UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona
(DHEA) na inflamação intestinal experimental**

Vanessa Beatriz Freitas Alves

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona
(DHEA) na inflamação intestinal experimental**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Vanessa Beatriz Freitas Alves

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicada à Farmácia em 30/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

ALVES, V. B. F.	Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na inflamação intestinal experimental		Doutorado FCFRP-USP 2016

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

Alves, Vanessa Beatriz Freitas.

Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na inflamação intestinal experimental. Ribeirão Preto, 2016.

138p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Cardoso, Cristina Ribeiro de Barros.

1. Dehidroepiandrosterona. 2. Imunomodulação. 3. Doença inflamatória intestinal.

Vanessa Beatriz Freitas Alves

Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na
inflamação intestinal experimental.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Cristina Ribeiro de
Barros Cardoso

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no *Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR)* do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos nº2012/17265-4 e nº2010/20162-7), da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias (NAP-DIN).

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida. Aos meus pais Hilda e Hiron, meu irmão Claudiney e meu namorado Rosan, pelo apoio inmensurável e por serem sempre o meu amparo!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ser o meu rochedo, minha fortaleza, meu escudo e o meu alto refúgio. Agradeço por me abençoar com seu Espírito para superar todos os obstáculos dessa trajetória me fortalecendo para finalizar este trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso que por meio dos seus conhecimentos me orientou com paciência e compreensão. Agradeço por confiar este projeto aos meus cuidados e por auxiliar no meu crescimento científico, profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, por enriquecer este trabalho com suas ideias dotadas de sabedoria, pela amizade, conselhos e por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Javier Lazo Chica pelos ensinamentos e por colaborar neste trabalho.

Aos demais colaboradores desse projeto: Paulo, Viviani e Angélica, que dedicaram seus esforços e tempo para ajudar nos longos experimentos. Sem o apoio de vocês, a finalização deste trabalho seria muito mais difícil. O meu muito obrigada de coração!

Aos secretários da pós-graduação, Henrique e Rosana pela atenção, carinho e dedicação de sempre nos serviços burocráticos.

A todos os professores da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pela competência nas disciplinas e pelo compartilhamento de experiências que ajudaram no meu crescimento profissional.

Às técnicas do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR), Viviani e Lelis, pela dedicação, competência profissional, carinho e disposição em ajudar. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR), em especial ao Paulo, que sempre demonstrou amizade sincera, dando conselhos, me apoiando nos momentos difíceis e acreditando em minha capacidade. Ainda, agradeço aos amigos Giuliano, Patrícia, Carol e Angélica pelo companheirismo, momentos de auxílio e até descontração, é certo que a presença de vocês tornou o fardo mais leve.

A FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Processo N° 2012/17265-4) pelo suporte financeiro (Processo N° 2010/20162-7) e do NAP-DIN, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe Hilda, meu pai Hiron e irmão Claudiney, por serem exemplos de humildade, solidariedade e companheirismo. Obrigada por me ensinarem o verdadeiro sentido da vida, por entenderem minhas escolhas, apoiarem as minhas decisões e compreenderem a minha ausência.

*Ao meu querido e amado **Rosan**, por sempre me escutar, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis, por compreender minha ausência com paciência e por todo carinho. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!*

*As minhas queridas amigas, **Beatriz Coutinho e Jane Freitas** por sempre me apoiarem, pela amizade sincera e pelos inúmeros conselhos. A amizade verdadeira é aquela que nem o tempo e a distância conseguem enfraquecer. Obrigada por sempre estarem presentes na minha vida mesmo que distantes.*

*Aos amigos do **Espaço Ophelia Camassutti**. Muito obrigada a todos vocês pelos momentos de descontração e por me ensinarem a nunca desistir de um sonho.*

*A todos **familiares e amigos** que contribuíram direta ou indiretamente durante essa caminhada e que torceram para a concretização deste projeto.*

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

*Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.*

*Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.*

*Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...*

*Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.*

*Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.*

Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.

*Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura.*

Fernando Pessoa

Resumo

*****

ALVES,V.B.F.**Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na inflamação intestinal experimental.** 2016. 138f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As Doenças inflamatórias intestinais (DII) são multifatoriais e sua etiologia envolve susceptibilidade genética, fatores ambientais, disbiose e ativação exacerbada do sistema imunológico no intestino. Essas doenças também tem sido relacionadas a baixos níveis de dehidroepiandrosterona (DHEA), um hormônio precursor de diversos esteroides e relacionado à modulação das respostas imunes. Porém, os mecanismos precisos que relacionam as ações deste hormônio com a proteção ou susceptibilidade à doença de Crohn ou colite ulcerativa ainda não são totalmente conhecidos. Sendo assim, este projeto buscou entender o papel imunomodulador do DHEA exógeno *in vitro* e *in vivo* durante a inflamação intestinal experimental induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos C57BL/6. Inicialmente, *in vitro*, DHEA inibiu a proliferação de células do baço de forma dose dependente nas concentrações de 5µM, 50µM ou 100µM, com diminuição da produção de IFN-γ. Este hormônio não foi tóxico para células de linhagem mieloide, embora tenha causado necrose em leucócitos nas doses mais elevada (50 µM e 100µM), o que pode ter influenciado a diminuição das citocinas *in vitro*. Nos ensaios *in vivo*, os camundongos tratados com DHEA (40 mg/Kg) foram avaliados na fase de indução da doença (dia 6) e durante o reparo tecidual, quando os animais expostos ao DSS e ao DHEA por 9 dias foram mantidos na ausência destas drogas até o dia 15. Houve diminuição do score pós-morte, melhora no peso e nos sinais clínicos da inflamação intestinal, com redução de monócitos no sangue periférico com 6 dias e aumento de neutrófilos circulantes na fase de reparo tecidual (15 dias). Ainda, a suplementação com DHEA levou à redução da celularidade da lâmina própria (LP) e ao restabelecimento do comprimento normal do intestino. O uso deste hormônio também diminuiu a expressão do RNAm de IL-6 e TGF-β, enquanto aumentou a expressão de IL-13 no colón dos animais durante a fase de indução da doença, o que provavelmente ajudou na atenuação da inflamação intestinal. Além disso, houve acúmulo de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço e diminuição apenas de linfócitos CD4⁺ nos linfonodos mesentéricos (LNM), indicando retenção das células CD4⁺ no baço após uso do DHEA. O tratamento foi também capaz de aumentar a frequência de células CD4 produtoras de IL-4 e diminuir CD4⁺IFN-γ⁺ no baço, além de reduzir a frequência de CD4⁺IL-17⁺ nos LNM, sugerindo efeito do DHEA no balanço das respostas Th1/Th2/Th17 relacionadas à colite. Em adição, as células de baço dos animais tratados com DHEA e expostos ao DSS se tornaram hiporresponsivas, como visto pela diminuição da proliferação após re-estímulos *in vitro*. Finalmente, DHEA foi capaz de atuar no metabolismo dos camundongos tratados, levando à diminuição de colesterol total e da fração LDL no soro durante a fase de indução da doença, sem gerar quaisquer disfunções hepáticas. Com isso, podemos concluir que o DHEA atua por meio do balanço das respostas imunes exacerbadas, minimizando os danos locais e sistêmicos causados pela inflamação intestinal induzida por DSS.

Palavras-chaves: dehidroepiandrosterona, imunomodulação, doença inflamatória intestinal, colite, hormônio.

*****Abstract

ALVES, V.B.F. **Study of the immunomodulatory potential of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in experimental intestinal inflammation.** 2016. 138s. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Inflammatory bowel diseases (IBD) are multifactorial diseases whose etiology involves genetic susceptibility, environmental factors, dysbiosis and exacerbated activation of the immune system in the gut. These diseases have also been associated to lower levels of dehydroepiandrosterone (DHEA), a precursor of various steroid hormones, related to modulation of immune responses. However, the precise mechanisms that link the actions of this hormone with protection or susceptibility to Crohn's disease or ulcerative colitis are still not fully understood. Thus, this project aimed to understand the immunomodulatory role of exogenous DHEA *in vitro* and *in vivo* in experimental intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate (DSS) in C57BL/6 mice. Initially, *in vitro*, DHEA inhibited the proliferation of spleen cells in a dose dependent way on the concentrations of 5 μ M, 50 μ M and 100 μ M, with decreased production of IFN- γ . This hormone was not toxic to myeloid lineage cells, although it caused necrosis of leukocytes at the highest doses (50 μ M and 100 μ M), which may have influenced the decrease of the cytokines *in vitro*. Mice treated with DHEA (40 mg / kg) were evaluated at the induction phase of the disease (day 6) and during tissue repair, when animals exposed to DSS and DHEA for 9 days were maintained in the absence these drugs until the day 15. There was decrease of postmortem score, improved weight and clinical signs of intestinal inflammation, besides reduced peripheral blood monocytes on day 6, together with an increase in circulating neutrophils in tissue repair phase (15 days). Supplementation with DHEA also led to a reduction in cellularity of the lamina propria (LP) and to the restoration of normal length of the gut. The use of this hormone also decreased the expression of IL-6 and TGF- β mRNA, while IL-13 was augmented in the colon of mice during the induction phase of the disease, a fact probably related to attenuation of intestinal inflammation. Furthermore, there was accumulation of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the spleen along with decreased CD4⁺ leukocytes in mesenteric lymph nodes (MLN), indicating retention of CD4⁺ cells in the spleen after use of DHEA. The treatment was also able to increase the frequency of CD4⁺ cells producing IL-4 and decrease CD4⁺IFN- γ ⁺ in spleen, with reduced frequency of CD4⁺IL-17⁺ in the MLN, suggesting a role for DHEA on the balance of Th1/Th2/Th17 responses related colitis. In addition, splenocytes of mice treated with DHEA and exposed to DSS became hiporresponsives as seen by decreased proliferation after re-stimulation *in vitro*. Finally, DHEA was able to act on the metabolism of treated mice, leading to decreased total cholesterol and LDL cholesterol in serum during the induction phase of the disease, without generating any liver dysfunction. Thus, we concluded that DHEA acts by balancing the exacerbated immune responses, minimizing local and systemic damages caused by intestinal inflammation induced by DSS.

Keywords: dehydroepiandrosterone, immunomodulation, inflammatory bowel disease, colitis, hormone.

Resumen

ALVES, V.B.F. **Estudio del potencial inmunomodulador de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) en la inflamación intestinal experimental.** 2016. 138hojas. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son multifactoriales y su etiología involucra susceptibilidad genética, factores ambientales, disbiosis y activación exacerbada del sistema inmunológico en el intestino. Esas enfermedades también han sido relacionadas a bajos niveles de dehidroepiandrosterona (DHEA), una hormona precursora de diversos esteroides y relacionado a la modulación de las respuestas inmunes. Sin embargo, los mecanismos precisos que relacionan las acciones de esta hormona con la protección o susceptibilidad a la enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa aún no son totalmente conocidos. Así siendo, este proyecto buscó entender el papel inmunomodulador de la DHEA exógena *in vitro* e *in vivo* durante la inflamación intestinal experimental inducida por dextrina sulfato de sodio (DSS) en ratones C57BL/6. Inicialmente *in vitro* la DHEA inhibió la proliferación de células del bazo de forma dosis dependiente en las concentraciones de 5 μ M, 50 μ M o 100 μ M, con disminución de la producción de IFN- γ . Esta hormona no fue tóxica para células de cepas mieloide, aunque tenga causado necrosis en leucocitos en dosis más elevadas (50 μ M o 100 μ M), lo que puede haber influenciado la disminución de las citosinas *in vitro*. En los ensayos *in vivo*, los ratones tratados con DHEA (40 mg/Kg) fueron evaluados en la fase de inducción de la enfermedad (día 6) y mientras el reparo tisidual, cuando los animales expuestos a DSS y DHEA por 9 días fueron mantenidos en la ausencia de estas drogas hasta el día 15. Hubo disminución del score pos muerte, mejora en el peso y en las señales clínicas de la inflamación intestinal, con reducción de monocitos en la sangre periférica con 6 días y aumento de neutrófilos circulantes en la fase de reparo tisidual (15 días). Aún, la suplementación con DHEA llevó a la reducción de la celularidad de la lámina propia (LP) y al restablecimiento de la largura normal del intestino. El uso de esta hormona también disminuyó la expresión del ARNm de IL-6 y TGF- β , mientras aumentó la expresión de IL-13 en el colon de los animales durante la fase de inducción de la enfermedad lo que, probablemente ayudó en la atenuación de la inflamación intestinal. Además, hubo acúmulo de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en el bazo y disminución solamente de linfocitos CD4⁺ en los linfonodos mesentéricos (LNM), indicando retención de las células CD4⁺ en el bazo pos el uso de la DHEA. El tratamiento fue también capaz de aumentar la frecuencia de células CD4 productoras de IL-4 y disminuir CD4⁺IFN- γ ⁺ en el bazo, además de reducir la frecuencia de CD4⁺IL-17⁺ en los LNM, sugiriendo efecto de la DHEA en el balance de las respuestas Th1/Th2/Th17 relacionadas a colitis. Además, las células del bazo de los animales tratados con DHEA y expuestos a DSS se volvieron hiporresponsivas, como visto por la disminución de proliferación pos re-estímulos *in vitro*. Finalmente, DHEA fue capaz de actuar en el metabolismo de los ratones tratados, llevando a la disminución de colesterol total y de la fracción LDL en el suero durante la fase de inducción de la enfermedad, sin generar cualesquiera disfunciones

hepáticas. Así podemos concluir que la DHEA actúa por medio del balance de las respuestas inmunes exacerbadas, minimizando los daños locales y sistémicos causados por la inflamación intestinal inducida por DSS.

Palabras llaves: dehidroepiandrosterona, inmunomodulación, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis, hormona.

*****

Lista de Figuras

Figura 1.	Protocolos de indução da inflamação intestinal, tratamento com DHEA, avaliação clínica e coleta das amostras.....	22
Figura 2.	Fotos do cólon de camundongos C57BL/6 demonstrando a sequência de fragmentos coletados destinados às diferentes análises.....	25
Figura 3.	Esquema de captura de imagem das lâminas histológicas.....	27
Figura 4.	Esquema para análise quantitativa da celularidade dos tecidos histológicos.....	28
Figura 5.	Efeito imunomodulador de dehidroepiandrosterona (DHEA) <i>in vitro</i>	40
Figura 6.	Efeito de DHEA na sobrevivência celular e toxicidade.....	42
Figura 7.	Avaliação dos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 durante os 6 primeiros dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA)	44
Figura 8.	Avaliação dos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 durante os 15 primeiros dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA)	45
Figura 9.	Avaliação dos leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 durante 6 e 15 dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com DHEA.....	47
Figura 10.	Análise histopatológica do cólon de camundongos C57BL/6 após indução da inflamação intestinal com/sem tratamento com DHEA.....	50
Figura 11.	Avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) após indução da inflamação intestinal com/sem tratamento com DHEA.....	51
Figura 12.	Quantificação do RNAm de citocinas e receptores (PPAR- α e PPAR- γ) nos cólons após 6 e 15 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	53
Figura 13.	Avaliação do infiltrado inflamatório após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	54
Figura 14.	Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 no baço e linfonodos mesentéricos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	55

Figura 15. Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 no intestino grosso após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	56
Figura 16. Avaliação da frequência de linfócitos intraepiteliais $T\gamma\delta$ após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	56
Figura 17. Avaliação da presença de células NKT e NK nos linfonodos mesentéricos e baço após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	57
Figura 18. Detecção de células monocíticas nos camundongos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	59
Figura 19. Avaliação do perfil de citocinas do baço e linfonodos mesentéricos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	61
Figura 20. Avaliação da proliferação celular e da capacidade de resposta à células reguladoras (Tregs) após indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	63
Figura 21. Frequência de células $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^-$ e quantificação de linfócitos T reguladores (GITR ou PD-1) após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA.....	65
Figura 22. Avaliação da função hepática e perfil lipídico durante 6 e 15 dias de indução de inflamação intestinal em camundongos tratamento ou não com DHEA.....	67

***** *Lista de Tabelas*

Tabela 1.	Escore clínico para avaliação da inflamação intestinal induzida por DSS.....	24
Tabela 2.	Escore pós-morte para avaliação da inflamação intestinal induzida por DSS	24
Tabela 3.	Primer usados para avaliação da expressão quantitativa dos genes no intestino grosso dos animais com inflamação intestinal experimental, tratados ou não com DHEA.....	31
Tabela 4.	Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço, linfonodos mesentéricos e intestino.....	34
Tabela 5.	Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço e linfonodos mesentéricos de células cultivadas <i>ex vivo</i>	34

Lista de abreviaturas e siglas

*****

βAET	Androstenetriol.
μL	Microlitro.
μm	Micrômetro.
μm ²	Micrômetro quadrado.
μM	Micromolar.
11β-HSD1	11β- hidroxisteróide-desidrogenase tipo 1.
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AKT	Proteína serina/treonina quinase, também conhecida por proteína quinase B (PKB).
ALT	Alanina aminotransferase.
AMP	Peptídeos antimicrobianos.
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico.
ANOVA	Análise de variância simples.
AST	Aspartato aminotransferase.
BrdU	Bromodeoxiuridina.
BSA	Fração V da albumina sérica bovina, do inglês " <i>bovine serum albumin</i> ".
Ca	Cálcio.
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
DC	Doença de Crohn, do inglês " <i>Crohn's disease</i> ".
CD	Acompanhado de um número: grupamento de diferenciação, do inglês " <i>cluster of differentiation</i> ".
cDNA	DNA complementar, do inglês " <i>complementary DNA</i> ".
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais.
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster.
CO ₂	Dióxido de carbono.
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
ConA	Concanavalina A.
cm	Centímetros.

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
Ct	Ciclo limiar.
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, do inglês " <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> ".
DACTB	Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas.
DEXA	Dexametasona.
DHEA	Hormônio dehidroepiandrosterona.
DHEA-S	Hormônio dehidroepiandrosterona sulfatado
DII	Doença(s) inflamatória(s) intestinal(is).
dL	Decilitros.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês " <i>deoxyribonucleic acid</i> ".
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato, do inglês " <i>deoxynucleotide triphosphates</i> ".
DO	Densidade óptica.
DSS	Dextran sulfato de sódio.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês " <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ".
ELISA	Imunoensaio enzimático, do inglês " <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ".
EPO	Eosinófilo-peroxidase (enzimas).
FACS	Separação de células ativada por fluorescência, do inglês " <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> ".
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.
FITC	do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> .
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
FoxP3 ⁺	do inglês " <i>Forkhead box P3</i> ".
FSC	Para avaliar tamanho das células, do inglês " <i>Forward Scatter</i> ".
g	Gramas.

<i>g</i>	Gravidade.
GABA	Ácido gama-amino butírico
GATA-3	Proteína de ligação GATA 3, do inglês " <i>GATA binding protein 3</i> ".
GC	Glicorticoides.
GFP	Proteína fluorescente verde, do inglês " <i>green fluorescent protein</i> ".
GITR	Membro da superfamília do receptor de TNF induzido por glicocorticoides, do inglês " <i>glucocorticoid-induced TNF receptors family</i> ".
<i>h</i>	Horas.
HaCat	Linhagem de queratinócitos humanos.
H&E	Hematoxilina e eosina.
H ₂ O	Água.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico.
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks, do inglês " <i>Hank's balanced salt solution</i> ".
HCl	Ácido clorídrico.
HDL	Lipoproteínas de alta densidade ligadas ao colesterol, do inglês " <i>High Density Lipoprotein</i> ".
Hepes	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico.
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio, do inglês " <i>hexadecyltrimethylammonium bromide</i> ".
IBD	Doença Inflamatória Intestinal, do inglês " <i>Inflammatory Bowel Disease</i> ".
ICOS	Co-estimulador das células T induzível do inglês " <i>Inducible T-cell costimulator</i> ".
IEC	Células epiteliais intestinais, do inglês " <i>intestinal epithelial cells</i> ".
IEL	Linfócitos intra epiteliais
IFN-γ	Interferon gama.
Ig	Imunoglobulina.

IL	Interleucina.
ILC	Células linfoides inatas, do inglês " <i>innate lymphoid cells</i> ".
IP	Iodeto de propídio, do inglês " <i>propidium iodide</i> ".
kg	Quilograma.
KHCO ₃	Carbonato de potássio.
KLH	do inglês " <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> ".
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade ligadas ao colesterol, do inglês " <i>Low density lipoprotein cholesterol</i> ".
LIR	Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação.
LNM	Linfonodos mesentéricos.
LP	Lâmina própria.
LPS	Lipopolissacarídio.
M	Molar.
M	Acompanhado de número: marcador de células ou <i>gate</i> .
mg	Miligrama.
Mg	Magnésio.
MgCl ₂	Cloreto de magnésio.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
mm ²	Milímetros quadrados.
mM	Milimolar.
MPO	Mieloperoxidase (enzimas).
MTT	do inglês " <i>3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> "
N	Normal.
Nº	Número.
NaCl	Cloreto de sódio.
NAG	N-acetil-β-D-glicosaminidase (enzimas).

NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio.
NAP-DIN	Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias.
NF-κB	Fator nuclear κB, do inglês " <i>nuclear factor κB</i> ".
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio.
NK	Exterminadora natural (célula), do inglês " <i>natural killer</i> ".
nm	Nanômetro.
nM	Nanomolar.
NO	Óxido nítrico, do inglês " <i>nitric oxide</i> ".
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina, do inglês " <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> ".
PBS	Solução salina tamponada com fosfato, do inglês " <i>phosphate buffered saline</i> ".
PD-1	Proteína de morte celular programada 1, do inglês " <i>programmed cell death 1</i> ".
PE	do inglês <i>Phycoerythrin</i> .
PerCP	do inglês " <i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i> ".
PE-Cy7	do inglês " <i>Phycoerythrin- Cyanin 7</i> ".
pg	Picograma(s).
PG	Propilenoglicol.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês " <i>phosphatidylinositol 3-kinases</i> ".
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo, do inglês " <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> ".
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (ou em tempo real), do inglês " <i>quantitative polymerase chain reaction</i> ".
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês " <i>ribonucleic acid</i> ".
RNA _m	RNA mensageiro.
ROR _γ t	Receptor Órfão Relacionado ao Receptor de Ácido Retinóico γt.
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês " <i>Reactive oxygen species</i> ".
RPMI	Meio de cultura RPMI 1640.

RUNX1	Fator 1 de transcrição relacionado com Runt, do inglês " <i>Runt-related transcription factor 1</i> ".
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
SFB	Soro fetal bovino.
SSC	Para avaliar complexidade e granulosidade das células, do inglês " <i>Side Scatter</i> ".
StAR	Proteína reguladora aguda da esteroidogênese.
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição, do inglês " <i>signal transducer and activator of transcription</i> ".
T-bet	Fator de transcrição específico de linfócitos Th1, do inglês " <i>Th1-specific T-box transcription factor</i> ".
TGI	Trato gastrointestinal.
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta, do inglês " <i>transforming growth factor beta</i> ".
Th	Linfócito T auxiliar, do inglês " <i>T helper</i> ".
TLR	Receptores Tipo <i>Toll</i> , do inglês " <i>Toll-like receptors</i> ".
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês " <i>tumor necrosis factor</i> ".
Tregs	Linfócito(s) T regulador(es).
UC	Colite ulcerativa, do inglês " <i>ulcerative colitis</i> ".
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
USP	Universidade de São Paulo.
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade, do inglês " <i>very low-density lipoprotein</i> ".

Lista de Símbolos

α	Alfa
β	Beta
©	Copyright
γ	Gama
°C	Graus celsius
®	Marca registrada
μ	Mi
%	Porcentagem
+	Soma (ou administrado junto)
™	Trademark
Δ	Variação
$\geq$	Maior e igual que
$<$	Menor que
X	Veze

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Resumen.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiii
Lista de símbolos.....	xx
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Doença Inflamatória Intestinal.....	2
1.1.1. Etiologia e resposta imunológica na DII.....	3
1.1.2. Tratamento.....	7
1.1.3. Modelo experimental.....	8
1.2. Dehidroepiandrosterona (DHEA).....	9
 2. JUSTIFICATIVA.....	 14
 3. OBJETIVOS.....	 16
3.1 Objetivo principal.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
 4. METODOLOGIA.....	 18
4.1. Animais.....	19
4.2. Avaliação do efeito imunomodulador de DHEA <i>in vitro</i>	19
4.3. Quantificação de citocinas.....	20
4.4. Ensaio de viabilidade celular.....	20
4.5. Avaliação da viabilidade de macrófagos.....	21
4.6. Colite induzida por DSS.....	21
4.7. Preparo e administração de DHEA.....	23
4.8. Escore clínico diário.....	23
4.9. Escore pós-morte.....	24
4.10. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras.....	25
4.11. Análise histológica.....	26
4.12. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO).....	28
4.13. Ensaio de N-acetilglicosaminidase (NAG).....	29

4.14. Ensaio de Eosinófilo-peroxidase (EPO).....	29
4.15. Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR.....	30
4.16. Extração das células para Citometria de Fluxo.....	32
4.17. Citometria de Fluxo.....	33
4.18. Análise da Citometria de Fluxo.....	34
4.19. Ensaio de co-cultivo de leucócitos com células T reguladoras.....	35
4.20. Testes bioquímicos.....	36
4.21. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Efeito imunomodulador do DHEA na proliferação celular <i>in vitro</i>	39
5.2. Toxicidade do DHEA em células mielóides e linfóides.....	41
5.3. Determinação da dose ideal de DHEA e avaliação dos parâmetros clínicos da inflamação intestinal.....	42
5.4. Avaliação sistêmica após tratamento com DHEA.....	46
5.5. Avaliação da inflamação no intestino após tratamento com DHEA.....	47
5.5.1. Avaliação histopatológica	47
5.5.2. Quantificação de MPO, NAG e EPO.....	49
5.5.3. Avaliação do perfil de citocinas e receptores PPAR no intestino.....	51
5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório após tratamento com DHEA.....	52
5.7. Avaliação da atividade funcional das células.....	60
5.8. Efeitos do DHEA na proliferação de leucócitos <i>in vivo</i>	62
5.9. Avaliação da toxicidade e perfil lipídico após uso do DHEA <i>in vivo</i>	66
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERENCIAS.....	81
ANEXO.....	102

1. Introdução

*****

1.1. Doença Inflamatória Intestinal

As duas principais formas clinicamente definidas como Doença Inflamatória Intestinal (DII), que são a Doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC) são doenças cronicamente remitentes que cursam com reações inflamatórias progressivas no trato gastrointestinal (TGI) (Bouma and Strober 2003). A DII afeta milhares de pessoas no mundo todo e nos últimos anos vêm aumentando o número de casos principalmente na faixa etária entre 30 a 40 anos de vida, além dos casos pediátricos. O risco de desenvolver complicações da DII parece estar diretamente ligado com a idade que o paciente começa desenvolver as primeiras manifestações da doença, sendo melhor o prognóstico quando o início da doença é após os 30 anos de vida (Jess, Simonsen et al. 2012).

Essas doenças têm afetado principalmente países desenvolvidos do ocidente como os países norte americanos e os países do oeste europeu (Molodecky, Soon et al. 2012, Burisch and Munkholm 2013). Considerando os países em desenvolvimento como o Brasil e o continente asiático, o número de casos da DII também está aumentando, no entanto os estudos sobre a evolução da doença permanecem escassos (Ng, Tang et al. 2013, Wong and Ng 2013). Ainda, os estudos para relatar a prevalência e incidência da DII no Brasil não refletem o perfil epidemiológico real da doença no país, sendo essas consideradas baixas. Estes estudos apresentam dificuldades em gerar dados exatos devido à heterogeneidade e tamanho do território brasileiro (Victoria, Sassak et al. 2009, Parente, Coy et al. 2015).

De forma geral, os pacientes com DII apresentam sinais e sintomas como diarreia persistente, sangramento retal, dor abdominal, obstrução intestinal, fístulas, febre, fadiga e perda de peso (Hendrickson, Gokhale et al. 2002, Fuss, Heller et al. 2004, Martins and Peppercorn 2004, Van Assche, Dignass et al. 2010, Kalla, Ventham et al. 2014). A inflamação exacerbada leva a danos prolongados e muitas vezes irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal (Bouma and Strober 2003). Ainda, essas doenças afetam a qualidade de vida dos pacientes, devido aos tratamentos longos e caros, além da necessidade de intervenções cirúrgicas, sendo ainda capazes de desencadear o desenvolvimento de outras doenças também consideradas graves como câncer cólon-retal (Russel and Stockbrugger 1996, Norman, Kirchner et al. 2006).

A DC é caracterizada por ulceração descontínua que afeta camadas mais profundas no TGI causando lesões transmuralis com a presença de granulomas que podem levar a complicações como fístulas, abscessos e estenoses. Além disso, a DC pode afetar qualquer porção do TGI (da orofaringe à região perianal), mas normalmente se localiza no íleo terminal e/ou cólon proximal (Van Assche, Dignass et al. 2010, Kalla, Ventham et al. 2014).

A UC se caracteriza por inflamação restrita ao cólon causando ulceração, hemorragias e edema que acometem de forma contínua camadas mais superficiais como mucosa e submucosa (Sepulveda, Beltran et al. 2008, Dignass, Eliakim et al. 2012).

A DC e a UC apresentam gravidade variável, além de possuir períodos de remissão clínica. Ainda, a DII pode apresentar manifestações extraintestinais acometendo a mucosa oral, fígado, pâncreas, rins, pulmões, vias oculares, articulações e sistema tegumentar (Baumgart and Sandborn 2007, Rodriguez-Moranta, Soriano-Izquierdo et al. 2007, Levine and Burakoff 2011).

Embora a DC e a UC sejam clinicamente semelhantes, é possível observar padrões de resposta imune bastante distintos. Em geral, os pacientes com DC apresentam resposta de células T helper 1 (Th1), com produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , e, recentemente, descobriu-se a presença de resposta Th17, com produção das citocinas IL-17 e IL-23 na mucosa inflamada. Já os pacientes portadores da colite ulcerativa apresentam inflamação intestinal caracterizada pela presença de resposta imune Th2, com presença de IL-4, IL-5 e IL-13 (Fujino, Andoh et al. 2003, Iwakura and Ishigame 2006, Iboshi, Nakamura et al. 2014). Estes padrões de resposta imunológica serão melhor discutidos posteriormente.

1.1.1. Etiologia e resposta imunológica na DII

Embora não se saiba exatamente qual o gatilho inicial que leva ao desenvolvimento da DII, sabe-se que esta doença está relacionada a uma base genética que supostamente predispõe ao aumento das respostas do sistema imunológico a um ou vários agentes próprios ou ambientais. Sendo assim, a DII é considerada uma doença multifatorial que envolve susceptibilidade genética, fatores ambientais, microbiológicos e sistema imunológico (Schreiber 2000, Vieth and Tannapfel 2006).

Os fatores genéticos e ambientais propiciam a disfunção na barreira epitelial intestinal, que facilita a translocação de bactérias comensais e produtos microbianos do lúmen para dentro da mucosa intestinal. Estes eventos levam à ativação das células imunológicas e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, se a inflamação aguda nas mucosas não for interrompida por mecanismos anti-inflamatórios e a supressão da resposta imune não for eficiente, a inflamação intestinal crônica é desenvolvida. Consequentemente, há complicações no funcionamento do intestino e destruição dos tecidos das mucosas, ambas causadas pela produção exacerbada das citocinas e ativação do sistema imune (Neurath 2014).

A mucosa intestinal é colonizada por mais de 400 espécies diferentes de bactérias comensais (Sepulveda, Beltran et al. 2008) e o sistema imune tem a função de diferenciar as bactérias patogênicas das comensais (Mowat 2003), gerando respostas adequadas de tolerância imunológica na maioria das vezes (Liu and Lefrancois 2004). Porém, o desequilíbrio no trato gastrointestinal que leva à alteração no número ou no tipo de micro-organismos que compõem a microbiota intestinal, pode resultar em aumento de patógenos capazes de desencadear resposta imune excessiva (Strober, Fuss et al. 2007). Ainda, as bactérias comensais são capazes de sintetizar no intestino metabólitos ativos e benéficos, como os ácidos graxos de cadeias curtas que apresentam funções anti-inflamatórias e podem aumentar a diferenciação de células para um padrão mais regulador (Walker, Sanderson et al. 2011, Furusawa, Obata et al. 2013). Entretanto, a produção exacerbada de outros metabólitos, como o ácido siálico, durante a inflamação intestinal e disbiose, pode favorecer o crescimento de bactérias patogênicas, como a enterohemorrágica *Escherichia coli*, contribuindo com o aumento da resposta imune e consequente produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Huang, Chassard et al. 2015). Sabe-se que nas DII há disbiose intestinal (Hold, Smith et al. 2014) com diminuição de bactérias dos filos Bacteroidetes e Firmicutes que ajudam na homeostasia do intestino e aumento de bactérias do filo Proteobacteria, que contribuem para a inflamação descontrolada na DII (Ott, Musfeldt et al. 2004, Walker, Sanderson et al. 2011). Neste contexto, a importância da microbiota intestinal também foi mostrada em estudos experimentais, nos quais animais com disbiose intestinal foram tratados com microbiota fecal de animais saudáveis, tendo como resultado melhora funcional das barreiras epiteliais da mucosa normalizando a

secreção de IgA e mucina, além de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Li, Liang et al. 2015) e pode ajudar a retorna à homeostasia intestinal (van Nood, Vrieze et al. 2013).

A resposta inflamatória excessiva na mucosa com DII é caracterizada por infiltrado composto por linfócitos, monócitos/macrófagos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Geboes 1994, Yang, Choi et al. 2002, Rijnierse, Koster et al. 2006, Yan, Kolachala et al. 2009). O epitélio intestinal representa uma enorme parte do corpo humano revestida por uma única camada de células epiteliais intestinais (IEC) formando uma barreira física robusta. As IEC ajudam nos processos de absorção de nutrientes e impedem que agentes agressores e bactérias do lúmen intestinal invadam a mucosa. Além disso, as IEC apresentam várias outras funções que são cruciais para a homeostase intestinal como a secreção de mucina, peptídeos antimicrobianos (AMP- lisozimas, defensinas, lectinas entre outros), compostos que influenciam a colonização microbiana, modulação das respostas imunes e detecção de microrganismos comensais e patogênicos (Artis 2008). Entretanto, os pacientes com DII podem apresentar disfunção de células de Paneth (célula IEC especializada) e assim contribuir com o aumento da inflamação intestinal pela diminuição da secreção de defensinas (Koslowski, Beisner et al. 2010). Ainda, os portadores da DII apresentam a camada de IEC mais frágil com descamação durante o processo inflamatório, podendo haver apoptose destas células e aumento da permeabilidade intestinal (Soderholm, Olaison et al. 2002, Gerova, Stoynov et al. 2011, Kiesslich, Duckworth et al. 2012).

Na imunidade inata, os macrófagos do intestino normal são condicionados a manter fenótipo não inflamatório (Smith, Ochsenbauer-Jambor et al. 2005). Em contraste, na DII essas células apresentam fenótipo ativado (Selby, Poulter et al. 1983) para a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (Rugtveit, Brandtzaeg et al. 1994, Rugtveit, Nilsen et al. 1997). Na DC os monócitos CD14⁺ estão aumentados em número e produzem mais IL-23 e TNF- α que aqueles na mucosa normal enquanto que na UC contribuem para a produção de IFN- γ pelas células T locais (Kamada, Hisamatsu et al. 2008). De forma similar, as células dendríticas intestinais são células apresentadoras de antígenos crucialmente envolvidas na iniciação e regulação de fenômenos na imunidade inata e adaptativa da DII (Rescigno and Di Sabatino 2009). Como os macrófagos, sua função é modulada pelo microambiente das mucosas funcionando para proteger e defender,

induzir tolerância ou mediar inflamação (Bilsborough and Viney 2004). O número de células dendríticas é relativamente pequeno, mas extremamente diversificado quando ao fenótipo e função, sendo que na DII, as células dendríticas são ativadas, sua expressão de receptores microbianos é aumentada e há produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6 (Hart, Al-Hassi et al. 2005).

Atualmente, outra linhagem celular, como as células linfoides inatas (ILC), vêm sendo descritas como importantes e fundamentais para a manutenção e homeostasia das mucosas (Spits and Di Santo 2011). As ILC são uma população de células de linhagem imune inata que respondem rapidamente a sinais de citocinas derivadas do epitélio intestinal. Elas têm um padrão de expressão de citocinas que se assemelha ao dos subconjuntos de células T auxiliares Th1, Th2, Th22 e Th17 (Spits and Cupedo 2012). Na DII, as ILC podem apresentar disfunção que levam à síntese exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (ILC1) e consequentemente aumento da inflamação intestinal (BERNINK et al., 2013).

Além disso, os estudos voltados para o entendimento da imunopatogênese da DII relatam que a doença resulta de uma disfunção na regulação do sistema imunológico, o que leva à polarização das células intestinais para as respostas adaptativas (Neuman 2007). Na DC há predominantemente um padrão de resposta Th1 com produção elevada de IFN- γ , IL-12 e TNF- α pelas células mononucleares da lâmina própria (Monteleone, Biancone et al. 1997, Parronchi, Romagnani et al. 1997, Fujino, Andoh et al. 2003, Iboshi, Nakamura et al. 2014). Ainda, também ocorre produção considerável de IL-17 e IL-23 por células Th17 e produção dupla de IFN- γ e IL-17 pela mesma célula T na mucosa (Fujino, Andoh et al. 2003, Annunziato, Cosmi et al. 2007, Globig, Hennecke et al. 2014) embora também tenha sido encontrada a presença de IL-21 modulando a resposta Th17 (Kolls and Linden 2004, Monteleone, Monteleone et al. 2005, Cho 2008) que, em geral, induz inflamação (Nakae, Komiyama et al. 2002, Nakae, Nambu et al. 2003, Koenders, Lubberts et al. 2005). Em contraste, a UC é considerada como padrão de resposta Th2, com aumento de IL-5 e IL-4 pelas células T e IL-13 por células NKT da mucosa inflamada (Fuss, Heller et al. 2004). A IL-13 induz citotoxicidade e apoptose prejudicando a função da barreira epitelial, eventos que explicam algumas características importantes da patogênese da UC (Heller, Florian et al. 2005). As células Th17 também estão presentes na mucosa com UC embora em número mais baixo do que na DC (Fujino, Andoh et al. 2003, Iboshi, Nakamura et al. 2014).

Outra subpopulação importante nas respostas imunes de mucosa são as células T reguladoras (Treg), que apresentam papel crítico no controle de reações autoimunes e inflamatórias crônicas. Sua função é controlar e impedir a ativação excessiva, potencialmente prejudicial ao organismo em doenças inflamatórias descontroladas (Jiang and Chess 2004, Feuerer, Hill et al. 2009). A expressão do fator de transcrição Foxp3 é característica das células Tregs (CD4⁺CD25⁺), sendo indispensável para seu desenvolvimento (Chen, Jin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003). Um dos principais mecanismos pelos quais as células Tregs exercem a função supressora é a liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β . Esta última pode modular a expressão de FoxP3 pelas Tregs, transformando células T periféricas CD4⁺CD25⁻ em CD4⁺CD25⁺. Uma outra forma que as células Tregs podem usar para controlar a resposta imunológica é competindo pelos fatores de crescimento (principalmente IL-2) com as células efectoras, levando à apoptose das células efectoras por privação de citocinas. Também as células Tregs podem interagir com células efectoras através da molécula de superfície CTLA-4, que libera sinais inibidores após a ligação com o receptor de membrana B7-1 (CD80) expresso em células dendríticas e células T ativadas (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

Alguns trabalhos demonstraram que as células Th17 e Treg dividem vias de diferenciação comum, sugerindo ligação entre ambas no seu desenvolvimento e funcionalidade (Weaver, Harrington et al. 2006, Mucida, Park et al. 2007, Weaver and Hatton 2009). Neste contexto, na DII ocorre um desequilíbrio entre os linfócitos T efetores inflamatórios e reguladores (Tregs) que iriam suprimir a resposta, provavelmente por um defeito no repertório e/ou função das células Tregs (Gonzalez, Gonzalez-Rey et al. 2009).

Alguns estudos destacam também a importância dos fatores ambientais na patogênese da DII (Thia, Loftus et al. 2008) mostrando que a doença pode ser desenvolvida em viajantes que migram para países com alta prevalência da mesma (Tsironi, Feakins et al. 2004). Além disso, em gêmeos monozigóticos, uma das crianças pode apresentar manifestações da doença dependendo do ambiente que habita (Halme, Paavola-Sakki et al. 2006).

1.1.2. Tratamento

A terapêutica utilizada atualmente para as DII é focada principalmente na redução da inflamação, tentando bloquear diferentes pontos da cascata imunológica (Lim and Hanauer 2004). Sendo assim, os tratamentos clássicos para as DII incluem amino-salicilatos, antibióticos, corticosteroides, tiopurinas, antagonistas do ácido fólico (metotrexato) e agentes biológicos como anti-TNF- α . Todos estes medicamentos têm diferentes alvos que contribuem para a regulação das respostas imunológicas exacerbadas tanto na DC como na UC (Sales-Campos, Basso et al. 2015).

O tratamento na DII também pode compreender duas abordagens terapêuticas diferentes conhecidos como estratégia *step-up* ou *top-down*. A primeira refere-se ao método clássico em que a intensidade do tratamento aumenta, juntamente com a gravidade da doença. Por outro lado, a estratégia *top-down* inclui o início precoce de tratamento intensivo, tais como terapias biológicas, a fim de evitar a ocorrência de complicações futuras (Lee 2012). No entanto, a escolha de uma destas diferentes abordagens pelo médico depende da capacidade de resposta do paciente a terapias anteriores, condição clínica e o diagnóstico. As opções de tratamento para UC ou DC diferem porque são entidades únicas com diferentes aspectos fisiopatológicos (Sales-Campos, Basso et al. 2015). Além disso, as cirurgias são indicadas para casos mais graves ou com complicações e alguns pacientes requerem repetidas intervenções para combater as complicações da doença (Kozuch and Hanauer 2008). Ainda, as terapias atuais não são totalmente curativas, e os indivíduos podem ser refratários ou não responder aos tratamentos convencionais. Nestes casos, fica evidente a necessidade de novos estudos que visam melhor esclarecer os mecanismos da DII e assim buscar tratamentos mais eficazes ou novos alvos terapêuticos para tratamento da mesma.

1.1.3. Modelo experimental

Grande variedade de modelos experimentais é utilizada para o estudo da DII em camundongos, sendo que fatores genéticos podem diferenciar a gravidade da doença apresentada pelo modelo (Borm. and Bouma 2004). Camundongos C57BL/6 são bons modelos de DII induzida por dextran sulfato de sódio (DSS),

desenvolvendo características patológicas semelhantes à doença em humanos (Yan, Kolachala et al. 2009). Sabe-se que o DSS se associa a ácidos graxos, tais como dodecanoato do lúmen intestinal para indução da colite (Laroui, Ingersoll et al. 2012) e que sua atividade inflamatória é conferida principalmente pelo dextran. Esta ideia é apoiada pelo fato de que quando o dextran entra no citoplasma, citocinas são sintetizadas, sinalizando para aumentar a inflamação intestinal e, assim, os efeitos deletérios do DSS são direcionados principalmente para o cólon distal (Laroui, Ingersoll et al. 2012). Porém, os mecanismos exatos que correlacionam a inflamação intestinal experimentalmente induzida por DSS, a desregulação do sistema imunológico e inflamação exacerbada que ocorre na DII humana ainda não são totalmente conhecidos.

Diferentes trabalhos mostram que durante a fase de indução da DII usando DSS, os animais apresentam índice grave da doença, com infiltração massiva de leucócitos polimorfonucleares no cólon (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) e níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias principalmente do perfil Th1 e Th17 (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1 β e IL-17) (Yan, Kolachala et al. 2009). Já nos períodos de recuperação, há aumento acentuado dos mediadores anti-inflamatórios IL-10, IL-4 e TGF- β , que são essenciais para a resolução de intestinal inflamação (Pelissier, Muller et al. 2006, Bento, Leite et al. 2012, Kim, Shajib et al. 2012, Mielke, Jones et al. 2013). Estes achados mostram que o padrão de resposta imunológica na inflamação intestinal induzida por DSS é muito semelhante com o que ocorre no humano, quando há o desenvolvimento principalmente a DC (Monteleone, Biancone et al. 1997, Parronchi, Romagnani et al. 1997, Fujino, Andoh et al. 2003, Yan, Kolachala et al. 2009).

1.2. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

O dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu conjugado de sulfato (DHEA-S) são os hormônios esteróides mais abundantes na circulação. São sintetizados pelas células da zona reticular das glândulas adrenais e pelas gônadas, a partir de moléculas de colesterol e precursores como 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesterona (Endoh, Kristiansen et al. 1996). As formas livres do DHEA e DHEA-S são os principais andrógenos produzidos pela adrenal, sendo que

pequenas quantidades de androstenediona e ainda menores quantidades de testosterona são também formadas (Endoh, Kristiansen et al. 1996).

DHEA-S é o esteróide mais abundante nos seres humanos com concentrações séricas de 250-500 vezes maior que o DHEA e serve principalmente como uma molécula precursora. DHEA-S é dessulfatado enzimaticamente para produzir DHEA, que por sua vez é convertido em vários compostos estrogênicos e androgênicos, sendo ainda que uma porção de DHEA produzido pode também ser convertido de volta à forma sulfatada (Kroboth, Salek et al. 1999, Tchernof and Labrie 2004). Logo, DHEA pode atuar como precursor de testosterona, estradiol, estrona e estriol, além de exercer importantes funções fisiológicas. O primeiro passo no metabolismo do DHEA é a conversão em DHEA-S, que é sua forma mais estável. Esta conversão é feita pela enzima sulfotransferase-DHEA que é codificada pelo gene SULT2A1. O gene SULT2A1 é altamente expresso na zona reticular do córtex adrenal, no intestino e no fígado. Além disso, pequenas doses de DHEA administradas oralmente são primeiramente metabolizados no fígado. O DHEA-S é transportado pela albumina e tem taxa de depuração metabólica mais lenta com meia-vida mais longa do que o DHEA (Otterness and Weinshilboum 1994, Strott 2002). O DHEA pode ser encontrado no cérebro do humano e também pode ser convertido em DHEA-S neste órgão (Plassart-Schiess and Baulieu 2001, Warner and Gustafsson 2015). O DHEA-S, além de ser precursor para síntese de andrógenos e de estrógenos, também possui papel na esteroidogênese. Pesquisadores observaram que a incubação de células da suprarrenal de humanos (NCI-H295R) com DHEA-S aumentou significativamente a expressão do RNAm da proteína Star (proteína reguladora da esteroidogênese aguda). Sabe-se que a Star é responsável pela translocação de colesterol do citoplasma para dentro das mitocôndrias (Asif, Ljubojevic et al. 2006).

O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) sintetizado na hipófise, estimula a síntese de DHEA e cortisol. Wolf e Kirschbaum (1999), descrevem evidências de que DHEA também pode ser sintetizada no cérebro, onde acredita-se que este hormônio aja sobre os receptores de neurotransmissores (Wolf and Kirschbaum 1999). Em particular, DHEA pode atuar como um antagonista do receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Majewska 1995, Espallergues, Mamiya et al. 2012), ativando o sistema nervoso central. Em mulheres, DHEA contribui para a obesidade abdominal e resistência à insulina. DHEA pode ter seus efeitos contrabalanceados

na pré-menopausa, quando o estrógeno encontra-se com concentrações elevadas; porém no metabolismo pós-menopausa ocorre diminuição de DHEA e estrógeno (Ebeling and Koivisto 1994). Em adição aos efeitos imunomoduladores, muitas citocinas produzidas durante as respostas imunológicas também podem influenciar vários mecanismos neuroendócrinos, como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) como parte de uma reação inflamatória ou de defesa (Chrousos 1995, Besedovsky and del Rey 1996, Turnbull and Rivier 1999). Além de poder influenciar diretamente a atividade das glândulas adrenais (Ehrhart-Bornstein, Hinson et al. 1998, Bornstein and Ehrhart-Bornstein 2000) as citocinas inflamatórias podem estimular a síntese de corticotropina - hormônio liberador no hipotálamo, levando à liberação de ACTH pela hipófise e subsequente produção dos esteróides adrenais glicocorticóides (GC) e DHEA (Chrousos 1995, Besedovsky and del Rey 1996, Turnbull and Rivier 1999). Em concentrações fisiológicas, os GC são capazes de alterar a resposta imunológica de um padrão de citocinas pró-inflamatórias para anti-inflamatórias, além de facilitar as respostas imunológicas humorais (Chrousos 1995, Besedovsky and del Rey 1996, Turnbull and Rivier 1999). Por outro lado, DHEA parece estimular as funções das células T auxiliares aumentando a capacidade e ativação destas células para produzir IL-2. Sendo assim, DHEA supostamente compensa os efeitos inibidores do GC na síntese de IL-2. Neste contexto, diversos trabalhos indicam que DHEA pode modificar a função de células imunológicas através da regulação da produção de citocinas tais como IL-2, IL-1, IL-6 e TNF (Boussiotis, Tsai et al. 2000, van Crevel, Karyadi et al. 2000). Ao mesmo tempo, DHEA parece exercer efeitos sinérgicos aos GC como anti-inflamatório (Dillon 2005, D'Attilio, Bozza et al. 2012). Este hormônio possui a capacidade de reduzir a ativação de leucócitos por meio da inibição de NF- κ B e ativação de receptores PPAR- α (Poynter and Daynes 1998). Além disso, é capaz de induzir a produção de IL-10 (Cheng and Tseng 2000), mediador essencial no controle das respostas exacerbadas como na DII.

A administração de DHEA também melhora as respostas imunes contra uma grande variedade de agentes patogênicos virais letais, infecções bacterianas e parasitárias, nas quais o efeito benéfico deste hormônio tem sido atribuído às suas propriedades imunomoduladoras (Bongiovanni, Mata-Espinosa et al. 2015, Gentilini, Velasquez et al. 2015). Por exemplo, a terapia com DHEA mostrou ser eficaz contra a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, promovendo aumento das

concentrações de NO, IL-12, IL-2 e IFN- γ (Santos, Toldo et al. 2008, Caetano, Santello et al. 2009, Zeckey, Hildebrand et al. 2010). Assim sendo, os efeitos potentes do DHEA têm sido demonstrados *in vitro* e *in vivo*. Sua administração melhorou as funções das células imunológicas durante a sepse experimental e após choque hemorrágico (Oberbeck, Nickel et al. 2002, Oberbeck, Deckert et al. 2007, Schmitz, Kobbe et al. 2010). No entanto, ainda não se sabe se o papel protetor de DHEA durante a inflamação sistêmica bacteriana é devido exclusivamente à sua atividade imunomoduladora ou se existem efeitos alternativos que explicariam o benefício clínico da administração de DHEA. Por outro lado, a administração subcutânea de DHEA levou à sobrevida aumentada dos animais com sepse e melhorou a função das células imunológicas (Schmitz, Kobbe et al. 2010). Zeckey e colaboradores (2010) demonstraram que a melhora da sepse após administração de DHEA estava relacionada com a presença de células NK e produção de IL-6 (Zeckey, Hildebrand et al. 2010).

Níveis baixos de DHEA no soro estão associados a doenças inflamatórias, incluindo lúpus, artrite reumatóide e DII. Embora não se saiba especificamente se os níveis de DHEA são reduzidos antes ou depois do início da doença autoimune, estas observações sugerem que este hormônio está envolvido em vias de regulação que auxiliam na homeostasia do sistema (Sawalha and Kovats 2008). Neste contexto, DHEA-S também vem ganhando interesse nos últimos anos devido a seus efeitos benéficos sobre doenças como lúpus e colite ulcerativa, assim como a obesidade, câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (Hanley and Arlt 2006). Em pacientes com lúpus eritematoso, o tratamento com DHEA (50-200 mg/dia) foi eficaz e induziu melhora dos sintomas da doença, além de redução modesta na excreção de proteína. Além disso, a necessidade de tratamento com corticosteróides foi diminuída e os efeitos colaterais do tratamento com DHEA foram supostamente leves (van Vollenhoven, Engleman et al. 1994, van Vollenhoven, Engleman et al. 1995, van Vollenhoven, Morabito et al. 1998, van Vollenhoven, Park et al. 1999, Chang, Lan et al. 2002, Petri, Mease et al. 2004). Ainda, a administração cutânea e oral de DHEA melhorou a dermatite atópica experimental, como visto pela redução da inflamação na pele (causada por infiltração de eosinófilos, mastócitos) e diminuição da produção de citocinas e quimiocinas associadas ao padrão de resposta Th2 (Chan, Liou et al. 2013).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da DII (Grisham 1994) em humanos (Vendemiale, Grattagliano et al. 1999). A administração de DHEA em ratos exerceu efeito antioxidante significativo na colite induzida por DSS, através da redução do dano oxidativo em proteínas e lipídios. Isto resultou em aumento na quantidade de muco do cólon e melhora da função hepática, indicando que DHEA pode ser útil na prevenção ou no tratamento da colite (Pelissier, Trap et al. 2004, Pelissier, Muller et al. 2006). Ainda, sabe-se que a concentração de DHEA-S está diminuída em pacientes com DII (de la Torre, Hedman et al. 1998, Straub, Vogl et al. 1998, Andus, Klebl et al. 2003) e DHEA-S inibe a produção de IL-6 por monócitos do sangue periférico em humanos (Straub, Vogl et al. 1998).

Andus e colaboradores (2003) desenvolveram um estudo pré-clínico em pacientes com doença de Crohn refratária ativa ou colite ulcerativa e mostraram que o tratamento com DHEA foi seguro e eficaz. Os pacientes apresentaram diminuição no Índice de Atividade da DC e no Índice de Atividade Clínica da UC. Seis pacientes com DC e seis pacientes com colite ulcerativa entraram em remissão. Porém, neste primeiro estudo utilizando DHEA para o tratamento de pacientes com DII não foi incluído um grupo placebo, tampouco foram realizados exames endoscópicos ou avaliação do sistema imunológico. Logo, o efeito exato de DHEA não pode ser determinado, especialmente sua participação na modulação da resposta imune associada à doença intestinal (Andus, Klebl et al. 2003).

Neste contexto e embora existam relatos importantes sobre a participação do DHEA na modulação da resposta imunológica, ainda não se sabe exatamente o papel deste hormônio na resposta inflamatória exacerbada da DII. Dessa forma, com o intuito de entender o papel de DHEA na inflamação intestinal, realizamos experimentos in vitro e in vivo para inicialmente avaliar se este hormônio poderia de fato exercer influência sobre a regulação do sistema imune após quebra da barreira intestinal.

2. *Justificativa*

A inflamação grave causada pela DII pode levar a danos prolongados e irreversíveis na função e estrutura gastrointestinal, além de desencadear o desenvolvimento de outras doenças como câncer cólon-retal. Respostas imunológicas inflamatórias podem ser moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) por meio de interações neuroimunoendócrinas e secreção de cortisol. Este hormônio, assim como dehidroepiandrosterona podem ser produzidos pelas glândulas adrenais, sob estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sintetizado pela hipófise. DHEA foi descrito como um importante modulador da resposta imunológica; porém os mecanismos precisos que podem relacionar as ações deste hormônio com a susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da DII ainda não são conhecidos. Sendo assim, este projeto visa entender o papel imunomodulador do DHEA na inflamação intestinal induzida experimentalmente e na etiologia das DII, com o intuito de proporcionar bases científicas para o desenvolvimento futuro de novas terapias para a colite ulcerativa e/ou doença de Crohn.

*****

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

Avaliar os efeitos do DHEA na modulação da resposta imune na inflamação intestinal induzida experimentalmente.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar o papel imunomodulador do DHEA *in vitro*.

3.2.2. Avaliar o papel do DHEA na DII experimental por meio de análise clínica e histopatológica do desenvolvimento da inflamação intestinal.

3.2.3. Estudar os efeitos de DHEA no acúmulo de células e infiltrado inflamatório na colite experimental.

3.2.4. Avaliar o papel do DHEA na modulação da resposta imunológica relacionada ao desenvolvimento da colite por meio da avaliação da produção de citocinas em animais com colite tratados ou não com DHEA, com ênfase nas subpopulações de células Th1, Th2, Tregs e Th17.

4. *Metodologia*

*****:

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, entre 6 e 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os camundongos foram transferidos e ambientados no biotério do *Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR)* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- FCFRP/USP, em microisoladores com água e ração esterilizados *ad libitum* durante todo o experimento. Foram utilizados 5 animais por grupo, assim divididos: grupo **Controle**, composto de camundongos saudáveis; grupo **DSS 3%**, composto de camundongos com inflamação intestinal induzida por único ciclo de exposição à água contendo DSS e que receberam ou não injeções subcutâneas do veículo do DHEA (propilenoglicol – PG) e grupo **DSS 3% + DHEA**, composto de camundongos com inflamação intestinal tratados com injeções subcutâneas de DHEA diluído em PG. Foram realizados estudos de dose-resposta para melhor definir a dose de DHEA a ser administrada nos camundongos, com base na literatura. Também foram utilizados camundongos transgênicos de *background* C57BL/6, fêmeas, com mesmo peso e idade descritos. Estes animais expressam proteína verde fluorescente (GFP - *green fluorescent protein*) sob controle do promotor FoxP3 (FoxP3-GFP⁺) e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (FMRP-USP). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo n. protocolo: 13.11362.539. (ANEXO-1).

4. 2. Avaliação do efeito imunomodulador de DHEA *in vitro*

Células totais obtidas do baço de camundongos naive, foram marcadas com 5µM de CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, EUA) para avaliação da proliferação celular durante tratamento *in vitro* com DHEA. As células foram tratadas com DHEA nas concentrações de 5µM, 50µM ou 100µM (Chan, Liou et al. 2013) e mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 5% de SBF inativado por calor (Gibco – Invitrogen, ONT, CA), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), 10 µM de HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO,

USA), 100 IU/mL de penicilina (Gibco – Invitrogen, ONT, CA) e 100 µg/mL de streptomycin (Gibco – Invitrogen, ONT, CA), por 72 horas a 37°C com 5% CO₂ em placa de cultura de 48 poços, na presença de concanavalina A (3µg/mL). Após esse período o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação das citocinas por ELISA e as células em proliferação foram levadas para leitura em citômetro de fluxo (FACSCanto™ II - BD Bioscience, San Diego, CA, EUA). As análises foram realizadas no software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.3. Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas IL-10 e IFN- γ foi realizada por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - sandwich*) nos sobrenadantes das culturas celular, conforme as recomendações do fabricante (OpTEIA, BD Pharmingen™, San Diego, CA, EUA). No ELISA foram utilizadas placas com 96 poços, onde 50µL da amostra foram incubados com os anticorpos de captura e de detecção. As reações foram reveladas pela adição de TMB e interrompidas pela adição de H₂SO₄ 2N, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

4.4. Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade de linfócitos após tratamento com DHEA, leucócitos do baço de camundongos naíves foram assepticamente isolados e mantidos em RPMI contendo 5% de SFB. As células foram contadas em câmara de Neubauer. Depois de 2 lavagens em meio RPMI contendo 5% de SFB, 1x10⁶ células/poço foram distribuídas em triplicata em placas de cultura de 48 poços e estimuladas com concanavalina A (ConA - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA) 3µg/mL. As células foram tratadas com DHEA nas concentrações de 5µM, 50µM ou 100µM e mantidas em cultura com meio RPMI completo, por 72 horas a 37°C com 5% CO₂. As células foram coletadas dos poços, marcadas com Anexina-V e iodeto de propídio (*Annexin-V-FLUOS Staining kit* - Roche, Mannheim, Alemanha) para a verificação de morte celular por apoptose e/ou necrose, seguindo as instruções do fabricante. Saponina 0,01% foi utilizada como controle positivo para morte celular por necrose, que foi caracterizada pela dupla marcação de anexina e IP (Anexina⁺IP⁺). Já apoptose foi detectada pela simples marcação de anexina (Anexina⁺IP⁻). As células foram

levadas para leitura em citômetro de fluxo e as análises foram realizadas no software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.5. Avaliação da viabilidade de macrófagos

A viabilidade celular foi testada em células da linhagem de macrófagos RAW 264-7 pelo ensaio de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). As células foram contadas em câmara de Neubauer e cultivadas a 1×10^5 células por poço (em placa de 48 poços), frente ao tratamento com DHEA nas concentrações de 5 μ M, 50 μ M ou 100 μ M e estímulo com LPS (1 μ g/mL) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). As células foram mantidas em cultura com meio DMEM (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% SFB, 44mM de bicarbonato de sódio, 2mM L-glutamina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), 10mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 IU/ml penicillina (Gibco - Invitrogen, ONT, CA) e 100 ug/ml streptomycina (Gibco - Invitrogen, ONT, CA) por 48 horas à 37°C com 5% CO₂. Dexametasona (DEXA) 5 μ M (Decadron®, Ache, SP, Brazil) foi usada como fármaco controle. Após 48 horas, 20 μ L de MTT (2,5mg/mL) foram adicionados à cultura para formação de cristais de formazan. Decorridos 4 horas de incubação, 100 μ L da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS - 20% em água destilada) foram adicionados à cultura, seguindo-se por incubação *overnight* para dissolver o produto de formazan em uma solução de cor púrpura. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro à 540 nm.

4.6. Colite induzida por DSS

A inflamação intestinal foi induzida com um único ciclo de administração exclusiva de água contendo 3% de dextran sulfato de sódio (DSS 3% - MP Biomedicals, Illkirch, France), que foi disponibilizada aos camundongos durante 6 ou 9 dias consecutivos, para os experimentos de indução de inflamação intestinal ou avaliação de reparo tecidual, respectivamente (Fig.1A e 1B). Os camundongos destinados à avaliação do reparo tecidual tiveram o DSS suspenso no nono dia e foram mantidos com água natural por mais 6 dias para avaliar a recuperação dos animais após o tratamento com DHEA. Os camundongos foram eutanasiados com 6

e 15 dias para coleta de amostras. Para o experimento de mortalidade, a inflamação intestinal foi induzida com um único ciclo de água contendo DSS 3% durante 20 dias consecutivos (Fig. 1C). Os animais foram pesados diariamente para acompanhamento da perda de peso, além da observação de sinais clínicos (Tabela-1). Também foram acompanhados o consumo de ração e água durante todo o período experimental.

Figura 1: Protocolos de indução de colite, tratamento com DHEA, avaliação clínica e coleta das amostras. Os camundongos foram submetidos à ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) a 3% e tratados com DHEA (40mg/kg). Em (A) protocolo para avaliação e coleta de 6 dias. Em (B) protocolo para avaliação do reparo tecidual e coleta em 15 dias. (C), avaliação da sobrevivência.

4.7. Preparo e administração de DHEA

A administração do hormônio DHEA (Trans-Dehydroandrosterone, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizada por meio de injeções subcutâneas na dose de 40mg/kg (em volume final de 100 µL), por camundongo, diariamente, por 6 dias. No experimento de reparo tecidual o tratamento com DHEA foi durante 9 dias consecutivos, simultaneamente à exposição ao DSS.

Primeiramente, o DHEA foi preparado em uma solução estoque na concentração de 0,08 mg/µL em 100% de propilenoglicol (PG - 1,2-Propanediol, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foi agitada em vórtex por 24 horas. Em seguida, foram retirados 10 µL da solução estoque, ou seja, 0,8 mg/camundongo/dia, que equivale à dose de 40mg/kg (Santos, Toldo et al. 2008, Caetano, Santello et al. 2009). Nesses 10 µL da solução estoque foram adicionados 40 µL de PG e mais 50 µL de solução fisiológica 0,9% (50%), totalizando 100 µL de uma injeção do DHEA, para um camundongo e em um dia.

Os grupos de animais com inflamação intestinal (DSS 3% + PG) receberam injeções subcutâneas do veículo do DHEA, que correspondeu a 50% de PG e 50% de solução fisiológica 0,9%. (Fig. 1)

4.8. Escore clínico diário

Os animais com inflamação intestinal que receberam ou não tratamento com DHEA e DSS foram avaliados quanto à presença de sinais clínicos da doença como diarreia, ânus molhado, piloereção, hipoatividade e sangramento retal, durante o período de indução da doença (6 dias) e na fase de reparo tecidual (15 dias) (Yan, Kolachala et al. 2009, Plesko, Banic et al. 2010, Sales-Campos, de Souza et al. 2015). Para esta avaliação, foi utilizado um critério de pontuação, no qual cada sinal apresentado pelo animal correspondeu a 1 ponto. A perda de peso grave (> 5% e <10%) em relação ao dia anterior recebeu 1 ponto e quando >10%, 2 pontos (Tabela 1). Por fim, foi realizada a soma de todos os valores do escore para cada dia/animal individualmente e estes dados foram apresentados graficamente.

Tabela 1- Escore clínico para avaliação da inflamação intestinal induzida por DSS

Parâmetros observados	Pontuação
Normal	0
Ânus molhado	1
Diarreia	1
Sangramento	1
Hipoatividade	1
Piloereção	1
Perda de peso ($\geq 5\%$ e $< 10\%$)*	1
Perda de peso ($\geq 10\%$)*	2

* Perda de peso em relação ao dia anterior

4.9. Escore pós-morte

Foi realizada a quantificação do escore pós-morte no intestino grosso coletado com 6 e 15 dias. Este órgão foi avaliado macroscopicamente quanto à presença de diarreia local ou difusa, sangramento local ou difuso. Quando o sinal apresentado foi local, somou-se 1 ponto, quando difuso 2 pontos (Tabela 2). Os valores foram somados individualmente e apresentados graficamente.

Tabela 2- Escore pós-morte para avaliação da inflamação intestinal induzida por DSS

Parâmetros observados		Pontuação
Normal		0
Diarreia	Local	1
	Difusa	2
Sangue	Local	1
	Difuso	2

4.10. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Os camundongos foram eutanasiados no 6º e 15º dia após a exposição ao DSS e tratamento com o DHEA. Também foram eutanasiados animais apenas expostos ao DSS que receberam injeções subcutâneas de PG e aqueles que receberam água natural. Após análise macroscópica e do comprimento, as amostras de intestino grosso obtidas foram lavadas com PBS para remoção das fezes. As amostras destinadas à histologia foram abertas longitudinalmente e enroladas em formato “rolo suíço” separadamente para cada animal. Em seguida, os tecidos foram imersos em PBS/formaldeído 10% para inclusão em parafina (Fig. 2B). Outras amostras de cólon foram fragmentadas e direcionadas para diferentes análises, obedecendo rigorosamente a mesma sequência para cada amostra coletada (Fig. 2A). Essas amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para trituração e dosagem de enzimas nos homogeneizados de tecidos. Os fragmentos de tecidos também foram pesados para posterior correção dos cálculos e os resultados dos ensaios enzimáticos foram expressos em densidade óptica por gramas (g) de tecido.

Figura 2: Fotos do cólon de camundongos C57BL/6 demonstrando a sequência de fragmentos coletados destinados às diferentes análises. Em (A), fragmentos dispostos para MPO: mieloperoxidase; NAG: N-acetilglicosaminidase; EPO: eosinófilo-peroxidase; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; ELISA: imunoenensaio enzimático. Em (B) fragmento para realização das histologias. Fotos tiradas e adaptadas por Alves.V.B.F.

Com o sangue coletado foi realizada a contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer e depois esfregaço sanguíneo corado com Panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), para contagem diferencial de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O número relativo de leucócitos foi calculado conforme a frequência (%) dos tipos celulares encontrados. Já a quantidade absoluta foi calculada multiplicando-se a frequência dos tipos celulares pelo número total de células obtido na contagem da câmara de Neubauer. O resultado foi dividido

por 100 (a quantidade total de células contadas = 100%) e expresso como número de células por mL de sangue. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue total a 2000xg, por 10 minutos e cuidadosamente coletado e armazenado a -70°C para as análises posteriores.

4.11. Análise histológica

A avaliação histológica do cólon foi realizada por meio da coloração com hematoxilina e eosina (H&E) das amostras de cólon fixadas em formaldeído 10% em PBS. As amostras de intestino grosso obtidas foram lavadas com PBS para remoção das fezes e foram abertas longitudinalmente, enroladas em formato “rolo suíço” separadamente para cada animal. Em seguida, os tecidos foram imersos em PBS/formaldeído 10% por 24h e depois passados para etanol 70%. As amostras foram desidratadas através de sucessivas incubações com álcoois etílicos de concentrações crescentes (70% a absoluto), terminando com incubação em uma mistura contendo álcool etílico absoluto e xilol em proporção 1:1. Após, os tecidos foram submetidos a 3 incubações sucessivas em xilol e colocados em 2 banhos sucessivos de parafina líquida. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em parafina e foram realizados cortes de 5µm de espessura no micrótomo (RM2125 RTS - Leica, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram posicionados em lâminas de microscopia, as quais foram colocados em estufa a 60°C para fixação. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 2 banhos sucessivos de xilol para retirar o excesso de parafina e reidratadas com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 70%). Os cortes foram então corados com H&E, novamente desidratados com concentrações crescentes de álcool (de 70% ao absoluto) e diafanizados com xilol. Finalmente, lamínulas foram adicionadas às lâminas com auxílio de Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). As imagens dos cortes histológicos foram capturadas e analisadas por um sistema de análise de imagens, utilizando uma câmera acoplada ao microscópio e computador. Para realizar a quantificação da extensão (perímetro) dos intestinos, os tecidos dispostos nas lâminas foram fotografados com câmera (Evolution MP 5.0 – color – Media Cibernetic) acoplada a um microscópio de luz (Nikon – Eclipse 50i) utilizando objetiva de 4X. Com o programa Image-Pro Insight (Media Cibernetic) foram realizadas a calibração da imagem e a medida do perímetro de cada corte histológico (Fig. 3), sendo que cada

foto do intestino teve seu respectivo resultado. Para a determinação da celularidade da lâmina própria (LP), os tecidos dispostos nas lâminas foram fotografados com câmera acoplada ao microscópio de luz, utilizando objetiva de 40X. Cinco áreas diferentes de cada corte histológico foram fotografadas. Utilizando o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA), foram desenhados quadrados com área total de $939,58 \mu\text{m}^2$ em toda a extensão da foto e as células presentes na LP de 10 quadrados diferentes foram contadas (Fig. 4). Por fim, foi somado o valor de células encontradas na LP e dividido por $0,0093958\text{mm}^2$ (este valor corresponde à área total dos quadrados contados, transformada em mm^2). Os resultados foram então expressos no gráfico em número de células por mm^2 .

Figura 3: Esquema de captura de imagem das lâminas histológicas. O esquema mostra como cada imagem foi analisada no programa (Image-Pro Insight - Media Cibernetic). Após adicionar a foto do tecido histológico no programa, foi realizada a calibração automática da imagem e a mucosa foi contornada para quantificação da extensão (perímetro) do intestino. Na parte inferior da tela do programa, o resultado do perímetro é mostrado.

Figura 4: Esquema para análise quantitativa da celularidade dos tecidos histológicos. Após adicionar a foto do tecido histológico no programa Image J, foi realizada a calibração automática da imagem e foram desenhados quadrados com área total de $939,58 \mu\text{m}^2$ (quadrados em vermelho) em toda a extensão da foto. As células presentes na LP de 10 quadrados diferentes foram contadas.

4.12. Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

Para quantificação de neutrófilos, foi avaliada a atividade da enzima MPO nos tecidos inflamados e controles (Krawisz, Sharon et al. 1984). Segmentos de intestino foram cortados em pequenos pedaços, pesados e imersos em solução tampão contendo fosfato de sódio (0,02M) e EDTA (5,58g/L) para homogeneização. Em seguida, o tecido foi centrifugado a 600xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensão por agitação em vórtex em solução tampão contendo fosfato de sódio e EDTA, e foi adicionada solução de NaCl 0,2% gelada para lisar as hemácias. O *pellet* obtido após centrifugação foi ressuspensão em solução tampão contendo fosfato de sódio e o detergente H-TAB 0,5% (Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio, Sigma-Aldrich, EUA). Para finalizar a extração das

enzimas, a amostra foi congelada e descongelada 3 vezes e centrifugada a 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático realizado em placas de 96 poços contendo 50µL da amostra, que foi revelado pela adição de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, BD Pharmingen™, São Diego, USA) e incubado à 37°C por 15 minutos no escuro. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450nm.

4.13. Ensaio de N-acetilglicosaminidase (NAG)

Para quantificação dos macrófagos, foi avaliada a atividade da enzima NAG nos tecidos inflamados e controles no mesmo sobrenadante utilizado para a quantificação da MPO. Para isto, foram utilizados 25µL dos sobrenadantes colocados em placas de 96 poços, foram adicionados 25µL de solução 2,24mM de NAG (p-nitrophenyl-2-acetamide-β-D-glucopiranoside) e 100µL de tampão citrato (50 mM, pH 4,5). A seguir, a placa foi incubada a 37°C durante 60 minutos. Por último, a reação foi interrompida pela adição de 100µL de tampão glicina (200 mM, pH 10.4), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 405nm.

4.14. Ensaio de Eosinófilo-peroxidase (EPO)

Para quantificação de eosinófilos, foi avaliada a atividade da enzima EPO nos tecidos inflamados e controles (Strath, Warren et al. 1985). Para tal, os tecidos foram removidos, pesados e ressuspensos em tampão Hanks sem vermelho de fenol, contendo 10mM de Hepes (Sigma-Aldrich, EUA) e então homogeneizados. O homogenato foi centrifugado a 1950xg por 10 minutos e o *pellet* lisado por meio de choque hipotônico. Esta suspensão resultante foi novamente centrifugada a 1950xg por 10 minutos e o *pellet* ressuspenso em tampão Hanks contendo 0,5% de HTAB. Foi realizado choque térmico das amostras seguido por centrifugação, sendo o sobrenadante utilizado para as reações. As amostras foram incubadas em placas de 96 poços com OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão Tris/HCl 0,05 mM e H₂O₂ e incubadas a 37°C por 30 minutos no escuro. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4M e a absorbância determinada a 492nm.

4.15. Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR

O RNA foi extraído a partir do fragmento do cólon de animais controles, animais que foram expostos ao DSS, tratados ou não com DHEA, para determinar a transcrição de genes por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O RNA total foi extraído por método orgânico utilizando-se TRIzol® (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguido por etapas de purificação com uso do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções dos fabricantes. Após, a quantidade, pureza e qualidade do RNA obtido foram determinadas com o uso de um espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O RNA purificado foi utilizado para a confecção do DNA complementar (cDNA - *complementary DNA*) com o sistema de transcrição reversa *High-Capacity* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 1µg de RNA total foi incubado com 0,5µg de oligo(dT)₁₂ e água livre de nuclease em quantidade suficiente para 5µL de volume final de reação. Deixou-se reagir por 5 minutos a 70°C. Posteriormente, as amostras foram arrefecidas a 4°C por 5 minutos e 15µL de uma solução contendo MgCl₂ 3mM, dNTP Mix 0,5mM, 1µL da transcriptase reversa ImProm-II™, tampão de reação ImProm-II™ 1x e água livre de nuclease em quantidade suficiente para 15µL de volume final. Em seguida, foram adicionados aos tubos contendo RNA (20µL de volume final de reação) e incubados a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos em termociclador (Mastercycler pro®, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Posteriormente, as amostras contendo cDNAs foram diluídas 10x em água livre de nuclease e estocadas a -20°C até a análise.

A expressão quantitativa dos genes das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-13, IL-10, IL-22, TGF-β, IFN-γ) e dos receptores PPAR-α e PPAR-γ foram analisadas por meio da reação de qPCR com o sistema de detecção *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Madison, WI, EUA). Cinco microlitros das amostras contendo cDNA foram colocados para reagir em placas apropriadas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate* - Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) com uma solução contendo *GoTaq®*, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso (300nM cada) e água livre de nuclease em quantidade suficiente para 10µL de solução (15µL de volume final de reação). Em seguida, as placas foram

cuidadosamente seladas (*MicroAmp optical adhesive film* - Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), rapidamente centrifugadas e a reação realizada em aparelho *StepOnePlus™* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), que compreendeu 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, além de um ciclo final com temperatura crescente de 60 a 95°C para a obtenção da curva de dissociação. Os oligonucleotídeos utilizados na reação estão na Tabela 3.

Tabela 3- Primer usados para avaliação da expressão quantitativa dos genes no intestino grosso dos animais com inflamação intestinal experimental, tratados ou não com DHEA.

Gene	Concentração	Primer	
		Senso	Anti-senso
β-actina	2,5 µM	5'-AACGAGCGGTTCCGATG-3'	5'-GGATTCCATACCCAAGAAGGA-3'
IL-6	1 µM	5'-CCCAATTTCCAATGCTCTCC-3'	5'-TGAATTGGATGGTCTTGGTCC-3'
IL-1β	15 µM	5'-TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC-3'	5'-TTGGAAGCAGCCCTTCATCT-3'
IFN-γ	30 µM	5'-CACACCTGATTACTACCTTC-3'	5'-GGGTTGTTGACCTCAAAC-3'
IL-13	5 µM	5'- CCACTACGGTCTCTCCAG -3'	5'- GGCGAAACAGTTGCTT -3'
TGF-β	5 µM	5'-TGAACCAAGGAGACGGAATACA-3'	5'-GGAGTTTGTATCTTTGCTGTCACA-3'
IL-22	5 µM	5'-GGCTGAAGGAGACAGTGAAAA-3'	5'-CCCAATCGCCTTGATCTCT-3'
IL-10	2,5 µM	5'- CAATAACTGCACCCACTCCC-3'	5'- GAGAAATCGATGACAGCGCCT-3'
PPAR-α	2,5 µM	5'-TCAATGCCTTAGAACTGGATGA-3'	5'-CCGATCTCCACAGCAAATTATA-3'
PPAR-γ	1,5 µM	5'-TGAGATCATCTACACGATGCTG-3'	5'-AGGAACTCCCTGGTCATGAA-3'

Todos os *primers* foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, EUA). Os resultados foram corrigidos pela β-actina, para normalizar os níveis de expressão dos genes alvos, que foram analisados com base no valor de Ct (ciclo limiar - *cycle threshold*). O resultado foi calculado pela fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra controle}$ (grupo Controle - animais sem indução de DII), onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene estudado} - Ct \beta\text{-actina}$. O número de vezes de expressão diferencial do RNA mensageiro (RNAm) comparado com o controle foi definido pela fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como já bem estabelecido pela Applied Biosystems® (*Applied Bulletin* - P/N 4303859).

4.16. Extração das células para Citometria de Fluxo

Para a quantificação e fenotipagem das células do infiltrado inflamatório de camundongos controles, DSS 3% tratados ou não com DHEA, foram coletados baço, linfonodos mesentéricos (LNM) e colón (Cardoso, Teixeira et al. 2008). Após maceração do baço com pinças e maceração dos linfonodos mesentéricos em peneiras estéreis, as células foram coletadas cuidadosamente, lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Este meio RPMI 1640 foi suplementado também com 0,1mM de aminoácidos não essenciais (*MEM non-essential amino acid solution* - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA), 23,8mM de NaHCO_3 , 10,9mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 500 μM de β -mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomicina (fornecidos por Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), pH 7,2-7,4 (chamado de RPMI completo). As células extraídas do baço foram tratadas por 4 minutos com tampão de lise (NH_4Cl 155mM, KHCO_3 10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,2) e em seguida, tanto as células do baço e LNM foram ressuspensas em 2mL de meio RPMI completo.

O colón removido foi destinado à avaliação da lâmina própria (LP) e dos linfócitos intraepiteliais (IEL). Este cólon foi então lavado com tampão HBSS (*Hanks balanced salt solution without $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$*) gelado para remoção das fezes do lúmen intestinal, aberto longitudinalmente e fragmentado em pedaços de aproximadamente 1cm. Os fragmentos foram adicionados em meio IEL (RPMI sem a suplementação descrita anteriormente, com adição apenas de tampão HEPES 20mM, 100U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomicina e 20% de SFB) e incubados a 37°C por 30 minutos sob agitação vigorosa. Após o período de incubação, os tubos contendo os tecidos foram novamente agitados de forma vigorosa para liberação dos IEL para o meio e, posteriormente, foram acondicionados por 5 minutos em gelo para reduzir a espuma formada. Depois, a solução foi filtrada em peneira de 70 μm , sendo que o filtrado resultante continha os IEL e os fragmentos retidos pela peneira continham a LP. Para extrair as células da LP, os fragmentos retidos foram incubados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de liberase TL (Roche, Mannheim, Alemanha) em meio RPMI (suplementado apenas com 23,8mM de NaHCO_3 e 10,9mM de HEPES; livre de SFB) a 37°C, por 60 minutos e sob agitação. Após o período de incubação, o tecido

digerido foi macerado e filtrado em peneira de 70µm para a obtenção das células. Os tubos contendo os IEL ou as células da LP foram então centrifugados a 300xg por 20 minutos e 4°C e, posteriormente, as células mononucleares foram obtidas por separação por gradiente em Ficoll-Paque^{TM} PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). No final do processo todas as amostras (baço, LNM, LP e IEL) foram contadas na câmara de Neubauer em azul de tripan 0,4% e as células foram utilizadas nos experimentos de cultura ou imunofenotipagem.

4.17. Citometria de Fluxo

Com a técnica de citometria de fluxo avaliamos a frequência das células CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, natural killer (NK), NKT e linfócitos Tγδ nos diferentes tecidos extraídos. Também realizamos a caracterização fenotípica das células T reguladoras (Tregs) que foram avaliadas pela expressão dos marcadores CD4, CD25, GITR e PD-1. Os anticorpos usados eram conjugados aos fluorocromos FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), Alexa Fluor 488, PE (*Phycoerythrin*), PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) ou PE-Cy7 (*Phycoerythrin- Cyanin 7*) (BD Pharmingen^{TM}, San Diego, USA) conforme Tabela 4.

As células extraídas do baço, LNM, LP e IEL, na concentração de 1x10⁷/mL, foram ressuspensas em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado e incubadas por 30 minutos a 4°C para bloqueio de ligações inespecíficas. Após este período, foram adicionados os anticorpos específicos para as moléculas de superfície das células (Tabela 4). Posteriormente, as células foram lavadas com 500µL de PBS e centrifugadas por 5 minutos a 400xg. As células marcadas apenas com anticorpos para moléculas de superfície foram fixadas em PBS contendo formol 1% e levadas para leitura em citômetro de fluxo (FACSCanto^{TM} II - BD Bioscience, San Diego, CA, EUA).

Também foram realizadas culturas das células do baço e LNM (*ex vivo*) em meio RPMI completo. Essas culturas foram realizadas na presença de brefeldina (*Golgi stop*, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas com PBS, bloqueadas e marcadas para moléculas de superfície (CD4), como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram lavadas, permeabilizadas com tampão de permeabilização (PBS contendo SFB 1% e saponina 1%) e incubadas com anticorpos específicos

para citocinas acoplados a fluorocromos (IFN- γ , IL-17, IL-10 e IL-4) (Tabela 5) por 30 minutos a 4°C. Após, as células foram lavadas, fixadas com formol 1% em PBS e levadas para leitura em citômetro de fluxo.

Tabela 4 - Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço, linfonodos mesentéricos e intestino.

Tubos	Fluorocromos			
	PercP	PE-Cy7	PE	FITC/Alexa Flúor 488
Isotipo Controle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Linfócitos T, NK e NKT	CD4	CD8	CD3	CD49b
Monócitos e células dendríticas	-	-	CD11b	CD11c
Linfócitos $\gamma\delta$	-	-	CD3	$\gamma\delta$
Linfócitos T reguladores	CD4	CD25	PD-1	GITR

Tabela 5- Anticorpos usados para caracterização fenotípica dos leucócitos de baço e linfonodos mesentéricos de células cultivadas *ex vivo*.

Células cultivadas			
Tubos	Fluorocromos		
	PercP	PeCy 7	PE
Isotipo controle	IgG1	IgG1	IgG1
Linfócitos Th1	CD4	-	IFN- γ
Linfócitos Th2	CD4	IL-4	
Linfócitos Th17	CD4	-	IL-17
Linfócitos T CD4 produtores de IL-10	CD4	-	IL-10

4.18. Análise da Citometria de Fluxo

Para obtenção dos percentuais das populações marcadas analisou-se em gráficos de pontos (Dot-plot) as propriedades de tamanho e granulosidade (*FSC* e *SSC*) das células, delineando-se *gates* em regiões específicas de linfócitos ou monócitos, das quais foram extraídos os dados de fluorescência. Os resultados foram obtidos subtraindo-se o valor encontrado para as células marcadas com anticorpos do valor encontrado para as células marcadas com os respectivos isotipos controles. Os fluorocromos utilizados para cada anticorpo encontram-se nas Tabelas 4 e 5. Para quantificação das subpopulações de linfócitos T realizou-se

também uma primeira análise nos parâmetros SSC x FSC, seguida por um *dot plot* para população correspondente às células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Para verificação das populações de NK e NKT, as análises foram feitas nos parâmetros SSC x FSC, seguida por dot plots para CD49b⁺CD3⁺ ou CD49b⁺CD3⁻. Já para as populações de monócitos e células dendríticas, analisamos nos parâmetros SSC x FSC marcando-se *gates* na região específica para os monócitos, seguida por dot plots para CD11b⁺CD11c⁺, CD11b⁻CD11c⁺ e CD11b⁺CD11c⁻. Na identificação de linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺, as análises foram feitas nos parâmetros SSC x CD3⁺, marcando a região correspondente aos linfócitos e fazendo um histograma para $\gamma\delta$ ⁺. Para obtenção dos percentuais das células Tregs a primeira *gate* foi delineada inicialmente na região de linfócitos em FSC x SSC, seguida por *gate* nas regiões duplamente positivas para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25. Em seguida, foram obtidos histogramas para marcações de GITR e PD-1. O mesmo foi realizado para as populações CD4⁺CD25⁻. Para obtenção dos percentuais de células CD4⁺ produtoras das citocinas analisadas, foi realizado o delineamento dos linfócitos nos gráficos de SSC x FSC seguido de dot plot e *gate* na região duplo positiva para CD4⁺ e para a citocina analisada. Todas as análises foram realizadas no software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.19. Ensaio de co-cultivo de leucócitos com células T reguladoras

Para avaliar a responsividade das células dos camundongos tratados com DHEA, frente a sinais reguladores, leucócitos foram co-cultivados na presença de células reguladoras (CD4⁺FoxP3⁺). O baço e linfonodos (exceto os linfonodos mesentéricos) de camundongos GFP-Foxp3 foram coletados para obtenção das células T reguladoras (GFP-FoxP3⁺ CD4⁺). As células extraídas foram lavadas, separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque e centrifugadas por 30 minutos 900xg a 25°C. Em seguida, foram usados 10 μ L de anticorpos anti-CD4 PerCyP (phycoerythrin-CyP) (BD Pharmingen^{TM}, San Diego, USA) para marcar a suspensão de células (2×10^7 células/mL) em volume final de 10 mL. Posteriormente, a suspensão de células marcadas foi levada ao citômetro (FACSÁria^{TM} III, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) para o "sorting" e separação das células T CD4 Foxp3⁺.

Considerando as células T respondedoras, camundongos controles, DSS 3% tratados ou não com DHEA foram acompanhados por 6 dias. Transcorrido esse período, o baço foi coletado para extração das células, que foram lavadas duas vezes e contadas em câmara de Neubauer. As células T reguladoras (GFP-FoxP3⁺ CD4⁺) e as células respondedoras (reguladoras : respondedoras) foram cultivadas na proporção de 1:5 (1×10^4 Tregs: 5×10^4 efetoras/células por poço) ou 1:10 (1×10^4 Tregs: 1×10^5 efetoras/células por poço) em meio RPMI 10% SFB por 72 horas a 37°C com 5% CO₂ em placa de 96 poços na presença de concanavalina A (3µg/mL).

Para determinar a proliferação celular *ex vivo*, foi utilizada a técnica de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU). O Brdu é um nucleosídeo sintético análogo à timidina que é incorporado às fitas novas de DNA sintetizado das células em processo de proliferação, substituindo a timidina. Assim, o aumento da incorporação de BrdU indica aumento da síntese de DNA e maior atividade proliferativa das células (Roche, South San Francisco, USA). Nas últimas 15 horas de cultura, foi adicionado 10µM de BrdU. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos e retirado o sobrenadante dos poços, cuidadosamente. As células foram então fixadas na superfície da placa após secagem em estufa à 60°C por 2 horas. Em seguida, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com 75mU de anticorpo anti-BrdU acoplado à enzima peroxidase diluído em 200µL de PBS com 1% BSA. Os poços foram novamente lavados com PBS, incubados por 30 minutos com TMB (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) e a reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 1M. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 450 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO). Também foi avaliada a proliferação celular na fase de reparo tecidual (15 dias) das células extraídas dos LNM dos animais tratados ou não com DHEA.

4.20. Testes bioquímicos

Para avaliar se o tratamento com DHEA foi seguro e não causava toxicidade *in vivo*, foram dosados no soro dos animais os testes bioquímicos de AST (Aspartato Aminotransferase) e ALT (Alanina Aminotransferase) seguindo as instruções do fabricante (ambos fabricados pela ®Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

Para avaliar se o tratamento com DHEA poderia causar alterações no perfil lipídico, foram realizados os testes para triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL) no soro dos animais, conforme recomendações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil)

4.21. Análise estatística

Os resultados encontrados foram tabulados no programa Graphpad Prism 5.0, o qual foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Quando a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea foram utilizados testes paramétricos t não pareados ou ANOVA – *One way* seguido de comparação múltipla de Tukey. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana foram utilizados os testes Mann Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn, para 3 ou mais grupos. Para as análises de sobrevida foi utilizado o teste de LogRank e Gehan-Breslow-Wilcoxon. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%).

*****5. Resultados

5.1. Efeito imunomodulador do DHEA na proliferação celular *in vitro*

Considerando-se os estudos anteriores sobre os efeitos do DHEA na modulação das respostas imunológicas durante condições inflamatórias, nós primeiramente buscamos averiguar os efeitos diretos deste hormônio sobre a proliferação de leucócitos extraídos do baço de camundongos *naïves*. Os esplenócitos extraídos foram marcados com CFSE e estimulados com ConA para avaliação da proliferação celular frente a tratamento *in vitro* com DHEA, nas concentrações de 5 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Os resultados mostraram diminuição da proliferação de linfócitos quando tratados com DHEA de forma dose dependente (Fig. 5A e 5B) ao longo de todos os picos de divisão celular analisada (M2-M5, a Fig. 5E).

Além disso, houve uma redução acentuada nos níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura destas células tratadas, especialmente com a dose mais elevada de DHEA (Fig. 5D). Curiosamente, a IL-10 foi mantida nas concentrações de 5 μ M e 50 μ M de DHEA, com total redução nos poços em que as células foram expostas à dose de 100 μ M do hormônio (Fig. 5C). Logo, estes resultados indicaram que este hormônio pode de fato exercer papel relevante na modulação da proliferação de linfócitos e na síntese de citocinas.

Figura 5: Efeito imunomodulador de dehidroepiandrosterona (DHEA) *in vitro*. Leucócitos foram isolados do baço de camundongos saudáveis, marcados com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE), estimulados com concanavalina A (ConA) e cultivados na presença de DHEA nas concentrações de 5 μ M, 50 μ M ou 100 μ M por 72 horas. **(A)** Dot plots e histogramas representativos da proliferação dos leucócitos, avaliada por citometria de fluxo, pelo método de CFSE. **(B)** média da porcentagem de proliferação; **(C)** quantificação das citocinas IL-10 e **(D)** IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de células e **(E)** média da porcentagem dos diferentes picos de proliferação. * $p < 0,05$. Estes resultados representam 3 experimentos independentes.

5.2. Toxicidade do DHEA em células mielóides e linfóides

Em seguida, buscamos avaliar se os efeitos de DHEA *in vitro* poderiam estar relacionados à morte dos leucócitos, ao invés da modulação imunológica após tratamento com DHEA.

No ensaio de MTT, observamos que o hormônio não foi tóxico para a linhagem celular de macrófagos RAW 264-7, independentemente da dose utilizada para o tratamento das células (5 μ M, 50 μ M ou 100 μ M), ou do estado de ativação dos macrófagos (estimulados ou não com LPS, Fig. 6A). No entanto, houve elevada frequência de células duplamente marcadas para anexina e iodeto de propídio quando os esplenócitos foram incubados com as doses mais elevadas (50 μ M ou 100 μ M de DHEA), indicando morte celular por necrose (Fig.6B). Em conjunto, estes resultados sugeriram que o tratamento com DHEA não foi tóxico para as células mielóides. No entanto, alguns dos efeitos observados inicialmente na modulação de citocinas e proliferação podem ser devido à morte de leucócitos (linfócitos), especialmente quando as células foram expostas a concentrações muito elevadas do hormônio.

Figura 6: Efeito de DHEA na sobrevida celular e toxicidade. Em (A), avaliação da viabilidade de macrófagos (RAW 264-7) por MTT, estimulados ou não com LPS (1 µg/mL) e tratamento com DHEA nas concentrações de 5µM, 50µM e 100µM. Dexametasona (DEXA) 5 µM foi utilizada como controle positivo. Em (B), os leucócitos foram isolados a partir dos baços de camundongos saudáveis, estimulados com ConA e cultivados na presença de diferentes concentrações de DHEA (5µM, 50µM ou 100µM) durante 72 horas. Após, as células foram marcadas com anexina (FITC) e iodeto de propídio (PI) e levadas para o citômetro de fluxo para leitura. No gráfico, frequência de células anexina⁺IP⁺ (necrose), anexina⁺IP⁻ (apoptose), anexina⁻IP⁺ (sem função fisiológica) e anexina⁻IP⁻ (células vivas). A saponina foi utilizada como controle positivo. Estes resultados representam dois experimentos independentes.

5.3. Determinação da dose ideal de DHEA para estudos *in vivo* e avaliação dos parâmetros clínicos da inflamação intestinal

Considerando-se os resultados dos efeitos do DHEA *in vitro*, buscamos avaliar seu potencial efeito terapêutico na inflamação intestinal experimental *in vivo*. Sendo assim, camundongos C57BL/6 foram expostos ao DSS e tratados com DHEA nas diferentes concentrações de 10, 20 e 40mg/kg/dia por via subcutânea (Santos, Toldo et al. 2008, Caetano, Santello et al. 2009), durante 6 dias consecutivos. A via subcutânea foi escolhida com base em artigos anteriores usando este hormônio como modulador da resposta imune (Santos, Toldo et al. 2008, Caetano, Santello et al. 2009, Rearte, Maglioco et al. 2013).

Os resultados mostraram que os camundongos tratados com DHEA apresentaram diminuição dos parâmetros clínicos da doença, especialmente no sexto dia de tratamento e quando receberam a dose de 40mg/kg/dia (Fig. 7A, 7B). Ao avaliarmos o peso dos animais, verificamos que ambos os grupos que receberam apenas DSS 3% e o grupo DSS 3% + PG apresentaram perda acentuada no sexto

dia, especialmente quando comparado ao grupo tratado com DHEA 40mg/kg/dia (Fig. 7B), corroborando os dados de redução do escore clínico da doença. Com isso, nossos resultados sugeriram que a melhor dose para o tratamento com DHEA foi 40mg/kg/dia. Ainda, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo exposto apenas ao DSS 3% e o grupo DSS 3% que recebeu injeções subcutâneas do veículo do DHEA, PG (DSS 3% + PG). Com isso, apenas o grupo DSS 3% + PG foi utilizado como controle positivo da doença, nos ensaios subsequentes.

Uma vez determinadas as doses e vias de tratamento, utilizamos os procedimentos para indução da inflamação intestinal por DSS, avaliação clínica e coleta das amostras, conforme esquema da figura 1. Observamos que o grupo DSS 3% + PG começou a apresentar os primeiros sinais da doença no quarto dia de exposição ao DSS, quando pudemos observar diminuição dos parâmetros clínicos no grupo tratado com DHEA. Estes achados permaneceram reduzidos durante todo o período experimental, inclusive durante a fase de reparo tecidual (Fig. 8A). Além disso, quando avaliamos o peso dos camundongos, verificamos que ambos os grupos que receberam DSS com ou sem tratamento com DHEA apresentaram perda de peso. Porém, esta perda foi menos evidente nos camundongos que receberam DHEA (Fig. 8B), o que também corrobora os resultados de redução do escore clínico da doença. O consumo de água e ração também foi avaliado e não houve diferença entre os grupos com DSS 3%, independentemente do tratamento (Fig. 8C e 8D). Para visualização da área afetada pela inflamação intestinal foi realizada a análise dos intestinos coletados para o escore pós-morte. Os camundongos tratados com DHEA apresentaram sinais da inflamação intestinal reduzidos quando comparados com o grupo DSS, tanto na fase de indução da doença (6 dias) como também na fase de reparo tecidual com 15 dias (Fig. 8F). Além disso, quando avaliamos se o tratamento com DHEA poderia aumentar a sobrevivência dos camundongos expostos ao DSS por um período contínuo, observamos que este parâmetro não foi alterado pelo tratamento com DHEA (Fig. 8E). Sendo assim, estes resultados indicaram que o DHEA pode modificar o curso das respostas decorrentes de um processo inflamatório intestinal *in vivo* por melhorar os sinais clínicos que são associados com a doença.

Figura 7: Avaliação dos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 durante os 6 primeiros dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA). Os animais receberam água com dextran sulfato de sódio (DSS) para indução da colite e tratamento com injeções diárias subcutâneas de DHEA nas concentrações de 10, 20 e 40mg/kg, para análise da melhor dose de tratamento. Os camundongos foram mantidos durante os 6 dias com o DSS e tratamento. As avaliações foram feitas diariamente e os dados representados como **(A)** escore clínico da doença, **(B)** avaliação do peso. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3%: camundongos com inflamação intestinal; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea do propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. Estes resultados representam um experimento independente.

Figura 8: Avaliação dos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 durante os 15 primeiros dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA). Os animais receberam água com dextran sulfato de sódio (DSS) para indução da colite e tratamento com injeções diárias subcutâneas de DHEA na dose de 40mg/kg. Os camundongos foram mantidos durante os 9 primeiros dias com o DSS e com tratamento. A avaliação foi feita diariamente e os dados representados como (A) escore clínico da doença de acordo com os parâmetros da tabela 1, (B) avaliação do peso, (C) consumo de água, (D) consumo de ração, (E) tratamento com DHEA durante os 9 primeiros dias e indução contínua da colite para avaliação da sobrevida e (F) avaliação do escore pós-morte de acordo com os parâmetros da tabela 2. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.4. Avaliação sistêmica após tratamento com DHEA

Sabendo que a administração *in vivo* do DHEA poderia alterar o curso da inflamação intestinal experimental, buscamos averiguar se o tratamento poderia causar alterações sistêmicas que justificassem a diminuição dos sinais clínicos e a menor perda de peso em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo da droga (Fig. 8A e 8B). Para isso, o sangue dos animais que receberam o DSS 3% com/sem tratamento foi coletado na fase de indução da doença (6 dias). Ainda, outros grupos tiveram o sangue coletado para avaliação do esfregaço sanguíneo na fase de reparo tecidual (15 dias).

Os resultados mostraram que os grupos que receberam DSS 3% com/sem DHEA exógeno apresentaram número total de células semelhantes em ambos os períodos de 6 e 15 dias avaliados (Fig. 9A e 9C). Na fase de indução da doença (6 dias), observamos que o grupo tratado com DHEA apresentou número e porcentagem de monócitos diminuídos quando comparado com o grupo que recebeu apenas DSS (Fig. 9A e 9B). Por outro lado, na fase de reparo tecidual (15 dias), os camundongos que receberam DHEA exógeno apresentaram número de neutrófilos aumentados quando comparado com o grupo DSS 3% + PG (Fig. 9C e 9D). Com isso, estes dados sugerem que o DHEA exógeno pode induzir alterações sistêmicas interferindo em alguns tipos de células sanguíneas circulantes. Ainda, os efeitos vistos nos parâmetros clínicos poderiam ser, em parte, devido à ação do tratamento no conjunto de células circulantes.

Figura 9: Avaliação dos leucócitos circulantes de camundongos C57BL/6 durante 6 e 15 dias de indução de inflamação intestinal e tratamento com DHEA. O sangue foi coletado, as células contadas e o esfregaço corado com Panótico para a contagem diferencial. Em (A) e (C) número de células por mL com 6 e 15 dias respectivamente. Em (B) e (D) porcentagem de células com 6 e 15 dias respectivamente. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.5. Avaliação da inflamação no intestino após tratamento com DHEA

5.5.1. Avaliação histopatológica

Para melhor visualização das áreas afetadas pela inflamação após tratamento com DHEA, foram realizadas análises histopatológicas do cólon dos camundongos

com 6 e 15 dias. No grupo controle saudável, a mucosa do intestino grosso apresentou-se dentro dos limites de normalidade, ou seja, com presença de criptas dispostas de forma reta e paralela, sem anormalidades arquitetônicas nestas criptas ou na lâmina própria (Fig. 10A-D).

O grupo exposto apenas ao DSS 3% por 6 dias apresentou perímetro total do cólon, de 50190 ± 3650 μm e quando avaliamos o comprimento do intestino dos animais do grupo tratado com DHEA, observamos que houve aumento do perímetro total para 67708 ± 6266 μm , que foi também semelhante ao grupo controle saudável. Estes resultados indicam que a inflamação intestinal cursa, de fato, com encurtamento do intestino afetado pela resposta inflamatória descontrolada causada pela exposição ao DSS (Kim, Shajib et al. 2012) e que o tratamento com DHEA foi benéfico na normalização do comprimento intestinal (Fig. 10C, $p < 0,05$). Já nos grupos que foram avaliados no período de reparo tecidual não foram observadas diferenças significantes entre eles com relação ao perímetro total do intestino (Fig. 10C). Considerando as lesões causadas no grupo exposto apenas ao DSS na fase de indução da doença (6 dias), foram observadas erosões intercaladas com áreas de mucosa normal. Nas regiões com erosão havia superfície epitelial com ausência de criptas e com anormalidades arquitetônicas, além de aumento da celularidade da lâmina própria (LP). O infiltrado celular da LP era composto, predominantemente, por células mononucleadas, que estavam presentes também na submucosa e muscular (Fig. 10A, 10B). O grupo tratado com DHEA apresentou áreas de erosões variáveis, intercaladas com mucosa normal. Nas áreas de erosão observamos perda da superfície epitelial com ausência de criptas e algumas áreas com anormalidades arquitetônicas. Na LP havia predomínio de células mononucleadas que estavam presentes também na submucosa, muscular e em alguns casos na serosa. Embora os grupos DSS e tratado com DHEA apresentassem características histopatológicas semelhantes, a análise quantitativa da celularidade presente na LP do grupo tratado mostrou diminuição significativa de células comparado com o grupo exposto apenas ao DSS (Fig. 10A, 10B e 10D). Com relação à fase de reparo tecidual (15 dias), os grupos expostos ao DSS tratados ou não com DHEA, apresentaram características histopatológicas semelhantes. Ambos grupos apresentaram áreas maiores de erosões, intercaladas com mucosa normal. Nas áreas de erosão houve perda da superfície epitelial com ausência de criptas e áreas com anormalidades arquitetônicas. Na LP observou-se predomínio de células mononucleadas que

estavam presentes também na submucosa, muscular e serosa. Ainda, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à quantificação da celularidade da LP (Fig. 10B e 10D).

5.5.2. Quantificação de MPO, NAG e EPO

A DII é causada por um processo inflamatório crônico multifatorial com importante participação do infiltrado inflamatório intestinal na destruição da mucosa. Sabendo disso e que o tratamento com DHEA pode influenciar os leucócitos sistêmicos levando a diminuição dos sinais clínicos da inflamação intestinal experimental, buscou-se analisar quais as possíveis populações celulares poderiam estar alteradas após terapia com DHEA. Para isso, foi realizada análise quantitativa do infiltrado inflamatório de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na inflamação intestinal causada pelo DSS e sua relação com o tratamento com DHEA foi realizada por meio dos ensaios de mieloperoxidase (MPO), N-acetilglucosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO), respectivamente, nas amostras de tecido intestinal coletadas de camundongos controles e DSS 3% com/sem tratamento com DHEA. De forma geral, os camundongos que receberam DSS 3% com/sem tratamento nos períodos de 6 e 15 dias, não apresentaram diferenças significativas nas enzimas MPO, EPO e NAG avaliadas (Fig. 11). No entanto, quando os tecidos foram avaliados na fase de reparo tecidual, os níveis de MPO tenderam a aumentar quando comparados com o grupo controle e o DSS (Fig. 11B), corroborando os resultados visto na contagem dos leucócitos sistêmicos (Fig. 9A e 9B). Estes dados sugeriram que o DHEA exógeno pode interferir principalmente de forma sistêmica nos neutrófilos e discretamente no sítio da inflamação. Ainda, nossas observações indicam que outros tipos de células podem estar envolvidos na redução do processo inflamatório e das manifestações clínicas da doença vistos nos resultados descritos acima.

Figura 10: Análise histopatológica do cólon de camundongos C57BL/6 após indução da inflamação intestinal com/sem tratamento com DHEA. Os animais receberam água com dextran sulfato de sódio (DSS 3%) para indução da colite e os grupos tratados receberam injeções subcutâneas de DHEA (40mg/kg), conforme descrito na Metodologia. Os camundongos foram eutanasiados com 6 e 15 dias e tiveram o cólon removido, processado para inclusão em parafina e corado por H&E para análise histológica. **(A)** Fotomicrografias dos grupos no período de indução da doença (6 dias). **(B)** Fotomicrografias dos grupos no período de reparo tecidual (15 dias). **(C)** Avaliação do perímetro do intestino. **(D)** Determinação da celularidade presente na lâmina própria (LP). ►: Celularidade na LP e submucosa dos grupos apenas expostos ao DSS; ►: Celularidade na LP dos grupos tratados com DHEA; *: perda da superfície epitelial com ausência de criptas. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. Linha tracejada representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Figura 11: Avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) após indução da inflamação intestinal com/sem tratamento com DHEA. Os fragmentos de intestino foram coletados, triturados e, processados para os ensaios de MPO, EPO e NAG, com leitura da densidade óptica (DO) dos sobrenadantes a 450, 490 e 405nm, respectivamente. Em (A) e (B) avaliação de MPO nos dias 6 e 15, respectivamente. Em (C) e (D) quantificação de EPO nos dias 6 e 15, respectivamente. Em (E) e (F) avaliação de NAG nos dias 6 e 15, respectivamente. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes.

5.5.3. Avaliação do perfil de citocinas e receptores PPAR no intestino

A produção descontrolada de citocinas inflamatórias exerce importante papel na destruição do intestino. Sabendo disso, buscamos averiguar se o uso do DHEA poderia modular a expressão de RNAm de diferentes citocinas (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-13, IL-10, IL-22, e TGF- β) no cólon dos animais. Além disso, avaliamos também a expressão do RNAm dos receptores PPAR- α e PPAR- γ (PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissomo), que possuem importantes funções na imunidade

local. Nossas análises revelaram que o tratamento com DHEA durante a fase de indução da doença (6 dias), diminuiu significativamente a expressão do RNAm da citocina pró-inflamatória IL-6 e da citocina TGF- β (Fig. 12A e 12F, respectivamente; * $p < 0,05$). Além disso, ainda durante a fase de indução da doença, o tratamento aumentou significativamente a expressão do RNAm da citocina IL-13 (Fig. 12D, * $p < 0,05$). No entanto, durante a fase de reparo tecidual, o DHEA não alterou a expressão do RNAm de nenhuma das citocinas avaliadas (Fig. 12). Com relação aos receptores PPAR- α PPAR- γ , também não foi observada nenhuma alteração da expressão do RNAm induzida por DHEA, em ambos períodos estudados.

5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório após tratamento com DHEA

Considerando a melhora histopatológica do cólon após tratamento com DHEA, buscamos averiguar e quantificar as alterações no infiltrado inflamatório no intestino grosso, assim como no baço e linfonodos mesentéricos dos animais doentes e tratados com DHEA no período de 6 dias, por citometria de fluxo. Para isso, primeiramente, as amostras foram coletadas e processadas para separação das células e foram quantificados os leucócitos totais com o auxílio da câmara de Neubauer. Verificamos que após o tratamento com DHEA ocorreu diminuição de leucócitos na LP quando comparados com o grupo DSS 3% (Fig. 13D, $p < 0,05$). Entretanto, não foi observada alteração no número total de leucócitos entre os grupos tratados ou não com DHEA quando avaliamos as células do baço, LNM ou IEL (Fig. 13A, 13B e 13C).

Em sequência, buscamos averiguar se o tratamento com DHEA poderia interferir no recrutamento e/ou acúmulo de linfócitos T, por meio da marcação das células mononucleares com anticorpos anti-CD3 para citometria de fluxo. Foi observado aumento da frequência de linfócitos T no baço dos camundongos tratados com DHEA, quando comparados aos grupos que receberam apenas DSS 3% + veículo, no período de 6 dias (Fig. 13E, $p < 0,05$). No entanto, não houve variação na frequência de linfócitos T nos LNM, IEL ou LP (Fig. 13F, 13G e 13H).

Figura 12: Quantificação do RNAm de citocinas e receptores (PPAR-α e PPAR-γ) nos cólons após 6 e 15 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. As amostras de cólon coletadas no 6° e 15° dia de experimento foram processadas para a realização de PCR em tempo real. Os resultados foram corrigidos pela β-actina para normalizar os níveis de expressão dos genes alvos. O número de vezes de expressão diferencial do RNAm foi comparado com o controle (grupo saudável) e calculado pela fórmula matemática $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (CT: ciclo limiar). Em **(A)** IL-6, **(B)** IL-1β, **(C)** IFN-γ, **(D)** IL-13, **(E)** IL-10, **(F)** TGF-β, **(G)** IL-22, **(H)** PPAR-α e **(I)** PPAR-γ (PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissomo). Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam um experimento independente. * $p < 0,05$

Figura 13: Avaliação do infiltrado inflamatório após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. O baço, linfonodos mesentéricos (LNM) e intestino grosso (LP e IEL) dos animais foram removidos, para contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer (A-D). Em seguida, as amostras foram marcadas com anticorpo específico para a molécula CD3 (linfócitos T) (E-H). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células CD3⁺ foi analisada na “gate” de linfócitos de acordo com parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) no software FlowJo. LP: lâmina própria; IEL: linfócitos intraepiteliais; Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * p < 0,05.

Para verificar se o tratamento com DHEA também poderia interferir no recrutamento e/ou acúmulo de linfócitos TCD4 e TCD8 no baço, LNM, LP ou IEL, foi realizada imunofenotipagem dos leucócitos obtidos destes compartimentos dos camundongos controles, DSS 3% tratados ou não com DHEA, no período de indução da doença (6 dias). Foi observado aumento da frequência de linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ no baço dos camundongos tratados DHEA (Fig.14B e 14C, respectivamente, p<0,05), com diminuição significativa dos linfócitos CD3⁺CD4⁺ nos LNM em comparação aos animais com inflamação intestinal não tratados (Fig. 14B, p<0,05). Já em relação ao compartimento da LP ou IEL, não foram observadas alterações no acúmulo de células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺ (Fig.15B e 15C,

respectivamente). Ainda, os IEL foram também analisados para o receptor T com cadeias $\gamma\delta$ e foi observada tendência à diminuição dos linfócitos T $CD3^+\gamma\delta^+$ nos animais que receberam tratamento com DHEA quando comparados com o grupo DSS 3% + PG (Fig. 16B). Juntos estes resultados indicam que possivelmente o tratamento com DHEA poderia manter os linfócitos TCD4 e TCD8 no baço e assim impedir que cheguem ao cólon e LNM.

Figura 14: Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 no baço e linfonodos mesentéricos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. O baço e linfonodos mesentéricos (LNM) foram removidos e processados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE), CD4 (PeCyP) e CD8 (PeCy7). Em (A), estratégia de *gate* analisada pelo software FlowJo após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. A porcentagem de células duplo positivas CD3CD4 (B) ou CD3CD8 (C). Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Figura 15: Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 no intestino grosso após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. Os linfócitos intraepiteliais (IEL) e as células da lâmina própria (LP) do cólon dos camundongos foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE), CD4 (PeCyP) e CD8 (PeCy7). **(A)**, estratégia de *gate*. Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células duplo positivas CD3CD4 **(B)** ou CD3CD8 **(C)** foi analisada pelo software FlowJo. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável.

Figura 16: Avaliação da frequência de linfócitos intraepiteliais T γ δ após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. Os linfócitos intraepiteliais (IEL) do cólon dos camundongos foram isolados e marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE) e γ δ (FITC). **(A)** Estratégia de *gate*. Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células duplo positivas CD3 γ δ **(B)** foi analisada pelo software FlowJo. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes.

Tendo em vista os resultados encontrados para os linfócitos TCD4 e TCD8, buscou-se averiguar as populações de células *natural killer* CD49b⁺ e CD3⁺CD49b⁺ (supostamente NKT), que poderiam estar alteradas nos linfonodos mesentéricos (LNM) e no baço dos animais após 6 dias de indução da inflamação e tratamento com DHEA. Porém, nenhuma alteração das células CD3⁺CD49b⁺ ou CD49b⁺ foi observada nos grupos avaliados (Fig.17B e 17C).

Figura 17: Avaliação da presença de células NKT e NK nos linfonodos mesentéricos e baço após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. Os linfonodos mesentéricos e o baço dos camundongos foram removidos e macerados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3 (PE) e CD49b (FITC). **(A)** Estratégia de *gate*. Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células duplo positivas CD3⁺CD49b⁺ (NKT) **(B)** ou simples positivas CD49b⁺ (NK) **(C)** foi analisada pelo software FlowJo. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes.

Ao avaliar-se as células monocíticas no compartimento de LP do intestino grosso, LNM e baço, verificou-se que houve aumento nos LNM da frequência de células CD11c⁺ (células dendríticas) nos camundongos tratados com DHEA,

comparados com os animais DSS 3% + PG (Fig. 18C, $p < 0,05$). Já em relação às células CD11b⁺ (supostamente macrófagos), houve diminuição da frequência das mesmas, também nos LNM dos animais tratados com DHEA, comparados com o grupo DSS 3% (Fig. 18C, $p < 0,05$). Porém, embora tenhamos visto estas alterações nos LNM, não houve diferença na frequência destas células no baço e LP dos grupos avaliados (Fig. 18B e 18D). Com estes resultados, podemos concluir que o DHEA parece modular as respostas imunológicas, influenciando também as populações de células dendríticas e macrófagos em sítios próximos da inflamação intestinal, como nos LNM.

Figura 18: Detecção de células monocíticas nos camundongos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. (A) Estratégia de *gate*. O baço **(B)**, linfonodos mesentéricos **(C)** e a lâmina própria **(D)** foram removidos e processados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD11b (PE) e CD11c (FITC). Em **Q1** observamos a porcentagem de células dendríticas (CD11c⁺), em **Q2** células CD11b⁺CD11c⁺ e as células CD11b⁺ em **Q3**; após aquisição das amostras em citômetro de fluxo. A porcentagem de células marcadas dentro da *gate* de monócitos foi analisada pelo software FlowJo. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

5.7. Avaliação da atividade funcional das células

Considerando-se que o DHEA influenciou o acúmulo de neutrófilos, monócitos e linfócitos sistemicamente, com algumas alterações observadas no intestino inflamado, procurou-se determinar a atividade funcional das células presentes no baço e LNM pós-DHEA. Os nossos dados mostraram que o tratamento *in vivo* com o hormônio durante a indução da inflamação intestinal levou à diminuição de IFN- γ , juntamente com o aumento da produção de IL-4 pelas células T CD4 (Fig. 19B, $*p < 0,05$) do baço dos camundongos. No entanto, ambos os grupos expostos ao DSS, independentemente do tratamento hormonal, não apresentaram diferenças em células T CD4 produtoras das citocinas IL-17 ou IL-10. Ainda, quando avaliamos as células dos LNM, observamos diminuição das células T CD4 produzindo IL-17 nos animais que receberam o DHEA comparados com o grupo não tratado (Fig. 19C, $*p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os animais tratados ou não com DHEA em relação às células produtoras de IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos LNM, (Fig. 19C). Portanto, concluiu-se que o tratamento com DHEA pode modular a atividade funcional dos linfócitos T do baço e LNM e então interferir com a produção sistêmica de algumas citocinas, direcionando as respostas das células T CD4 para uma resposta mais limitada durante a inflamação intestinal.

Figura 19: Avaliação do perfil de citocinas do baço e linfonodos mesentéricos após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. Os linfonodos mesentéricos e o baço foram removidos e macerados para extração dos leucócitos. Após 4h de cultura na presença de brefeldina, as células foram coletadas, marcadas com anticorpos específicos para CD4 (PeCyP), IFN- γ , IL-10, IL-17 (PE) ou IL-4 (PeCyP) para detecção dos linfócitos T CD4 produtores das respectivas citocinas, por citometria de fluxo. Em **(A)**, estratégia de *gate*, **(B)** células do baço e **(C)** células dos linfonodos mesentéricos. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

5.8. Efeitos do DHEA na proliferação de leucócitos *in vivo*

Considerando a capacidade de DHEA modular sistemicamente a produção de citocinas por linfócitos T dos órgãos linfoides secundários, buscamos avaliar como estaria a capacidade de resposta dos leucócitos após a suplementação com DHEA *in vivo*. Os dados mostraram que as células de camundongos tratados com DHEA tiveram menor proliferação em comparação com os animais DSS após re-estímulos com ConA *in vitro* (Fig.20A, * $p < 0,05$), tanto na fase de indução da doença quanto na fase de reparo tecidual. Além disso, quando realizamos o co-cultivo dos esplenócitos com células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ para analisar a responsividade dos leucócitos após tratamento com DHEA *in vivo*, observamos que as células de baço de ambos os grupos foram passíveis de supressão por células Treg. Entretanto, embora não tenha sido estatisticamente significativo, as células de baço dos camundongos tratados com DHEA tiveram aparentemente maior suscetibilidade à supressão mediada por Tregs, especialmente na maior proporção Tregs: esplenócitos (1:5) (Fig.20B, 20C e 20D). Embora estudos futuros ainda sejam necessários para melhor averiguar estes achados, os resultados indicam que as células do baço tornam-se hiporresponsivas após exposição *in vivo* ao DHEA, o que pode ter contribuído, de forma geral, para redução do quadro inflamatório dos camundongos com colite.

Figura 20: Avaliação da proliferação celular e da capacidade de resposta a células reguladoras (Tregs) após indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com dehidroepiandrosterona (DHEA). Em (A), os leucócitos foram isolados a partir dos baços e linfonodos mesentéricos (LNM) de camundongos controles saudáveis e de camundongos que receberam dextran sulfato de sódio (DSS), com ou sem tratamento com DHEA, avaliados nos períodos de 6 e 15 dias. As células foram cultivadas durante 72 horas a 37°C em estufa com 5% CO₂, na presença ou não de concanavalina A (ConA, 3ug/mL). Posteriormente, para determinar a proliferação celular foi utilizado o teste de incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU). Em (B, C e D), o baço e linfonodos de camundongos GFP-Foxp3 foram coletados para “sorting” das células T reguladoras (CD4⁺Foxp3GFP⁺). As Tregs e os esplenócitos dos camundongos tratados ou não com DHEA durante a período de 6 dias, foram cultivados na proporção de 1: 5 (B) ou 1:10 (C) em meio RPMI com 10% SFB durante 72 horas a 37°C em estufa com 5% CO₂, na presença de ConA (3ug/mL). Para determinar a proliferação celular foi utilizado o teste de incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU). Em (D), frequência de supressão da proliferação dos leucócitos de baço em co-cultura com as Tregs nas proporções de 1:5 e 1:10. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam um experimento independente. * p < 0,05.

Tendo em vista que o tratamento com DHEA foi capaz de regular a responsividade celular (Fig. 20) e sabendo que para o controle da inflamação se faz necessário o equilíbrio entre células T efectoras e células T reguladoras, buscamos analisar quais alterações poderiam estar ocorrendo nas populações de células Tregs após tratamento dos animais com DHEA. Para esta avaliação, células do baço e LNM foram analisadas e marcadas para as populações $CD4^+CD25^+$ (células T reguladoras naturais) e $CD4^+CD25^-$. Nossos resultados não apontaram diferenças em ambas populações celulares após indução da inflamação intestinal e tratamento com DHEA (Fig. 20B). Ainda, para melhor caracterização das células Tregs, outros marcadores como GITR e PD-1 foram utilizados. Nossos resultados também não demonstraram diferenças significativas entre os grupos que receberam DSS com ou sem tratamento, para ambos marcadores, tanto no baço quanto LNM (Fig. 21C e 21D).

Figura 21: Frequência de células CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ e quantificação de linfócitos T reguladores (GTR ou PD-1) após 6 dias de indução da inflamação intestinal em camundongos tratados ou não com DHEA. Os linfonodos mesentéricos (LNM) e baço dos camundongos controles e tratados foram removidos para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos específicos para CD4 (PeCyP), CD25 (PeCy7), GTR (FITC) e PD-1 (PE). Após aquisição em citômetro de fluxo, a porcentagem de células expressando CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻ (**B**), CD4⁺CD25⁺GTR⁺ e CD4⁺CD25⁺GTR⁺ (**C**) e (**D**) CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ e CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ foi determinada após análise na *gate* de linfócitos (**A**), com auxílio do software FlowJo. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam 2 experimentos independentes.

5.9. Avaliação da toxicidade e perfil lipídico após uso do DHEA *in vivo*

Em sequência, buscamos avaliar, *in vivo*, se o tratamento com DHEA na dose de 40mg/kg poderia causar algum dano sistêmico, sendo considerado tóxico. Para isso foi realizada a avaliação hepática dosando as enzimas AST e ALT nos animais após exposição ao DSS e tratamento com DHEA. Nossos resultados mostraram que o tratamento não levou a alterações hepáticas em nenhum dos períodos estudados (6 e 15 dias), demonstrando assim não ser tóxico ao organismo vivo na dose usada nos nossos experimentos (Fig. 22A, 22B).

Sabe-se que o DHEA é um hormônio esteroide sintetizado a partir de moléculas de colesterol, sendo precursor da testosterona (Endoh, Kristiansen et al. 1996, Kroboth, Salek et al. 1999, Miller and Auchus 2011). Neste sentido, o uso do DHEA como tratamento poderia causar efeitos metabólicos anabolizantes e interferir no metabolismo dos lipídeos. Para avaliar essa hipótese, buscamos analisar o perfil lipídico no soro dos grupos experimentais após exposição ao DSS e tratamento nos dois períodos estudados. Nossos resultados mostraram que houve diminuição significativa das concentrações de colesterol total e da fração do colesterol LDL nos animais tratados com DHEA durante a fase ativa da doença, quando comparamos com o grupo apenas exposto ao DSS (Fig. 22C * $p < 0,05$), ou seja, um efeito benéfico do tratamento na regulação dos níveis de lipídeos. Já na fase de reparo tecidual, não observamos diferenças entre os grupos (Fig. 22D).

Figura 22: Avaliação da função hepática e perfil lipídico durante 6 e 15 dias de indução de inflamação intestinal em camundongos tratamento ou não com DHEA. Para realização dos testes bioquímicos, o soro foi obtido através da centrifugação do sangue total. Em (A) AST e ALT no período de 6 dias, (B) AST e ALT no período de 15 dias, (C) perfil lipídico no período de 6 dias e (D) perfil lipídico no período de 15 dias. AST: Aspartato Aminotransferase; ALT: Alanina Aminotransferase; HDL: Lipoproteínas de alta densidade ligadas ao colesterol; LDL: Lipoproteínas de baixa densidade ligadas ao colesterol; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade. Controle: camundongos saudáveis; DSS 3% + PG: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de propilenoglicol (PG - veículo do DHEA); DSS 3% + DHEA: camundongos com inflamação intestinal que receberam injeção subcutânea de DHEA. **Linha tracejada** representa o grupo controle saudável. Estes resultados representam um experimento independente. * $p < 0,05$.

6. *Discussão*

Embora existam importantes estudos sobre a participação do DHEA na modulação da resposta imune, o papel exato deste hormônio na inflamação intestinal crônica ainda é obscuro. Como pode ser visto em diferentes estudos, o DHEA interfere no sistema imunológico de diversas formas, que variam de acordo com o modelo experimental, podendo, por exemplo, modular a função de células imunológicas através da regulação da produção de diferentes citocinas (Cheng and Tseng 2000, Li, Tang et al. 2014). Ainda, o tratamento com DHEA provou ser eficaz contra a infecção por diferentes agentes patogênicos como vírus, bactérias e parasitas (Santos, Toldo et al. 2008, Caetano, Santello et al. 2009, Zeckey, Hildebrand et al. 2010, D'Attilio, Bozza et al. 2012, Bongiovanni, Mata-Espinosa et al. 2015, Gentilini, Velasquez et al. 2015).

Os baixos níveis de DHEA no soro de pacientes com DII podem ser associados à patogênese da doença (de la Torre, Hedman et al. 1998, Straub, Vogl et al. 1998) e pode ser relacionado com manifestações clínicas aumentadas tanto UC ou DC (Andus, Klebl et al. 2003). No presente trabalho, demonstramos que este hormônio foi capaz de reduzir os sinais clínicos da colite experimental, com redução do escore pós-morte e diminuição da perda de peso em comparação com o grupo DSS (com inflamação intestinal) não tratado. Ainda, vimos que o DHEA exógeno pode atuar como um modulador sistêmico e local da inflamação intestinal, controlando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6 e IL-17), diminuindo a proliferação celular e deixando as células efetoras mais hiporresponsivas, o que provavelmente auxilia no reestabelecimento da tolerância periférica e minimiza os danos da inflamação intestinal causados pela exposição ao DSS. Estas observações estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram que tanto a administração subcutânea ou intramuscular de DHEA levaram ao aumento da sobrevivência dos animais com sepse e melhoraram a função de células imunológicas para combater a infecção gerada pela sepse (Schmitz, Kobbe et al. 2010, Al-Banna, Pavlovic et al. 2014).

Nossos resultados também apontaram para um papel de DHEA na redução de monócitos na fase ativa da doença (6 dias) na circulação, diminuição da frequência de macrófagos e aumento de células dendríticas nos LNM durante o tratamento DHEA. Os macrófagos são células com participação importante na resposta imune inata no sistema gastrointestinal. Eles iniciam e mantêm respostas imunológicas protetoras contra agentes patogênicos através da sua alta atividade

fagocítica e bactericida, que permitem a captura e a destruição de microrganismos que rompem a barreira epitelial do intestino (Rani, Smulian et al. 2011, Bain and Mowat 2014). Durante a inflamação intestinal, os macrófagos recrutados aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-23 e IL-6 (Kamada, Hisamatsu et al. 2008) , juntamente com a geração de óxido nítrico (Rugtveit, Haraldsen et al. 1995), e aumento da expressão de receptores tipo Toll (TLR) em sua superfície (Thiesen, Janciauskiene et al. 2014). Assim, ocorre a ativação de linfócitos T efetores produtores de IFN- γ que também contribuem para a patogênese e inflamação intestinal crônica (Kamada, Hisamatsu et al. 2008). Embora inicialmente os monócitos cumpram funções de proteção, o seu recrutamento para o tecido da mucosa pode ajudar na destruição intestinal (Rugtveit, Brandtzaeg et al. 1994, Rugtveit, Nilsen et al. 1997). Assim, sugerimos que o tratamento com DHEA ajudou a minimizar os danos causados pela inflamação diminuindo os monócitos sistêmicos e os macrófagos dos LNM do grupo tratado. Já com relação as células dendríticas CD11c⁺, trabalhos descrevem que possuem origem linfoide, promovendo principalmente resposta de células T CD8⁺ (Turley, Fletcher et al. 2010). Com base nessa informação, especulamos que as células dendríticas possam interferir na inflamação local dos camundongos expostos ao DSS após tratamento com DHEA estimulando resposta imunológica de células T CD8⁺.

O tratamento com DHEA também conduziu a um aumento do número de neutrófilos circulantes na fase de reparo tecidual (15 dias). Estes resultados poderiam ser indício de melhora da inflamação intestinal, devido ao fato de que os neutrófilos podem ser responsáveis por iniciar as respostas imunológicas, auxiliando na eliminação dos patógeno pela geração de ROS e recrutamento de outras células do sistema imunológico (Borregaard 2010). Durante a fase de resolução da inflamação, os neutrófilos promovem a cicatrização de feridas através da indução da expressão na sua membrana de enzimas como a NADPH-oxidase, que é composta por cinco subunidades incluindo p40^{phox}. Camundongos deficientes para p40^{phox} possuem cicatrização intestinal prejudicada após colite induzida por DSS, indicando que esta subunidade dos neutrófilos é essencial para as funções de reparação de tecidos. Além disso, na ausência de neutrófilos houve aumento da gravidade da colite por exposição ao DSS durante 7 dias e 100% de mortalidade dos camundongos no terceiro dia após a retirada do DSS (Conway, Goel et al. 2012).

Ainda, neutrófilos ajudam na produção de mediadores anti-inflamatórios lipídicos para funções de reparo tecidual (Chan and Moore 2010).

De fato, a DII é causada por uma resposta inflamatória crônica e multifatorial com participação importante do infiltrado inflamatório intestinal na destruição da mucosa (Yan, Wang et al. 2015, Vargas Robles, Citalan Madrid et al. 2016, Xu, Ma et al. 2016). O tratamento com DHEA não influenciou o acúmulo de neutrófilos, eosinófilos ou monócitos no cólon dos animais dos nossos experimentos. Estes resultados corroboram em partes os achados de Lichte, et al., que demonstraram que o uso de DHEA em camundongos com lesões musculoesqueléticas, não influenciou o infiltrado de neutrófilos no pulmão, avaliado pelo ensaio de MPO. Entretanto, ainda neste modelo experimental, o tratamento com DHEA reduziu os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1, simultaneamente ao aumento de IL-10 no soro (Lichte, Pfeifer et al. 2014), importante citocina produzida por células T reguladoras, que age inibindo citocinas pró-inflamatórias (Cheng and Tseng 2000). Sendo assim, eles sugeriram que o DHEA pode ser uma opção de tratamento para reduzir a inflamação sistêmica após lesões musculoesqueléticas (Lichte, Pfeifer et al. 2014). Além disso, ratos que receberam tratamento com DHEA intraperitoneal (50 mg/kg) durante 7 dias, seguido por exposição de DSS por mais 7 dias apresentaram redução de danos oxidativos em proteínas e lipídios, diminuição do infiltrado inflamatório e redução de MPO, além de um aumento da produção de muco no cólon, o que indica que o DHEA pode ser útil na prevenção ou tratamento de inflamação intestinal (Pelissier, Trap et al. 2004, Pelissier, Muller et al. 2006). Este trabalho corrobora os resultados de nossos experimentos, sendo ainda que diferentemente deste estudo, o nosso mostrou os efeitos de DHEA na modulação local e sistêmica da resposta imune, durante a indução ativa da doença e na fase de reparo tecidual.

Zeckey e colaboradores mostraram no modelo de sepse, que o tratamento com DHEA levou à diminuição significativa na porcentagem de células CD8⁺, células NK e nenhuma alteração nas células CD4⁺ no sangue periférico dos camundongos, o que levou ao aumento da sobrevivência dos animais após sepse. No entanto, quando avaliaram animais IL-6^{-/-}, observaram aumento significativo de ambas células, CD8⁺ e células NK. Com isso eles concluíram que os efeitos benéficos do DHEA parecem estar diretamente relacionados à síntese de IL-6, diminuindo as células CD8⁺ e células NK que possivelmente estariam envolvidas na patogênese da doença

(Zeckey, Hildebrand et al. 2010). Entretanto, embora em nossos resultados tenhamos observado diminuição da expressão do RNAm de IL-6 no intestino dos animais após tratamento com DHEA, houve apenas aumento de células CD3⁺CD8⁺ no baço e nenhuma alteração nas células NK. Além disso, DHEA aumentou a frequência de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de forma mais sistêmica, além da diminuição de células CD3⁺CD4⁺ nos LNM. Estes dados indicam a importância de DHEA na modulação dessas células, possivelmente na tentativa de conter a resposta inflamatória exacerbada no intestino e mantendo as células efectoras no baço. Apesar da escassez de dados que avaliam o efeito do DHEA na migração de leucócitos para o intestino, Al-Banna e colaboradores demonstraram que a administração de DHEA reduziu o número de leucócitos aderentes nas vênulas intestinais e consequentemente, reduziu o recrutamento dos leucócitos durante a sepse experimental, levando à melhora significativa na sobrevivência dos ratos (Al-Banna, Pavlovic et al. 2014). Estes resultados também corroboram nossa hipótese e indicam que o tratamento com DHEA pode interferir na dinâmica do tráfego de leucócitos durante a inflamação do intestino. No entanto, mais estudos ainda são necessários para melhor explicar o envolvimento de DHEA na migração de leucócitos durante a colite experimental.

As DII resultam de uma disfunção na regulação do sistema imunológico (Neuman 2007, Yan, Wang et al. 2015, Vargas Robles, Citalan Madrid et al. 2016). De forma interessante, nossos resultados demonstraram que o tratamento durante a fase de indução da doença contribuiu diminuindo citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IFN- γ e IL-17, em contraste com o aumento das citocinas IL-13 e IL-4 (secretadas principalmente por células do perfil Th2), além da diminuição do TGF- β . Na doença de Crohn, ocorre resposta predominante do padrão Th1 com elevada produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , produzidos por células mononucleares de lâmina própria (Monteleone, Biancone et al. 1997, Parronchi, Romagnani et al. 1997, Fujino, Andoh et al. 2003, Iboshi, Nakamura et al. 2014), de forma semelhante ao nosso modelo DSS em que o aumento dos níveis de IFN- γ são observados especialmente na inflamação intestinal avançada (Yan, Kolachala et al. 2009). Já a UC no humano apresenta-se com uma resposta predominantemente do padrão Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (Biasi, Leonarduzzi et al. 2013, Iboshi, Nakamura et al. 2014, Neurath 2014). Além disso, há também a secreção significativa de IL-17 e IL-23 por células Th17 na mucosa em ambas doenças, DC e UC (Fujino, Andoh et al. 2003,

Annunziato, Cosmi et al. 2007). Os nossos dados demonstraram que os camundongos tratados com DHEA apresentaram diminuição de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , em contraste à produção aumentada de IL-4 no baço. Portanto, esta inversão da resposta imunológica após o tratamento com DHEA pode ser associado com a melhora da doença (Globig, Hennecke et al. 2014, Lv, Liu et al. 2015). Sabe-se que a diferenciação para o subtipo de linfócitos Th2 requer a sinalização mediada por IL-4, a qual aumenta sua própria produção e de outras citocinas, como IL-5. Além disso, para a ativação dos linfócitos Th2, é necessário que ocorra supressão de outras vias de sinalização, tais como a inibição da expressão de STAT-4 ou de T-bet que levaria a diferenciação para Th1 (Zhu 2010). Ainda, o tratamento com DHEA é capaz de aumentar o muco no intestino de ratos atenuando a colite experimental (Pelissier, Muller et al. 2006), possivelmente induzido pela citocina IL-13 que promove a fibrose (Lee, Homer et al. 2001) e induz a produção de muco no intestino (McDermott, Humphreys et al. 2005). Os resultados aqui apresentados corroboram estes dados e indicam que o aumento de IL-13 nos camundongos tratados poderia ser associado com a melhora do intestino.

Por outro lado, foram observados níveis reduzidos de TGF- β após tratamento com DHEA em nossos animais. O TGF- β é um mediador pleiotrópico que pode exercer papel anti-inflamatório ou induzir a diferenciação das células Th17 (Littman and Rudensky 2010). Já as citocinas secretadas pelas células Th17, IL-17 e IL-22, têm importante papel na regulação da microbiota intestinal normal (Zenewicz, Yancopoulos et al. 2008). Entretanto, trabalhos têm sugerido que as células Th17 possuem grande plasticidade, podendo secretar IFN- γ (citocina do perfil de células Th1) ou expressar o fator de transcrição FoxP3, fundamental para as propriedades anti-inflamatórias das células Tregs (Ueno, Ghosh et al. 2015). O equilíbrio entre a diferenciação de células Th17 e células Tregs é regulado por citocinas tais como IL-6 e IL-23 no intestino (Ahern, Schiering et al. 2010, Littman and Rudensky 2010). O desequilíbrio entre essas células também pode estar relacionado à ruptura da barreira intestinal, aumento da resposta imune sistêmica contra a microbiota local e à exacerbação da inflamação nas DIIs (Fujino, Andoh et al. 2003, Annunziato, Cosmi et al. 2007, Globig, Hennecke et al. 2014). Em nossos resultados mostramos diminuição da expressão do RNAm de IL-6 e TGF- β , além da diminuição de células T CD4⁺IL-17⁺ nos LNM dos animais tratados com DHEA. Dessa forma, sugerimos que o tratamento interfere na diferenciação dos linfócitos diminuindo as células Th17

e reduzindo a inflamação intestinal. Em vista destes dados, é plausível que o DHEA possa exercer papel terapêutico na inflamação intestinal através da modulação das respostas imunológicas inflamatórias, relacionadas com os danos teciduais.

Diversos trabalhos mostraram que o DHEA possui papel na modulação de citocinas, assim como visto por Du et. al., que mostrou que este hormônio, quando adicionado em cultura, aumentou a produção de IL-4 (Th2) e diminuiu IFN- γ proveniente de células do baço de camundongos SJL/J imunizados com KLH em adjuvante de Freund completo (Du, Guan et al. 2001). Pratschke, et al., mostraram que pacientes que foram submetidos a grandes cirurgias abdominais (ressecções cólon-retais, ressecções hepáticas, cirurgia do pâncreas) podem apresentar maior susceptibilidade a infecções, devido ao desequilíbrio de células Th1/Th2 que são controladas por citocinas e também por hormônios esteroides. Sabendo disso, eles coletaram o sangue de pacientes que foram submetidos a grandes cirurgias (2 horas antes e logo depois da cirurgia) e realizaram experimentos com as células, tratando com DHEA *in vitro*. As análises dessas culturas mostraram que as células coletadas antes e principalmente pós-cirurgia e que foram tratadas com DHEA, apresentaram níveis de IL-2, IFN- γ e IL-10 reduzidos, além de menor expressão do CD69⁺ nas células T CD4⁺, simultaneamente a nenhuma alteração na expressão do CD69⁺ nas células T CD8⁺ (Pratschke, von Dossow-Hanfstingl et al. 2014). Os nossos resultados corroboram parcialmente estas descobertas e sugerem que DHEA pode inverter o padrão de resposta imune, na tentativa de modular a inflamação. Assim, a regulação da resposta inflamatória *in vivo* por DHEA, provavelmente, ocorreu via modulação das citocinas pró-inflamatórias produzidas após a indução da inflamação intestinal pelo DSS, o que sugere um papel crítico para este hormônio no controle do equilíbrio Th1/Th2 com efeito imunomodulador.

Em relação à atividade celular, o DHEA inibiu a proliferação de linfócitos. Além disso, embora não significativo, as células do baço parecem ser mais predispostas a supressão pelas células Tregs após tratamento *in vivo* com DHEA, sugerindo que diferentes vias de regulação poderiam ser utilizadas por este hormônio para controlar as respostas efectoras durante a inflamação intestinal. De fato, a maior hiporresponsividade dos esplenócitos de animais tratados com DHEA poderia estar relacionada à susceptibilidade aumentada a sinais reguladores, anergia ou qualquer outro mecanismo que poderia contribuir para o reestabelecimento da tolerância periférica. No entanto, estudos futuros serão ainda

realizados para melhor averiguar esta hipótese (Curtsinger, Lins et al. 2003, Liechtenstein, Dufait et al. 2012, Chen and Flies 2013, Luan, Yin et al. 2015, Sundstrom, Stenstad et al. 2016).

Sabe-se que as células Tregs expressam o fator de transcrição Foxp3 e são indispensáveis para prevenir e controlar a inflamação causada por respostas imunológicas. Sendo assim, as células Tregs têm a capacidade de evitar a autoimunidade e controlar respostas imunológicas protetoras, de modo que o número de células Tregs é um determinante crucial para a regulação do sistema imunológico. O número reduzido de células Tregs pode facilitar o desenvolvimento de respostas autoimunes fatais, enquanto que muitas células Tregs podem causar supressão imunológica de modo prejudicial ao organismo (Kim, Rasmussen et al. 2007, Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008, Liston and Gray 2014). Além disso, as células Tregs podem expressar diferentes moléculas que auxiliam nas suas funções supressoras (Kitoh, Ono et al. 2009, Fu, Ergun et al. 2012, Rudra, deRoos et al. 2012), como o receptor para IL-2 (cadeia- α ou CD25), CTLA-4 (Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), GITR (membro da superfamília do receptor de TNF induzido por glicocorticoides), PD-1 (proteína de morte celular programada 1) e ICOS (coestimulador induzível de células T). Além disso, múltiplos sinais podem também reforçar a expressão de FoxP3, tais como GATA3, RUNX1 e STAT3 (Kitoh, Ono et al. 2009, Fu, Ergun et al. 2012, Rudra, deRoos et al. 2012). Esta interação de sinais e receptores assegura que a população de células Tregs seja mantida no estado diferenciado para o perfil regulador, que é necessário para a homeostase do sistema imunológico (Rubtsov, Nieuwenhuis et al. 2010). Em nosso trabalho, ressaltamos a importância do balanço entre as populações de células Tregs e células efetoras para a homeostasia do sistema imunológico. Porém, o tratamento não influenciou na frequência das células Tregs quando avaliamos a expressão de CD25, GITR e PD-1.

Em ensaios *in vitro* o DHEA mostrou importante efeito inibidor na proliferação de linfócitos e consequentemente redução das citocinas IL-10 e IFN- γ nas culturas com todas as doses de DHEA testadas. Nas doses mais baixas, o DHEA pareceu modular IFN- γ diminuindo suas concentrações, sem reduzir IL-10. Isto sugere que apenas a dose mais elevada de DHEA testada foi tóxica para os linfócitos ocasionando a morte de células produtoras de IL-10, como visto nos nossos resultados. Já para linhagens mielóides, nenhuma dose testada de DHEA influenciou na viabilidade dos macrófagos, indicando que este hormônio não é tóxico

para tal linhagem celular. Ainda, o tratamento de esplenócitos naïves com DHEA (6 μ M), estimulados com LPS ou ConA levou à diminuição de IFN- γ , IL-2 e aumento de IL-10 (Powell and Sonnenfeld 2006), mostrando a capacidade imunomoduladora deste hormônio. Estes achados mostraram que apenas doses inferiores a 20 μ M tiveram capacidade de modular citocinas pró-inflamatórias, corroborando nossos resultados, nos quais doses muito altas do DHEA poderiam ser tóxicas para as células. Ortega-Calderón et. al., observaram que o tratamento *in vitro* com DHEA foi capaz de inibir a proliferação de três linhagens diferentes de células humanas de câncer de útero, o que confirma os nossos resultados novamente sobre o forte potencial terapêutico de DHEA (Ortega-Calderon and Lopez-Marure 2014).

Em cultura de células de baço provenientes de camundongos geneticamente propensos a desenvolver esclerose múltipla, DHEA inibiu a proliferação e reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-12 e TNF- α), em doses abaixo de 20 μ M. Estes resultados confirmam o fato de que a DHEA pode apresentar propriedades anti-inflamatórias potentes que poderiam ser, em parte, mediadas pela inibição da ativação de NF- κ B (Du, Khalil et al. 2001). O uso do DHEA levou à inibição da inflamação em células endoteliais aórticas humanas (Altman, Motton et al. 2008), redução da resposta inflamatória em células HaCat (Chan, Liou et al. 2013) e induziu a proliferação de células epiteliais da próstata pela via PI3K/AKT (Sun, Yang et al. 2010). Todos esses efeitos foram via NF- κ B. Além disso, as células T reguladoras em contato com células T efetoras podem liberar AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) em níveis elevados e inibir o fator de transcrição NF- κ B. Em consequência da sua inibição, ocorre a redução da proliferação celular e diminuição de IL-2 e IFN- γ (Minguet, Huber et al. 2005). Esses estudos indicam que a forma que DHEA exerce suas funções moduladoras pode ser pela via do fator NF- κ B. No entanto, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para esclarecer a via exata que o DHEA utiliza para realizar suas funções imunomoduladoras.

Alguns estudos indicam que a utilização subcutânea de DHEA pode gerar metabólitos com efeitos sobre o sistema imunológico. De fato, o DHEA é um precursor de diferentes hormônios, como o androstenediol, a androstenediona, estrona, testosterona, di-hidrotestosterona e estradiol-1(Rutkowski, Sowa et al. 2014). A aplicação intravenosa de androstenodiol melhorou a sobrevivência de animal no modelo de sepse e o mesmo efeito foi observado com o uso de DHEA subcutâneo (Schmitz, Lendemans et al. 2014). O metabólito androstenetriol (β AET)

apresentou efeitos inibidores na produção de NO por células RAW264-7 após estimulação com LPS, além de redução do infiltrado celular em animais após estímulo com carragenina (Ahlem, Auci et al. 2011). Além disso, Babickova et. al., demonstraram que camundongos fêmeas desenvolvem uma colite mais branda, devido às ações do hormônio 17β -estradiol (Babickova, Tothova et al. 2015). Estas descobertas sugerem que o DHEA como precursor destes metabólitos pode ser, indiretamente, o responsável pelos efeitos imunomoduladores encontrados nestes estudos.

Sabe-se que o DHEA é um hormônio esteroide sintetizado a partir de moléculas de colesterol (Endoh, Kristiansen et al. 1996, Kroboth, Salek et al. 1999). Neste sentido, o uso do DHEA como tratamento poderia causar efeitos metabólicos anabolizantes como o aumento da massa muscular/força através da hipertrofia de fibras musculares, devido ao aumento da síntese proteica intracelular. Além disso, o tratamento prolongado com hormônios esteroides poderia também interferir no metabolismo de lipídios (Arnold 2009, Nieschlag and Vorona 2015, Nieschlag and Vorona 2015). Diferentes estudos demonstraram evidências do papel cardioprotetor do DHEA (Simoncini, Mannella et al. 2003, Savineau, Marthan et al. 2013, Rutkowski, Sowa et al. 2014). Em um estudo pré-clínico utilizando DHEA (100mg-200mg) como tratamento em pacientes com lúpus, houve redução dos níveis de LDL, colesterol total e triglicérides no soro dos pacientes que receberam tratamento comparados com o grupo placebo (Petri, Lahita et al. 2002). Em nossos resultados, concluímos que a dose de DHEA usada em nossos experimentos foi eficaz, ajudando também a regular os níveis de lipídeos no soro dos animais tratados. Sabe-se que os andrógenos possuem importantes funções no metabolismo dos lipídeos, como o armazenamento dos mesmos e lipólise, ajudando assim na distribuição dos depósitos de gordura por todo o corpo (Zerradi, Dereumetz et al. 2014). Ainda, Tagawa et.al. demonstraram em cultura de tecido adiposo, que o DHEA possui efeitos antiobesidade, inibindo a enzima 11β -hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 1 (11β -HSD1), que ajuda na formação de tecido adiposo (Tagawa, Minamitani et al. 2011).

Classicamente, o DHEA e sulfato de DHEA são precursores cruciais da biossíntese de esteroides sexuais humanos e são os esteroides mais abundantes secretados pelas glândulas suprarrenais em adultos. No entanto, as funções do DHEA podem ser além do seu papel geralmente conhecido no sistema endócrino.

Até agora, diversos estudos demonstraram que o DHEA também está envolvido em respostas imunológicas, sendo capaz de modular as reações inflamatórias. Nossos estudos corroboram esses achados e podem ajudar na compreensão dos efeitos de DHEA, principalmente na inflamação intestinal.

7. *Conclusões*

*****

- DHEA leva à inibição da proliferação das células imunológicas *in vitro* e *in vivo*.
- DHEA controla as respostas imunológicas sistêmica e local, melhorando os sinais clínicos e histológicos da inflamação intestinal e não apresentando efeitos tóxicos *in vivo*.
- DHEA regula a inflamação intestinal por meio da redução do acúmulo de células infiltrantes no intestino.
- DHEA contribui para a melhora da colite experimental por meio do balanço entre as respostas Th1/Th2/Th17 *in vivo*.

8. *Referências*

*****

Ahern, P. P., C. Schiering, S. Buonocore, M. J. McGeachy, D. J. Cua, K. J. Maloy and F. Powrie (2010). "Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells." Immunity **33**(2): 279-288.

Ahlem, C. N., D. L. Auci, F. Nicoletti, R. Pieters, M. R. Kennedy, T. M. Page, C. L. Reading, E. Y. Enioutina and J. M. Frincke (2011). "Pharmacology and immune modulating properties of 5-androstene-3 β ,7 β ,17 β -triol, a DHEA metabolite in the human metabolome." J Steroid Biochem Mol Biol **126**(3-5): 87-94.

Al-Banna, N., D. Pavlovic, N. Sharawi, V. H. Bac, M. Jaskulski, C. Balzer, S. Weber, V. Nedeljkov and C. Lehmann (2014). "Combination of dehydroepiandrosterone and orthovanadate administration reduces intestinal leukocyte recruitment in models of experimental sepsis." Microvasc Res **95**: 82-87.

Altman, R., D. D. Motton, R. S. Kota and J. C. Rutledge (2008). "Inhibition of vascular inflammation by dehydroepiandrosterone sulfate in human aortic endothelial cells: roles of PPAR α and NF- κ B." Vascul Pharmacol **48**(2-3): 76-84.

Andus, T., F. Klebl, G. Rogler, N. Bregenzner, J. Scholmerich and R. H. Straub (2003). "Patients with refractory Crohn's disease or ulcerative colitis respond to dehydroepiandrosterone: a pilot study." Aliment Pharmacol Ther **17**(3): 409-414.

Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-1861.

Arnold, J. T. (2009). "DHEA metabolism in prostate: For better or worse?" Mol Cell Endocrinol **301**(1-2): 83-88.

Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." Nat Rev Immunol **8**(6): 411-420.

Asif, A. R., M. Ljubojevic, I. Sabolic, V. Shnitsar, M. Metten, N. Anzai, G. A. Muller, G. Burckhardt and Y. Hagos (2006). "Regulation of steroid hormone biosynthesis enzymes and organic anion transporters by forskolin and DHEA-S treatment in adrenocortical cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(6): E1351-1359.

Babickova, J., L. Tothova, E. Lengyelova, A. Bartonova, J. Hodosy, R. Gardlik and P. Celec (2015). "Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens." Inflammation **38**(5): 1996-2006.

Bain, C. C. and A. M. Mowat (2014). "The monocyte-macrophage axis in the intestine." Cell Immunol **291**(1-2): 41-48.

Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2007). "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." Lancet **369**(9573): 1641-1657.

Bento, A. F., D. F. Leite, R. Marcon, R. F. Claudino, R. C. Dutra, M. Cola, A. C. Martini and J. B. Calixto (2012). "Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice." Biochem Pharmacol **84**(11): 1459-1469.

Besedovsky, H. O. and A. del Rey (1996). "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses." Endocr Rev **17**(1): 64-102.

Biasi, F., G. Leonarduzzi, P. I. Oteiza and G. Poli (2013). "Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets." Antioxid Redox Signal **19**(14): 1711-1747.

Bilsborough, J. and J. L. Viney (2004). "Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease." Gastroenterology **127**(1): 300-309.

Bongiovanni, B., D. Mata-Espinosa, L. D'Attilio, J. C. Leon-Contreras, R. Marquez-Velasco, O. Bottasso, R. Hernandez-Pando and M. L. Bay (2015). "Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **95**(5): 562-569.

Borm., M. E. A. and G. Bouma (2004). "Animal models of inflammatory bowel disease " Autoimmune diseases and inflammation: 1740-6757.

Bornstein, S. R. and M. Ehrhart-Bornstein (2000). "Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis." Z Rheumatol **59 Suppl 2**: II/12-17.

Borregaard, N. (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes." Immunity **33**(5): 657-670.

Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-533.

Boussiotis, V. A., E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes and A. E. Goldfeld (2000). "IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients." J Clin Invest **105**(9): 1317-1325.

Burisch, J. and P. Munkholm (2013). "Inflammatory bowel disease epidemiology." Curr Opin Gastroenterol **29**(4): 357-362.

Caetano, L. C., F. H. Santello, M. Del Vecchio Filipin, V. Brazao, L. N. Caetano, M. P. Toldo, J. C. Caldeira and J. C. do Prado Junior (2009). "Trypanosoma cruzi: dehydroepiandrosterone (DHEA) and immune response during the chronic phase of the experimental Chagas' disease." Vet Parasitol **163**(1-2): 27-32.

Cardoso, C. R., G. Teixeira, P. R. Provinciatto, D. F. Godoi, B. R. Ferreira, C. M. Milanezi, D. B. Ferraz, M. A. Rossi, F. Q. Cunha and J. S. Silva (2008). "Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation." Clin Exp Allergy **38**(2): 338-349.

Chan, C. C., C. J. Liou, P. Y. Xu, J. J. Shen, M. L. Kuo, W. B. Len, L. E. Chang and W. C. Huang (2013). "Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse." J Dermatol Sci **72**(2): 149-157.

Chan, M. M. and A. R. Moore (2010). "Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production." J Immunol **184**(11): 6418-6426.

Chang, D. M., J. L. Lan, H. Y. Lin and S. F. Luo (2002). "Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **46**(11): 2924-2927.

Chen, L. and D. B. Flies (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." Nat Rev Immunol **13**(4): 227-242.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.

Cheng, G. F. and J. Tseng (2000). "Regulation of murine interleukin-10 production by dehydroepiandrosterone." J Interferon Cytokine Res **20**(5): 471-478.

Cho, J. H. (2008). "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **8**(6): 458-466.

Chrousos, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation." N Engl J Med **332**(20): 1351-1362.

Conway, K. L., G. Goel, H. Sokol, M. Manocha, E. Mizoguchi, C. Terhorst, A. K. Bhan, A. Gardet and R. J. Xavier (2012). "p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation." J Immunol **189**(7): 3631-3640.

Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-1151.

D'Attilio, L., V. V. Bozza, N. Santucci, B. Bongiovanni, G. Didoli, S. Radcliffe, H. Besedovsky, A. del Rey, O. Bottasso and M. L. Bay (2012). "TGF-beta neutralization abrogates the inhibited DHEA production mediated by factors released from M. tuberculosis-stimulated PBMC." Ann N Y Acad Sci **1262**: 1-9.

de la Torre, B., M. Hedman and R. Befrits (1998). "Blood and tissue dehydroepiandrosterone sulphate levels and their relationship to chronic inflammatory bowel disease." Clin Exp Rheumatol **16**(5): 579-582.

Dignass, A., R. Eliakim, F. Magro, C. Maaser, Y. Chowers, K. Geboes, G. Mantzaris, W. Reinisch, J. F. Colombel, S. Vermeire, S. Travis, J. O. Lindsay and G. Van Assche (2012). "Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis." J Crohns Colitis **6**(10): 965-990.

Dillon, J. S. (2005). "Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(3): 377-385.

Du, C., Q. Guan, M. W. Khalil and S. Sriram (2001). "Stimulation of Th2 response by high doses of dehydroepiandrosterone in KLH-primed splenocytes." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 1051-1060.

Du, C., M. W. Khalil and S. Sriram (2001). "Administration of dehydroepiandrosterone suppresses experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice." J Immunol **167**(12): 7094-7101.

Ebeling, P. and V. A. Koivisto (1994). "Physiological importance of dehydroepiandrosterone." Lancet **343**(8911): 1479-1481.

Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum and G. P. Vinson (1998). "Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis." Endocr Rev **19**(2): 101-143.

Endoh, A., S. B. Kristiansen, P. R. Casson, J. E. Buster and P. J. Hornsby (1996). "The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase." J Clin Endocrinol Metab **81**(10): 3558-3565.

Espallergues, J., T. Mamiya, M. Vallee, T. Koseki, T. Nabeshima, J. Temsamani, C. Laruelle and T. Maurice (2012). "The antidepressant-like effects of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane in mice is related to changes in neuroactive steroid and monoamine levels." Neuropharmacology **62**(1): 492-502.

Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis and C. Benoist (2009). "Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes." Nat Immunol **10**(7): 689-695.

Fu, W., A. Ergun, T. Lu, J. A. Hill, S. Haxhinasto, M. S. Fasset, R. Gazit, S. Adoro, L. Glimcher, S. Chan, P. Kastner, D. Rossi, J. J. Collins, D. Mathis and C. Benoist (2012). "A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells." Nat Immunol **13**(10): 972-980.

Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba and Y. Fujiyama (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.

Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase and H. Ohno (2013). "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." Nature.

Fuss, I. J., F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, P. Mannon and W. Strober (2004). "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." J Clin Invest **113**(10): 1490-1497.

Geboes, K. (1994). "From inflammation to lesion." Acta Gastroenterol Belg **57**(5-6): 273-284.

Gentilini, M. V., L. N. Velasquez, P. Barrionuevo, P. C. Arriola Benitez, G. H. Giambartolomei and M. V. Delpino (2015). "Adrenal steroids modulate the immune response during *Brucella abortus* infection by a mechanism that depends on the regulation of cytokine production." Infect Immun **83**(5): 1973-1982.

Gerova, V. A., S. G. Stoyanov, D. S. Katsarov and D. A. Svinarov (2011). "Increased intestinal permeability in inflammatory bowel diseases assessed by iohexol test." World J Gastroenterol **17**(17): 2211-2215.

Globig, A. M., N. Hennecke, B. Martin, M. Seidl, G. Ruf, P. Hasselblatt, R. Thimme and B. Bengsch (2014). "Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN-gamma+IL-17+coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **20**(12): 2321-2329.

Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, L. Rico, D. Buscher and M. Delgado (2009). "Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses." Gastroenterology **136**(3): 978-989.

Grisham, M. B. (1994). "Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease." Lancet **344**(8926): 859-861.

Halme, L., P. Paavola-Sakki, U. Turunen, M. Lappalainen, M. Farkkila and K. Kontula (2006). "Family and twin studies in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **12**(23): 3668-3672.

Hanley, N. A. and W. Arlt (2006). "The human fetal adrenal cortex and the window of sexual differentiation." Trends Endocrinol Metab **17**(10): 391-397.

Hart, A. L., H. O. Al-Hassi, R. J. Rigby, S. J. Bell, A. V. Emmanuel, S. C. Knight, M. A. Kamm and A. J. Stagg (2005). "Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **129**(1): 50-65.

Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, J. Mankertz, A. H. Gitter, N. Burgel, M. Fromm, M. Zeitz, I. Fuss, W. Strober and J. D. Schulzke (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." Gastroenterology **129**(2): 550-564.

Hendrickson, B. A., R. Gokhale and J. H. Cho (2002). "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease." Clin Microbiol Rev **15**(1): 79-94.

Hold, G. L., M. Smith, C. Grange, E. R. Watt, E. M. El-Omar and I. Mukhopadhyaya (2014). "Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years?" World J Gastroenterol **20**(5): 1192-1210.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Huang, Y. L., C. Chassard, M. Hausmann, M. von Itzstein and T. Hennot (2015). "Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice." Nat Commun **6**: 8141.

Iboshi, Y., K. Nakamura, E. Ihara, T. Iwasa, H. Akiho, N. Harada, M. Nakamuta and R. Takayanagi (2014). "Multigene analysis unveils distinctive expression profiles of helper T-cell-related genes in the intestinal mucosa that discriminate between ulcerative colitis and Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **20**(6): 967-977.

Iwakura, Y. and H. Ishigame (2006). "The IL-23/IL-17 axis in inflammation." J Clin Invest **116**(5): 1218-1222.

Jess, T., J. Simonsen, K. T. Jorgensen, B. V. Pedersen, N. M. Nielsen and M. Frisch (2012). "Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years." Gastroenterology **143**(2): 375-381 e371; quiz e313-374.

Jiang, H. and L. Chess (2004). "An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation." J Clin Invest **114**(9): 1198-1208.

Kalla, R., N. T. Ventham, J. Satsangi and I. D. Arnott (2014). "Crohn's disease." BMJ **349**: g6670.

Kamada, N., T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, A. Sakuraba, M. T. Kitazume, A. Sugita, K. Koganei, K. S. Akagawa and T. Hibi (2008). "Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis." J Clin Invest **118**(6): 2269-2280.

Kiesslich, R., C. A. Duckworth, D. Moussata, A. Gloeckner, L. G. Lim, M. Goetz, D. M. Pritchard, P. R. Galle, M. F. Neurath and A. J. Watson (2012). "Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease." Gut **61**(8): 1146-1153.

Kim, J. J., M. S. Shajib, M. M. Manocha and W. I. Khan (2012). "Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD." J Vis Exp(60).

Kim, J. M., J. P. Rasmussen and A. Y. Rudensky (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." Nat Immunol **8**(2): 191-197.

Kitoh, A., M. Ono, Y. Naoe, N. Ohkura, T. Yamaguchi, H. Yaguchi, I. Kitabayashi, T. Tsukada, T. Nomura, Y. Miyachi, I. Taniuchi and S. Sakaguchi (2009). "Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells." Immunity **31**(4): 609-620.

Koenders, M. I., E. Lubberts, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, M. M. Helsen, J. K. Kolls, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2005). "Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1." Arthritis Rheum **52**(3): 975-983.

Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**(4): 467-476.

Koslowski, M. J., J. Beisner, E. F. Stange and J. Wehkamp (2010). "Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease." Int J Med Microbiol **300**(1): 34-40.

Kozuch, P. L. and S. B. Hanauer (2008). "Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy." World J Gastroenterol **14**(3): 354-377.

Krawisz, J. E., P. Sharon and W. F. Stenson (1984). "Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models." Gastroenterology **87**(6): 1344-1350.

Kroboth, P. D., F. S. Salek, R. A. Stone, R. J. Bertz and F. J. Kroboth, 3rd (1999). "Alprazolam increases dehydroepiandrosterone concentrations." J Clin Psychopharmacol **19**(2): 114-124.

Laroui, H., S. A. Ingersoll, H. C. Liu, M. T. Baker, S. Ayyadurai, M. A. Charania, F. Laroui, Y. Yan, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2012). "Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon." PLoS One **7**(3): e32084.

Lee, C. G., R. J. Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, J. M. Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, R. M. Senior and J. A. Elias (2001). "Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)." J Exp Med **194**(6): 809-821.

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

Levine, J. S. and R. Burakoff (2011). "Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease." Gastroenterol Hepatol (N Y) **7**(4): 235-241.

Li, M., P. Liang, Z. Li, Y. Wang, G. Zhang, H. Gao, S. Wen and L. Tang (2015). "Fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation have comparable effects on the re-establishment of mucosal barrier function in mice with intestinal dysbiosis." Front Microbiol **6**: 692.

Li, W. J., L. P. Tang, Y. Xiong, W. P. Chen, X. D. Zhou, Q. H. Ding and L. D. Wu (2014). "A possible mechanism in DHEA-mediated protection against osteoarthritis." Steroids **89**: 20-26.

Lichte, P., R. Pfeifer, B. E. Werner, P. Ewers, M. Tohidnezhad, T. Pufe, F. Hildebrand, H. C. Pape and P. Kobbe (2014). "Dehydroepiandrosterone modulates the inflammatory response in a bilateral femoral shaft fracture model." Eur J Med Res **19**: 27.

Lichtenstein, T., I. Dufait, A. Lanna, K. Breckpot and D. Escors (2012). "Modulating Co-Stimulation during Antigen Presentation to Enhance Cancer Immunotherapy." Immunol Endocr Metab Agents Med Chem **12**(3): 224-235.

Lim, W. C. and S. B. Hanauer (2004). "Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease." Rev Gastroenterol Disord **4**(2): 66-85.

Liston, A. and D. H. Gray (2014). "Homeostatic control of regulatory T cell diversity." Nat Rev Immunol **14**(3): 154-165.

Littman, D. R. and A. Y. Rudensky (2010). "Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation." Cell **140**(6): 845-858.

Liu, Z. and L. Lefrancois (2004). "Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response." J Immunol **173**(7): 4324-4330.

Luan, Y. Y., C. F. Yin, Q. H. Qin, N. Dong, X. M. Zhu, Z. Y. Sheng, Q. H. Zhang and Y. M. Yao (2015). "Effect of Regulatory T Cells on Promoting Apoptosis of T Lymphocyte and Its Regulatory Mechanism in Sepsis." J Interferon Cytokine Res **35**(12): 969-980.

Lv, Q. K., J. X. Liu, S. N. Li, Y. J. Gao, Y. Lv, Z. P. Xu, B. X. Huang, S. Y. Xu, D. X. Yang, Y. L. Zeng, D. F. Liu and W. Wang (2015). "Mycophenolate Mofetil Modulates Differentiation of Th1/Th2 and the Secretion of Cytokines in an Active Crohn's Disease Mouse Model." Int J Mol Sci **16**(11): 26654-26666.

Majewska, M. D. (1995). "Neuronal actions of dehydroepiandrosterone. Possible roles in brain development, aging, memory, and affect." Ann N Y Acad Sci **774**: 111-120.

Martins, N. B. and M. A. Peppercorn (2004). "Inflammatory bowel disease." Am J Manag Care **10**(8): 544-552.

McDermott, J. R., N. E. Humphreys, S. P. Forman, D. D. Donaldson and R. K. Grencis (2005). "Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection." J Immunol **175**(5): 3207-3213.

Mielke, L. A., S. A. Jones, M. Raverdeau, R. Higgs, A. Stefanska, J. R. Groom, A. Misiak, L. S. Dungan, C. E. Sutton, G. Streubel, A. P. Bracken and K. H. Mills (2013). "Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by gammadelta T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation." J Exp Med **210**(6): 1117-1124.

Miller, W. L. and R. J. Auchus (2011). "The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders." Endocr Rev **32**(1): 81-151.

Minguet, S., M. Huber, L. Rosenkranz, W. W. Schamel, M. Reth and T. Brummer (2005). "Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors." Eur J Immunol **35**(1): 31-41.

Molodecky, N. A., I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema and G. G. Kaplan (2012). "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." Gastroenterology **142**(1): 46-54 e42; quiz e30.

Monteleone, G., L. Biancone, R. Marasco, G. Morrone, O. Marasco, F. Luzzza and F. Pallone (1997). "Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells." Gastroenterology **112**(4): 1169-1178.

Monteleone, G., I. Monteleone, D. Fina, P. Vavassori, G. Del Vecchio Blanco, R. Caruso, R. Tersigni, L. Alessandroni, L. Biancone, G. C. Naccari, T. T. MacDonald and F. Pallone (2005). "Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease." Gastroenterology **128**(3): 687-694.

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.

Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.

Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano and Y. Iwakura (2002). "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses." Immunity **17**(3): 375-387.

Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo and Y. Iwakura (2003). "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice." J Immunol **171**(11): 6173-6177.

Neuman, M. G. (2007). "Immune dysfunction in inflammatory bowel disease." Transl Res **149**(4): 173-186.

Neurath, M. F. (2014). "Cytokines in inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **14**(5): 329-342.

Ng, S. C., W. Tang, J. Y. Ching, M. Wong, C. M. Chow, A. J. Hui, T. C. Wong, V. K. Leung, S. W. Tsang, H. H. Yu, M. F. Li, K. K. Ng, M. A. Kamm, C. Studd, S. Bell, R. Leong, H. J. de Silva, A. Kasturiratne, M. N. Mufeen, K. L. Ling, C. J. Ooi, P. S. Tan, D. Ong, K. L. Goh, I. Hilmi, P. Pisespong, S. Manatsathit, R. Rerknimitr, S. Aniwan, Y. F. Wang, Q. Ouyang, Z. Zeng, Z. Zhu, M. H. Chen, P. J. Hu, K. Wu, X. Wang, M. Simadibrata, M. Abdullah, J. C. Wu, J. J. Sung and F. K. Chan (2013). "Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study." Gastroenterology **145**(1): 158-165 e152.

Nieschlag, E. and E. Vorona (2015). "Doping with anabolic androgenic steroids (AAS): Adverse effects on non-reproductive organs and functions." Rev Endocr Metab Disord.

Nieschlag, E. and E. Vorona (2015). "MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions." Eur J Endocrinol **173**(2): R47-58.

Norman, K., H. Kirchner, H. Lochs and M. Pirlich (2006). "Malnutrition affects quality of life in gastroenterology patients." World J Gastroenterol **12**(21): 3380-3385.

Oberbeck, R., H. Deckert, J. Bangen, P. Kobbe and D. Schmitz (2007). "Dehydroepiandrosterone: a modulator of cellular immunity and heat shock protein 70 production during polymicrobial sepsis." Intensive Care Med **33**(12): 2207-2213.

Oberbeck, R., E. Nickel, M. von Griensven, T. Tschernig, T. Wittwer, D. Schmitz and H. C. Pape (2002). "The effect of dehydroepiandrosterone on hemorrhage-induced suppression of cellular immune function." Intensive Care Med **28**(7): 963-968.

Ortega-Calderon, Y. N. and R. Lopez-Marure (2014). "Dehydroepiandrosterone inhibits proliferation and suppresses migration of human cervical cancer cell lines." Anticancer Res **34**(8): 4039-4044.

Ott, S. J., M. Musfeldt, D. F. Wenderoth, J. Hampe, O. Brant, U. R. Folsch, K. N. Timmis and S. Schreiber (2004). "Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease." Gut **53**(5): 685-693.

Otterness, D. M. and R. Weinshilboum (1994). "Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase: molecular cloning of cDNA and genomic DNA." Chem Biol Interact **92**(1-3): 145-159.

Parente, J. M., C. S. Coy, V. Campelo, M. P. Parente, L. A. Costa, R. M. da Silva, C. Stephan and J. M. Zeitune (2015). "Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil." World J Gastroenterol **21**(4): 1197-1206.

Parronchi, P., P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli and S. Romagnani (1997). "Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease." Am J Pathol **150**(3): 823-832.

Pelissier, M. A., C. Muller, M. Hill and R. Morfin (2006). "Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat." Steroids **71**(3): 240-248.

Pelissier, M. A., C. Trap, M. I. Malewiak and R. Morfin (2004). "Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver." Steroids **69**(2): 137-144.

Petri, M. A., R. G. Lahita, R. F. Van Vollenhoven, J. T. Merrill, M. Schiff, E. M. Ginzler, V. Strand, A. Kunz, K. J. Gorelick, K. E. Schwartz and G. L. S. Group (2002). "Effects of prasterone on corticosteroid requirements of women with systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **46**(7): 1820-1829.

Petri, M. A., P. J. Mease, J. T. Merrill, R. G. Lahita, M. J. Iannini, D. E. Yocum, E. M. Ginzler, R. S. Katz, O. S. Gluck, M. C. Genovese, R. Van Vollenhoven, K. C. Kalunian, S. Manzi, M. W. Greenwald, J. P. Buyon, N. J. Olsen, M. H. Schiff, A. F. Kavanaugh, J. R. Caldwell, R. Ramsey-Goldman, E. W. St Clair, A. L. Goldman, R. M. Egan, R. P. Polisson, K. G. Moder, N. F. Rothfield, R. T. Spencer, K. Hobbs, B. J. Fessler, L. H. Calabrese, L. W. Moreland, S. B. Cohen, B. J. Quarles, V. Strand, M. Gurwith and K. E. Schwartz (2004). "Effects of prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **50**(9): 2858-2868.

Plassart-Schiess, E. and E. E. Baulieu (2001). "Neurosteroids: recent findings." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 133-140.

Plesko, S., M. Banic, V. Plecko, B. Anic, T. Brkic, H. Renata and I. Rotkvic (2010). "Effect of azithromycin on acute inflammatory lesions and colonic bacterial load in a murine model of experimental colitis." Dig Dis Sci **55**(8): 2211-2218.

Powell, J. M. and G. Sonnenfeld (2006). "The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production." J Interferon Cytokine Res **26**(1): 34-39.

Poynter, M. E. and R. A. Daynes (1998). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging." J Biol Chem **273**(49): 32833-32841.

Pratschke, S., V. von Dossow-Hanfstingl, J. Dietz, C. P. Schneider, A. Tufman, M. Albertsmeier, H. Winter and M. K. Angele (2014). "Dehydroepiandrosterone modulates T-cell response after major abdominal surgery." J Surg Res **189**(1): 117-125.

Rani, R., A. G. Smulian, D. R. Greaves, S. P. Hogan and D. R. Herbert (2011). "TGF-beta limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function." Eur J Immunol **41**(7): 2000-2009.

Rearte, B., A. Maglioco, D. Machuca, D. M. Greco, V. I. Landoni, N. Rodriguez-Rodrigues, R. Meiss, G. C. Fernandez and M. A. Isturiz (2013). "Dehydroepiandrosterone and metyrapone partially restore the adaptive humoral and cellular immune response in endotoxin immunosuppressed mice." Innate Immun **20**(6): 585-597.

Rescigno, M. and A. Di Sabatino (2009). "Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease." J Clin Invest **119**(9): 2441-2450.

Rijnierse, A., A. S. Koster, F. P. Nijkamp and A. D. Kraneveld (2006). "Critical role for mast cells in the pathogenesis of 2,4-dinitrobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction." J Immunol **176**(7): 4375-4384.

Rodriguez-Moranta, F., A. Soriano-Izquierdo and J. Guardiola (2007). "[Current status of treatment of inflammatory bowel disease]." Cir Esp **82**(5): 254-259.

Rubtsov, Y. P., R. E. Niec, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist and A. Y. Rudensky (2010). "Stability of the regulatory T cell lineage in vivo." Science **329**(5999): 1667-1671.

Rudra, D., P. deRoos, A. Chaudhry, R. E. Niec, A. Arvey, R. M. Samstein, C. Leslie, S. A. Shaffer, D. R. Goodlett and A. Y. Rudensky (2012). "Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network." Nat Immunol **13**(10): 1010-1019.

Rugtveit, J., P. Brandtzaeg, T. S. Halstensen, O. Fausa and H. Scott (1994). "Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes." Gut **35**(5): 669-674.

Rugtveit, J., G. Haraldsen, A. K. Hogasen, A. Bakka, P. Brandtzaeg and H. Scott (1995). "Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells." Gut **37**(3): 367-373.

Rugtveit, J., E. M. Nilsen, A. Bakka, H. Carlsen, P. Brandtzaeg and H. Scott (1997). "Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease." Gastroenterology **112**(5): 1493-1505.

Russel, M. G. and R. W. Stockbrugger (1996). "Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update." Scand J Gastroenterol **31**(5): 417-427.

Rutkowski, K., P. Sowa, J. Rutkowska-Talipska, A. Kuryliszyn-Moskal and R. Rutkowski (2014). "Dehydroepiandrosterone (DHEA): hypes and hopes." Drugs **74**(11): 1195-1207.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.

Sales-Campos, H., P. J. Basso, V. B. Alves, M. T. Fonseca, G. Bonfa, V. Nardini and C. R. Cardoso (2015). "Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases." Braz J Med Biol Res **48**(2): 96-107.

Sales-Campos, H., P. R. de Souza, P. J. Basso, A. D. Ramos, V. Nardini, J. E. Chica, M. L. Capurro, A. Sa-Nunes and C. R. de Barros Cardoso (2015). "Aedes aegypti salivary gland extract ameliorates experimental inflammatory bowel disease." Int Immunopharmacol **26**(1): 13-22.

Santos, C. D., M. P. Toldo, F. H. Santello, V. Filipin Mdel, V. Brazao and J. C. do Prado Junior (2008). "Dehydroepiandrosterone increases resistance to experimental infection by Trypanosoma cruzi." Vet Parasitol **153**(3-4): 238-243.

Savineau, J. P., R. Marthan and E. Dumas de la Roque (2013). "Role of DHEA in cardiovascular diseases." Biochem Pharmacol **85**(6): 718-726.

Sawalha, A. H. and S. Kovats (2008). "Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus." Curr Rheumatol Rep **10**(4): 286-291.

Schmitz, D., P. Kobbe, A. Wegner, F. Hammes and R. Oberbeck (2010). "Dehydroepiandrosterone modulates survival and immune functions during sepsis depending on the way of drug administration." Med Chem **6**(4): 229-232.

Schmitz, D., S. Lendemans and R. Oberbeck (2014). "Androstenediol modulates sepsis induced alterations of survival and immune functions in a murine model of sepsis." Med Chem **10**(2): 137-143.

Schreiber, S. (2000). "Inflammatory bowel disease: immunologic concepts." Hepatogastroenterology **47**(31): 15-28.

Selby, W. S., L. W. Poulter, S. Hobbs, D. P. Jewell and G. Janossy (1983). "Heterogeneity of HLA-DR-positive histiocytes in human intestinal lamina propria: a combined histochemical and immunohistological analysis." J Clin Pathol **36**(4): 379-384.

Sepulveda, S. E., C. J. Beltran, A. Peralta, P. Rivas, N. Rojas, C. Figueroa, R. Quera and M. A. Hermoso (2008). "[Inflammatory bowel diseases: an immunological approach]." Rev Med Chil **136**(3): 367-375.

Simoncini, T., P. Mannella, L. Fornari, G. Varone, A. Caruso and A. R. Genazzani (2003). "Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms." Endocrinology **144**(8): 3449-3455.

Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor and L. E. Smythies (2005). "Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system." Immunol Rev **206**: 149-159.

Soderholm, J. D., G. Olaison, K. H. Peterson, L. E. Franzen, T. Lindmark, M. Wiren, C. Tagesson and R. Sjolahl (2002). "Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease." Gut **50**(3): 307-313.

Spits, H. and T. Cupedo (2012). "Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function." Annu Rev Immunol **30**: 647-675.

Spits, H. and J. P. Di Santo (2011). "The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling." Nat Immunol **12**(1): 21-27.

Strath, M., D. J. Warren and C. J. Sanderson (1985). "Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors." J Immunol Methods **83**(2): 209-215.

Straub, R. H., D. Vogl, V. Gross, B. Lang, J. Scholmerich and T. Andus (1998). "Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **93**(11): 2197-2202.

Strober, W., I. Fuss and P. Mannon (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." J Clin Invest **117**(3): 514-521.

Strott, C. A. (2002). "Sulfonation and molecular action." Endocr Rev **23**(5): 703-732.

Sun, H. Z., T. W. Yang, W. J. Zang and S. F. Wu (2010). "Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NF κ B via PI3K/AKT signaling pathway." J Endocrinol **204**(3): 311-318.

Sundstrom, P., H. Stenstad, V. Langenes, F. Ahlmanner, L. Theander, T. G. Ndah, K. Fredin, L. Borjesson, B. Gustavsson, J. Bastid and M. Quiding-Jarbrink (2016). "Regulatory T Cells from Colon Cancer Patients Inhibit Effector T-cell Migration through an Adenosine-Dependent Mechanism." Cancer Immunol Res.

Tagawa, N., E. Minamitani, Y. Yamaguchi and Y. Kobayashi (2011). "Alternative mechanism for anti-obesity effect of dehydroepiandrosterone: possible contribution of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in rodent adipose tissue." Steroids **76**(14): 1546-1553.

Tchernof, A. and F. Labrie (2004). "Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies." Eur J Endocrinol **151**(1): 1-14.

Thia, K. T., E. V. Loftus, Jr., W. J. Sandborn and S. K. Yang (2008). "An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia." Am J Gastroenterol **103**(12): 3167-3182.

Thiesen, S., S. Janciauskiene, H. Uronen-Hansson, W. Agace, C. M. Hogerkorp, P. Spee, K. Hakansson and O. Grip (2014). "CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease." J Leukoc Biol **95**(3): 531-541.

Tsironi, E., R. M. Feakins, C. S. Probert, D. S. Rampton and D. Phil (2004). "Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom." Am J Gastroenterol **99**(9): 1749-1755.

Turley, S. J., A. L. Fletcher and K. G. Elpek (2010). "The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs." Nat Rev Immunol **10**(12): 813-825.

Turnbull, A. V. and C. L. Rivier (1999). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action." Physiol Rev **79**(1): 1-71.

Ueno, A., A. Ghosh, D. Hung, J. Li and H. Jijon (2015). "Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **21**(43): 12283-12295.

Van Assche, G., A. Dignass, J. Panes, L. Beaugerie, J. Karagiannis, M. Allez, T. Ochsenkuhn, T. Orchard, G. Rogler, E. Louis, L. Kupcinkas, G. Mantzaris, S. Travis and E. Stange (2010). "The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis." J Crohns Colitis **4**(1): 7-27.

van Crevel, R., E. Karyadi, F. Preyers, M. Leenders, B. J. Kullberg, R. H. Nelwan and J. W. van der Meer (2000). "Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities." J Infect Dis **181**(3): 1194-1197.

van Nood, E., A. Vrieze, M. Nieuwdorp, S. Fuentes, E. G. Zoetendal, W. M. de Vos, C. E. Visser, E. J. Kuijper, J. F. Bartelsman, J. G. Tijssen, P. Speelman, M. G. Dijkgraaf and J. J. Keller (2013). "Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*." N Engl J Med **368**(5): 407-415.

van Vollenhoven, R. F., E. G. Engleman and J. L. McGuire (1994). "An open study of dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **37**(9): 1305-1310.

van Vollenhoven, R. F., E. G. Engleman and J. L. McGuire (1995). "Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial." Arthritis Rheum **38**(12): 1826-1831.

van Vollenhoven, R. F., L. M. Morabito, E. G. Engleman and J. L. McGuire (1998). "Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months." J Rheumatol **25**(2): 285-289.

van Vollenhoven, R. F., J. L. Park, M. C. Genovese, J. P. West and J. L. McGuire (1999). "A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus." Lupus **8**(3): 181-187.

Vargas Robles, H., A. F. Citalan Madrid, A. Garcia Ponce, A. Silva Olivares, M. Shibayama, A. Betanzos, L. Del Valle Mondragon, P. Nava and M. Schnoor (2016). "Experimental Colitis Is Attenuated by Cardioprotective Diet Supplementation That Reduces Oxidative Stress, Inflammation, and Mucosal Damage." Oxid Med Cell Longev **2016**: 8473242.

Vendemiale, G., I. Grattagliano and E. Altomare (1999). "An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease." Int J Clin Lab Res **29**(2): 49-55.

Victoria, C. R., L. Y. Sassak and H. R. Nunes (2009). "Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil." Arg Gastroenterol **46**(1): 20-25.

Vieth, M. and A. Tannapfel (2006). "New pieces of the pathogenetic mosaic in inflammatory bowel disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **18**(2): 123-124.

Walker, A. W., J. D. Sanderson, C. Churcher, G. C. Parkes, B. N. Hudspith, N. Rayment, J. Brostoff, J. Parkhill, G. Dougan and L. Petrovska (2011). "High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease." BMC Microbiol **11**: 7.

Warner, M. and J. A. Gustafsson (2015). "DHEA - a precursor of ERbeta ligands." J Steroid Biochem Mol Biol **145**: 245-247.

Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli and K. M. Murphy (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." Immunity **24**(6): 677-688.

Weaver, C. T. and R. D. Hatton (2009). "Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective." Nat Rev Immunol **9**(12): 883-889.

Wolf, O. T. and C. Kirschbaum (1999). "Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans." Brain Res Brain Res Rev **30**(3): 264-288.

Wong, S. and S. Ng (2013). "What Can We Learn From Inflammatory Bowel Disease in Developing Countries?" Current Gastroenterology Reports **15**(3): 1-9.

Xu, L., L. Ma, J. Lian, J. Yang and S. Chen (2016). "Gene expression alterations in inflamed and unaffected colon mucosa from patients with mild inflammatory bowel disease." Mol Med Rep.

Yan, H., H. Wang, X. Zhang, X. Li and J. Yu (2015). "Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice." Int J Clin Exp Med **8**(11): 20245-20253.

Yan, Y., V. Kolachala, G. Dalmasso, H. Nguyen, H. Laroui, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2009). "Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis." PLoS One **4**(6): e6073.

Yang, S. K., M. S. Choi, O. H. Kim, S. J. Myung, H. Y. Jung, W. S. Hong, J. H. Kim and Y. I. Min (2002). "The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids." Am J Gastroenterol **97**(1): 126-132.

Zeckey, C., F. Hildebrand, P. Hoevel, K. Muller, C. Krettek, T. Barkhausen and M. van Griensven (2010). "Activity of lymphocyte subpopulations in polymicrobial sepsis and DHEA treatment in IL-6 knockout mice." J Innate Immun **2**(5): 469-477.

Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens and R. A. Flavell (2008). "Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease." Immunity **29**(6): 947-957.

Zerradi, M., J. Dereumetz, M. M. Boulet and A. Tchernof (2014). "Androgens, body fat Distribution and Adipogenesis." Curr Obes Rep **3**(4): 396-403.

Zhu, J. (2010). "Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation." Immunol Cell Biol **88**(3): 244-249.

Anexo

ANEXO-1: Certificado da comissão de ética em experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.1362.53.9), intitulado "Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na inflamação intestinal experimental", de autoria de **Vanessa Beatriz Freitas Alves e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 31/03/2014.

Colaboradores:

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.1362.53.9), entitled: "Estudo do potencial imunomodulador de Dehidroepiandrosterona (DHEA) na inflamação intestinal experimental", by **Vanessa Beatriz Freitas Alves and Cristina Ribeiro de Barros Cardoso** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, March, 31 2014.

Ribeirão Preto, 04 de Abril de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
 Presidente da CEUA

João Fernando Velho de Andrade Diniz
 Auxiliar da Secretaria da CEUA