STEPHANE TEREZA QUEIROZ DE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DO GENE *SCL11A1* NO DESENVOLVIMENTO DA
COLITE POR SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA EM MODELO
MURINO DE INFLAMAÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós –
Graduação de Imunologia
do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em
Ciências.

STEPHANE TEREZA QUEIROZ DE ANDRADE

**INFLUÊNCIA DO GENE *SCL11A1* NO DESENVOLVIMENTO DA
COLITE POR SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA EM MODELO
MURINO DE INFLAMAÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Instituto de Ciências Biomédicas

Orientador: Prof. Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho

Coorientador: Dra. Solange Massa

Versão original.

São Paulo

2019

Dedicatória

Dedico esse trabalho á minha mãe biológica Ornelina Andrade e Silva (*in memoriam*), que infelizmente não pode acompanhar de perto o meu crescimento, mas me deixou aos cuidados da melhor pessoa do mundo, minha mãe

Josefina Varga Andrade Silva.

Agradecimentos

❖ A Deus

❖ A minha família

Por sempre terem sempre me apoiado, respeitado minhas escolhas e permanecido ao meu lado quando eu mais precisei nunca desistindo de mim.

❖ Aos meus amigos e colegas de laboratório

Aline Vasconcelos, Bridilla Luiza, Bruna Favoretto, Eronita Garcia, Letícia Monteleone, Mara Irineu, Paula Diana, Rebecca Rodrigues, Ronaldo Mateus, Tamiris Guidugli, Thamara Gonçalves, por todas as risadas, desabafos, conselhos e doces.

❖ Aos meus amigos e colegas do Biotério

Aline Dias, Antônio Luiz, Breno Almeida, Cristiane Garramoni, Gustavo Gonçalves por toda ajuda e companhia.

❖ Aos pesquisadores do Laboratório

Andrea Borrego, Aryene Goes, José Ricardo, Milene Silva, Mônica Spadafora, Nancy Starobinas, Olga Ibañez, Solange Massa, Wafa Cabrera por toda ajuda, conselhos e ensinamentos durante esse período.

❖ Ao meu Orientador

Orlando Garcia Ribeiro Filho, pela paciência, dedicação e ensinamentos.

❖ A CAPES

Por ter me financiado durante o meu trabalho

Epígrafe

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

Resumo

Andrade, S T Q. **Influência do gene *Slc11a1* no desenvolvimento da colite induzida por sulfato sódico de Dextrana em modelo murino de inflamação aguda**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A colite ulcerativa é considerada uma doença inflamatória caracterizada por processo crônico de lesão da mucosa do cólon e associada a um risco aumentado para carcinogênese. A patogênese da doença envolve fatores ambientais e genéticos com participação ativa de células inflamatórias fagocíticas, particularmente macrófagos ativados. Estudos genéticos em humanos indicam a associação de variantes do gene, que codifica a proteína transportadora de íons *Slc11a1* (ou *Nramp1*), com a suscetibilidade a esta doença, assim como resistência ou suscetibilidade à infecção por parasitas intracelulares em várias espécies animais. Essa proteína tem efeitos pleiotrópicos sobre macrófagos, influenciando suas atividades inflamatórias, tumoricida e antimicrobiana. O modelo de estudo experimental mais adequado para o desenvolvimento da colite ulcerativa tem sido realizado por meio da ingestão de Sulfato Sódico de Dextrana em animais suscetíveis. Os camundongos selecionados geneticamente para alta (*AIRmax*) ou baixa resposta (*AIRmin*) inflamatória aguda ao Biogel representam um modelo alternativo àqueles que utilizam linhagens isogênicas mutantes para os alelos do gene *Slc11a1*. Os camundongos *AIRmax* e *AIRmin* apresentaram um desequilíbrio de frequência do alelo S do gene *Slc11a1* ao longo do processo seletivo, 9% e 60%, respectivamente. Para estudar os efeitos desses alelos na modulação dos fenótipos de resistência ou suscetibilidade à infecção e resposta inflamatória aguda, foram obtidas, por cruzamentos assistidos pelo genótipo, quatro linhagens homozigotas para os alelos R e S do referido gene com fundo genético de *AIRmax* e *AIRmin*. Com este modelo, nos propomos estudar a relação entre o desenvolvimento de colite ulcerativa em resposta ao DSS e a presença dos alelos R ou S do gene *Slc11a1* em animais selecionados para *AIR* com estes alelos fixados, *AIRmax^{RR}*, *AIRmax^{SS}*, *AIRmin^{RR}* e *AIRmin^{SS}*. Para isso avaliamos o IAD (Índice de Atividades de Doença), considerando a perda de peso, a presença de diarreia e de sangue no ânus e/ou nas fezes como parâmetros. Também consideramos a análise histológica do cólon por meio da determinação de escores para algumas categorias tais como, infiltrado inflamatório, modificações epiteliais e destruição da sua arquitetura; atividade da mieloperoxidase, como medida indireta de inflamação, produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido e populações celulares presente no epitélio do órgão. Nossos resultados apontam para uma maior sensibilidade dos animais *AIRmin^{SS}* aos efeitos do DSS, apresentando um IAD significativamente maior do que as demais linhagens. Além disso, parâmetros inflamatórios como MPO, IL6, G-CSF e MCP-1 e estruturais como redução do comprimento do cólon e caracterização histopatológica do tecido mostraram alterações importantes, destacando os camundongos *AIRmin^{SS}* como um modelo de sensibilidade. Concluindo, o presente estudo sugere a influência do gene *Slc11a1* no fenótipo de resistência à UC, independente da constituição genética do indivíduo. Por outro lado, quando ocorre a fixação do alelo S, no caso representativo dos animais *AIRmin^{SS}*, uma interação com o background genético de baixa resposta inflamatória é importante na determinação da sensibilidade à doença.

Palavras Chave: Inflamação, Colite Ulcerativa, Seleção Genética, Sulfato Sódico de Dextrana (DSS)

Abstract

Andrade, S T Q **Influence of the *Slc11a1* gene on the development of dextran sodium sulfate (DSS)-induced-colitis in murine model of acute inflammation**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Ulcerative colitis (UC) is considered an inflammatory disease characterized by a chronic process of colon mucosa lesion and associated with an increased risk for carcinogenesis. The pathogenesis of the disease involves environmental and genetic factors with active participation of inflammatory phagocytic cells, particularly activated macrophages. Genetic studies in humans indicate the association of variants of the gene encoding the ions carrier protein SLC11A1 (or Nramp1) with susceptibility to UC, as well as resistance or susceptibility to infection by intracellular parasites in several animal species. This protein has pleiotropic effects on macrophages, influencing its inflammatory, tumoricidal and antimicrobial activities. The most suitable experimental study model for the development of UC has been the use of Sodium Sulfate Dextran in susceptible animals. Genetically selected mice for high (AIRmax) or low (AIRmin) inflammatory response to Biogel represent an alternative model to those that use isogenic mutant strains for the *Slc11a1* alleles. The AIRmax and AIRmin mice showed an allelic imbalance of the *Slc11a1* gene of 9% and 60%, respectively. In order to study the effects of these alleles on the modulation of resistance or susceptibility phenotypes to infection and acute inflammatory response, four lines of mice homozygous for the R and S alleles of said AIRmax and AIRmin gene were obtained by crosses assisted by the genotype. Therefore, we propose to study the relationship between the development of UC induced by DSS and the presence of the R or S alleles of the *Slc11a1* gene in selected mice for AIR with the fixed alleles, AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS}. For that, we evaluated as UC parameters, DAI (Disease Activity Index), considering weight loss, diarrhea and presence of blood in anus or feces. We also considered the histopathological analysis of the colon by scores for some categories such as, inflammatory infiltrate, epithelial modifications and destruction of its architecture, myeloperoxidase activity as an indirect measure of inflammation, production of pro- and anti-inflammatory cytokines in tissue and cell populations in the distal colon epithelium. Our results point to a greater sensitivity of the AIRmin^{SS} mice to the effects of the DSS, presenting DAI significantly higher than in the others mice. In addition, inflammatory parameters such as MPO, IL6, G-CSF and MCP-1 and structural factors such as reduction of colon length and histopathological alterations, highlighting the AIRmin^{SS} mice as the most sensible. In conclusion, the present study suggests the influence of the *Slc11a1*^{RR} allele on resistance to UC, independently of the individual genetic constitution. On the other hand, when the S allele fixation occurs, in the case of AIRmin^{SS}, an interaction with genetic background of low inflammatory response is important in determining the UC.

Keywords: Inflammation, Ulcerative Colitis (UC), Genetic Selection, Dextran Sodium Sulfate (DSS)

Lista de Ilustrações

Fig. 1. Seleção genética bidirecional.....	11
Fig.2. Protocolo de indução da colite utilizando DSS-MP 2,5%.....	15
Fig.3. Fenótipo da colite	24
Fig.4. Comprimento do cólon.....	25
Fig.5. Atividade de mieloperoxidase (MPO).....	26
Fig.6. Fotomicrografias das porções distais do Cólon obtidas dos animais AIRmaxRR, AIRmaxSS, AIRminRR e AIRminSS aos 7 dias após tratamento com DSS a 2,5% ou Água.....	28
Fig.7. Parâmetros de Histologia.....	29
Fig.8. Número total de células no segmento distal do cólon.....	30
Fig.9. Análise por citometria do infiltrado inflamatório no segmento distal	32
Fig.10. Análise por citometria das populações celulares presentes na mucosa do cólon no segmento distal	33
Fig.11. Análise por citometria das populações de macrófagos no segmento distal.....	35
Fig.12. Análise por citometria das populações de macrófagos com função reguladora no segmento distal	36
Fig.13. Expressão gênica das citocinas pró e anti-inflamatórias	39
Fig.14. Expressão gênica de quimiocinas e fator de crescimento.....	40
Fig.15. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon.....	42
Fig.16. Concentração dos fatores de crescimento no cólon.....	43
Fig.17. Concentração das quimiocinas no cólon.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Escores utilizados no cálculo do IAD baseado no trabalho de WIRTZ, S. et al, 2007.....	16
Tabela 2. Escores utilizados na classificação dos parâmetros Histológicos por Erben et al, 2014.....	18
Tabela 3. Mediana dos escores dos animais dos grupos AIRmaxRR , AIRmax SS AIRmin RR AIRmin SS segundo os parâmetros da Tabela 1	28
Tabela 4. Resumo dos resultados com destaque (*) para os parâmetros mais diferenciados a favor dos animais AIRmin ^{SS}	45

Lista de Abreviações

AJ- Junções de Adesão

AIR -Resposta Inflamatória Aguda

DNBS - Ácido Dinitrobenzenesulfônico

DSS- Dextran Sulfato de Sódio

ER- Reticulo Endoplasmático

G-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GWAS - *Genome Wide Association Studies*

HE-Hematoxilina & Eosina

IAD- Índice de Atividade da Doença

IBD- Doenças Inflamatórias Gastrointestinais- do inglês *Inflammatory Bowel Disease*

IECs- Células Epiteliais Intestinais

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-4- Interleucina 4

IL-6- Interleucina 6

IL-10- Interleucina 10

IL-17- Interleucina 17

ILCs -Células Linfóides Inatas- do inglês *Innate Lymphoid Cells*

INF- γ -Interferon γ

iNOS- enzima óxido nítrico sintetase

LPS-Lipopolissacarídeo

MCP-1-Proteína de quimioatração de monócitos- do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

M-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos

MHC- complexo de histocompatibilidade principal

MIP-1 α - Proteína Inflamatória de Macrófagos- do inglês *Macrophage inflammatory protein*

MPO- Mieloperoxidase

MUC2-Mucina Tipo 2

NLR- Receptores do tipo Nod- do inglês *Nod Like Receptor*

NO- óxido nítrico

Nramp1- Proteína de Resistência Natural Associada a Macrófagos-do inglês *Natural Resistance Associated Macrophage Protein*

PRRs- Receptores de Reconhecimento de Padrões do Inglês *Pattern Recognition Receptors*

ROS- radicais de oxigênio

Scl11a1- *Solute Carrier Family 11 Member*

SNPs -Polimorfismo de nucleotídeo único – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

STAT3-*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*

TA-Temperatura ambiente

TJ-*Tight Junctions*

TLR- Receptores do tipo Nod- do inglês *Toll Like Receptor*

TM- Dominínios de Membrana

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

UC- Colite Ulcerativa- do inglês *Ulcerative Colitis*

Sumário

INTRODUÇÃO	1
• Imunologia das mucosas- mucosa intestinal	2
• Colite Ulcerativa	3
Indução de colite por Sulfato Sódico de Dextrana – DSS	6
• <i>Slc11a1 (Nramp1)</i>	7
• Modelo animal	9
OBJETIVOS	13
METODOLOGIA	14
Animais	15
Indução da colite	15
Análise fenotípica da Colite	16
Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	17
Análise Histológica	17
Expressão gênica (RT-PCR)	18
Extração e purificação de RNA (RNAspin Mini Kit Healthcare)	18
Real Time PCR (RT-PCR)	18
Dosagem de Citocinas por Multiplex	20
Extração proteica	20
Determinação do nível de citocinas por Multiplex	20
Análise fenotípica por citometria de fluxo	21
Análise estatística	21
RESULTADOS	22
1. Fenótipo da Colite	23
2. Quantificação da Mieloperoxidase (MPO)	26
3. Análise Histológica	27
4. Caracterização das populações celulares no cólon	30
5. Expressão Gênica de Citocinas	38
6. Diferença na Produção de Citocinas	41
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

- **Imunologia das mucosas- mucosa intestinal**

O intestino é um ambiente propício para albergar diversos microrganismos devido à grande quantidade de nutrientes oriundos dos alimentos presentes na forma aeróbica no lúmen intestinal. Esses microrganismos compõem a microbiota e são separados do sistema imunológico do hospedeiro por um sistema de barreiras que bloqueiam, quando íntegras, as reações imunológicas do hospedeiro e as eventuais interações com patógenos.

As mucosas constituem essas barreiras, que além de proteção, desempenham as funções de absorção, secreção, transporte de macromoléculas entre outros. Em condições infecciosas é necessário que exista um balanço entre a resposta inflamatória gerada contra agentes infecciosos e a tolerância à microbiota residente (Odenwald; Turner, 2017; Wells *et al*, 2016).

O trato gastrointestinal é o que apresenta a maior superfície de mucosas (cerca de 400m²) e tem a função de absorver nutrientes necessários ao organismo ao mesmo tempo em que impede a entrada de patógenos. Para essa finalidade existem barreiras físicas e químicas (Bischoff *et al*, 2014). A primeira delas é uma camada de muco que recobre toda a mucosa formada pela mucina tipo 2 (MUC2) secretada pelas *goblet cells*. Essa camada é subdividida em duas partes: uma mais interna, que tem a função de impedir o contato da microbiota com as células epiteliais intestinais, e uma mais externa que se forma devido à atividade proteolítica da MUC2 pelas bactérias que compõem a microbiota (Geremia *et al*, 2014; Vancamelbeke; Vermeire, 2017; Okumura ; Takeda, 2018).

A segunda seria formada pelas células epiteliais intestinais (IECs) que formam tanto uma barreira física quanto química através da secreção de peptídeos antimicrobianos como as Defensinas. Na monocamada de células epiteliais estão presentes os complexos juncionais (TJ do inglês, Tight Junctions) que controlam o fluxo paracelular de grandes moléculas, formadas por proteínas transmembrânicas como Claudinas e Ocludinas e complexos juncionais; e abaixo estão presentes as Junções de

Adesão (AJ) e desmossomos, que mantêm a integridade do epitélio por meio da adesão célula-célula e também participam da sinalização celular sendo formadas principalmente por Caderinas (Bischoff *et al*, 2014; Odenwald; Turner, 2017; Vancamelbeke ; Vermeire, 2017; Wells *et al*, 2016).

Essas barreiras não apenas impedem a infecção por agentes patogênicos como também regulam a permeabilidade intestinal. Quando ocorre uma inflamação, como em casos de Doenças Inflamatórias Gastrointestinais (IBD –*Inflammatory Bowel Disease*), doenças celíacas, alergias a determinados alimentos e estágio iniciais de câncer de cólon, onde há a produção de citocinas inflamatórias, pode haver um aumento de permeabilidade, o que por sua vez pode contribuir para a severidade da doença (Bischoff *et al*, 2014; Wells *et al*, 2016).

Outra característica da mucosa intestinal é ser considerado um ambiente de tolerância, de modo a montar uma resposta contra patógenos e ao mesmo tempo se manter tolerante com relação à microbiota comensal e antígenos considerados inofensivos (Neurath ; Finotto; Glimcher, 2002). O reconhecimento da microbiota e de bactérias e outros organismos patogênicos dá-se através dos PRRs (Pattern Recognition Receptors) como TLRs (*Toll Like Receptor*) e NLRs (*Nod Like Receptors*). No entanto, no caso das espécies comensais que estão presentes na microbiota, esse reconhecimento leva a respostas imunorreguladoras (Littman; Pamer, 2011; Palm ; De Zoete; Flavell, 2015). Isto ocorre pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , indução de hiporresponsividade de células T pelas células dendríticas, diferenciação de células T_{reg} e produção de IgA pelos Linfócitos B (Coombes; Maloy, 2007; Mann; Li, 2014; Neurath; Finotto; Glimcher, 2002).

- **Colite Ulcerativa**

Quando a homeostasia intestinal é quebrada, isso pode levar a um quadro de inflamação como é o caso das IBDs (do inglês: *Inflammatory Bowel Disease*). A colite ulcerativa (UC – do inglês: *Ulcerative Colitis*), juntamente com a Doença de Crohn, é classificada como uma doença inflamatória gastrointestinal caracterizada por uma inflamação crônica da mucosa intestinal, seguido por períodos de remissão (Hisamatsu *et al*, 2013; Molodecky *et al*, 2012; Shouval; Rufo, 2017). Nos últimos 50 anos, houve um aumento na incidência de IBD, onde 60% correspondem à UC, sendo que as maiores incidências de colite ulcerativa foram relatadas no norte da Europa (24,3 por

100.000), no Canadá (19,2 por 100.000) e na Austrália (17,4 por 100.000). As taxas de prevalência são mais elevadas na Europa (505 por 100.000), no Canadá (248 por 100.000) e nos EUA (214 por 100.000) (Molodecky *et al*, 2012; Ungaro; Mehandru; Allen *et al*, 2017).

Embora sua etiologia ainda permaneça desconhecida, mas considerada como uma interação entre suscetibilidade genética, fatores ambientais, microbiota intestinal e disfunção imunológica, acredita-se que ela esteja associada ao estilo de vida ocidentalizado, devido ao alto índice de incidência progressiva nos países desenvolvidos nas últimas décadas (Tatiya-Aphiradee; Chatuphonprasert; Jarukamjorn, 2018). Fatores como industrialização e urbanização das sociedades modernas acompanhadas de mudanças nas exposições a microrganismos patogênicos, a poluentes ambientais e a medicamentos, falta de saneamento básico de países pobres e mudanças nos comportamentos de estilo de vida, propiciaram o desenvolvimento potencial de fatores de risco para IBD. Um fato curioso é que imigrantes de países subdesenvolvidos são mais sensíveis a fatores ambientais de risco de IBD, como por exemplo, uso de antibióticos, que leva a mudanças bruscas da microbiota, bem como o estilo de vida ocidentalizado. (Ko *et al*, 2015; Molodecky *et al*, 2012; Shouval; Rufo, 2017).

Dentre os fatores que podem acarretar em inflamação intestinal e no desenvolvimento da UC, podemos citar as predisposições genéticas e hereditariedade (cerca de 23 %) e os fatores ambientais.

Com relação aos fatores de risco genéticos, os estudos de associação do genoma (GWAS - *Genome Wide Association Studies*) identificaram 200 *loci* gênicos não sobrepostos, incluindo 28 que são compartilhados entre a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Os genes localizados nesses *loci* foram identificados como relacionados à homeostase intestinal incluindo função de barreira, restituição epitelial, defesa microbiana, regulação imune inata, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), autofagia, regulação da imunidade adaptativa e estresse do retículo endoplasmático (ER). Recentemente, a presença de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) no fator de transcrição *HNF4A*, que regula a montagem do complexo de junção apical, também foi relacionada à UC (Geremia *et al*, 2014; Hisamatsu *et al*, 2013; Kohr; Gardet; Xavier, 2011; Ungaro; Mehandru; Allen *et al*, 2017).

Como fatores ambientais, destacamos: (i) o tipo de parto, se normal ou cesariana, que influencia na formação e composição da flora intestinal e também no desenvolvimento e função das células imunes intestinais; (ii) amamentação, cujos estudos descrevem um papel protetor contra IBD; (iii) dieta, pois o alto consumo de carnes e produtos processados com baixo conteúdo de fibras foram relacionados com um aumento do risco para IBD; (iv) infecções por parasitas, que também aumentam o risco de IBD; e (v) situações prolongadas ou recorrentes de estresse que podem levar à inflamação intestinal por meio de mecanismos entéricos, neuronais ou hormonais e com produção de citocinas pró-inflamatórias e alteração da permeabilidade intestinal. Curiosamente o tabagismo parece ter um efeito protetor da colite (Hisamatsu *et al*, 2013; Legaki, 2016; Shouval; Rufo, 2017; Tatiya-Aphiradee; Chatuphonprasert; Jarukamjorn, 2018).

A UC é caracterizada por inflamação que é limitada ao cólon, iniciando no reto, podendo abranger apenas uma porção ou todo o cólon (pancolite) e se espalha de forma contínua com alterações inflamatórias superficiais limitadas à mucosa e submucosa, levando a perda de células caliciais (*globlet cells*), hiperplasia, abscessos de cripta e, mais gravemente, ulceração (Erben *et al*, 2016; Ungaro; Mehandru; Allen *et al*, 2017; Tatiya-aphiradee; Chatuphonprasert; Jarukamjorn, 2018). A inflamação na colite é bastante associada a uma resposta Th2 não convencional com produção aumentada de citocinas IL-5 e IL-13. No entanto, a presença de Th17 e ILCs (Innate Lymphoid Cells) também se mostrou importante para a patogênese dessa doença, através da secreção de IL-17 e IL-23 que ajudam a criar um ambiente inflamatório e também a infiltração de plasmócitos produtores de IgG (Geremia *et al*, 2014; Hisamatsu *et al*, 2013; Jiang *et al*, 2009; Kohr; Gardet; Xavier, 2011).

Os macrófagos (MΦs) são células fagocíticas que compõem uma importante população residente nos tecidos e desempenham um papel fundamental no reconhecimento e na eliminação de bactérias assim como também na homeostase. (Hisamatsu *et al*, 2013). Os MΦs residentes do intestino apresentam diferenças em relação aos esplênicos, pois apesar de apresentarem atividade bactericida e capacidade fagocítica, não apresentam produção de mediadores inflamatórios em resposta aos receptores TLR e sua atividade está voltada para regulação da resposta inflamatória e manutenção do epitélio através da produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e

TGF- β), ajudando a manter a população de células T reguladoras juntamente com as células dendríticas (Bain; Mowat, 2014; Mann ; Li, 2014; Qualls *et al*, 2006)

No entanto, foi documentado que os MΦs desempenham um papel importante nas IBDs, por meio da produção de mediadores como TNF- α , IL-1, IL-6, radicais de oxigênio e ativação de linfócitos, podendo levar à cronificação da doença (Kojima *et al*, 2001; Lissner *et al*, 2015; Okayasu, 1990). Além disso, foi reportado por Grimm e colaboradores que macrófagos CD14 positivos são uma das maiores populações celulares presentes na mucosa em casos de inflamação (Grimm *et al*, 1995).

Portanto já que estas células desempenham um papel significativo na patogênese da doença e o gene *Slc11a1* apresenta vários efeitos pleiotrópicos em suas funções, o estudo da expressão fenotípica de seus alelos na modulação da UC é de grande interesse.

Indução de colite por Sulfato Sódico de Dextrana – DSS

Existem muitos modelos de inflamação da mucosa para simular a patologia da UC, um deles é por meio da administração do agente químico Dextran Sulfato de Sódio (DSS). O DSS é um derivado polianiónico de dextran, um polímero de glicose sintetizado naturalmente por bactérias como *Leuconostoc* e *Streptococcus*, produzido por esterificação com ácido clorossulfúrico (Jurjus; Khoury; Reimund, 2004; Solomon *et al*, 2010).

A introdução de DSS como modelo experimental em camundongo para a indução do fenótipo de colite foi feita por Okayasu proposta pela primeira vez em 1990. A partir deste trabalho, diversos estudos demonstraram que o DSS em concentrações que variaram de 1 a 6% oferecido na água aos animais resultou em inflamação aguda ou crônica no cólon, dependendo do protocolo de administração (Okayasu, 1990; Perse & Cerar, 2012; Solomon *et al*, 2010). A colite induzida por DSS se inicia no reto e depois se expande para a região distal do cólon, e a inflamação geralmente se limita à mucosa, podendo se expandir para a submucosa com a formação de edemas e ulcerações. Os sintomas clínicos incluem diarreia, sangue oculto e sangramento retal grave, de modo que é possível avaliar os diferentes aspectos da colite produzida por DSS no que concerne à avaliação clínica, fatores patológicos e genéticos, conforme revisado por

Martina Perse e Anton Cerar (Okayasu, 1990; Perse & Cerar, 2012; Solomon *et al*, 2010)

O exato mecanismo que permite o DSS induzir a colite não é totalmente esclarecido. Sabe-se que o DSS provoca mudanças na barreira epitelial e alterações da permeabilidade intestinal antes do início da reação inflamatória, levando à ruptura das criptas intestinais e agressão às células epiteliais (Chassaing *et al*, 2013; Eichele; Kharbanda, 2017; Solomon *et al*, 2010; Strober; Fuss; Blumberg, 2002). Esse processo pode estar relacionado ao aumento de apoptose nas células epiteliais devido a uma paralisação do ciclo celular pelo DSS (Araki, *et al*, 2012), o que pode explicar o aumento de toxicidade dependente do tempo, concentração e também do peso molecular do DSS (Ni; Chen; Hollander, 1996; Perse, , & Cerar, 2012). Além disso, foi mostrado que o DSS pode se ligar a várias moléculas da matriz extracelular como fibronectina e colágeno através de interação iônica, afetar a expressão de moléculas de adesão e modificar a composição da microbiota (Ni; Chen; Hollander, 1996; Nell; Suerbaum; Josenhans, 2010). Devido a essas alterações e ao aumento na permeabilidade intestinal há um encontro da microbiota intestinal com a população celular presente na mucosa subjacente causando inflamação, ulceração, alta infiltração de neutrófilos, macrófagos e células NK e uma resposta do tipo Th1 com altos níveis de produção de INF- γ , TNF- α IL-1 β , e posteriormente, cicatrização e reparo tecidual (Eichele ; Kharbanda, 2017; Jurjus; Khoury; Reimund, 2004; Kitajima; Takuma; Morimoto, 1999; Strober; Fuss; Blumberg, 2002; Takeda; Kiyoshi, *et al*, 1999).

Para uma melhor compreensão da Colite Ulcerativa, modelos animais têm sido utilizados e, apesar de não representarem a complexidade total da doença, são utilizados para análise de diversos aspectos da colite tais como: pesquisa de populações celulares, análises histológicas e análises fenotípicas entre outras.

- ***Slc11a1 (Nramp1)***

O gene *Slc11a1*, também conhecido como *Nramp1* (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*), localizado no cromossomo 1, foi descoberto através de posicionamento clonal, dentro do *locus* associado à resistência natural contra a infecção por *S. typhimurium*, *L. donovani* e várias espécies de micobactérias, incluindo

M. bovis e *M. lepraemurium*, por isso também chamado locus *Bcg*, *Lsh* ou *Ity* (Vidal *et al*, 1993; Barton; Whitehead; Blackwell, 1995; Blackwell; Searle, 1999; Wessling-Resnick, 2015).

O gene *Scl11a1* codifica uma proteína de membrana integral, de 90–100 kDa, hidrofóbica, que possui 12 domínios de membrana (TM) com um sítio de transporte conservado e uma região citoplasmática N-terminal que codifica um domínio de ligação SH3 rico em Pro/Ser (Vidal *et al*, 1993; Barton; Whitehead; Blackwell, 1995; Canonne-Hergaux *et al*, 1999; Vidal *et al*, 1996). Estudos mostraram que essa proteína possui uma estrutura secundária e terciária muito similar a canais de K^+ sendo altamente glicosilada e fosforilada em macrófagos (Blackwell; Searle, 1999; Vidal *et al*, 1996)

A proteína Scl11a1 localiza-se em lisossomos/endossomos tardios sendo encontrada em células de origem mielóides maduras (monócitos/macrófagos), granulócitos, células dendríticas e também em linfócitos (Archer, 2015; Govoni *et al*, 1997; Mulero *et al*, 2002; Valdez *et al*, 2008; Wessling-Resnick, 2015). É um transportador de cátions (Fe^{2+} , Zn^{2+} , e Mn^{2+}) do tipo simporte, onde o transporte ocorre em ambos os sentidos, sendo que a direção é dependente do pH. Um dos mecanismos descritos é o transporte de ferro, que pode acontecer para dentro do fagossomo onde, sob baixo pH, a reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^*$) favorece a geração de radicais de oxigênio (ROS) para matar microrganismos ou para fora do endossomo de modo a privar os microrganismos de um íon essencial. (Blackwell; Searle, 1999; Jabado *et al*, 2000; Wessling-Resnick, 2015).

O gene *Scl11a1* tem um papel importante na imunidade inata e na defesa contra infecções. Embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos, sabe-se que ele influencia a ativação de macrófagos exercendo uma gama de efeitos pleiotrópicos na função destas células, tais como a regulação de quimiocinas e citocinas, indução da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), expressão de moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), fator de necrose tumoral α (TNF α), liberação de óxido nítrico (NO), fluxo de L-arginina, explosão oxidativa e tumorocida, bem como atividade antimicrobiana (Barton; Whitehead; Blackwell, 1995; Blackwell; Searle, 1999; Wojciechowski *et al*, 1999).

Este gene possui uma mutação pontual na região de leitura, G169D no quarto domínio da região transmembrana, que leva à substituição de aminoácidos não conservada de *gly* para *asp* na posição 169 e à formação de uma proteína não funcional. Essa mutação é responsável por um quadro de suscetibilidade a infecções. Frehel e

colegas mostraram que em animais com o alelo suscetível *Nramp1*^{D169} (S) os macrófagos apresentam uma maturação mais lenta dos lisossomos e uma menor taxa de fusão fagossomo-lisossomo do que os animais resistentes *Nramp1*^{G169} (R). Acredita-se também que a proteína Nramp1 possa estar envolvida na sinalização intracelular (Vidal *et al*, 1996; Blackwell; Searle, 1999; Canonne-Hergaux *et al*, 1999)

Como foi citado anteriormente, os macrófagos possuem um papel importante na patogênese de IBD e como o gene *Scl11a1* exerce efeitos pleiotrópicos nessas células, influenciando na sua atividade, pode determinar a resistência ou a suscetibilidade à UC.

A associação deste gene com a ocorrência de IBD foi mostrada inicialmente por Kojima e colaboradores em populações japonesas e por Zaahl *et. al* em habitantes da África do Sul, onde polimorfismos no gene *NRAMP* parecem levar à predisposição à IBD (Archer, 2015; Sun; Zhang; Shi, 2016; Zaahl *et al*, 2006). Em camundongos foi visto por Jiang e colaboradores que o gene *Scl11a1* também tem influência na colite induzida por DSS (Jiang *et al.*, 2009). Portanto acredita-se que essa mutação possa ter um papel importante no desenvolvimento de UC.

- **Modelo animal**

Desde 2004, cientistas do mundo inteiro vêm utilizando, além das linhagens isogênicas como modelo de camundongos sensíveis à colite, animais geneticamente modificados em genes específicos reguladores do sistema imune no sentido de elucidar os mecanismos genéticos na patogênese da UC, bem como testar diferentes intervenções terapêuticas para inibir estrategicamente a expressão de genes específicos envolvidos na regulação da sensibilidade às doenças intestinais (Perse & Cerar, 2012).

Esses modelos, de maneira geral, não refletem fielmente uma população geneticamente heterogênea como é a humana e, tratando-se de uma doença multifatorial, apresentam complexidades genéticas restritas para o entendimento amplo da doença. Neste sentido propomos a utilização de modelo de camundongos produzidos segundo um processo de seleção fenotípica artificial.

Há anos o grupo de pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan estuda a regulação genética das respostas imunológica específica e não específica representadas, respectivamente, pelos fenótipos de produção quantitativa de anticorpos e de desenvolvimento de reação inflamatória aguda por meio de experimentos de seleção fenotípica bidirecional, visando sempre a produção de linhagens de camundongos com características fenotípicas quantitativas opostas para estes dois caracteres imunológicos. Especificamente para a imunidade inata, foram obtidas linhagens com máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda (AIR, do inglês: *Acute Inflammatory Response*) a corpo estranho, Biogel P100 (Ibanez *et al*, 1992).

As linhagens AIRmax e AIRmin foram obtidas por seleção fenotípica bidirecional a partir de uma população geneticamente heterogênea (F0) oriunda de cruzamentos equilibrados entre oito linhagens isogênicas (figura 1). Para selecionar os animais que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória, foi injetado gel de poliacrilamida (Biogel) no tecido subcutâneo, substância não imunogênica e não biodegradável. A reação inflamatória produzida foi avaliada após 24 horas da injeção de Biogel, considerando o número total de leucócitos infiltrados e o teor de proteínas extravasadas (Biozzi *et al*, 1998; Ibanez *et al*, 1992).

Os camundongos que apresentaram alta ou baixa reatividade inflamatória foram acasalados seletivamente entre si para a produção das linhagens AIRmax e AIRmin, respectivamente. Estes acasalamentos foram realizados consecutivamente a cada geração de Seleção, sendo que o máximo de separação fenotípica entre as linhagens foi atingido ao redor de 20 gerações. Neste momento, os genes responsáveis pela regulação de máxima ou mínima resposta fixaram-se em homozigose nas respectivas linhagens, mantendo um fundo genético heterogêneo.

Ao longo do processo seletivo as diferenças fenotípicas entre as duas linhagens AIRmax e AIRmin aumentaram progressivamente. Por meio de cálculos de parâmetros genéticos, foi possível estimar que a regulação desse caráter deve ser operada pela interação de 9 a 12 loci gênicos independentes (Biozzi *et al*, 1998; Ibanez *et al*, 1992).

Estudos com os animais AIRmax e AIRmin foram realizados com o intuito de esclarecer a regulação genética operante em situações como: artrite induzida por pristane (Vigar *et al*, 2000), tumorigênese de pele (Biozzi *et al*, 1998; De Souza *et al*,

2009), de pulmão (Maria *et al*, 2003) e de cólon (Di Pace *et al*, 2006), doenças infecciosas (Araujo *et al*, 1998; Borrego *et al*, 2006) e alterações na medula óssea (Katz *et al*, 2014; Katz *et al*, 2016)

Verificou-se também nestas linhagens um desequilíbrio de frequência entre os alelos de resistência (R) e de susceptibilidade (S) à infecção por *S. typhimurium* do gene *Slc11a1* (*Nramp1*). A frequência do alelo S na população inicial (F₀) era de 25% mas com a seleção ela mudou para 60% nos animais AIRmin e 9% nos animais AIRmax, sendo que camundongos homozigotos para o alelo S foi somente encontrado na linhagem AIRmin enquanto que os animais AIRmax não apresentaram este alelo em homozigose (Araujo *et al*, 1998).

Devido a essa diferença foi iniciada a produção de linhagens de camundongos homozigotos para os alelos R e S por meio de acasalamentos assistidos pelo genótipo, partindo das linhagens parentais AIRmax e AIRmin. Assim, foram produzidas as sublinhagens homozigotas para os alelos R e S do gene *Slc11a1*, denominadas AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, conforme exemplificado na figura 1.

Fig. 1 Seleção genética bidirecional

Seleção das linhagens AIRmax e AIRmin seguida da produção das sublinhagens R e S por genotipagem dos alelos do locus *Slc11a1*.

Essas linhagens apresentaram diferenças com relação à resposta inflamatória demonstrando uma interação gênica entre os alelos do gene *Slc11a1* com aqueles selecionados para AIR. Foi observado que os animais AIRmin^{SS} foram extremamente sensíveis à infecção por *S.typhimurium*, com DL50 de 100 bactérias. Já os AIRmax^{SS} apresentaram comportamento de resistência indicando clara modulação do fundo genético fixado para máxima AIR sobre o fenótipo de sensibilidade que este alelo classicamente confere às linhagens isogênicas. Quanto à sensibilidade aos efeitos da endotoxina (LPS) a diferença de susceptibilidade está restrita à linhagem e não ao polimorfismo do gene *Slc11a1*, isto é, AIRmax mais sensível do que os AIRmin (Borrego *et al*, 2006).

Além das divergências na resposta contra *S.typhimurium* e LPS, esses animais também mostraram diferença na resposta na artrite reumatóide por Pristane (PIA- do inglês: *Pristane-Induced Arthritis*) (Peters, *et al*, 2007), nos níveis do componente C5 do sistema complemento, sendo os animais AIRmax^{RR} completamente deficientes (Amano *et al*, 2009), e no processo de cicatrização (De Franco *et al*, 2007).

Nesse contexto, propusemos avaliar a relação do gene *Slc11a1* com o desenvolvimento da UC por DSS comparativamente nas linhagens AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos *RR* ou *SS*. Por meio da caracterização fenotípica dos aspectos clínicos, inflamatórios e estruturais do cólon, após o tratamento com DSS, permitiu propormos possíveis mecanismos operantes na UC relacionados ao polimorfismo do gene *Slc11a1*.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a possível relação entre o gene *Slc11a1* e o fenótipo de resistência ou suscetibilidade à UC induzida por DSS, utilizando as linhagens AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos R e S como modelo. Para tanto avaliamos:

- os aspectos clínicos como alterações do peso corpóreo e ocorrência de diarreia sanguinolenta ou não;
- variação do comprimento do cólon
- alterações da arquitetura do cólon decorrente do tratamento com DSS por meio de preparações histológicas focando na possível instalação de um processo inflamatório;
- a atividade de MPO como medida indireta da reação inflamatória;
- a produção de citocinas inflamatórias no cólon por Multiplex
- as populações celulares que possam estar modificadas localmente no cólon por meio de análise fenotípica por citometria de fluxo

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens AIRmax e AIRmin com o alelo *SS* e *RR*, AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}, com idade entre 2 e 3 meses mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os experimentos obedeceram aos preceitos do Comitê de Ética do Instituto Butantan (CEUAIB) protocolo n° 1335/14.

Indução da colite

Os animais das quatro linhagens foram separados em dois grupos: tratados e controle, sendo submetidos a uma avaliação durante um período de 7 dias. O grupo tratado recebeu Dextran Sulfato de Sódio (MP - Biomedicals, LLC, France) (Di Pace *et al*, 2006) diluído a 2,5% em água destilada em bebedouros para ingestão *ad libitum* durante 7 dias. Após esse período os animais foram eutanasiados e o cólon foi coletado. O grupo controle recebeu, simultaneamente ao grupo tratado, apenas água destilada em bebedouros para ingestão *ad libitum* e foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Fig.2. Protocolo de indução da colite utilizando DSS-MP 2,5%.

Figura de autoria própria

Análise fenotípica da Colite

A caracterização do fenótipo da Colite foi realizada inicialmente pela avaliação do quadro clínico geral medido pelos parâmetros: alteração de peso corpóreo, consistência das fezes como indicação de diarreia e presença de sangue nas fezes diretamente ou no ânus do camundongo (Wirtz *et al*, 2007).

Os animais foram pesados antes do início do tratamento e diariamente a partir do terceiro dia e observados em relação à presença ou ausência de diarreia ou sangramento retal. Nesse período, foram determinados os valores diários de IAD calculados usando a fórmula:

$$\text{IAD} = \text{perda de peso corporal} + \text{escore de diarreia} + \text{escore de sangramento retal}$$

As médias e o erro padrão foram calculados para os respectivos grupos.

Escore foram obtidos conforme tabela 1 a seguir:

Tabela1. Escores utilizados no cálculo do IAD baseado no trabalho de Wirtz *et al*, 2007

Escore			
Escore	Perda de Peso	Diarreia	Sangramento Retal
0	Nenhuma	Ausente	Ausente
1	5-10%	Fezes semi-pastosas	Sangue restrito ao ânus em pequena quantidade e/ou filetes nas fezes
2	10-15%	Fezes pastosas	Sangue nas fezes em quantidade moderada e/ou além do ânus
3	15-20%	Fezes líquidas	Sangue nas fezes e/ou além do ânus em quantidade abundante
4	>20%	-	-

Após o período de 7 dias da avaliação clínica, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, o cólon foi retirado, lavado em salina e seu comprimento e peso registrados. Em seguida, o tecido foi analisado quanto ao comprimento, características histológicas, atividade de MPO, produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias e caracterização celular por citometria de fluxo.

Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para a determinação da atividade de MPO, o segmento distal do cólon foi homogeneizado em Polytron (BRINCKMAN) com 1mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%, em EDTA (10 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, durante 10 minutos a 4°C. O ensaio de MPO foi conduzido em 10µl do sobrenadante de cada amostra em placa de 96 poços adicionando 200 µl de tampão substrato, constituído de: tampão fosfato 50mM, pH 6.0, peróxido de hidrogênio 0,1%, orto-dianisidina 1,3% em H₂O. Após 5 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de solução de azida sódica 1,3% em H₂O. Os valores de atividade de MPO foram expressos pelo valor das absorbâncias, obtidas a 450 nm (por grama de tecido) em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments).

Análise Histológica

Segmentos distais do cólon foram obtidos e fixados em paraformaldeído 10% por 24hs, seguido de armazenamento em etanol 70% até o processo de inclusão em parafina. As amostras foram incluídas em parafina e seccionadas a 5µm para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes foram analisados pelas patologistas Natalia Coelho Couto de A. Fernandes e Juliana Mariotti Guerra do Núcleo de Anatomia Patológica - Instituto Adolfo Lutz. Elas deram escores para os segmentos utilizando os parâmetros histológicos presentes em três grandes categorias de acordo com Erben e colaboradores (2014), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Escores utilizados na classificação dos parâmetros Histológicos por Erben *et al*, 2014

Escores								
Categoria	Infiltrado inflamatório			Arquitetura Tecidual			Alteração Epitelial	
Escores	Severidade	Extensão	Tipo de infiltrado	Erosão	Tecido de Granulação	Edema de Submucosa	Hiperplasia	Perda/ Necrose
1	Mínimo <10%	Mucosa	Linfo-histiocitário	1	1	1	Mínima < 25%	Mínima < 25%
2	Discreto 10-25%	Mucosa e Submucosa	Misto	2	2	2	Discreta 25-35%	Discreta 25-35%
3	Moderado 26-50%	Transmural	Heterofílico	3	3	3	Moderada 36-50%	Moderada 36-50%
4	Marcante > 51%	-		4	4	4	Marcante > 51%	Marcante > 51%

Expressão gênica (RT-PCR)

Extração e purificação de RNA (RNAspin Mini Kit Healthcare)

Para a extração de RNA foi utilizado um fragmento de 30 mg do segmento distal do cólon, triturado em equipamento TissueLyser LT (Qiagen), utilizando tubos eppendorf de 2mL contendo 1 esfera de aço inoxidável (5 mm de diâmetro médio) e incubada por 15 minutos em gelo seco. Os tubos foram inseridos no adaptador do TissueLyser (mantido a 15-25°C) e incubados à temperatura ambiente durante 2 minutos. Após a adição de 1 ml de tampão de lise (GE Healthcare) o TissueLyser operou por 4 minutos a 50Hz para homogeneização completa do tecido e as amostras foram colocadas em um mini filtro RNAspin e centrifugadas por 1 minuto a 13.000 x g. Após a extração, a purificação foi realizada seguindo as instruções do fabricante do kit GE Healthcare UK Limited.

Real Time PCR (RT-PCR)

A partir do RNA extraído, 1µg foi usado para sintetizar cDNA por transcrição reversa usando First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basileia, Suíça) com uma mistura 1: 1 de oligo (dT) e oligonucleotídeos hexâmeros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado 5 µL do cDNA na diluição 1:10, a seguir foram adicionados 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix (2x) e 300 µM dos primers sensoriais e antisense descritos abaixo em um volume final de reação de 20 µL. Os

ensaios foram realizados em 4 repetições, incluindo a análise da expressão gênica constitutiva de *RPS29* (Proteína Ribossomal S29), *Ppia* (Ciclofilina) e os genes *Il-1 β* , *Il-6*, *Il-10*, *Il-17*, *Tnf- α* , *Inf- γ* , *Mcp-1*, *Gm-csf*, *Mip-1 α* .

<i>Gene</i>	<i>Primer Foward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>Ppia</i> (Ciclo)	5'- AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT-3'	3'-AAATGCCCCGCAAGTCAAAAG-5'
<i>RPS29</i>	5'-TCTACTGGAGTCACCCACGGAAGT-3'	3'-GTCAGTCGAATCCATTCAAGGTCGC-5'
<i>Il-1β</i>	5'-TTGACGGACCCCCAAAAGATG-3'	3'-AGAAGGTGCTCATGTCCTGA-5'
<i>Il-6</i>	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'	3'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-5'
<i>Il-10</i>	5'-GCTGGACAACATACTGCTAACC3'	3'-CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTG-5'
<i>Il-17</i>	5'-TGAACCTCCTGGATGACATG-3'	3'-GTGTTTCACAGTCCGTTTCC-5'
<i>Tnf</i>	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	3'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-5'
<i>Infγ</i>	5'-GCTCTGAGACAATGAACGCT-3'	3'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-5'
<i>MCP-1</i>	5'-GCCTGCTGTTTCACAGTTGC-3'	3'-TCATTGGGATCATCTTGCTG-5'
<i>GM-CSF</i>	5'-TGAACCTCCTGGATGACATG-3'	3'-GTGTTTCACAGTCCGTTTCC-5'
<i>Mip-1α</i>	5'-GGTCTCCACCACTGCCCTTCG-3'	3'-GGTGGCAGGAATGTTTCGGCTC-5'

As reações foram incubadas no termociclador PT-200 (MJ Research, Inc. Watertown, MA, EUA) e inicialmente submetidas a uma fase de ativação da enzima polimerase a 95°C durante 15 min. ("Hot Start"). As sequências alvo foram amplificadas com 50 ciclos consistindo em etapas sucessivas de desnaturação (95 durante 20 segundos), emparelhamento (55 durante 20 segundos) e extensão (72 durante 1 min). A detecção de fluorescência de SYBR Green incorporada no material de cadeia dupla foi realizada na etapa de extensão no aparelho StepOnePlus (A&B Applied Biosystem). Após a etapa de amplificação, o produto da reação foi submetido a um estágio de fusão onde a temperatura variou de 55 a 99°C e a fluorescência da reação foi adquirida a cada 1°C, registrando a temperatura na qual a dissociação ou desnaturação da fita dupla do material amplificado ocorreu. Os dados foram analisados pelo programa "Opticon Monitor Analysis Software 2.03"

Dosagem de Citocinas por Multiplex

Extração proteica

Para avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, o segmento distal foi homogeneizado e as proteínas extraídas seguindo protocolo de extração utilizando o TissueLyser.

Para este fim, 30 mg do segmento distal foram transferidos para pré-arrefecimento a 4°C em tubos de microcentrifuga de 2 ml contendo 1 esfera de aço inoxidável (5 mm de diâmetro médio) e incubados durante 15 minutos em gelo seco. Os tubos foram então inseridos no adaptador TissueLyser (mantido a 15-25°C) e incubados à temperatura ambiente durante 2 minutos onde foi adicionado 1 ml de tampão de lise.

O tampão de lise utilizado foi o meio RIPA consistindo em: Hidroximetilaminometano (Tris) 50Mm; NaCl 150Mm; EDTA 1Mm pH 8,0; Triton X-100 1%; SDS – Dodecil Sulfato de Sódio e os comprimidos do coquetel de inibição de protease-EDTA-Free(SIGMA-S8830-2TAB). O TissueLyser operou por 4 minutos a 50Hz para homogeneização completa do tecido. A amostra foi então centrifugada a 1000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -80°C.

Determinação do nível de citocinas por Multiplex

Para a avaliação da produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 TNF- α , INF- γ ; quimiocinas MCP-1 e MIP-1 α e fatores de crescimento G-CSF, GM-CSF e M-CSF produzidas localmente, foi utilizado o lisado de um fragmento do terço distal do cólon por meio do teste Multiplex.

A tecnologia Multiplex MILLIPLEX[®] MAP é baseada na Luminex[®] xMAP[®] que consiste em um processo que marca microesferas de poliestireno com dois fluoróforos. Por meio da utilização de concentrações precisas destas substâncias, podem ser criados até 100 conjuntos diferentes de microesferas, cada uma delas com uma assinatura baseada em um código de cores, que podem ser identificadas pelo instrumento Bioplex.

Para tanto, as amostras foram previamente centrifugadas e mantidas a temperatura ambiente (TA) antes de iniciar o ensaio. Primeiramente, a placa foi lavada com 200 μ L de tampão de lavagem por poço e mantida sob agitação por 10 min a TA e em seguida o conteúdo foi dispensando pela inversão da placa magnética. Foram

adicionados 25 μ L de cada padrão e controles nos poços apropriados segundo a indicação do fabricante. Adicionamos 25 μ L de amostras não diluídas (puro) nos poços apropriados. Logo após foram acrescentados 25 μ L das microesferas em cada poço. As placas foram cuidadosamente seladas e incubadas *overnight*. No dia seguinte, o conteúdo foi cuidadosamente removido pela inversão da placa e realizado duas lavagens com 200 μ L de tampão. Adicionamos 25 μ L dos anticorpos/poço de detecção e realizado uma incubação por 1 h. Acrescentamos 25 μ L/poço de estreptoavidina PE e incubamos por adicionais 30 min. O conteúdo da placa foi removido e em seguida foram realizadas duas lavagens. Adicionamos 150 μ L de “Sheath fluid” e a leitura foi realizada no aparelho Bioplex seguindo as instruções do fabricante.

Análise fenotípica por citometria de fluxo

Células viáveis foram isoladas de diferentes segmentos do cólon através do método utilizado por *Gasteiger* (*Gasteiger et al*, 2015) e numeradas em câmara hemocitométrica de Malassez. Uma alíquota de 100 μ L de uma suspensão celular a 1×10^6 células/mL foi incubada com anticorpos monoclonais dirigidos contra: CD11b (clone M1/70), Gr1 (clone RB6-8C5), CD4 (clone RM4-5), CD8 (clone 53-6.7), CD45 (clone 30-F11), MHCII (clone M5/114.15.2), F4/80 (clone BM8) e IL-10 (clone SXC-1). Como controle foi utilizado células não marcadas. Todos os anticorpos são originados da BD Biosciences Pharmigen (BD Biosciences Pharmigen, Franklin Lakes, NJ, USA). Foi considerado o registro de 50000 células, utilizando FACSCantoII e analisado pelo programa FlowJo (Tree Star).

Análise estatística

As diferenças entre as médias foram calculadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Turkey para a comparação entre os grupos. Consideramos significativos os valores de *p* inferiores a 0,05, bicaudal. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPadPrism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA,).

RESULTADOS

Após a indução da colite por DSS, os animais foram avaliados a partir do terceiro dia, com base na perda de peso, consistência das fezes e presença de sangramento (fezes ou ânus), e no sétimo dia foram eutanasiados para a retirada do cólon, o qual foi utilizado diferentes fragmentos do segmento distal. Foram utilizadas como abordagens: caracterização fenotípica da doença através do IAD, medida do comprimento do cólon, avaliação histológica e avaliação da inflamação por meio da medida da MPO, citocinas e fenotipagem das células do tecido.

1. Fenótipo da Colite

Os parâmetros utilizados para caracterização do IAD foram: perda de peso, sangramento nas fezes e/ou ânus e consistência das fezes. A cada um deles foi dado um escore conforme tabela 1 em Metodologia e o escore final foi o resultado da somatória dos vários parâmetros considerados. Assim os animais tratados com DSS das quatro linhagens tiveram seus escores registrados durante 5 dias consecutivos.

De acordo com a figura 3, os animais que apresentaram um maior índice de IAD foram os AIRmin^{SS}, caracterizado por uma perda de peso acentuada (Fig.4) e significativo sangramento. As demais linhagens apresentaram os mesmos sintomas, mas de forma menos agressiva. O grupo AIRmax também apresentou sintomas, porém de forma muito branda, independente da presença dos alelos *R* ou *S*. Este resultado infere que o alelo *S* confere um fenótipo de suscetibilidade à colite, mas ocorrendo apenas em um *background* de baixa resposta inflamatória.

Fig.3. Fenótipo da colite

Grupos de camundongos das linhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} foram avaliados, do 3° ao 7° dia, em relação IAD (A), com relação a porcentagem de perda de peso (B) e mortalidade (C) durante 7 dias de tratamento com DSS na concentração de 2,5% ($n=5$) ou água ($n=5$). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA) *AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR}.

Outra característica avaliada foi a variação do comprimento do cólon considerado da extremidade distal (reto) até o início do ceco. Os resultados apresentados na figura 4 mostram que em todos os grupos, exceto AIRmax^{SS}, o comprimento do cólon diminuiu significativamente quando comparado aos respectivos controles. Entre os grupos tratados com DSS foi observado que o grupo AIRmin^{SS} apresentou a maior diminuição de comprimento, o que evidencia a severidade da doença nesta linhagem, corroborando os dados de fenótipo de IAD.

Fig.4. Comprimento do cólon.

Animais das linhagens AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS na concentração de 2,5% ($n=5$) e animais controles ($n=5$) foram avaliados com relação a diminuição de comprimento do cólon. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA) * AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} e # Tratados x Controles.

2. Quantificação da Mieloperoxidase (MPO)

Para verificar se os parâmetros da colite induzida por DSS (IAD) observado está relacionado com a inflamação, foi medida a atividade enzimática da mieloperoxidase no segmento distal do colón no 7º dia do tratamento. Foi observado que os grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} tiveram um aumento da atividade de MPO enquanto que os grupos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} não apresentaram aumento ou não o mantiveram até o final do tratamento (Fig. 5). Isso indica que o alelo *S* pode interferir com a atividade desta enzima e consequentemente com a inflamação exclusiva por neutrófilos.

Fig.5. Atividade de mieloperoxidase (MPO).

Animais dos grupos AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS na concentração de 2,5% ($n=5$) e animais controle que receberam água ($n=5$) foram analisados com relação a atividade de Mieloperoxidase no segmento distal. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA) **a**: AIRmax^{RR} x AIRmax^{SS} **b**: AIRmin^{RR} x AIRmin^{SS} e **#**: Tratado x Controle.

3. Análise Histológica

Para observar o grau de severidade da doença, realizamos análise histológica dos cólons obtidos no 7º dia de tratamento com DSS. Um fragmento do segmento distal do cólon foi utilizado para a preparação das lâminas que foram coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E) para análise por patologistas especializados. A análise obedeceu o critério sugerido por Erben (2014) que estabeleceu escores para representar o nível da inflamação, arquitetura tecidual e alteração do epitélio (Tabela 2).

Na figura 7 está representada uma fotomicrografia de cada linhagem para os dois grupos: não tratados (A, B, C e D) e tratados com DSS (E, F, G e H). Verificamos que, apesar de um baixo IAD na análise clínica, o grupo AIRmax^{RR} apresentou um grande infiltrado infamatório e também danos à estrutura do cólon. No entanto, a barreira epitelial não sofreu muitos danos (seta), o que pode ser a causa de seus sintomas clínicos serem mais brandos do que os demais grupos (Fig.6E).

O grupo AIRmax^{SS} mostrou o menor nível de IAD e na histologia, a arquitetura do cólon se manteve relativamente intacta assim como a barreira epitelial (seta), embora tenha a presença de um infiltrado inflamatório (Fig.6F).

O grupo AIRmin^{RR} apresentou o segundo maior IAD, no entanto o perfil histológico apresentou um baixo infiltrado inflamatório e a arquitetura do cólon, embora tenha sofrido danos, se manteve pouco prejudicada. Já a barreira epitelial foi severamente danificada (seta) (Fig. 6G).

O grupo AIRmin^{SS}, como verificado na Figura 1, apresentou o maior IAD na avaliação clínica, indicando maior sensibilidade ao tratamento por DSS. Comparando com o perfil obtido com a análise histológica observamos que esse grupo apresentou um alto infiltrado inflamatório, uma arquitetura do colón severamente comprometida e a barreira epitelial altamente danificada (seta) (Fig.6H).

As análises por escores, representados pelas medianas, mostraram uma diferença entre os grupos em relação ao infiltrado inflamatório, à destruição da arquitetura da tecidual e às alterações epiteliais. Embora todos tenham apresentado um infiltrado inflamatório misto, que nos casos mais graves afetou até a submucosa, o grau de lesão

na arquitetura do epitélio variou entre os grupos, sendo que os animais AIRmin^{SS} foram os mais afetados (Tabela 3).

Fig.6. Fotomicrografias das porções distais do Cólon obtidas dos animais AIRmaxRR, AIRmaxSS, AIRminRR e AIRminSS aos 7 dias após tratamento com DSS a 2,5% ou Água.

Animais AIRmax^{RR} (A), AIRmax^{SS} (B), AIRmin^{RR} (C) e AIRmin^{SS} (D) representam os grupos tratados com água. Animais AIRmax^{RR} (E), AIRmax^{SS} (F), AIRmin^{RR} (G) e AIRmin^{SS} (H) foram tratados com 2,5% de DSS *ad libitum*. As setas indicam destruição epitelial. Coloração H&E. Escala 200 µm.

Tabela 3. Mediana dos escores dos animais dos grupos AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, AIRmin^{SS} segundo os parâmetros da Tabela 1.

Parâmetros	Infiltrado inflamatório			Arquitetura tecidual			Alteração epitelial	
	Severidade	Extensão	Tipo de Infiltrado	Erosão	Tecido de Granulação	Edema de Submucosa	Hiperplasia	Perda glandular/Necrose
AIRmax ^{RR}	2	2	2	0,5	1,5	2	0	1,5
AIRmin ^{RR}	1,5	1,5	1,5	0	1	0	0,5	1
AIRmax ^{SS}	1,5	1	2	0	0,5	1	0	0
AIRmin ^{SS}	2	2	2	2	2	1	0	2

Na Figura 7 estão representados as médias dos parâmetros considerados na análise histológica: inflamação (A), alterações no tecido e epitélio (B e C). A análise desses parâmetros mostrou que apesar de todos os animais apresentarem um aumento equivalente de inflamação com escore ao redor de 2,5, os animais AIRmin^{SS} desenvolvem mais alterações na arquitetura tecidual ou epitelial em relação às demais linhagens, especialmente erosão, o que demonstra a maior sensibilidade desse grupo ao DSS. A média do grupo controle engloba os animais das quatro linhagens por não apresentarem alterações significativas conforme visto nos cortes apresentados na figura 6.

Fig.7. Parâmetros de Histologia

Média dos *escores* utilizados para avaliar os cortes histológicos de animais das linhagens AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS na concentração de 2,5% ($n=5$) e animais controle que receberam água ($n=5$). (A) Intensidade da Reação Inflamatória. (B) Alterações na arquitetura tecidual e (C) alteração epitelial. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA). *AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR}; **d**: AIRmax^{SS} x AIRmin^{SS} #: Tratado x Controle.

4. Caracterização das populações celulares no cólon

Com a finalidade de caracterizarmos as populações celulares presentes no cólon dos camundongos e avaliarmos as possíveis diferenças intra- ou interlinhagens, células foram obtidas do segmento distal do cólon de animais tratados ou não com DSS 2,5% no 7º dia de tratamento e marcadas com anticorpos específicos, cujas combinações são usadas para caracterizar fenotipicamente as diferentes populações celulares (imunofenotipagem). Os grupos tratados foram compostos de 5 animais de cada linhagem que receberam 2,5% de DSS e 3 animais de cada linhagem como controles que receberam apenas água.

Apresentamos na **Figura 8** o número total de células (células/mL) obtidas do cólon para cada linhagem estudada. Verificamos que o rendimento de extração foi alto e uniforme, onde todos os grupos, incluindo os controles, atingiram a ordem de 2 a 3 x 10⁶ células/mL, independentemente do tratamento.

Fig.8. Número total de células no segmento distal do cólon

Número total de células extraídas do cólon no 7º dia do tratamento com DSS 2,5% ou água de 5 animais de cada grupo AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR}, AIRmin^{SS}. # diferença em relação aos controles. *Diferença entre AIRmax e AIRmin. Os resultados estão expressos com os valores individuais e média. O teste estatístico, ANOVA, considerou significativo quando p<0,05, bicaudal.

Para caracterizar as populações celulares presentes no cólon após digestão dos segmentos por collagenase foi utilizada a seguinte estratégia de marcação: população granulocítica ($CD11b^+GR1^+$), linfócitos TCD4 ou TCD8 na população de $CD45^+$ ($CD45^+CD4^+CD8^+$), macrófagos segundo o protocolo de marcação de Mowat & Bain (2011) ($MHCII^+/F4/80^+$) e macrófagos apresentadores de antígeno com possível função reguladora ($MHCII^+ F4/80^+IL-10^+$).

Infiltrado Granulocítico

Para caracterizar um infiltrado granulocítico, em decorrência do tratamento com DSS, utilizamos os anticorpos reveladores de granulócitos/neutrófilos, GR1 e CD11b, e avaliamos a presença destas células no tecido do cólon no 7º dia do tratamento com DSS. Cinco animais tratados e três controles de cada linhagem foram utilizados neste experimento.

Observamos um aumento de células do infiltrado inflamatório ($Gr1^+CD11b^+$) com relação aos controles nos animais do grupo AIRmax, sendo que o grupo AIRmax^{SS} foi o que apresentou o maior aumento. Em relação aos animais do grupo AIRmin não houve diferença entre os tratados e os controles (Fig.9). Esse resultado mostra a relação entre o infiltrado inflamatório e o *background* genético de alta e baixa resposta, uma vez que os animais AIRmax apresentaram um maior número de células inflamatórias.

Fig.9. Análise por citometria do infiltrado inflamatório no segmento distal.

(A) Citogramas representativos da estratégia de análise das populações Gr1⁺CD11b⁺ dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS 2,5% ($n=5$) ou que receberam apenas água ($n=3$). (B) Número absoluto das células presentes no cólon dos animais das 4 linhagens calculado das porcentagens determinadas nas diferentes populações caracterizadas. Os resultados estão expressos com os valores individuais e média. **a:** AIRmax^{RR} x AIRmax^{SS}; **c:** AIRmax^{RR} x AIRmin^{RR}; **d:** AIRmax^{SS} x AIRmin^{SS}; **#:** Tratado x Controle $p < 0,05$ (ANOVA).

População Linfoide

Para caracterizar as células linfoides infiltradas no tecido do cólon, estabelecemos uma estratégia de marcação com anti-CD45 para isolar as células leucocitárias (CD45⁺) do tecido e, em seguida, avaliar a presença de células CD4 e CD8 positivas nesta população (Figura 10A). As porcentagens determinadas das populações foram transformadas em número absoluto para cada linhagem e tratamento (Fig. 10B).

Utilizando a estratégia de análise apresentada na Fig. 10A, foi observado uma diferença significativa nas populações CD4 e CD8 principalmente entre os grupos AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} que se comportou como os controles. Com relação às outras linhagens, não foi constatada diferenças significativas, provavelmente devido à grande variação individual apresentada pelos grupos AIRmax.

Fig.10. Análise por citometria das populações celulares presentes na mucosa do cólon no segmento distal.

(A) Citogramas representativos da estratégia de análise das populações CD4⁺ e CD8⁺ dos animais AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS 2,5% ($n=5$) ou que receberam apenas água ($n=3$). (B) Número absoluto das células CD4 e (C) CD8 obtido das porcentagens destas populações presentes no cólon dos animais das 4 linhagens. Os resultados estão expressos com os valores individuais e média. d: AIRmax^{SS} x AIRmin^{SS} $p < 0,05$ (ANOVA).

Macrófagos

A população de macrófagos foi caracterizada seguindo o protocolo de marcação de Mowat & Bain (2011) que os definem como uma população duplo positiva para os marcadores F4/80 e MHC II.

Foi observado um aumento da população de macrófagos somente nos animais da linhagem AIRmax, sendo que o grupo AIRmax^{SS} apresentou um maior número de células aos 7 dias de tratamento. Isso indica que o fundo genético de máxima resposta inflamatória influencia no fenótipo de UC apesar da fixação dos alelos *R* ou *S* nestas linhagens (Fig.11).

Fig.11. Análise por citometria das populações de macrófagos no segmento distal.

(A) Citogramas representativos das populações $\text{MHCII}^+\text{F4/80}^+$ dos animais $\text{AIRmax}^{\text{RR}}$, $\text{AIRmax}^{\text{SS}}$, $\text{AIRmin}^{\text{RR}}$ e $\text{AIRmin}^{\text{SS}}$ tratados com DSS 2,5% ($n=5$) ou que receberam apenas água ($n=3$). (B) Número absoluto das células presentes no cólon dos animais das 4 linhagens calculado das porcentagens determinadas nas diferentes populações caracterizadas. Os resultados estão expressos com os valores individuais e média. **a:** $\text{AIRmax}^{\text{RR}}$ x $\text{AIRmax}^{\text{SS}}$ **c:** $\text{AIRmax}^{\text{RR}}$ x $\text{AIRmin}^{\text{RR}}$; **d:** $\text{AIRmax}^{\text{SS}}$ x $\text{AIRmin}^{\text{SS}}$ **#:** Tratado x Controle $p < 0,05$ (ANOVA).

Macrófagos com função reguladora

Dentro do grupo dos macrófagos foram analisados aqueles que teriam uma possível função reguladora ((MHC II⁺) F4/80⁺IL-10⁺) (Fig.12A) e se gene *Sc111a1* poderia exercer alguma influência nessa função.

A população considerada foi composta por células MHCII⁺F4/80⁺IL10⁺. Observamos que os animais do grupo AIRmin^{SS} foram os únicos que não apresentaram um aumento dessas células mantendo um nível basal (Fig. 12B). O que pode significar que o alelo *S* exerce influência sobre essa população de macrófagos.

Fig.12. Análise por citometria das populações de macrófagos com função reguladora no segmento distal.

(A) Citograma representativos das populações IL-10⁺ F4/80⁺ a partir da população MHC II⁺ dos animais AIRmax^{RR}; AIRmax^{SS}; AIRmin^{RR}; AIRmin^{SS} tratados com DSS 2,5% ($n=5$) ou que receberam apenas água ($n=3$). (B) Animais dos grupos AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS na concentração de 2,5% ($n=5$) e animais controle que receberam água ($n=5$) foram analisados com relação a população de macrófagos com possível função reguladora (MHC II⁺ (F4/80⁺IL-10⁺)). Os resultados estão expressos com os valores individuais e média. *AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} #: Tratados x Controles $p < 0,05$ (ANOVA).

5. Expressão Gênica de Citocinas

Para avaliar a produção de mediadores químicos, citocinas e quimiocinas, pró e anti-inflamatórias, foi realizada uma análise da potencialidade do organismo de produzir tais mediadores por expressão gênica por meio de ensaios de PCR em tempo Real, bem como a presença de proteínas por ensaios de Multiplex. Nos dois ensaios foi utilizado o segmento distal do cólon excisado no 7º dia do tratamento com DSS a 2,5% ou água. Os grupos foram compostos de 5 animais de cada linhagem tratados ou não com DSS.

Foram observados diferentes perfis de expressão gênica nos grupos tratados de AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} nas citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Na expressão de IL-1 β é possível observar que os animais dos grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} apresentaram um maior nível em relação aos demais grupos, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e controles

A expressão de IL-6 mostrou-se elevada apenas nos animais do grupo AIRmin^{SS} enquanto nos outros grupos ela permaneceu baixa (**Fig. 13**). Uma vez que o grupo AIRmin^{SS} mostrou-se mais sensível à indução de colite por DSS, apresentando sintomas clínicos e características histológicas que evidenciam a severidade da doença, é possível fazer uma correlação do aumento de expressão dessa citocina com o quadro de colite desenvolvido pelos animais.

Com relação a IL-10 os animais do grupo AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} também apresentaram maior expressão gênica desta citocina (**Fig. 13**). A maior expressão nos animais AIRmin^{SS} também está correlacionada com a severidade da doença, provavelmente devido à alguma supressão de mecanismos de reparo, visto que o grupo foi o que apresentou maior severidade na UC.

O grupo AIRmin^{SS} também apresentou uma expressão gênica significativamente superior de IL-17 com relação ao grupo AIRmax^{SS}. É possível que essa diferença na expressão gênica entre os grupos seja devido ao *background* de baixa resposta inflamatória na presença do alelo *S*. Uma vez que entre os grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} não houve diferença na expressão. Já a expressão de TNF- α parece estar relacionada com a presença do alelo *R* uma vez que os grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} foram os que apresentaram sua maior expressão, no entanto, estes animais não

apresentaram um quadro severo de colite. Com relação à citocina INF- γ , quimiocinas e fatores de crescimento não foi possível identificar diferenças significativas devido à alta variação dentro dos grupos (**Fig. 14**).

Fig.13. Expressão gênica das citocinas pró e anti-inflamatórias.

Grupos de 5 animais de cada linhagem AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} foram tratados com DSS 2,5% ou água durante 7 dias. Os dados estão expressos como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, expressão relativa aos respectivos calibradores AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controle. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA). **a:** AIRmax^{RR} x AIRmax^{SS}, **b:** AIRmin^{RR} x AIRmin^{SS}, **d:** AIRmax^{SS} x AIRmin^{SS} e ***** AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin.

Fig.14. Expressão gênica de quimiocinas e fator de crescimento.

Animais dos grupos AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} AIRmin^{SS} que foram tratados com DSS 2,5% durante 7 dias ($n=5$) ou água ($n=5$) foram analisados quanto a expressão gênica de GM-CSF, MCP-1 e MIP-1α no segmento distal do intestino.

6. Diferença na Produção de Citocinas

Além da expressão gênica as citocinas e quimiocinas também foram analisadas no lisado de um fragmento de 50mg do segmento distal do cólon de animais tratados com DSS 2,5% ou água. Foi utilizada a técnica de Multiplex onde foram analisadas, simultaneamente nas mesmas amostras, as citocinas IL-1, IL-6, INF γ , TNF α , IL-17, IL-4, IL-10, quimiocinas MCP-1 e MIP-1 α e fatores de crescimento G-CSF, GM-CSF, e M-CSF (Fig. 15).

Dentre das citocinas IL-1 β , IL-10, IL-4, IL-17, INF- γ e TNF- α no grupo AIRmax^{RR} não foi possível observar níveis diferentes entre as quatro linhagens, ou seja, não houve qualquer alteração na produção dessas citocinas em decorrência do tratamento com DSS, apesar de algumas diferenças interlinhagens tenham sido observadas nos ensaios de PCR. Por outro lado, a concentração de IL-6 mostrou-se alta somente no grupo AIRmin^{SS} correlacionando em 100% com os resultados obtidos de expressão gênica desta citocina (Fig. 15).

Com relação aos fatores de crescimento avaliados, o G-CSF, assim como a IL-6, mostrou-se elevado somente no grupo AIRmin^{SS}, enquanto os demais fatores GM-CSF e M-CSF permaneceram praticamente inalterados (Fig.16).

Este fato destaca a IL-6 e o G-CSF como sendo mediadores de grande importância no quadro da colite ulcerativa desenvolvida pelos camundongos AIRmin^{SS}, além de uma possível interação gênica entre o alelo *S* do gene *Sc111a1* e o fundo genético de baixa resposta inflamatória aguda produzido pelo processo de Seleção Genética Bidirecional.

Fig.15. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon.

Animais dos grupos AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} AIRmin^{SS} tratados com DSS 2,5% durante 7 dias ($n=5$) ou água ($n=5$) foram analisados quanto aos níveis das citocinas no lisado do cólon. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA). * AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin e # Tratado x Controle.

Fig.16. Concentração dos fatores de crescimento no cólon.

Animais dos grupos AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} tratados com DSS 2,5% durante 7 dias ($n=5$) ou água ($n=5$) foram analisados quanto aos níveis de G-CSF, GM-CSF e M-CSF no segmento distal do intestino obtido no 7º dia de tratamento. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA). **b** Indica diferença entre AIRmin^{SS} x AIRmin^{RR}, ***** Indica diferença significativa de AIRmin^{SS} x AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin. **#** Indica diferença entre Tratado x Controle valor $p < 0,05$ (ANOVA)

Fig.17. Concentração das quimiocinas no cólon.

Animais dos grupos AIRmax^{RR} AIRmax^{SS} AIRmin^{RR} AIRmin^{SS} tratados com DSS Sigma 2,5% ($n=5$) durante 7 dias e animais controle que receberam apenas água ($n=5$) foram avaliados com relação a produção de MCP-1 e MIP-1α. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças entre as médias são significativas para $p < 0,05$ (ANOVA) **b**: AIRmin^{SS} x AIRmin^{RR} **d**: AIRmax^{SS} x AIRmin^{SS}; **#**: Tratado x Controle.

Apresentamos na **Tabela 4** um resumo de todos os resultados obtidos neste trabalho, indicando as respectivas medidas em cada linhagem e, no caso de mediadores, o tipo daqueles diferencialmente expressos na linhagem AIRmin^{SS}. Com isso, podemos destacar os seguintes parâmetros nos camundongos AIRmin^{SS}: IAD, taxa de sobrevivência, comprimento do cólon, MPO, características histológicas (erosão e necrose), dinâmica celular (macrófagos produtores de IL10), citocinas (IL6), quimiocinas (MCP-1) e fator de crescimento (G-CSF).

Tabela 4. Resumo dos resultados, com destaque (*) para os parâmetros mais diferenciados a favor dos animais AIRmin^{SS}.

	AIRmax ^{RR}	AIRmax ^{SS}	AIRmin ^{RR}	AIRmin ^{SS}
IAD (escore)	2	1,5	2	9.2*
Sobrevida (%)	100	100	100	75*
Cólon (cm)	10	10	10	7*
MPO (DO)	400	150	250	100*
ESCORE	Inflamação	5	2	3
	Erosão	0,5	0,5	3*
	Tec.granulação	2	1,5	3
	Necrose	2	0,5	3*
	Edema	2,5	1,5	1,5
X10 ⁵ /mL	Total	25	30	20
	Granulócito	2,5	4	1
	CD4	2,5	3	2
	CD8	1	1,2	0,7
	Macrófagos	2,5	3,5	1,5
	Macrófago/IL10	1,5	1,7	1,5
Expressão Gênica				
	Citocinas	IL1β/IL10/TNFα	TNFα/IFNγ	TNFα
	Quimiocinas	-	-	-
	Fator de Crescimento	-	-	-
Multiplex				
	Citocinas	-	-	-
	Quimiocinas	MCP-1	-	-
	Fator de crescimento	-	-	-

* Parâmetros com diferença a favor do grupo dos animais AIRmin^{SS}

DISCUSSÃO

A colite ulcerativa é uma doença cuja etiologia ainda não foi completamente elucidada sendo que vários fatores, ambientais e genéticos, podem levar ao desenvolvimento da doença (Tatiya-Aphiradee; Chatuphonprasert; Jarukamjorn, 2018). Por se tratar de uma doença complexa multifatorial, a regulação genética é regulada por diferentes genes ou *loci* gênicos. Muitos candidatos foram descritos para regular essa doença, no entanto alguns deles foram muito pouco explorados experimentalmente.

O presente estudo objetivou avaliar a participação do gene *Scl11a1* no desenvolvimento da Colite Ulcerativa. O gene *Scl11a1* codifica uma proteína que é uma transportadora de íons Fe^+ e Mn^+ presente em populações leucocitárias, especialmente macrófagos e monócitos, e é importante no combate a infecções bacterianas. Jiang *et al* (2009) foi o primeiro e único a demonstrar experimentalmente uma associação desse gene com a colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos mutantes de fundo genético C57B10. A presença de uma mutação, que causa a perda de função da proteína, segundo o autor, melhora o quadro de colite, quando avaliados os parâmetros de perda de peso e redução do comprimento do cólon (Jiang *et al*, 2009).

Em 2006, pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan apresentaram um estudo da expressão fenotípica da Colite Ulcerativa induzida por DSS em camundongos geneticamente heterogêneos produzidos por Seleção Genética Bidirecional, considerando a resposta inflamatória aguda a corpo estranho, AIRmax e AIRmin (Di Pace *et al*, 2006).

Estas duas linhagens foram utilizadas por apresentarem uma maior complexidade genética em relação às linhagens isogênicas comumente usadas para o estudo da regulação genética da UC. Neste estudo, foram avaliados alguns parâmetros relacionados à UC como perda de peso, consistência das fezes e sangramento, compondo o Índice de Atividade da Doença (IAD), conforme proposto por Stevceva e colaboradores em (1999). Além disso foram avaliadas as expressões gênicas de algumas citocinas pró- e anti-inflamatórias e alguns aspectos histopatológicos. Nesse estudo, os animais AIRmax apresentaram maior severidade da UC do que os AIRmin quando induzida com 2,5% de DSS. Considerando os componentes inflamatórios da UC, estes resultados acompanharam os respectivos fenótipos de AIR, ou seja, animais selecionados para a alta capacidade inflamatória aguda desenvolve UC mais intensa (Di Pace *et al.*, 2006).

Como estas linhagens apresentam polimorfismo no gene *Scl11a1*, foi realizado um processo seletivo por genotipagem para os alelos *R* e *S* do referido gene. Assim

foram produzidas as quatro sublinhagens AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos *R* (resistência) e *S* (suscetibilidade) do gene (Araujo *et al.*, 1998; Borrego *et al.*, 2006).

No sentido de ampliar o entendimento da participação do gene *Slc11a1* na regulação genética da UC, utilizamos essas sublinhagens por apresentarem um fundo genético heterogêneo, o que torna um modelo mais adequado para a extrapolação em populações naturais como a população humana.

Utilizando as mesmas condições de indução de UC, com uma pequena modificação nos escores do IAD, obtivemos resultados de maior amplitude àqueles preconizados no estudo de Jiang (Jiang *et al.*, 2009), ou seja, a proteína SLC11A1 defectiva não só apresenta uma ação protetora, como também permissiva ao desenvolvimento da doença. Estes fenótipos opostos dependem ou estão relacionados com o *background* genético de máxima ou de mínima AIR, ou seja, animais AIRmin^{SS} foram sensíveis, enquanto os AIRmax^{SS} foram resistentes.

O grupo representado pelos animais AIRmin^{SS} mostrou maior sensibilidade ao DSS, apresentando um aumento significativo no IAD a partir do 6º dia de tratamento, atingindo um escore máximo de 9,2 caracterizado por diarreia, sangramento, perda de peso acentuada e uma diminuição do comprimento do cólon. Esse resultado demonstra claramente uma relação entre o gene *Slc11a1* defectivo e o desenvolvimento da colite. Por outro lado, os animais com o gene defectivo, mas com genética de alta capacidade inflamatória não desenvolveu a doença de maneira importante.

A partir do fenótipo IAD, estabelecido nas sublinhagens AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos *R* ou *S*, foram realizadas análises histológicas a fim de verificar os danos causados pelo tratamento, correlacionando-as com os sintomas clínicos apresentados.

Foi observado um infiltrado inflamatório presente em todos os grupos, no entanto, eles apresentaram diferenças com relação ao efeito causado na mucosa pelo DSS. Foram utilizadas duas categorias para avaliar os danos causados pelo tratamento

1. Danos na Arquitetura Tecidual representado pelos parâmetros: Erosão, Tecido de granulação e Edema de Submucosa; e
2. Modificações Epiteliais cujo os parâmetros apresentados foram: Hiperplasia e Necrose.

Para a linhagem AIRmax, os animais AIRmax^{RR} apresentaram vários danos a arquitetura tecidual caracterizados por uma grande quantidade de tecido de granulação, edemas na submucosa e também alterações epiteliais identificadas por uma alta necrose/perda glandular. Já o grupo AIRmax^{SS} foi o que sofreu menos danos,

evidenciados por tecido de granulação e edemas na submucosa, mas mantendo a arquitetura do cólon.

Nos grupos AIRmin, os animais AIRmin^{RR} também mostraram danos na arquitetura tecidual devido a presença de tecido de granulação e edemas na submucosa, além de alterações epiteliais evidenciadas através de hiperplasia e necrose ou perda glandular. Os animais AIRmin^{SS} apresentaram lesões mais graves, correlacionando-se com a severidade da doença (IAD), caracterizadas por danos na arquitetura tecidual devido a uma intensa erosão, tecido de granulação e alterações epiteliais com um alto índice de necrose/perda glandular. De fato, estas observações são comumente encontradas em modelos experimentais em que o DSS leva a um quadro de inflamação em decorrência de danos da barreira epitelial, desregulação da expressão das moléculas de adesão, com consequente disfunção da permeabilidade intestinal (Eichele, & Kharbanda, K, 2017).

Baseando-se nos dados de histopatologia, é possível inferir que os animais AIRmin (RR ou SS) são mais sensíveis aos efeitos do DSS, visto que sofreram grandes alterações epiteliais. Apesar dos animais do grupo AIRmax também apresentarem danos, estes parecem ter sido causados pela intensa inflamação e não unicamente pela sensibilidade ao DSS. Portanto os sintomas clínicos severos observados nos animais AIRmin^{SS} podem ser devido à sensibilidade desse grupo aos efeitos diretos do DSS o que levou a uma perda quase que completa da sua barreira epitelial e destruição da arquitetura da mucosa. Este quadro tem sido descrito para diferentes modelos experimentais de UC induzida por DSS, como por exemplo os animais das linhagens isogênicas, BALB/c, C57Bl/6 e C3H/He/J, conforme revisado por Derrick Eichele em 2017.

Uma vez observado a presença de um infiltrado celular caracterizado como sendo inflamatório em todos os grupos, avaliamos as populações celulares presentes nesse infiltrado a fim de verificar possíveis associações com a gravidade da doença. Para isso foram analisadas as diferentes populações: Granulócitos (Gr1⁺/CD11b⁺), Linfócitos (CD45⁺CD4⁺) ou (CD45⁺CD8⁺), Macrófagos (F4/80⁺MHCII⁺) e Macrófagos produtores de IL-10 (MHC II⁺ F4/80⁺ IL-10⁺).

A primeira diferença observada foi em relação ao infiltrado granulocítico caracterizado por células Gr1⁺CD11b⁺. Os animais do grupo AIRmax apresentaram um maior número de células com relação aos animais AIRmin, sendo que o grupo AIRmax^{SS} foi o que apresentou maior concentração de células. De fato, estas linhagens

têm capacidade de produzir reação inflamatória mais intensa do que os AIRmin devido à seleção de genes reguladores da alta AIR (Borrego *et al.*, 2006).

A partir desses resultados foi realizada uma medida indireta da atividade de neutrófilos através do ensaio de MPO para avaliar a participação dessas células no fenótipo da colite por DSS. A MPO mostrou-se aumentada apenas nos grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR}, sendo possível uma associação entre a atividade desta enzima e o alelo *R* independentemente do *background* genético. O aumento da atividade da MPO é um marco em modelos de colite por DSS especialmente na fase aguda, sendo os neutrófilos uma das populações responsáveis pela inflamação (Bento *et al.*, 2012; Randhawa, *et al.*, 2014). No entanto, essa atividade não parece estar relacionada com o fenótipo da colite uma vez que os animais AIRmin^{SS} não apresentaram um aumento da atividade dos neutrófilos.

A disfunção na barreira epitelial e, portanto, um aumento de permeabilidade, provocados pelo DSS, pode levar a uma ativação do sistema imune pela própria microbiota (Eichele & Kharbanda, 2017; Munyaka *et al.* 2016). A constatação de um maior infiltrado granulocítico em animais AIRmax (RR ou SS) com relação aos AIRmin, nos leva a inferir que esta diferença é devido à seleção AIR, ou seja, animais selecionados para alta resposta inflamatória possuem maior atividade da medula óssea com consequente elevada produção de células (Ribeiro *et al.*, 2003), embora ocorra uma alta produção de G-CSF pelas células do epitélio intestinal na linhagem AIRmin^{SS}.

Já o maior número de células observadas no grupo AIRmax^{SS}, em relação aos animais AIRmax^{RR} pode estar relacionado ao *Slc11a1* ou genes associados determinando maior ou menor infiltrado celular em resposta ao DSS. Esta diferença de infiltrado celular entre as linhagens AIRmax foi também observada para a AIR induzida por Biogel (Borrego *et al.*, 2006).

A população linfóide também foi avaliada, caracterizando-se a partir de uma população CD45⁺ linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo AIRmax^{SS} em relação aos AIRmin^{SS}. No entanto, como não houve uma diferença significativa em relação aos respectivos controles é possível que essa seja uma variação natural das linhagens, não contribuindo para o fenótipo da colite. De acordo com a literatura na fase, de 7 dias de DSS, o infiltrado celular é predominantemente neutrofílico e macrofágico (Bento *et al.*, 2012).

Com relação aos macrófagos, duas abordagens de marcação foram utilizadas, seguindo o protocolo de Mowat & Bain (2011): uma população F4/80⁺ MHCII⁺

caracterizada como macrófagos e outra de células apresentadoras de antígeno produtoras de IL-10 (MHC II⁺ F4/80⁺IL-10⁺), consideradas como macrófagos que possuem uma atividade reguladora.

Nos macrófagos F4/80⁺ MHCII⁺, foi observado um padrão semelhante aos granulócitos onde houve aumento da população apenas nos animais AIRmax, sendo que o grupo AIRmax^{SS} apresentaram um maior número de células. Como relatado anteriormente, a UC por DSS na fase aguda acontece pela ação principal de macrófagos e neutrófilos (Bento *et al*, 2012), sendo que os macrófagos contribuem através da produção de radicais de oxigênio (ROS), mediadores químicos como citocinas e quimiocinas e podem afetar a integridade do epitélio, contribuindo para um aumento da permeabilidade em casos de inflamação (Lissner *et al*, 2015). Esses macrófagos, por seguirem o mesmo padrão do perfil dos granulócitos, isto é, AIRmax maior do que AIRmin, significa que o *background* de alta resposta inflamatória está relacionado com esta diferença.

A população de macrófagos do cólon deriva de uma população de monócitos que ao entrar na mucosa sofrem uma diferenciação *in situ* com a aquisição gradual de MHCII, F4 / 80, CD64, CD11c, CX3CR1 e perda de Ly6C. Essa população é chamada de residente e tem como característica a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β (BAIN *et al*, 2014). Esta população de células pode ser importante na supressão da colite experimental por DSS juntamente com células dendríticas residentes da mucosa (Qualls *et al*, 2006). Assim, as células de fenótipo MHC II⁺ F4/80⁺IL-10⁺ encontradas no epitélio do cólon sob a ação do DSS podem ter a função reguladora da UC, uma vez que estavam presentes em todos os grupos exceto nos AIRmin^{SS}. Uma vez que os efeitos pleiotrópicos do gene *Slc11a1* afetam a atividade dos macrófagos (Barton; Whitehead; Blackwell, 1995), isto poderia levar à diminuição do número dessas células, contribuindo para o aumento da inflamação e consequente cronificação da doença nos AIRmin^{SS}.

Uma vez que a colite por DSS é caracterizada pela produção de vários mediadores químicos como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, foi feita uma avaliação com relação à produção desses mediadores por meio de expressão gênica e a presença de proteínas.

O aumento dos níveis de IL-1β está relacionado com a resposta inflamatória na colite por DSS (Eichele & Kharbanda, 2017). Na análise da expressão gênica, houve um aumento de IL-1β nos grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} enquanto que os níveis desta

citocina no lisado do cólon não apresentaram diferença. É descrito na literatura que a expressão gênica de IL-1 β está aumentada na fase aguda e os níveis da proteína aumenta preferencialmente na fase crônica (Bento *et al*, 2012; Egger *et al*, 2000).

A IL-6 é produzida por linfócitos T, macrófagos e células endoteliais em casos de inflamação na mucosa e é uma das citocinas que contribui para o influxo de leucócitos (Mudter; Neurath, 2007), induz a diferenciação de células B em plasmócitos (Muraguchi, Atsushi *et al*, 1988), aumenta a citotoxicidade dependente de anticorpo (Tsang *et al* 1991) e foi visto que ela está relacionada ao aumento da severidade da doença em humanos e em modelos experimentais murinos (Li *et al*, 2010, Bento *et al*, 2012; Egger *et al*, 2000).

Esta interleucina também está envolvida em cascatas de sinalização e imunorregulação, após meio da ligação com seu receptor (IL-6R) em células gp130 positivas ativando o fator de transcrição STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*), tendo sido associada a uma cronificação da doença e aumento de incidências de câncer de cólon (Bollrath, *et al*, 2009; Grivennikov, *et al* 2009; Múzes, *et al*, 2012; Waldner; Neurath, 2014).

No nosso caso, foi observado um aumento de IL-6 no grupo AIRmin^{SS} tanto na expressão gênica como na concentração da proteína, o que é um indício de sua importância no fenótipo da colite nesses animais. Já foi reportado o aumento dessa citocina em modelos de colite por DSS ainda na fase aguda da doença com permanência durante a fase crônica (Alex *et al*, 2009), um indicativo de uma possível cronificação da doença no grupo AIRmin^{SS}. Jiang *et al.*, 2009 também observou um aumento da expressão gênica de IL-6 no 7º dia de tratamento, no entanto, isso ocorreu apenas nos animais que possuíam o fenótipo *Sc111a1*^{wt} (selvagem) portadores da proteína funcional o que contribuiu para a conclusão do autor de uma suposta proteção da colite nos animais *Sc111a1*^{mt} (mutado) cuja proteína é defectiva.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que também está presente na colite. Foi observado um aumento da expressão desta citocina nos grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}, no entanto não houve nenhuma diferença significativa na concentração da proteína no lisado do cólon. É descrito aumento da expressão gênica dessa citocina em modelos de DSS na fase aguda (Egger, *et al*, 2000) e da proteína na fase crônica da doença (Alex *et al*, 2009). Isso poderia explicar a expressão de IL-10 no grupo AIRmin^{SS}, mas não da proteína no lisado, provavelmente por não ter atingido o estágio crônico. Também é

possível que a presença do alelo *S* possa estar interferindo na produção desta citocina, uma vez que foi visto uma diminuição das populações produtoras de IL-10 no cólon.

O TNF- α é uma das citocinas consideradas como marcadoras no modelo de colite por DSS (Eichele & Kharbanda, 2017) e sua expressão bem como a concentração proteica aparecem aumentadas na fase aguda (Alex *et al*, 2009; Egger, *et al*, 2000). Houve um aumento da expressão de TNF- α nos grupos AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR}, mas não foi acompanhado pela concentração da proteína no sobrenadante, sugerindo que a expressão gênica pode estar relacionada com a presença do alelo *R*. É possível que, embora haja uma alta expressão, não esteja havendo a produção da proteína devido a mecanismos de regulação pós-transcricionais que podem estar relacionados com a presença do alelo *R* bem como pelo *background* de alta resposta inflamatória.

A colite induzida por DSS também leva a um aumento do nível do fator de crescimento G-CSF (Ito *et al*, 2008). Em estudos utilizando modelo de colite por DSS com as linhagens isogênicas (C57BL/6 e BALB/c) foi visto uma associação entre a concentração de G-CSF e a cronificação da doença (Melgar; Karlsson; Michaëlsson, 2005). Nos nossos resultados, o G-CSF esteve aumentado apenas nos animais AIRmin^{SS}, provavelmente relacionado com a destruição da barreira epitelial pelo DSS, uma vez que os animais AIRmax apresentaram níveis mínimos de G-CSF independentemente do alelo. Kamezaki *et al* (2005) mostrou *in vitro* que, além do papel na maturação e proliferação de células da linhagem neutrofílica, o G-CSF também pode prolongar o tempo de vida dessas células, prevenindo a apoptose. Portanto, mesmo que a atividade da mieloperoxidase estivesse baixa nos animais AIRmin^{SS} é possível que a grande concentração de G-CSF estivesse impedindo a apoptose dos neutrófilos, que por sua vez contribuíram para o processo inflamatório, severidade e possível cronificação da doença.

Com relação à quimiocina MCP-1, Khan *et al* (2006) demonstrou a importância dessa quimiocina no modelo experimental para colite em camundongos utilizando DNBS (Ácido Dinitrobenzenesulfônico) através da modulação da produção de citocinas e da intensidade do infiltrado inflamatório. Os animais AIRmin^{SS} também apresentaram um aumento na concentração, mas não na expressão gênica. Uma vez que essa quimiocina mostrou um aumento apenas na fase crônica da doença (Alex *et al*, 2009), isto pode ser um indicativo de contribuição para o quadro inflamatório da doença nos AIRmin^{SS} e possível relação entre a presença do alelo *S* no *background* inflamatório de baixa resposta com a sensibilidade a colite.

O nosso trabalho sugere fortemente a influência do gene *Slc11a1* no fenótipo da UC. Indivíduos que apresentam o alelo *R* são resistentes à UC independente do *background* genético da alta ou baixa capacidade inflamatória. No entanto, quando ocorre a fixação do alelo *S* com o *background* genético de baixa resposta inflamatória (AIRmin^{SS}), o fenótipo de resistência à colite apresentado pela linhagem AIRmin parental é alterado.

Por fim, consideramos que o uso de animais com características genéticas selecionadas e o fundo genético heterogêneo preservado constituem modelo adequado e alternativo àqueles com linhagens isogênicas mutantes, para o estudo translacional de fenômenos complexos e multifatoriais como é a Colite Ulcerativa.

CONCLUSÕES

Os dados experimentais obtidos por meio da mensuração de parâmetros clássicos de UC induzida por DSS como alto índice de atividade da doença (IAD), maior porcentagem de perda de peso corpóreo, menor taxa de sobrevivência e diminuição do tamanho do cólon são claros e reforçam a candidatura do alelo *Slc11a1*^{SS}, presente em fundo genético de mínima resposta inflamatória (AIRmin), na sensibilidade à Colite Ulcerativa.

A destruição epitelial provocada pelo DSS, constatada pelas análises histopatológicas, ocorreu sobretudo nos animais que apresentaram o alelo *S*, com *background* genético de mínima resposta inflamatória aguda, corroborando os aspectos clínicos (IAD).

Na avaliação das populações celulares presentes no epitélio do cólon aos 7 dias do tratamento com DSS, verificamos inicialmente que os fenótipos de alta ou baixa reatividade inflamatória foram preservados nas linhagens AIRmax ou AIRmin, respectivamente, independente do alelo *R* ou *S*.

As abordagens de expressão gênica e de proteínas revelaram altas concentrações de IL6, G-CSF e MCP-1. Estes fatores estão associados com o fenótipo de alta intensidade da doença nos AIRmin^{SS}. Portanto, este resultado aparentemente contraditório pode ser um mecanismo compensatório dado o baixo nível inflamatório desta linhagem, no que concerne ao número inferior de células e baixa atividade de MPO.

O uso das quatro linhagens AIRmax e AIRmin *RR* ou *SS* como modelo experimental possibilitou sugerir que a resistência à UC pode ocorrer em indivíduos que possuam o alelo *R* do gene *Slc11a1*, contrariamente ao preconizado na literatura que destaca este alelo como permissivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alex P, et al. "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." *Inflammatory bowel diseases* 2008 Oct;15(3): 341-352.

Amano, M. T., et al. "A new model of outbred genetically selected mice which present a strong acute inflammatory response in the absence of complement component C5." *Inflammation Research* 2009 Jan; 58(4): 204-209.

Araki Y, et al. "Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis." *Oncology reports* 2012 Ago; 28(5): 1597-1605.

Araujo, Luiza MM, et al. "Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response." *European journal of immunology* 1998 Mar 28(9): 2913-2920.

Archer, Nicholas S., Najah T. Nassif, Bronwyn A. O'Brien. "Genetic variants of SLC11A1 are associated with both autoimmune and infectious diseases: systematic review and meta-analysis." *Genes and immunity* Apr; 2015 16(4): 275

Bain, Calum C., and Allan McI Mowat. "Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation." *Immunological reviews* 2014 260(1): 102-117.

Barton, C. Howard, Simon H. Whitehead, and Jenefer M. Blackwell. "Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways." *Molecular medicine* 1995 Mar; 1(3): 267-279.

Bento, Allisson Freire, et al. "Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice." *Biochemical pharmacology* 2012 Dez; 84(11): 1459-1469.

Biozzi, G., et al. "Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse." *Carcinogenesis* 1998 Feb; 19(2): 337-346.

Bischoff, Stephan C., et al. "Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy." *BMC gastroenterology* 2014 ;14(1): 189.

Blackwell, Jenefer M., and Susan Searle. "Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (= Ity/Lsh/Bcg)." *Immunology letters* 1999 Jan; 65(1-2): 73-80.

Bollrath, Julia, et al. "gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis." *Cancer cell* 2009 Feb;15(2): 91-102.

Borrego, Andrea, et al. "Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines." *Microbes and infection* 2006 Out; 8(12-13): 2766-2771.

Canonne-Hergaux, François, et al. "The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function." *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999 Jul/Ago;111(4): 283-289.

Chassaing, Benoit, et al. "AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition." *Gut* 2014 Jun; 63(7): 1069-1080.

- Coombes, Janine L., and Kevin J. Maloy. "Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells." *Seminars in immunology*. Academic Press, 2007 Abr; 19 (2):116-126
- De Franco, Marcelo, et al. "Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice." *Mammalian Genome* 2007 Mai; 18(4): 263-269.
- De Souza, Vinicius RC, et al. "Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice." *International journal of cancer* 2009 Out; 124(6): 1478-1482.
- Di Pace, Roberto Francisco, et al. "Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness." *Carcinogenesis* 2006 Ago; 27(8): 1517-1525.
- Egger, Bernhard, et al. "Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency." *Digestion* 2000 Mar; 62(4): 240-248.
- Eichele, Derrick D., and Kusum K. Kharbanda. "Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis." *World journal of gastroenterology* 2017 Set; 23(33): 6016.
- Erben, Ulrike, et al. "A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models." *International journal of clinical and experimental pathology* 2014 Jul; 7(8): 4557
- Erben, Ulrike, et al. "Histomorphology of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases (IBD) mouse models and its relevance for IBD in men." 2016 Fev; *Int J Clin Exp Med* 9: 408-442.
- Frehel, Claude, et al. "Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages." *Cellular microbiology* 2002 Ago; 4(8): 541-556.
- Gasteiger, Georg, et al. "Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs." *Science* 2015 Nov; 350(6263): 981-985.
- Geremia, Alessandra, et al. "Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease." *Autoimmunity reviews* 2014 Jan; 13(1): 3-10.
- Grimm, M. C., et al. "Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa—implications for pathogenesis." *Clinical & Experimental Immunology* 1995 Mai; 100(2): 291-297.
- Grivennikov, Sergei, et al. "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer cell* 2009 Fev; 15(2): 103-113.
- Govoni, Gregory, et al. "Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo." *Journal of Leukocyte Biology* 1997 Ago; 62(2): 277-286.
- Hisamatsu, Tadakazu, et al. "Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Pharmacology & therapeutics* 2013 Mar; 137(3): 283-297.
- Ibanez, Olga M., et al. "Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness." *European journal of immunology* 1992 Out; 22(10): 2555-2563.
- Ito, Reiko, et al. "Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice." *Biochemical and biophysical research communications* 2008 Dez; 377(1): 12-16.

Jabado, Nada, et al. "Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane." *Journal of Experimental Medicine* 2000 Oct 192(9): 1237-1248.

Jiang, Hui-Rong, et al. "Influence of Slc11a1 (formerly Nramp1) on DSS-induced colitis in mice." *Journal of leukocyte biology* 2009 Apr; 85(4): 703-710.

Kamezaki, Kenjiro, et al. "Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling." *Stem cells* 2005 Oct; 23(2): 252-263.

Katz, Iana Suly Santos, et al. "7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene-induced genotoxicity on bone marrow cells from mice phenotypically selected for low acute inflammatory response." *DNA repair* 2016 Jan; 37: 43-52.

Katz, Iana Suly Santos, et al. "7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism." *International journal of toxicology* 2014 Feb; 33(2): 130-142

Khan, Waliul I, et al. "Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006 May; 291(5): G803-G811.

Khor, Bernard, Agnes Gardet, and Ramnik J. Xavier. "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* 2011 Jun; 474(7351): 307.

Kitajima, Shuji, Shigenobu Takuma, and Masatoshi Morimoto. "Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." *Experimental animals* 1999 Dec; 48(3): 137-143

Kojima, Y., et al. "Inflammatory bowel disease is associated with a novel promoter polymorphism of natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene." *Tissue Antigens* 2001 Sep; 58(6): 379-384.

Ko, Yanna, et al. "Inflammatory bowel disease environmental risk factors: a population-based case-control study of Middle Eastern migration to Australia." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2015 Aug; 13(8): 1453-1463.

Jurjus, Abdo R., Naim N. Khoury, and Jean-Marie Reimund. "Animal models of inflammatory bowel disease." *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2004 Sep/Oct; 50(2): 81-92.

Legaki, Evangelia, and Maria Gazouli. "Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases." *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 2016 Feb; 7(1): 112.

Li, Y. I., et al. "Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis." *Gut* 2010 Feb; 59(2): 227-235.

Lissner, Donata, et al. "Monocyte and M1 macrophage-induced barrier defect contributes to chronic intestinal inflammation in IBD." *Inflammatory bowel diseases* 2015 Jun; 21(6): 1297-1305.

Littman, Dan R., and Eric G. Pamer. "Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses." *Cell host & microbe* 2011 Oct; 10(4): 311-323.

Mann, Elizabeth R., and Xuhang Li. "Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells." *World journal of gastroenterology: WJG* 2014 Aug; 20(29): 9653.

Maria, Durvanei Augusto, et al. "Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response." *Oncogene* 2003 Jan; 22(3): 426.

Melgar, Silvia, Agneta Karlsson, and Erik Michaëlsson. "Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2005 Jun; 288(6): G1328-G1338.

Molodecky, Natalie A., et al. "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." *Gastroenterology* 2012 Jan; 142(1): 46-54.

Mowat, Allan McI, and Calum C. Bain. "Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation." *Journal of innate immunity* 2011 Out; 3(6): 550-564.

Mudter, Jonas, and Markus F. Neurath. "Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance." *Inflammatory bowel diseases* 2007 Ago; 13(8): 1016-1023.

Mulero, Victoriano, et al. "Solute carrier 11a1 (Slc11a1; formerly Nramp1) regulates metabolism and release of iron acquired by phagocytic, but not transferrin-receptor-mediated, iron uptake." *Biochemical Journal* 2002 Abr; 363(1): 89-94.

Munyaka, Peris Mumbi, et al. "Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice." *Journal of basic microbiology* 2016 Abr; 56(9): 986-998.

Muraguchi, A. T. S. U. S. H. I., et al. "The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells." *Journal of Experimental Medicine* 1988 Feb; 167(2): 332-34

Múzes, Györgyi, et al. "Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases." *World journal of gastroenterology: WJG* 2012 Nov; 18(41): 5848.

Nell, Sandra, Sebastian Suerbaum, and Christine Josenhans. "The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models." *Nature Reviews Microbiology* 2010 Jul; 8(8): 564.

Neurath, Markus F., Susetta Finotto, and Laurie H. Glimcher. "The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity." *Nature medicine* 2002 Jun; 8(6): 567.

Ni, J., S. F. Chen, and D. Hollander. "Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes." *Gut* 1996 Ago; 39(2): 234-241.

Odenwald, Matthew A., and Jerrold R. Turner. "The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?" *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2017 Nov; 14(1): 9.

Okayasu, Isao, et al. "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." *Gastroenterology* 1990 Mar; 98(3): 694-702.

Okumura, Ryu, and Kiyoshi Takeda. "Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers." *Inflammation and regeneration* 2018 Abr; 38(1): 5.

Palm, Noah W., Marcel R. de Zoete, and Richard A. Flavell. "Immune-microbiota interactions in health and disease." *Clinical immunology* 2015 Ago; 159(2): 122-127.

Perše, Martina, and Anton Cerar. "Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks." *BioMed Research International* 2012 Mar; 2012:718617

Peters, L. C., et al. "Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice." *Genes and Immunity* 2007 Nov; 8(1): 51.

Qualls, Joseph E., et al. "Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes." *Journal of leukocyte biology* 2006 Ago; 80(4): 802-815.

Randhawa, Puneet Kaur, et al. "A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents." *The Korean journal of physiology & pharmacology* 2014 Ago;18(4): 279-288.

Ribeiro, Orlando G., et al. "Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response." *Journal of leukocyte biology* 2003 Out; 74(4): 497-506.

Shouval, Dror S., and Paul A. Rufo. "The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: a review." *JAMA pediatrics* 2017 Out; 171(10): 999-1005.

Solomon, Livingstone, et al. "The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview." *Comparative clinical pathology* 2010 Jun; 19(3): 235-239.

Stevceva, Liljana, et al. "Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice." *Journal of gastroenterology and hepatology* 1999 Jan; 14(1): 54-60.

Strober, Warren, Ivan J. Fuss, and Richard S. Blumberg. "The immunology of mucosal models of inflammation." *Annual review of immunology* 2002 Abr; 20(1): 495-549.

Sun, Manyi, Li Zhang, and Songli Shi. "Associations between NRAMP1 polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis/Crohn's disease: A Meta-analysis." *Immunological investigations* 2016 Mar; 45(3): 255-270.

Takeda, Kiyoshi, et al. "Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils." *Immunity* 1999 Jan; 10(1): 39-49.

Tatiya-aphiradee, Nitima, Waranya Chatuphonprasert, and Kanokwan Jarukamjorn. "Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis." *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* 2018 Mai 30(1): 1-10.

Tsang, K. Y., et al. "Human recombinant interleukin-6 enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity of human tumor cells mediated by human peripheral blood mononuclear cells." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1991 Jan; 34(1): 9-16.

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B. *et al.* "Ulcerative colitis" *The Lancet*, 2017 Mai; 389(10080): 1756-1770.

Valdez, Yanet, et al. "Nramp1 expression by dendritic cells modulates inflammatory responses during *Salmonella Typhimurium* infection." *Cellular microbiology* 2008 Jul; 10.8: 1646-1661.

Vancamelbeke, Maaïke, and Séverine Vermeire. "The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease." *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2017 Jun; 11(9): 821-834.

Vidal, Silvia M., et al. "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg." *Cell* 1993 Mai;73.3 : 469-485.

Vidal, Silvia M., et al. "Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains." *The Journal of Immunology* 1996 Out; 157(8): 3559-3568.

Vigar, Nicole D., et al. "Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction." *European journal of immunology* 2000 Aug; 30(2): 431-437.

Waldner, Maximilian J., and Markus F. Neurath. "Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development." *Seminars in immunology*. Academic Press, 2014 Fev; 26(1): 75-79

Wells, Jerry M., et al. "Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2016 Dez; 312(3) : G171-G193.

Wessling-Resnick, Marianne. "Nramp1 and other transporters involved in metal withholding during infection." *Journal of Biological Chemistry* 2015 Jul; 290(31): 18984-18990.

Wirtz, Stefan, et al. "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." *Nature protocols* 2007 Mar; 2(3): 541.

Wojciechowski, Wojciech, et al. "Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene." *The Journal of Immunology* 1999 Set; 163(5): 2688-2696.

Zaahl, Monique G., et al. "The- 237C→ T promoter polymorphism of the SLC11A1 gene is associated with a protective effect in relation to inflammatory bowel disease in the South African population." *International journal of colorectal disease* 2006 Jul; 21(5): 402.