protocolos experimentais anteriores, porém, utilizando amostras dos grupos tratados e desafiados.

A quantificação de leucócitos totais do sangue periférico não apresentou diferenças entre os grupos (Figura 27 A), embora tenhamos observado diminuição significativa de neutrófilos circulantes após nova disbiose dos animais tratados com IFX (Figura 27B). As

demais populações celulares não foram modificadas frente ao desafio.

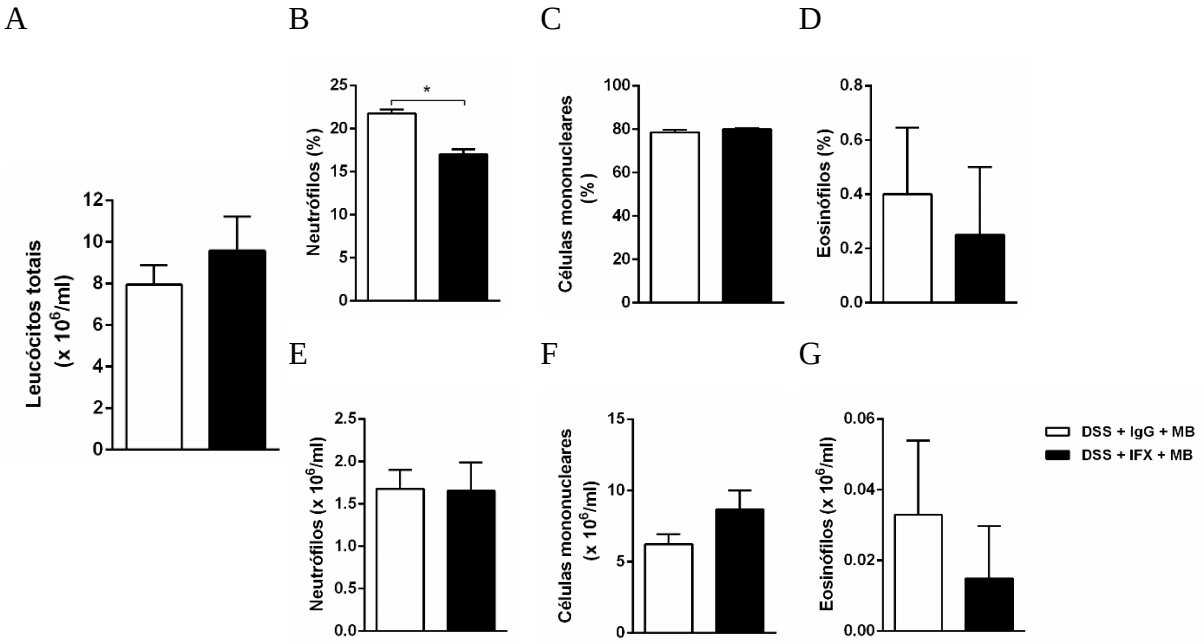


Figura 27. Quantificação de leucócitos do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ao sétimo dia com IFX. Foram então aguardados 6 dias para o reparo tecidual e no 13º dia os animais foram desafiados com uma microbiota em disbiose. Vinte e quatro horas após o do desafio, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado. Leucócitos sanguíneos foram quantificados em hemocitômetro. Para a contagem diferencial, o número total de células obtidas na quantificação em hemocitômetro multiplicado pelo tanto de células contados no esfregaço sanguíneo divididos por 100. **A -** Contagem de leucócitos totais do sangue periférico. **B-D** – Frequência de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos do esfregaço do sangue periférico. **E-G –** Número absoluto de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos do sangue periférico. Os resultados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

Em seguida, os leucócitos totais foram extraídos de órgãos linfoides secundários, tendo sido observado aumento significativo do número de células no baço dos animais tratados com IFX e desafiados com MB em disbiose (Figura 28B), embora não tenham sido detectadas alterações na frequência de macrófagos (Figura 28C), células dendríticas (Figura 28D), linfócitos T CD4 (Figura 28E) ou T CD8 (Figura 28F). Em contraste, não houve diferenças na contagem de células dos MLN, mas o tratamento com IFX seguido por desafio levou à redução de células dendríticas $CD11b^{+}CD11c^{+}$ nos linfonodos mesentéricos (MLN) (Figura 28D e J). As outras subpopulações avaliadas não mostraram diferenças entre os grupos tratados ou não com IFX e que sofreram nova disbiose (Figuras 28H, J e K).

Porém, ao avaliar a atividade funcional dos leucócitos destes órgãos linfoides, foi detectado aumento significativo da proliferação das células provenientes dos linfonodos mesentéricos (mas não baço, Figuras 29 C e B, respectivamente), conforme detalhado na estratégia de análise da citometria de fluxo (Figura 29A).

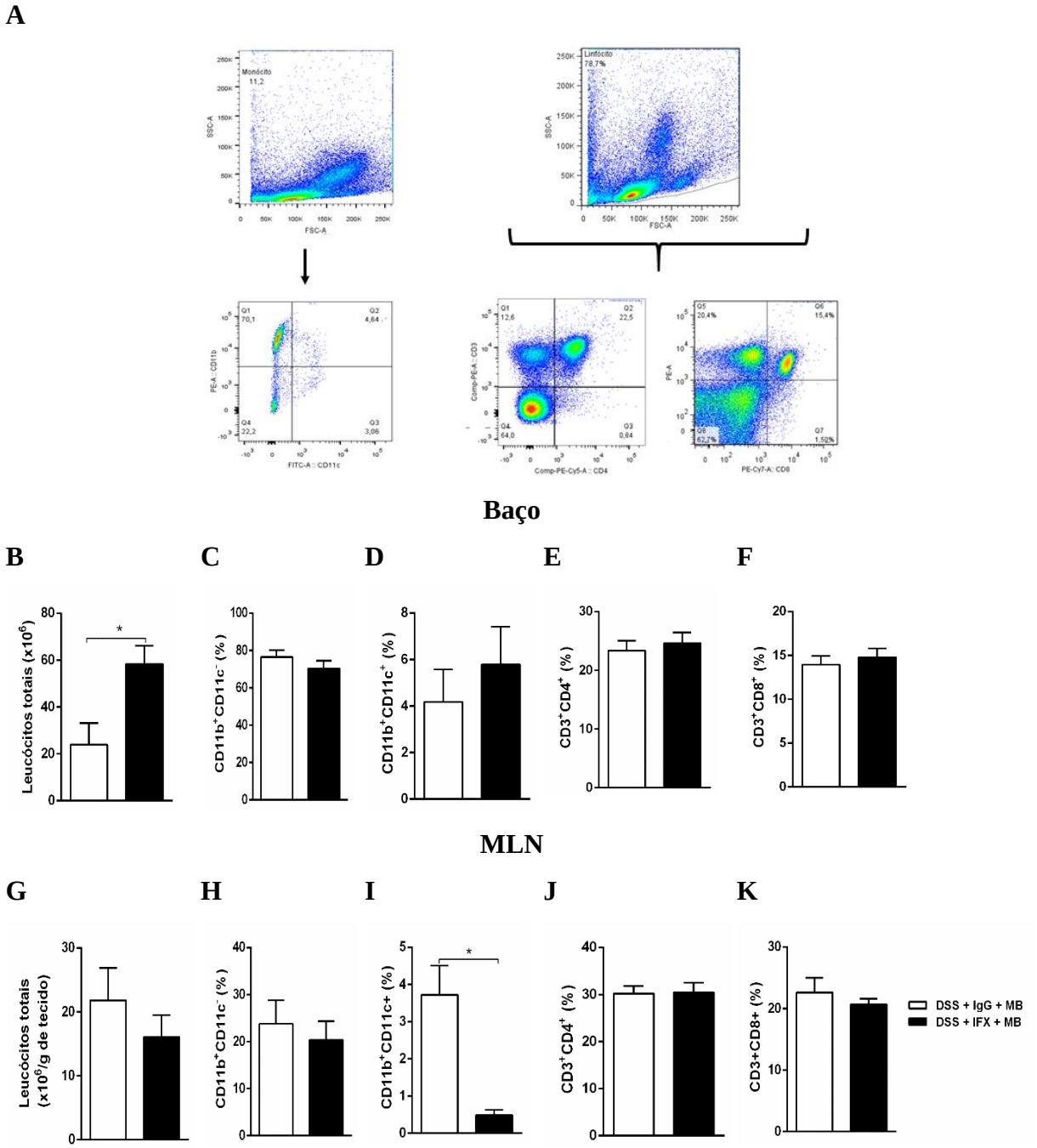


Figura 28. Imunofenotipagem de leucócitos do baço e dos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental e tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não ao sétimo dia com IFX. Foram então aguardados 6 dias para o reparo tecidual e no 13º dia os animais foram desafiados com microbiota em disbiose. Vinte e quatro horas após o do desafio, os animais foram eutanasiados e o baço e linfonodos mesentéricos (LNM) para extração dos leucócitos que foram marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A –** Estratégia de *gate*. **B –** Leucócitos totais do baço expressos em número de células ($x10^6$). **C–F -** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ presentes no baço. **G -** Leucócitos totais dos linfonodos mesentéricos (MLN) expressos em número de células ($x10^6$**) H–I -** Frequência de leucócitos $CD11b^+$ $CD11c^+$, $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ presente nos MLN. Dados representativos de dois experimentos independentes. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

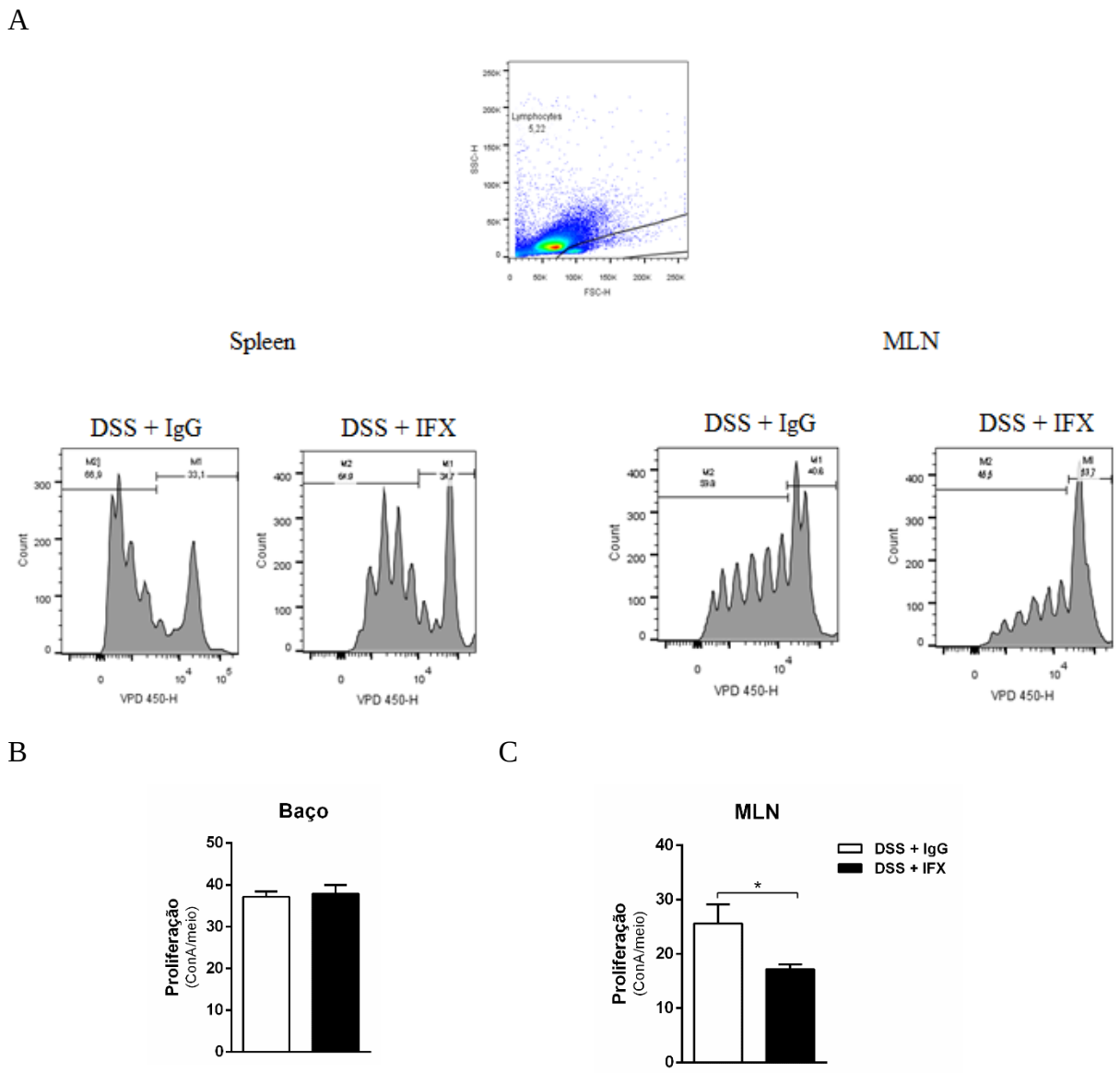


Figura 29. Cultura ex vivo de células de baço e linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados com infliximab (IFX). Os camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e foram tratados ao sétimo dia com 5 mg/Kg de IFX e retirado o agente indutor da colite, após 6 dias eles receberam salina 0,9% e 24 depois foram eutanasiados e baço e os MLN foram colhidos, marcados com Violet proliferation dye (VPD) e reestimulados com concanavalina A (ConA) por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo para análise de proliferação. O sobrenadante foi direcionado para a quantificação de citocinas. **A –** *Gate* e histograma de proliferação celular. **B –** Frequência de proliferação de esplenócitos. **C –** Frequência de proliferação de células do MLN. Esses dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

Ao avaliar a presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no cólon inflamado, observou-se que os animais expostos à água contendo DSS 3%, tratados com o IFX e desafiados com MB em disbiose tiveram aumento significativo da atividade de MPO e diminuição de NAG quando comparados àqueles desafiados mas não tratados com IFX (Figuras 30A e B, respectivamente). A atividade de eosinófilos não foi alterada entre os grupos avaliados (Figura 30C).

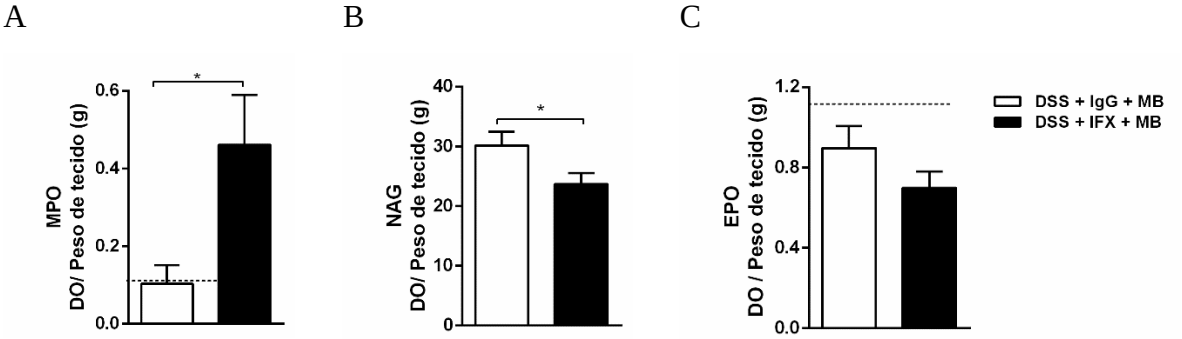


Figura 30. Detecção da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A), N-acetilglicosaminidase (NAG) (B) e eosinófilo-peroxidase (EPO) (C) no colón de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Os camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para os referidos ensaios enzimáticos. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) e corrigidos pelo peso do tecido em gramas (g). As linhas pontilhadas referem-se ao grupo controle saudável. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. N=5 animais por grupo. * $p < 0.05$.

Posteriormente foram avaliadas as populações infiltrantes na lamina própria, por citometria de fluxo. Nos camundongos submetidos à colite experimental, tratados com IFX e desafiados com MB em disbiose houve aumento expressivo de leucócitos totais frente àqueles tratados com IgG controle e desafiados (Figura 31B). Utilizando diferentes estratégias de *gating* (Figura 31A), detectou-se, novamente, aumento significativo de neutrófilos $CD45^+GR1^+$ e células $CD45^+CD11b^+GR1^+$ (Figuras 31D e F, respectivamente) nos animais previamente tratados com IFX. Ao analisar as subpopulações de macrófagos e células dendríticas, notou-se redução de leucócitos $CD11b^-F4/80^+$ (Figura 31H) e aumento significativo de populações de células dendríticas $CD11b^+CD11c^+CD103^+$ tolerogênicas e $CD11b^+CD11c^+CD103^-$ inflamatórias presentes no cólon (Figuras 31K e L, respectivamente).

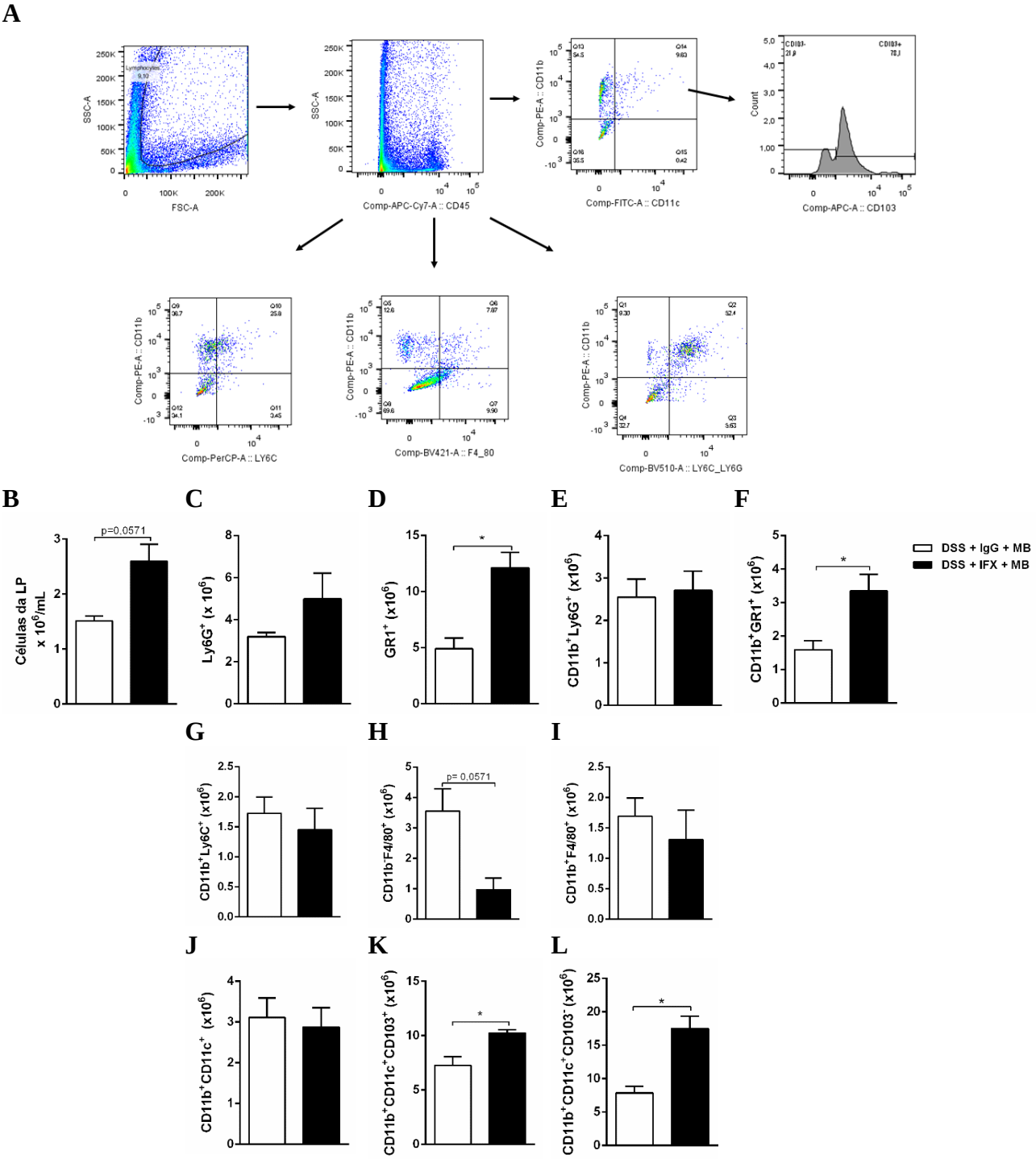


Figura 31. Imunofenotipagem de leucócitos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental, tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para extração dos leucócitos da LP que foram posteriormente marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A-** Estratégia de *gate* **B -** Contagem total de leucócitos da lâmina própria **C-F -** Número absoluto de células $CD45^+Ly6G^+$; $CD45^+GR1^+$. $CD45^+CD11b^+Ly6G^+$; $CD45^+CD11b^+GR1^+$. **G-I -** Número absoluto de células $CD45^+CD11b^+Ly6C^+$; $CD45^+CD11b^-F4/80^+$; $CD45^+CD11b^-F4/80^{+\cdot}$ **J-L -** $CD11b^+CD11c^+$; $CD11b^+CD11c^+CD103^+$; $CD11b^+CD11c^+CD103^-$. Resultados expressos em número de células $x10^6$. Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

Em concordância com os resultados anteriores, observou-se que os linfócitos totais $CD3^+$ da LP apresentaram tendência a aumento nos animais tratados e desafiados com MB em disbiose (Figura 32B). Além disso, praticamente todas as subpopulações de linfócitos avaliados apresentaram aumento em número na lâmina própria (células T naive, ativadas, de memória central, de memória efetora e T de memória residentes, Figura 32), exceto a subpopulação de linfócitos T CD4 naive ($CD3^+CD4^+CD62L^+CD44^-$), que mostrou-se reduzida no cólon dos camundongos tratados com IFX e desafiados (Figura 32H). Em contrapartida, considerando-se a estratégia de *gating* demonstrada na Figura 33A pra análise do compartimento intraepitelial (IEL), observou-se redução total destes linfócitos (Figura 33), incluindo a diminuição de células $CD45^+CD3^+CD4^+$ (Figura 33C), $CD45^+CD3^+CD8^+$ (Figura 33D) e $CD45^+CD3^+TCR\gamma\delta^+$ (Figura 33E) no grupo tratado com IFX e que sofreu nova disbiose em comparação àquele tratado com IgG controle.

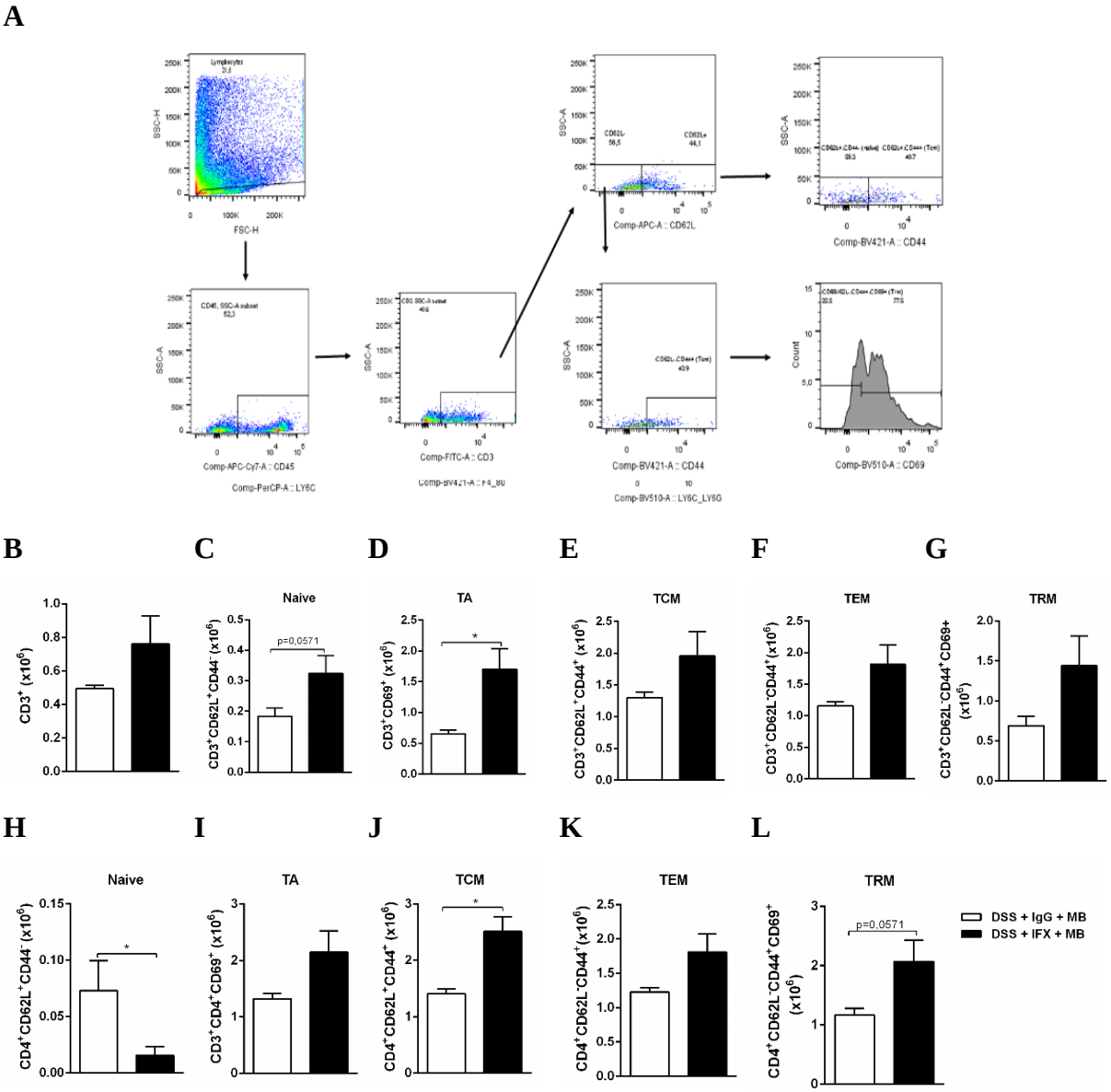


Figura 32. Imunofenotipagem de linfócitos da lâmina própria (LP) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para extração dos leucócitos da LP que foram posteriormente marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A** – Estratégia de *gate*. **B-G –** Número absoluto de linfócitos $CD3^+$; $CD3^+CD62L^+CD44^-$; $CD3^+CD69^+$; $CD3^+CD62L^+CD44^+$; $CD3^+CD62L^-CD44^+$; $CD3^+CD62L^-CD44^+CD69^+$; **H-L –** Número absoluto da subpopulação de linfócitos $CD4^+CD62L^+CD44^-$; $CD3^+CD4^+CD69^+$; $CD4^+CD62L^+CD44^+$; $CD4^+CD62L^-CD44^+$ e $CD4^+CD62L^-CD44^+CD69^+$. TA: Linfócitos T ativado; TCM: Linfócitos T de memória central; TEM: Linfócitos T de memória efetora; TRM: Linfócitos T de memória residente Resultados expressos em número de células $x10^6$ Estes dados são representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *$p < 0.05$.

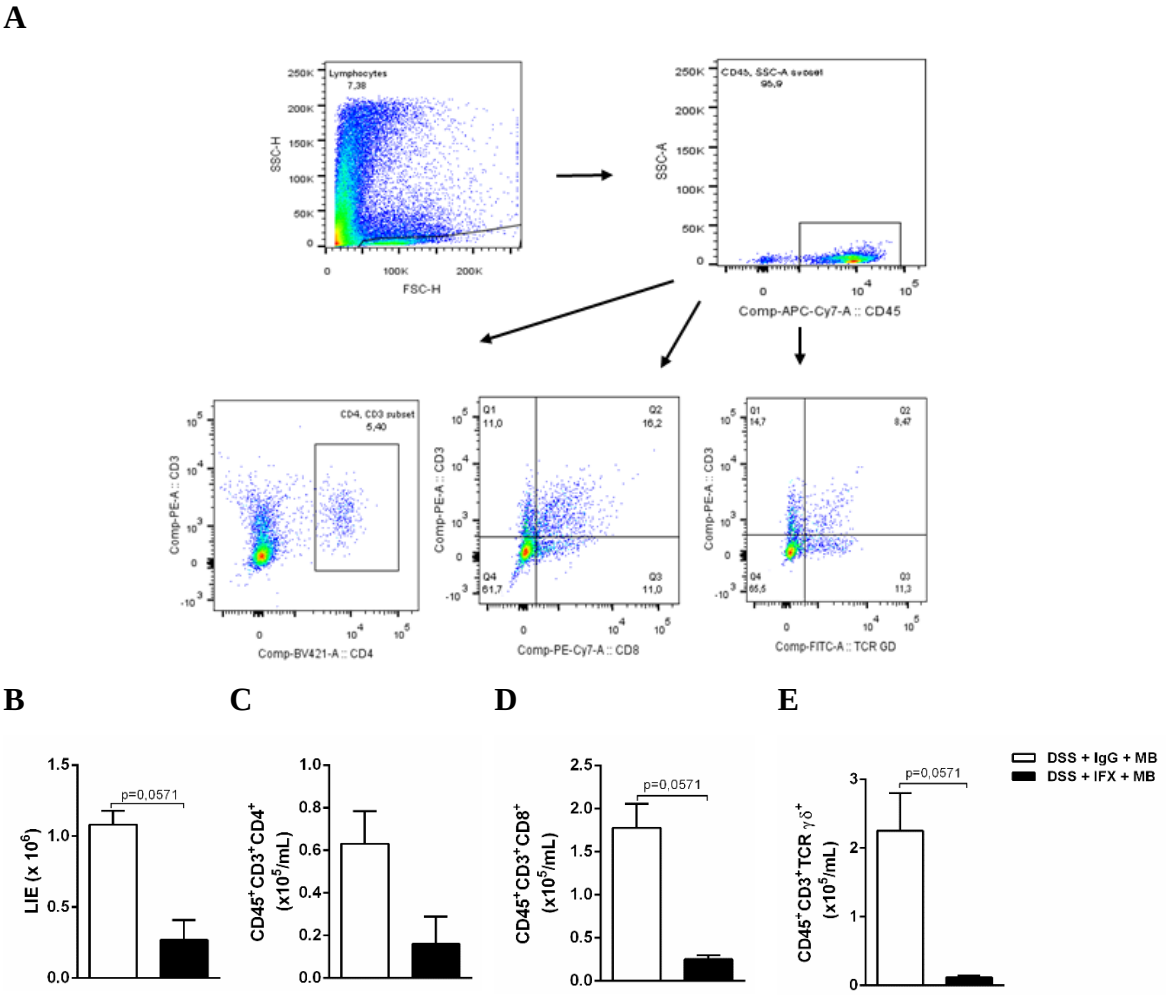


Figura 33. Imunofenotipagem de linfócitos intraepiteliais (LIE) de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e o intestino processado para extração dos LIE que foram posteriormente marcados com anticorpos específicos acoplados à fluorófilos para os marcadores de interesse. A análise foi realizada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. **A-** Estratégia de *gate* **B -D –** Número absoluto de linfócitos $CD45^+CD3^+CD4^+$ **(B),** $CD45^+CD3^+CD8^+$ **(C)** e $CD45^+CD3^+TCR\gamma\delta^+$ **(D).** Dados representativos de um experimento. N=5 animais por grupo. *p < 0.05.

Após a avaliação das populações celulares infiltrantes no cólon, buscou-se avaliar se a nova disbiose induzida pelo desafio citado poderia influenciar na expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas. Neste contexto, notou-se que CCL2 e CCL6 tiveram redução significativa dos níveis de expressão nos animais submetidos à terapia com anti-TNF e desafiados com MB em disbiose (Figuras 34A e C). Não houve diferenças na expressão das demais moléculas entre os grupos avaliados (Figuras 34B, E, F, G).

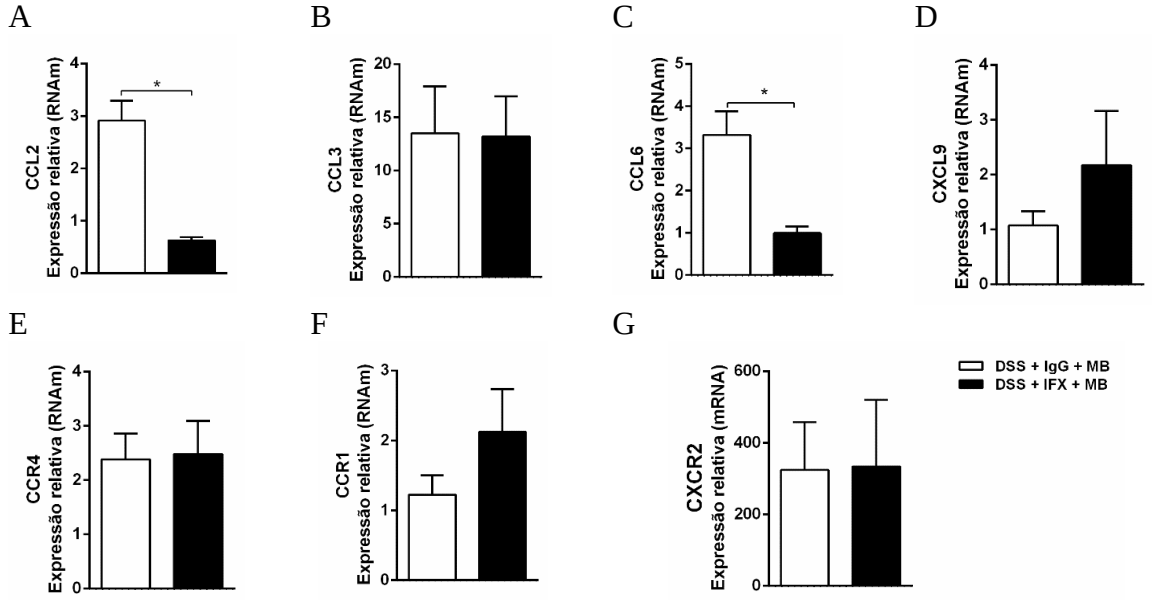


Figura 34. Avaliação da expressão de quimiocinas presentes no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de β-actina. **A –** Expressão relativa de RNAm de CCL2. **B –** Expressão relativa de RNAm de CCL3. **C –** Expressão relativa de RNAm de CCL6. **D** - Expressão relativa de RNAm de CCR1. **E** - Expressão relativa de RNAm de CCR4. **F -** Expressão relativa de RNAm de CXCL9. **G** - Expressão relativa de RNAm de CXCR2. Dados representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

Considerando a expressão gênica de citocinas, as análises revelaram que o desafio com MB em disbiose nos animais tratados com o anti-TNF levou ao aumento de mRNA de IL-21 (Figura 35B) e, em especial, de IL-13 (Figura 35E), em comparação com o grupo desafiado e tratado com IgG controle.

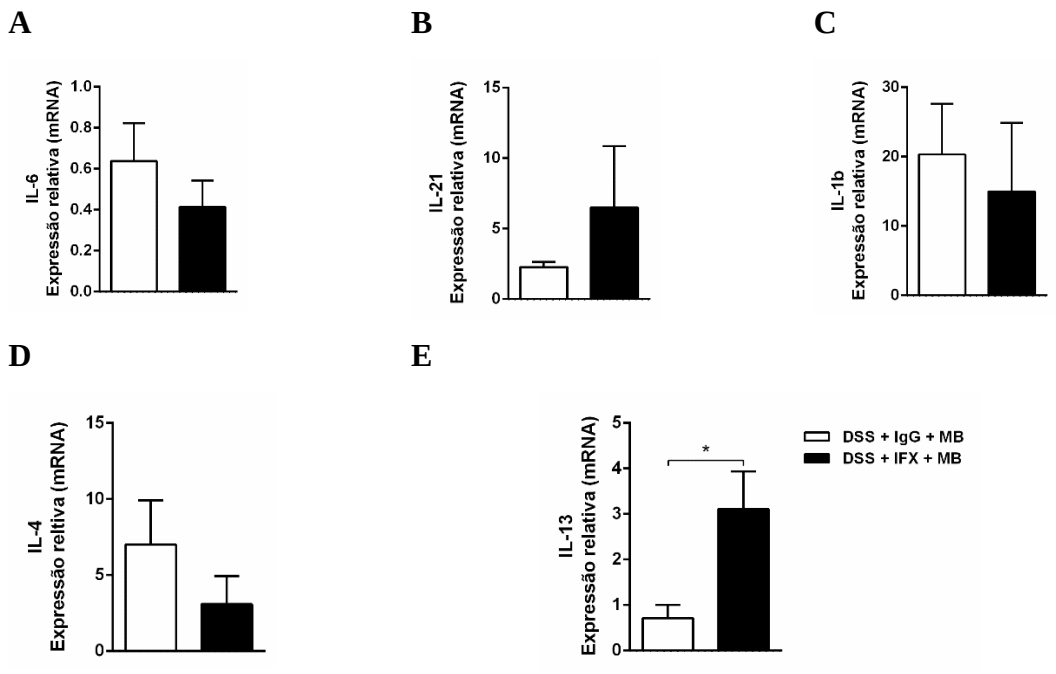


Figura 35. Avaliação da expressão de citocinas presentes no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão do genede β-actina (IL-6 e IL4) e GAPDH (IL-1β, IL-21 e IL13). **A –** Expressão relativa de RNAm de IL-6. **B –** Expressão relativa de RNAm de IL-21. **C –** Expressão relativa de RNAm de IL-1 β. **D -** Expressão relativa de RNAm de IL-4. **E -** Expressão relativa de RNAm de IL-13. Dados representativos de dois experimento independentes. N=5 animais por grupo. *p<0,05

Em sequência, a análise da expressão de mRNA de enzimas relacionadas à esteroidogênese, mostrou redução significativa da enzima CYP11B1 após nova disbiose nos animais submetidos à colite experimental e tratados com IFX, indicando uma suposta diminuição da corticosterona intestinal. Nota-se também que a expressão nesse grupo foi menor que o grupo controle naive, sem inflamação intestinal (Figura 36B).

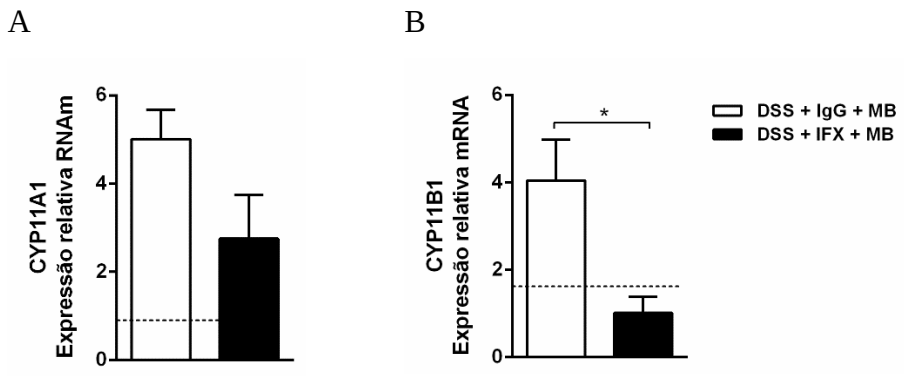


Figura 36. Avaliação da expressão de enzimas precursoras de corticosterona no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de β-actina **A –** Expressão relativa de RNAm de CYP11A1. **B –** Expressão relativa de RNAm de CYP11B1. Dados representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

Com o intuito de averiguar se uma nova disbiose poderia influenciar na expressão das moléculas de junção no cólon, procedeu-se às reações de PCR em tempo real e, dentre as proteínas analisadas, não houve diferenças aparentes de expressão de claudina-1 (Figura 37A), ocludina (Figura 37B) ou ZO-1 (Figura 37C) entre os dois grupos avaliados, após a nova disbiose intestinal. Entretanto, o desafio nos animais que receberam IFX levou a um aumento significativo da permeabilidade intestinal (Figura 38), embora sem reflexos sistêmicos de translocação microbiana aumentada (Figura 39).

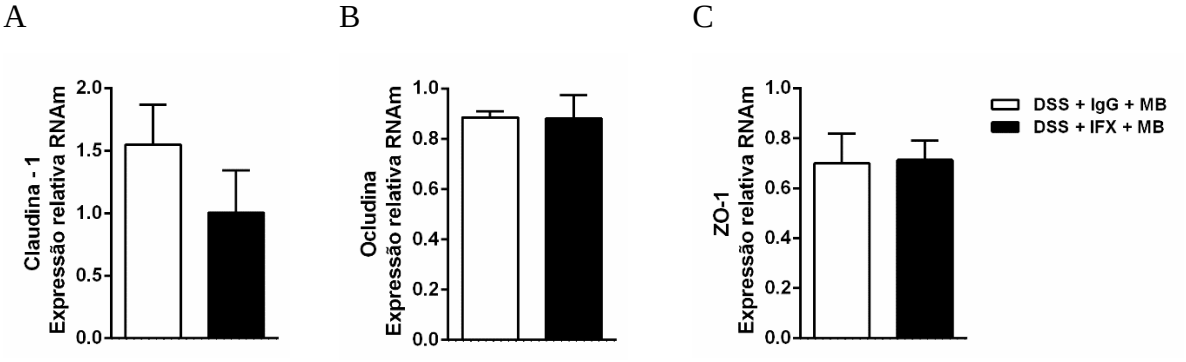


Figura 38. Avaliação da expressão das proteínas de *tight juntions* no cólon de camundongos submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e amostras do cólon foram coletadas e processadas para a realização de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de β-actina**. A –** Expressão relativa de RNAm de Claudina-1. **B –** Expressão relativa de RNAm de Ocludina. **C –** Expressão relativa de RNAm de ZO-1. Os dados são representativos de um único experimento. N=5 animais por grupo. *p<0,05.

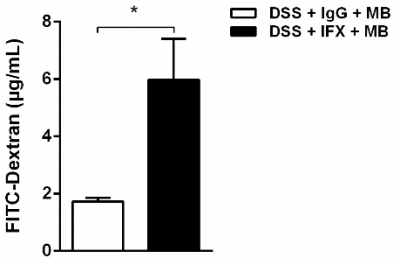


Figura 39. Avaliação da permeabilidade intestinal pela quantificação de FITC-Dextran presente no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e tiveram o sangue coletado para a quantificação da molécula de FITC-Dextran (µg/mL) no soro. Dados representativos de dois experimentos independentes. N=5 animais por grupo. *p < 0.05.

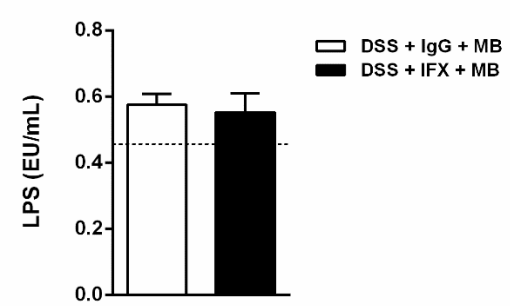


Figura 38. Determinação de Lipopolissacarideo (LPS) circulante no soro de camundongos C57BL/6 submetidos à colite experimental tratados ou não com infliximab (IFX)) e desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Camundongos foram expostos por 7 dias à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% e tratados ou não com IFX, foram aguardados 6 dias para o reparo tecidual e ao 13º dia os animais foram desafiados com microbiota (MB) em disbiose. Após 24 horas os camundongos foram eutanasiados e tiveram o sangue coletado para a avaliação do produto bacteriano (LPS) no soro. Resultados expressos em unidade de endotoxina (EU/mL) no soro dos animais. Estes dados são representativos de dois experimentos independentes. N=5 animais por grupo. *p < 0.05.

5. Discussão

O tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) com anticorpos monoclonais, como bloqueadores de TNF, tem como principal função controlar as respostas inflamatórias exacerbadas, reduzir os episódios de recidiva da doença e prolongar os períodos de remissão clínica. O Infliximab é um dos imunobiológicos mais utilizados para doenças como Crohn e colite ulcerativa; porém seus impactos no sistema imune ainda são pouco conhecidos, em especial seus efeitos nas respostas imunológicas frente à recidiva da doença, que pode ocorrer devido a inúmeros fatores, como a não responsividade ao tratamento ou uma nova disbiose no trato intestinal. Diversos trabalhos têm relatado que a microbiota intestinal de pacientes com DII contribui para a recidiva da doença após o tratamento, em que a interrupção do anti-TNF, por exemplo, pode reduzir algumas bactérias benéficas para o controle da inflamação, como *Firmicutes* e *Bacteroidetes*[48, 49]. Portanto, para investigar os efeitos do IFX na DII, foram realizados protocolos experimentais de modo a simular o que acontece com pacientes na recaída da inflamação, frente a um novo desbalanço da microbiota local.

Inicialmente, avaliamos se um desafio antigênico com microbiota em disbiose poderia impactar na resposta imunológica pós colite experimental, na ausência de tratamento. Como observado na figura 2, após a retirada do agente colitogênico os animais voltaram a ganhar peso e diminuir o escore clínico. Porém, após serem desafiados com microbiota em disbiose houve recaída da doença; validando, assim, o modelo experimental proposto. Até o momento, foram realizados estudos que visam compreender a importância da disbiose intestinal tanto em animais submetidos à colite experimental como em pacientes com DII[44, 46] e nossos resultados sustentam a hipótese de que este desbalanço pode ser um dos gatilhos para a reagudização da doença.

Além das alterações clínicas observadas, o desafio com MB em disbiose também levou ao aumento de leucócitos no baço e nos MLN, redução da frequência de neutrófilos circulantes, aumento de monócitos no sangue e macrófagos no intestino, além da maior produção de IL-17A e TNF no cólon inflamado. O TNF pode ativar e recrutar macrófagos para o local inflamado[61] e estas células são cruciais para a manutenção da homeostasia e funcionamento fisiológico intestinal. Os macrófagos induzem proliferação epitelial, possuem atividade bactericida e produzem de citocinas, como por exemplo IL-6 e TNF, sendo que esta última mostrou-se aumentada no cólon dos camundongos após o desafio[61, 62, 63]. Tal achado indica que a possível translocação bacteriana pelo desafio com MB em disbiose pode estar sendo contida no cólon, uma vez que não houve diferença de LPS circulante entre os grupos avaliados.

O delineamento experimental realizado serviu de base para analisarmos o melhor dia de tratamento com Infliximab, uma vez que a terapia tem alta eficácia no momento em que a

inflamação intestinal está na fase moderada a grave[64]. Deste modo, a terapia com este anti-TNF no sétimo dia (antes da maior gravidade da doença) levou à melhora da atividade clínica no terceiro dia posterior ao tratamento, com menor perda de peso e diminuição do escore clínico. Esta mesma melhora clínica foi constatada em outros grupos experimentais em que os camundongos são expostos durante 3 dias ao DSS 2,5% e tratados no terceiro dia com o fármaco; mas a diferença significativa da melhora clínica dos animais, vista neste procedimento, ocorre cinco dias após a administração do IFX[57].

No nosso trabalho, ao desafiarmos os camundongos com MB em disbiose, observamos o retorno dos sinais clínicos, mesmo após a terapia, sugerindo que o IFX não protege contra a recidiva desta doença crônica. Acredita-se que a recaída dos pacientes esteja relacionada à imunossupressão causada pelo anti-TNF, predispondo-os a infecções oportunistas, logo nos primeiros meses do tratamento, sustentando assim a hipótese da piora da atividade clínica nos animais desafiados com MB em disbiose após o tratamento[65]. Estudos anteriores têm relatado que alguns pacientes não respondem à terapia após 22 semanas, devido à resposta contra o anti-TNF[49, 60], o que poderia estar associado à redução de certas populações de bactérias como *Firmicutes* e *Bacteroidetes* que são importantes para o re-equilíbrio da microbiota, contribuindo assim para o retorno da doença[48, 49]. Entretanto, acreditamos que em nosso estudo as chances de resposta anti-terapia biológica são remotas, uma vez que os camundongos receberam uma única dose do IFX, que é um anticorpo quimérico, com frações de origem humana e murina[55].

O tratamento com anti-TNF não reduziu o número de leucócitos totais circulantes, mas a frequência de neutrófilos mostrou-se aumentada nos animais tratados (mas não desafiados). Houve também, diminuição da frequência de células mononucleares do sangue periférico e de subpopulações como macrófagos $CD11b^{+}CD11c^{-}$ e linfócitos $CD3^{+}CD4^{+}$ no baço dos camundongos apenas tratados com IFX. Outra redução causada pela terapia imunossupressora foi a frequência de células dendríticas $CD11b^{+}CD11c^{+}$ nos MLN bem como a capacidade proliferativa *in vitro* dos leucócitos deste mesmo órgão. Esta diminuição pode ser oriunda das ações do IFX, pois um dos seus mecanismos é levar à apoptose das células que expressam o TNF ligado à membrana através da atividade de citotoxicidade celular dependente do anticorpo, uma vez que linfócitos T, células dendríticas e macrófagos podem produzir o TNF ou expressar seu receptor[64, 66]. Em contrapartida, observou-se o aumentou do número de leucócitos e de células dendríticas $CD11b^{+}CD11c^{+}$ no baço dos camundongos tratados e desafiados com MB em disbiose. No entanto, o número de leucócitos totais nos MLN não foram alterados neste grupo, mas houve redução de DC $CD11b^{+}CD11c^{+}$ nos MLN e aumento da capacidade

proliferativa de células dos linfonodos drenantes do intestino dos animais tratados e desafiados. Embora o tratamento com anti-TNF possa diminuir a capacidade proliferativa, como visto nos animais tratados com IFX (mas não desafiados), um desafio antigênico pode reativar essas células aumentando sua proliferação pelo reconhecimento de antígenos bacterianos vindos da MB em disbiose[67, 68]

Além disso, observamos nesse grupo uma significativa redução de neutrófilos do sangue periférico associado ao aumento da atividade dos mesmos no colón. Sabe-se que recrutamento de fagócitos polimorfonucleares é uma das principais causas de inflamação intestinal[69]. Uma vez recrutados reconhecem e são ativados por patógenos produzindo altas concentrações de ROS, peptídeos antimicrobianos como α-defensinas e catelicidinas, mieloperoxidase dentre outros[69]. Sendo assim, a ativação exacerbada dos neutrófilos pode acarretar em lesão tecidual, comprometendo a barreira epitelial. A imunofenotipagem da LP do cólon dos camundongos tratados apenas com IFX mostrou aumento dos neutrófilos $Ly6G^+$, $CD11b^+Ly6G^+$, de células dendríticas $CD11b^+CD11c^+$ $CD11b^+CD11c^+CD103^+$ tolerogênicas e $CD11b^+CD11c^+CD103^+$ inflamatórias. Por outro lado, como citado acima, o desafio com MB em disbiose pós-terapia aumentou o número de neutrófilos $GR1^+$, $CD11b^+GR1^+$ e células dendríticas $CD11b^+CD11c^+CD103^-$ inflamatórias na LP. Dados da literatura sugerem que a ativação de células mielóides para um perfil inflamatório pode ser devido principalmente a sinais desencadeados pelo reconhecimento do antígeno, levando à ativação de receptores do tipo *Toll* nestas células, potencializando a rápida mobilização de neutrófilos, aumento da fagocitose, *burst* respiratório, produção de metatoprotease e enzimas que causam danos teciduais[69, 70]. De fato, os animais tratados com IFX e desafiados com MB em disbiose apresentaram maior destruição do cólon, com notório aumento da permeabilidade intestinal.

As análises das subpopulações de linfócitos na LP não mostraram diferenças após a terapia com IFX; porém, houve aumento significativo de algumas subpopulações após o desafio com MB em disbiose no grupo tratado. Houve aumento do número de linfócitos T ativados $CD3^+CD69^+$, o que possivelmente está associado ao desafio antigênico, uma vez que a ativação da resposta adaptativa pode estar ligada à fase aguda tardia da colite induzida por DSS[71].

As células T de memória podem reconhecer os peptídeos de bactérias intestinais diminuindo o processo infeccioso, mas em contrapartida podem promover condições inflamatórias, o que justificaria o aumento das células T de memória central e residentes após o desafio com microbiota em disbiose nos camundongos tratados[72, 73]. As células T de memória central são residentes em órgãos linfoides expressando $CCR7^+$, porém elas podem perder a

expressão deste receptor permitindo sua migração para os tecidos periféricos em estímulo a antígenos bacterianos ou virais, podendo se desenvolver em células T de memória residentes[72]. Por outro lado, as células T de memória residentes não são recirculantes e residem nos tecidos periféricos, respondendo rapidamente contra infecções *in situ*[72].

Camundongos apenas submetidos à terapia com IFX (e não desafiados) apresentaram redução da expressão de IL-21 e da quimiocina CXCL9 no cólon; porém, não houve alteração das subpopulações de linfócitos da LP e intraepiteliais. Por outro lado, notou-se o aumento da expressão de IL-21 e de CXCL9 nos animais tratados com o anti-TNF e desafiados com MB em disbiose. Relatos apontam que após a vigésima sexta semana de tratamento, os pacientes apresentam elevado aumento da expressão de citocinas de perfil Th1 e Th17 no cólon, aumentando os riscos de recidiva da doença[74]. A IL-21 é uma citocina expressa por células perfil Th17, podendo regular atividade das células NK e células $TCD8^+$, além de levar à polarização das T reguladoras para o perfil Th17[75]. Em pacientes com DII, já foi relatado que a IL-21 liberada pela células Th17 pode aumentar a síntese de proteases da matriz extracelular, estimular a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e recrutamento de neutrófilos, contribuindo para o aumento da inflamação[75]. Entretanto, apesar do aumento da expressão de moléculas indutoras de migração nos camundongos tratados e submetidos ao desafio com MB em disbiose, houve também a diminuição do número de linfócitos intraepiteliais. A redução destes linfócitos poderia estar relacionada com o aumento de algumas bactérias presentes no material fecal utilizado no transplante de MB em disbiose, como por exemplo do filo das proteobactérias; enquanto que as populações de bacteroidetes, firmicutes e actinobactéria estavam em menor quantidade. Bactérias do gênero *Salmonella ssp.*, *Yersinia ssp.* e *Escherichia ssp* são capazes de levar à morte celular pela presença de fatores de virulência, acarretando em destruição tecidual[67, 68], o que poderia justificar a redução do número de LIE após o desafio com MB em disbiose. Ademais, sabe-se que pacientes com inflamação intestinal têm aumento de proteobactérias e diminuição de bacteroidetes, o que corrobora com nossos resultados de análise de expressão bacteriana do grupo doador de microbiota em disbiose[40, 41, 42].

Houve também a diminuição da expressão de CCL6 e CCL2 em ambos os grupos tratados (desafiados ou não). Essas moléculas são conhecidamente responsáveis pelo recrutamento de monócitos inflamatórios e macrófagos. Essa diminuição, provavelmente causada pelo tratamento com anti-TNF, foi acompanhada da redução da migração e atividade de macrófagos no cólon. A mesma diminuição de CCL2 foi vista em pacientes com artrite reumatoide, nas articulações sinoviais, após o tratamento com IFX. Tal tratamento inibe a ação

do TNF, uma das citocinas essenciais na indução da expressão de CCL2[76, 77]. Como dito anteriormente, as IBD são caracterizadas por um recrutamento excessivo de leucócitos da circulação sanguínea para a parede intestinal inflamada. Esse processo é regulado pela expressão de quimiocinas e seus receptores em leucócitos e em células endoteliais. Estudos mostram que em biópsias de pacientes com CD ativa ocorre um aumento da expressão de quimiocinas e seus receptores como, CCL2-6, CCL19-20, CXCL1-2, CXCL9-11, CXCL13, CCR5, CCR7, CXCR2. No entanto o tratamento com IFX levou à redução da expressão da maioria deles com exceção de CCL-20 e CXCL1-2 que permaneceram aumentadas mesmo após o tratamento[78].

A terapia imunossupressora com anti-TNF mostrou-se promissora na melhora da inflamação intestinal como visto anteriormente. Contudo, durante situações de estresse imunológico e inflamação, as células epiteliais intestinais podem produzir substâncias imunossupressoras como glicocorticoides, que têm a função de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, regulando assim o sistema imunológico[79, 80]. A produção do glicocorticoide é realizada através de enzimas esteroidogênicas do citocromo P450, como o CYP11B1 e CYP11A1, reguladas pelo receptor nuclear fator esteroidogênico 1, realizando assim o controle imunoendócrino da inflamação[79, 80].

Em nossos experimentos houve aumento da expressão de CYP11B1, o que poderia justificar a melhora clínica dos animais tratados com IFX (sem desafio com MB), contribuindo para a diminuição da inflamação. Porém, quando avaliamos a expressão destas enzimas nos animais submetidos à terapia e desafiados com MB em disbiose, observamos a redução da expressão de CYP11B1 e aparentemente a redução de CYP11A1, sustentando a hipótese da recaída dos animais após o desafio. O CYP11A1 é uma enzima responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona, que por sua vez pode dar origem a progesterona e o CYP11B1 é responsável pela conversão do 11-desoxicortisol em cortisol e também da 11-deoxicorticosterona em corticosterona, consequentemente levando à imunossupressão[79].

Tais reduções observadas nas enzimas esteroidogênicas nos animais tratados e desafiados com MB em disbiose, poderiam também estar relacionadas à ação da microbiota, acarretando no excesso de ativação de neutrófilos nos animais tratados e desafiados, uma vez que o anti-TNF está inibindo células essenciais para o reconhecimento e morte do patógeno como os macrófagos. Assim, a ativação exacerbada de neutrófilos poderia estar relacionada com aumento dos níveis de mediadores inflamatórios, como ROS, NO e NET's, gerando lesão tecidual, o que poderia levar ao aumento da permeabilidade intestinal vista nos animais

desafiados com MB em disbiose[70]. Porém, ensaios mais aprofundados ainda precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Outro resultado que corrobora esse aumento da permeabilidade é a elevada expressão de IL-21 e IL-13, vista nos animais desafiados e previamente tratados com IFX. Já está bem elucidado na literatura que durante a inflamação intestinal induzida pelo DSS, a expressão de claudina-2 é aumentada e está associada ao aumento da produção de IL-13 no cólon, alterando a permeabilidade intestinal, assim como visto em nosso modelo experimental pós desafio[25].

Não foram observadas diferenças visíveis da piora clínica da doença entre os camundongos tratados com IFX e desafiados com MB e aqueles tratados com IgG e desafiados. No entanto, foi evidente que a terapia com o imunobiológico gerou alterações significativas no sistema imune de mucosa intestinal, impactando consideravelmente as respostas frente à quebra da normobiose com o novo desafio antigênico. Neste contexto, embora o bloqueio de TNF tenha contribuído para o controle inicial do processo inflamatório, a consequente imunossupressão seguida por desafio alterou a proliferação celular, produção de citocinas, mediadores anti-inflamatórios, comprometeu a barreira intestinal e a resposta imune local, o que poderia gerar consequências a médio ou longo prazo, além das imediatas observadas. Assim, frente a um processo infeccioso, seja por vírus, parasita ou até mesmo uma nova disbiose intestinal, o sistema imunológico poderia não responder adequadamente e, consequentemente, não controlar o processo infeccioso ou inflamatório subsequentes. Logo, a inibição de macrófagos e mediadores inflamatórios vista após o uso do IFX, associada à ativação excessiva de células pós desafio com MB em disbiose, poderia impactar na homeostasia e na adequada regulação dos processos inflamatórios de mucosa intestinal.

Sendo assim, sabendo que a terapia com IFX diminui a inflamação intestinal e melhora a atividade clínica das DII, é importante ressaltar a possibilidade de surgimento de efeitos indesejáveis decorrentes da imunossupressão, como aumento da predisposição a processos infecciosos e imunopatologias. Contudo, o desenvolvimento de novas terapias, especialmente combinadas com os imunobiológicos, poderia melhorar ainda mais os quadros clínicos da doença e dessa forma atenuar os efeitos indesejáveis do controle excessivo da resposta imune. Finalmente, este trabalho visou ampliar o conhecimento aplicável das consequências do tratamento das doenças inflamatórias com imunobiológicos, especialmente frente a um desafio infeccioso que poderia comprometer o bom funcionamento e regulação imunológica do trato gastrintestinal.

6. Conclusão

6 – Conclusões

- O transplante de microbiota em disbiose para receptores em fase de reparo da colite gerou recidiva da doença
- O tratamento com infliximab melhorou os aspectos clínicos e imunológicos da doença, reduzindo a inflamação local.
- A imunossupressão causada pelo uso do anti-TNF não protegeu da recidiva da doença após nova disbiose, com piora da atividade clínica, inflamação intestinal exacerbada, acúmulo de neutrófilos e aumento da permeabilidade intestinal com alterações na homeostasia do sistema imune de mucosas

7. Referências

7. Referências

1. Fonseca, D.M. *et al.* Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. *Cell* **163**, 354-366 (2015).

2. Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A. & Saliba, W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **22**, 1078-1087 (2016).

3. Wallace, K.L., Zheng, L.B., Kanazawa, Y. & Shih, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **20**, 6-21 (2014).

4. Basso, P.J. *et al.* Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Braz J Med Biol Res* **47**, 727-737 (2014).

5. Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641-1657 (2007).

6. Eichele, D.D. & Kharbanda, K.K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol* **23**, 6016-6029 (2017).

7. Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L. & EpiCom, E. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* **7**, 322-337 (2013).

8. Molodecky, N.A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46-54 e42; quiz e30 (2012).

9. Ng, S.C. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* **390**, 2769-2778 (2018).

10. Rocchi, A. *et al.* Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Can J Gastroenterol* **26**, 811-817 (2012).

11. Kappelman, M.D. *et al.* Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults. *Gastroenterology* **135**, 1907-1913 (2008).

12. Marchetti, M. & Liberato, N.L. Biological therapies in Crohn's disease: are they cost-effective? A critical appraisal of model-based analyses. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* **14**, 815-824 (2014).

13. Ng, S.C. Emerging leadership lecture: Inflammatory bowel disease in Asia: emergence of a "Western" disease. *J Gastroenterol Hepatol* **30**, 440-445 (2015).

14. Bamias, G., Arseneau, K.O. & Cominelli, F. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* **33**, 411-416 (2017).

15. Wirtz, S. *et al.* Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc* **12**, 1295-1309 (2017).

16. Perse, M. & Cerar, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 718617 (2012).

17. Kiesler, P., Fuss, I.J. & Strober, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **1**, 154-170 (2015).

18. Okayasu, I. *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702 (1990).

19. Corfield, A.P., Wallace, H.M. & Probert, C.S. The molecular biology of inflammatory bowel diseases. *Biochem Soc Trans* **39**, 1057-1060 (2011).

20. Kamada, N. & Rogler, G. The Innate Immune System: A Trigger for Many Chronic Inflammatory Intestinal Diseases. *Inflamm Intest Dis* **1**, 70-77 (2016).

21. Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K. & Takada, H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* **44**, 3100-3111 (2007).

22. Heller, F. *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**, 550-564 (2005).

23. Salmond, R.J. *et al.* IL-33 induces innate lymphoid cell-mediated airway inflammation by activating mammalian target of rapamycin. *J Allergy Clin Immunol* **130**, 1159-1166 e1156 (2012).

24. Shajib, M.S. *et al.* Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS One* **8**, e72774 (2013).

25. Prasad, S. *et al.* Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* **85**, 1139-1162 (2005).

26. Hata, K. *et al.* IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G1035-1044 (2002).

27. Sun, Y. *et al.* Gingko biloba extract (Ginaton) ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis in mice via reducing IL-6/STAT3 and IL-23/IL-17. *Int J Clin Exp Med* **8**, 17235-17247 (2015).

28. Griffin, G.K. *et al.* IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol* **188**, 6287-6299 (2012).

29. Sznurkowska, K. *et al.* Peripheral and Intestinal T-regulatory Cells are Upregulated in Children with Inflammatory Bowel Disease at Onset of Disease. *Immunol Invest*, 1-10 (2016).

30. Lord, J.D. Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **21**, 11236-11245 (2015).

31. Zhang, M. *et al.* Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats. *BMC Gastroenterol* **16**, 84 (2016).

32. Siakavellas, S.I. & Bamias, G. Tumor Necrosis Factor-like Cytokine TL1A and Its Receptors DR3 and DcR3: Important New Factors in Mucosal Homeostasis and Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* **21**, 2441-2452 (2015).

33. Sidhu-Varma, M., Shih, D.Q. & Targan, S.R. Differential Levels of Tl1a Affect the Expansion and Function of Regulatory T Cells in Modulating Murine Colitis. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 548-559 (2016).

34. Sujino, T. *et al.* Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4(+) T cells controls gut inflammation. *Science* **352**, 1581-1586 (2016).

35. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65 (2010).

36. Ishaq, H.M. *et al.* Molecular Alteration Analysis of Human Gut Microbial Composition in Graves' disease Patients. *Int J Biol Sci* **14**, 1558-1570 (2018).

37. Kamdar, K. *et al.* Innate Recognition of the Microbiota by TLR1 Promotes Epithelial Homeostasis and Prevents Chronic Inflammation. *J Immunol* **201**, 230-242 (2018).

38. Koboziev, I., Reinoso Webb, C., Furr, K.L. & Grisham, M.B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med* **68**, 122-133 (2014).

39. Rooks, M.G. *et al.* Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J* **8**, 1403-1417 (2014).

40. Ott, S.J. *et al.* Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 685-693 (2004).

41. Vrakas, S. *et al.* Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* **12**, e0170034 (2017).

42. Bosman, E.S., Chan, J.M., Bhullar, K. & Vallance, B.A. Investigation of Host and Pathogen Contributions to Infectious Colitis Using the Citrobacter rodentium Mouse Model of Infection. *Methods Mol Biol* **1422**, 225-241 (2016).

43. Kamada, N., Seo, S.U., Chen, G.Y. & Nunez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* **13**, 321-335 (2013).

44. De Fazio, L. *et al.* Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *World J Gastroenterol* **20**, 2051-2061 (2014).

45. Wright, E.K. *et al.* Microbial Factors Associated with Postoperative Crohn's Disease Recurrence. *J Crohns Colitis* **11**, 191-203 (2017).

46. Putignani, L. *et al.* Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 487-504 (2016).

47. Jacobs, J.P. *et al.* Microbial, metabolomic, and immunologic dynamics in a relapsing genetic mouse model of colitis induced by T-synthase deficiency. *Gut Microbes* **8**, 1-16 (2017).

48. Rajca, S. *et al.* Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **20**, 978-986 (2014).

49. Zhou, Y. *et al.* Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems* **3** (2018).

50. Valatas, V., Vakas, M. & Kolios, G. The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G763-785 (2013).

51. Sales-Campos, H. *et al.* Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res* **48**, 96-107 (2015).

52. Lee, J.C. Predicting the course of IBD: light at the end of the tunnel? *Dig Dis* **30 Suppl 1**, 95-99 (2012).

53. Zenlea, T. & Peppercorn, M.A. Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **20**, 3146-3152 (2014).

54. Targan, S.R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**, 1029-1035 (1997).

55. de Paula-Silva, M. *et al.* Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis. *Biochem Pharmacol* **115**, 104-113 (2016).

56. Mowat, C. *et al.* Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **60**, 571-607 (2011).

57. Lopetuso, L.R. *et al.* Locally injected Infliximab ameliorates murine DSS colitis: differences in serum and intestinal levels of drug between healthy and colitic mice. *Dig Liver Dis* **45**, 1017-1021 (2013).

58. Dahlen, R. *et al.* Infliximab inhibits activation and effector functions of peripheral blood T cells in vitro from patients with clinically active ulcerative colitis. *Scand J Immunol* **78**, 275-284 (2013).

59. Assas, B.M. *et al.* Anti-inflammatory effects of infliximab in mice are independent of tumour necrosis factor alpha neutralization. *Clin Exp Immunol* **187**, 225-233 (2017).

60. Zhou, Y. *et al.* Infliximab for the treatment of Crohn's disease: efficacy and safety in a Chinese single-center retrospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **27**, 1270-1275 (2015).

61. Shaw, T.N. *et al.* Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med* **215**, 1507-1518 (2018).

62. Konkel, J.E. *et al.* Transforming Growth Factor-beta Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* **46**, 660-674 (2017).

63. Smythies, L.E. *et al.* Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* **115**, 66-75 (2005).

64. Matsuoka, K. *et al.* Factors predicting the therapeutic response to infliximab during maintenance therapy in Japanese patients with Crohn's disease. *PLoS One* **13**, e0204632 (2018).

65. Rahier, J.F. *et al.* Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **8**, 443-468 (2014).

66. Davignon, J.L. *et al.* Modulation of T-cell responses by anti-tumor necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: a review. *Arthritis Res Ther* **20**, 229 (2018).

67. Koffel, R. *et al.* Host-Derived Microvesicles Carrying Bacterial Pore-Forming Toxins Deliver Signals to Macrophages: A Novel Mechanism of Shaping Immune Responses. *Front Immunol* **9**, 1688 (2018).

68. Crane, J.K., Majumdar, S. & Pickhardt, D.F., 3rd. Host cell death due to enteropathogenic Escherichia coli has features of apoptosis. *Infect Immun* **67**, 2575-2584 (1999).

69. Ahmed, A.U., Yim, H.C.H., Alorro, M., Ernst, M. & Williams, B.R.G. Integrin-Linked Kinase Expression in Myeloid Cells Promotes Inflammatory Signaling during Experimental Colitis. *J Immunol* (2017).

70. Veglia, F., Perego, M. & Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* **19**, 108-119 (2018).

71. Kwon, S.H. *et al.* T Cell-Specific Knockout of STAT3 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Reducing the Inflammatory Response. *Immune Netw* **18**, e30 (2018).

72. Farber, D.L., Yudanin, N.A. & Restifo, N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 24-35 (2014).

73. Hegazy, A.N. *et al.* Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology* **153**, 1320-1337 e1316 (2017).

74. Rismo, R. *et al.* Normalization of mucosal cytokine gene expression levels predicts long-term remission after discontinuation of anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **48**, 311-319 (2013).

75. Holm, T.L. *et al.* Evaluating IL-21 as a Potential Therapeutic Target in Crohn's Disease. *Gastroenterol Res Pract* **2018**, 5962624 (2018).

76. Eriksson, C., Rantapaa-Dahlqvist, S. & Sundqvist, K.G. Changes in chemokines and their receptors in blood during treatment with the TNF inhibitor infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* **42**, 260-265 (2013).

77. Xia, L., Lu, J. & Xiao, W. Blockage of TNF-alpha by infliximab reduces CCL2 and CCR2 levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Investig Med* **59**, 961-963 (2011).

78. Puleston, J. *et al.* A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **21**, 109-120 (2005).

79. Zhu, Y. *et al.* Intestinal epithelium-specific knockout of the cytochrome P450 reductase gene exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **354**, 10-17 (2015).

80. Kim, J.W., Havelock, J.C., Carr, B.R. & Attia, G.R. The orphan nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450 enzyme in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 1678-1685 (2005).

8. Anexo I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da inflamação continuada e do tratamento imunomodulador do Anti-TNF na competência imunológica e suas consequências na colite experimental", registrada sob nº 16.1.1144.60.7, sob a responsabilidade de Jefferson Luiz da Silva e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 26/10/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/11/17 a 21/04/19
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	180
Peso/Idade	20g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central do Campus USP RP

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2017.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/N° - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892