UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da melatonina no controle da colite experimental,
via modulação da microbiota intestinal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientada: Lia Vezenfard Barbosa

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

RESUMO

VEZENFARD-BARBOSA, Lia. **Efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal.** 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As Doenças Inflamatórias Intestinais resultam de resposta imune desregulada, com o envolvimento da microbiota intestinal, susceptibilidade genética e fatores ambientais, promovendo inflamação crônica e ampla destruição tecidual. Estudos recentes descrevem efeitos do hormônio melatonina (MLT) em doenças inflamatórias, controlando as respostas imunes. Além da ação da MLT sobre o ritmo circadiano de humanos, a molécula pode também modular o ciclo de bactérias intestinais e exercer ação imunomoduladora. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do tratamento com MLT na colite experimental, tanto na fase aguda de indução da inflamação, quanto no período de remissão e reparo tecidual. Além disso, buscamos verificar se a presença da microbiota intestinal modifica a resposta inflamatória frente ao tratamento com o hormônio. Para isso, camundongos machos C57BL/6 foram expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) e tratados com MLT. Em animais avaliados durante a fase aguda, a MLT promoveu aumento do escore clínico, maior número de leucócitos, especificamente, células mononucleares e neutrófilos, no sangue periférico. No cólon, foi observado aumento de fator de necrose tumoral (TNF), em contraste à redução de interleucina 17 (IL-17). Em camundongos avaliados durante a fase de reparo da colite, a MLT levou à maior perda de peso corporal, elevado escore clínico, maior número de células mononucleares e neutrófilos circulantes. Houve maior recrutamento de neutrófilos e macrófagos no cólon, quantificada indiretamente pelos ensaios de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente. O hormônio promoveu também expressivo aumento de TNF, maior frequência de linfócitos T CD4 ou CD8 de memória efetores e redução da população de células T reguladoras FoxP3⁺ no baço, além de aumento de linfócitos T CD4 de memória residente nos linfonodos mesentéricos (MLN), na fase de remissão da inflamação. Para averiguar se os efeitos da MLT ocorriam via microbiota intestinal, os camundongos foram submetidos à antibioticoterapia previamente à indução da colite. De fato, os resultados mostraram que os animais tratados com o hormônio, na ausência da microbiota intestinal, apresentaram reversão do fenótipo clínico da doença, em comparação com a fase aguda e remissão da colite. O tratamento com MLT induziu menor perda de peso e escore clínico, além de redução do número de células mononucleares no sangue periférico. No cólon, houve redução de TNF e NAG, enquanto que nos linfonodos mesentéricos, foi observado aumento de células produtoras das citocinas IL-4 e IL-10, em contraste à redução de CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ na ausência de antibioticoterapia. As populações de linfócitos de memória não foram mais alteradas em animais com depleção da microbiota. Em ensaios *ex vivo*, linfócitos do baço e MLN de camundongos sem depleção da microbiota apresentaram maior proliferação celular em relação à frequência proliferativa após a antibioticoterapia. Esses resultados corroboram com os efeitos do hormônio via microbiota intestinal. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a MLT agrava a colite experimental, tanto na fase aguda quanto na remissão da inflamação, sendo seus principais efeitos dependentes da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias Intestinais. Melatonina. Microbiota Intestinal.

ABSTRACT

VEZENFARD-BARBOSA, Lia. **Effects of melatonin in the control of experimental colitis, via modulation of the intestinal microbiota.** 2020. 85p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Inflammatory Bowel Diseases result from an unregulated immune response, with the involvement of intestinal microbiota, genetic susceptibility and environmental factors, which together promote chronic inflammation and extensive tissue destruction. Recent studies described the effects of the hormone melatonin (MLT) in inflammatory diseases, controlling immune responses. In addition to the action of MLT on the circadian rhythm of humans, this molecule can also modulate the cycle of intestinal bacteria and exert an immunomodulatory action. In this regard, the aim of this study was to evaluate the influence of MLT treatment on experimental colitis, in the acute phase of inflammation as well as during disease remission and tissue repair. In addition, we investigated the role of the intestinal microbiota in the MLT's modulation of the gut inflammatory response. For that, male C57BL/6 mice were exposed to dextran sulfate sodium (DSS) and treated with melatonin (MLT). In animals evaluated during the acute phase, MLT promoted increased clinical score, besides augmented number of mononuclear cells and neutrophils in the peripheral blood. We also detected a high concentration of tumor necrosis factor (TNF) and reduced interleukin 17 (IL-17) in the colon. During the remission of inflammation, MLT induced greater loss of body weight, increased clinical score and elevated number of leukocytes in the bloodstream, represented by mononuclear cells and neutrophils. Furthermore, there was augmented activity of neutrophils and macrophages in the colon, as detected by myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglycosaminidase (NAG) assays, respectively. The hormone also promoted a significant increase in TNF and in the frequency of effector memory T lymphocytes, along with reduced FoxP3⁺ regulatory T cells in the spleen. In addition, there was an increase in resident memory T CD4 lymphocytes in the mesenteric lymph nodes (MLN), during remission phase. However, in the absence of intestinal microbiota, the inflammatory effects of MLT were milder and mice had a reversal of the disease phenotype. The treatment reduced body weight loss and clinical score. Also, MLT after antibiotic therapy led to a decrease in the number of mononuclear cells in the peripheral blood and to reduced TNF and NAG in the colon. In the mesenteric lymph nodes we observed an increase in cells producing IL-4 and IL-10 cytokines, in contrast to the reduction in CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ lymphocytes in mice with colitis and in the absence of antibiotic therapy. The memory lymphocyte populations were no longer altered in animals with microbiota depletion. *Ex vivo* assays with lymphocytes from spleen and MLN of colitis mice treated with MLT showed augmented cell proliferation in contrast to the proliferative frequency after antibiotic therapy. These results corroborate the effects of the hormone via intestinal microbiota. In conclusion, our results showed that MLT aggravates experimental colitis, both in the acute phase and in the remission of inflammation and its main effects depend on the intestinal microbiota.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Melatonin. Intestinal Microbiota.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais

Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são caracterizadas por desordens que cursam com inflamação crônica no trato gastrointestinal e perturbação em seu funcionamento normal. A Doença de Crohn (CD) e Colite Ulcerativa (UC) são as principais formas definidas, denominadas DII (1). Os sinais clínicos são variáveis e dependentes da extensão e gravidade das lesões. Ambas apresentam sintomas como dores abdominais, diarreia recorrente, presença de sangue nas fezes, perda de peso, febre e fadiga, além do aumento do risco de câncer de cólon (2). As DII foram associadas também ao aumento da mortalidade devido às complicações da própria doença ou por patologias extra intestinais, como doenças cardiovasculares e pulmonares (3) além de câncer cólon-retal e do trato biliar (4, 5).

Cada doença possui também características específicas. Pacientes acometidos pela UC podem apresentar manifestações como irritação perianal, fissuras, hemorroidas, fistulas e abscessos (6). A UC cursa com inflamação contínua na região do cólon e reto, geralmente afetando apenas a camada mucosa da parede intestinal (7). Diferentemente, a CD pode levar à resposta inflamatória em qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus. Entretanto, afeta predominantemente a região do íleo (porção terminal do intestino delgado) e cólon (intestino grosso). A inflamação pode ocorrer de forma descontínua, sendo comum a presença de regiões saudáveis entre regiões acometidas pela doença. Além disso, pode afetar todas as camadas da parede do intestino. É frequentemente associada a complicações como estenoses, obstrução e fístulas entre segmentos intestinais ou com outros órgãos não conectados ao intestino (2, 8).

As DII acometem principalmente jovens-adultos e não possuem cura. Embora a maioria de novos diagnósticos sejam realizadas nessa faixa etária, estas enfermidades podem afetar indivíduos em qualquer idade, desde a infância até a idade senil (9, 10). O diagnóstico é estabelecido por uma combinação de fatores ao abordar diferentes aspectos da inflamação. Inicialmente são descartadas causas infecciosas. Para a identificação dessas doenças é analisado o histórico médico, realizada avaliação clínica, além de exames endoscópicos, histopatológicos e radiológicos (1).

A etiologia das DII não foi ainda esclarecida completamente; no entanto, evidências sugerem que são doenças de origem multifatorial. Sabe-se que ocorre a interação entre a desregulação das respostas imunes, susceptibilidade genética (11, 12), influência da microbiota intestinal, além do envolvimento de fatores ambientais (13), para o surgimento das doenças.

Em indivíduos saudáveis, a associação balanceada entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico promove a manutenção da tolerância imunológica, permitindo equilíbrio entre a indução de respostas efectoras a agentes patogênicos e tolerância a antígenos inócuos (14).

1.2. Epidemiologia

A ocorrência dessas desordens pode variar conforme a região geográfica, sendo que a maioria dos casos relatados são em países industrializados. Entretanto, durante as últimas décadas a incidência e a prevalência destas doenças aumentaram globalmente (10, 15). Estimativas futuras indicam aumento exponencial no número de casos em países desenvolvidos e recém-industrializados até 2025, demonstrando acometimento em pessoas de diversas regiões do mundo (10).

A exemplo do Brasil, no estado de São Paulo, a prevalência é de 52,6 casos para cada 100.000 indivíduos (16) e no Espírito Santo é de 38,2 casos/100.000 pessoas (17), enquanto que no estado do Piauí a prevalência é de 12,8 casos/100.000 indivíduos (18). Estes estudos populacionais indicam, além do aumento na incidência e prevalência das DII ao longo do tempo, um maior número de casos em regiões mais desenvolvidas do Brasil (19), o que corrobora os estudos mundiais.

1.3. Indução de colite experimental

Ainda que os modelos experimentais não reproduzam toda a complexidade das DII em humanos, são ferramentas de grande importância para investigação das mesmas. Diferentes modelos animais têm sido utilizados para a indução de colite experimental e proporcionar o estudo das alterações imunológicas em DII. Os modelos podem ser classificados em 4 categorias: modelos químicos, modelos geneticamente modificados, modelos de transferência de células e modelos congênitos (20).

Os modelos químicos de indução de colite intestinal em murinos são os mais utilizados devido ao possível controle do início, duração e intensidade da colite. Os modelos de indução por dextran sulfato de sódio (DSS), ácido trinitrobenzeno (TNBS) e oxazolona são bem estabelecidos e amplamente utilizados (21). Dentre estes, a colite induzida por DSS apresenta algumas vantagens devido à sua facilidade, controlabilidade e reprodutibilidade. Dependendo do objetivo do estudo, o desenvolvimento de colite aguda, crônica ou recidiva, pode ser controlada por meio da mudança de concentração e frequência de administração do DSS (22, 23).

O DSS é um polissacarídeo sulfatado solúvel em água. Possui peso molecular variável, de 5 a 1400 kDa, e para a indução de inflamação intestinal em camundongos, estes devem ser expostos a 40-50 kDa de DSS. A colite ocasionada por esse agente colitogênico é semelhante morfológica e sintomaticamente aos danos epiteliais encontrados na colite em humanos; no entanto, o DSS não induz diretamente a inflamação intestinal. O mecanismo pelo qual atua é através de sua toxicidade química ao atingir o cólon, o que resulta em lesão tecidual. Nesse sentido, há ruptura da monocamada de células epiteliais do intestino, favorecendo maior translocação bacteriana e antígenos associados à mucosa, promovendo uma resposta pró-inflamatória (23).

1.4. Resposta imune na doença inflamatória intestinal e o envolvimento da microbiota

Células do sistema inato existentes na mucosa intestinal expressam receptores que reconhecem e respondem rapidamente a antígenos microbianos presentes na parede celular bacteriana. A exposição contínua a esses antígenos promove a regulação da resposta imunológica, mantendo um equilíbrio entre tolerância e defesa do organismo. A ativação do sistema imune inato induz, em sequência, as respostas adaptativas. Há a regulação de subgrupos de linfócitos T (Th1, Th2, Th17 e Treg) para manutenção do equilíbrio. Falhas na homeostase intestinal, como a expansão e hiperatividade de células efectoras em contraste com deficiência de mecanismos reguladores levam à inflamação intestinal. A inflamação é caracterizada por reações exacerbadas direcionadas a antígenos próprios, derivados da microbiota e ambientais (14).

A microbiota intestinal de mamíferos é composta por uma comunidade que inclui bactérias, fungos, vírus e protozoários. Desses organismos, a maior parte são bactérias. No intestino de adultos saudáveis há mais bactérias que células no corpo humano, sendo aproximadamente 100 trilhões (24). Em camundongos, a maioria das bactérias intestinais pertence a 4 filos principais: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (25), enquanto em humanos os 2 filos principais são Bacteroidetes e Firmicutes (24).

A microbiota desempenha papel fundamental na indução, treinamento e função do sistema imunológico do hospedeiro, assim como no desenvolvimento de enfermidades. Pacientes acometidos por DII apresentam disbiose intestinal, ou seja, variações nas populações de bactérias, fungos e vírus presentes no intestino. Esta disbiose está relacionada ao desequilíbrio de microrganismos comensais e patogênicos no intestino (14). No trato gastrointestinal, as infecções de mucosa agudas são caracterizadas por disbiose. As bactérias comensais atuam na regulação do sistema imunológico, enquanto bactérias patogênicas causam

disfunções na imunidade por possuírem propriedades invasivas e inflamatórias. Dessa forma, a quebra da normobiose pode propiciar inflamação exacerbada e desenvolvimento de doenças.

Em decorrência da quebra da tolerância imunológica, as inflamações podem tornar-se crônicas, caracterizadas por exacerbado infiltrado de células imunes no tecido intestinal. Várias populações leucocitárias, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e linfócitos, participam da patogênese dessas doenças (2, 26). O acúmulo de células nos locais de inflamação contribui para o agravamento da lesão tecidual através da produção de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 23 (IL-23), interferon γ (IFN- γ) e citocinas da via IL-23/Th17, Th1, dentre outras (2). A produção de quimiocinas resulta no recrutamento de leucócitos adicionais, propiciando um ciclo de inflamação. Na doença de Crohn, a imunidade é mediada pelo perfil de resposta Th1, com aumento da produção de interleucina 12 (IL-12), IFN- γ e TNF. Em contraste, na colite ulcerativa, o perfil de resposta inflamatória é mediado por células Th2, com aumento na interleucina-13 (IL-13) e interleucina-4 (IL-4). Em ambas, há infiltrado inflamatório com padrão de resposta Th17, caracterizado pela produção de interleucinas 17A, 17F e 22 (27, 28).

1.5. Tratamentos para Doenças Inflamatórias Intestinais

No que concerne aos tratamentos, há um crescente aumento na quantidade e variedade de medicamentos que visam o controle e redução dos processos inflamatórios exacerbados presentes nestas doenças e, para a escolha da melhor abordagem terapêutica, é analisado o tipo de doença, as características individuais de cada paciente e os locais afetados (29). Embora os tratamentos para DII possam apresentar resultados promissores, estes medicamentos têm eficácia limitada e respostas variáveis, podendo culminar em resultados imprevisíveis. A terapia ideal deve reduzir a inflamação, induzir remissão clínica a longo prazo, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, além de não levar à imunossupressão exacerbada (30).

Geralmente, a escolha dos medicamentos ocorre por etapas (29) e podem incluir ácido aminosalicílico, corticosteroides, antibióticos, agentes imunossupressores e imunorreguladores, como os imunobiológicos (31-33). No entanto, pode haver efeitos colaterais significativos ou não responsividade pelos pacientes e, por essas razões, é importante identificar novas abordagens terapêuticas a fim de reduzir a inflamação crônica presente nestas doenças, sem prejudicar a resposta inflamatória fisiológica.

1.6. Melatonina

Pesquisas recentes vêm destacando o efeito do tratamento em conjunto com o hormônio melatonina (MLT) na modulação da resposta nas DII. Em 1958, a MLT foi isolada da glândula pineal bovina. Inicialmente foi identificada como um hormônio produzido exclusivamente pela glândula pineal e posteriormente foi descrita sua produção em órgãos não endócrinos, como nos olhos, pele, timo, medula óssea e trato gastrointestinal (34, 35). A MLT sintetizada pela glândula pineal é dependente da estimulação hipotalâmica e sua secreção diária é controlada pelo ritmo circadiano sincronizado ao ciclo claro/escuro, característico do dia e da noite. A secreção de MLT proveniente da pineal ocorre predominantemente no período noturno e sua síntese é inibida pela luz. Em contrapartida, a secreção de MLT por fontes extra pineais parece não estar relacionada ao fotoperíodo (36, 37).

É uma molécula presente em animais vertebrados e invertebrados, além de bactérias, algas, plantas e fungos (38-43). Por muito tempo, a MLT foi considerada apenas pela sua função no controle do ritmo circadiano dos organismos. Porém, ademais das funções cronobiológicas, estudos recentes ressaltam os importantes efeitos da MLT como anti-inflamatória, antioxidante, oncostática e imunomoduladora (44-47). Sua síntese ocorre a partir do triptofano e para sua produção é necessária a ação de algumas enzimas. Altas concentrações de MLT e a maquinaria enzimática essencial para sua catálise foi descrita em linfócitos humanos (48) e células da medula óssea de humanos e camundongos (49), além de ser encontrada em mastócitos (50), células NK, eosinófilos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e no timo (34, 51).

No trato gastrointestinal há altas concentrações de MLT oriunda de outras partes do organismo, além da síntese feita pelas células enterocromafins presentes no tecido intestinal (52-54). É interessante destacar que, no intestino, a quantidade de MTL encontrada é maior que os níveis em qualquer outro órgão, inclusive na glândula pineal, sugerindo efeitos fundamentais dessa molécula no trato gastrointestinal (36, 37).

A MLT tem capacidade de modular a resposta imune através de mecanismo diretos, por meio de sua interação com radicais livres, ou ação dependente de receptores. Há três tipos de receptores do hormônio, sendo os receptores de membrana, o receptor citosólico e os receptores nucleares. Os receptores de membrana, denominados MT1 e MT2, são acoplados à proteína G. Há um terceiro receptor de membrana para a MLT, o MT3, que não apresenta alta afinidade de ligação e a ação da MLT ocorre através da interação com a enzima quinona redutase (55). Os receptores nucleares para a MLT pertencem à família do receptor órfão do ácido retinoico (ROR) e receptor Z retinoico (RZR) (34). As células do sistema imune podem

responder à MLT por via indireta ou dependente de receptores de membrana e nucleares, regulando assim, respostas celulares e humorais (51, 55).

1.7. Melatonina em Doenças Inflamatórias Intestinais

Em referência às DII, há estudos controversos sobre o impacto do hormônio frente a inflamação intestinal. Resultados obtidos em modelos animais apontaram para o efeito benéfico da MLT, devido à redução dos sintomas e gravidade da doença (56-58). Nessa perspectiva, em um relato de caso foi destacado a menor recorrência de sintomas clínicos após uso do hormônio (3 mg/dia) em um paciente acometido por UC. No entanto, o mesmo efeito não foi observado em casos reportados por pacientes durante a remissão clínica da DC (59) e UC (60), quando houve recidiva da doença ativa após a autoadministração de cápsulas de MLT (3 mg/dia). Em ambos os casos, após o a suspensão do uso do hormônio, houve remissão completa dos sintomas. Ainda em uma investigação em ratos, a utilização da MLT resultou em efeitos benéficos no tratamento agudo, enquanto o tratamento crônico agravou a colite (61).

Além dos efeitos que a MLT pode exercer sobre as células do sistema imune na melhora ou piora da colite, estudos recentes sugerem que o microbioma intestinal também é influenciado pela ação de MLT. Foi relatado que pelo menos uma espécie de bactéria intestinal, a *Enterobacter aerogenes*, responde à MLT apresentando ritmo circadiano (62). O ciclo circadiano em vertebrados resulta da expressão rítmica de “*clock genes*” e o sistema gastrointestinal também apresenta a expressão desses genes em um padrão circadiano (63). É apontado ainda, que o relógio circadiano presente na microbiota intestinal é coordenado pelo relógio do hospedeiro, com envolvimento da MLT (62, 63).

1.8. Justificativa

As DII afetam milhares de pessoas em todo o mundo, são caracterizadas por inflamação crônica e ampla destruição tecidual. Essas desordens resultam de resposta imune desregulada, envolvendo fatores como susceptibilidade genética, microbiota intestinal e influências ambientais. Estudos controversos demonstraram os efeitos da MLT nas DII, com resultados benéficos e melhora da doença ou relatos de piora da inflamação. Portanto, a literatura atual é inconclusiva. A MLT está presente em diversos tecidos e órgãos, inclusive no trato gastrointestinal, podendo atuar modulando a inflamação. Ademais, estudos recentes, apontam para a ação do hormônio em bactérias intestinais de camundongos e humanos. Sabe-se também que alterações na microbiota intestinal desempenham importante papel na etiologia dessas afecções; entretanto, não é conhecido o efeito da MLT nas disbiose em modelos de colite

experimental. Portanto, é de extrema relevância estudos que visem avaliar os efeitos desse hormônio nas DII. Neste contexto, o presente trabalho visou esclarecer os efeitos da MLT durante a indução da colite e no momento de reparo da inflamação, após a retirada do agente colitogênico.

CONCLUSÕES

- A melatonina agravou a colite experimental durante a fase aguda da inflamação.
- A melatonina dificultou a remissão do processo inflamatório durante a fase de reparo tecidual.
- A MLT regula a resposta inflamatória via microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS

1. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7(10):827-51.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2066-78.
3. Olen O, Askling J, Sachs MC, Neovius M, Smedby KE, Ekblom A, et al. Mortality in adult-onset and elderly-onset IBD: a nationwide register-based cohort study 1964-2014. *Gut*. 2019.
4. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1097-104.
5. Jussila A, Virta LJ, Pukkala E, Farkkila MA. Mortality and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide register study in Finland. *J Crohns Colitis*. 2014;8(9):1088-96.
6. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):247-83.
7. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6(10):965-90.
8. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010;4(1):7-27.
9. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
10. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720-7.
11. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
12. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(4):564-71.
13. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. 2019;157(3):647-59 e4.
14. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.
15. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
16. Gasparini RG, Sasaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in Sao Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018;11:423-9.
17. Lima Martins A, Volpato RA, Zago-Gomes MDP. The prevalence and phenotype in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):87.
18. Parente JM, Coy CS, Campelo V, Parente MP, Costa LA, da Silva RM, et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1197-206.
19. Quaresma AB, Kaplan GG, Kotze PG. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019.
20. Bamias G, Arseneau KO, Cominelli F. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017;33(6):411-6.
21. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):154-70.
22. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2017;12(7):1295-309.

23. Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(33):6016-29.
24. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
25. Chung YW, Gwak HJ, Moon S, Rho M, Ryu JH. Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227886.
26. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
27. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70.
28. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*. 2014;63(11):943-50.
29. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med*. 1991;325(13):928-37.
30. Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfa G, Nardini V, et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(2):96-107.
31. Breton J, Kastl A, Hoffmann N, Rogers R, Grossman AB, Mamula P, et al. Efficacy of Combination Antibiotic Therapy for Refractory Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(9):1586-93.
32. Gil-Candel M, Gascon-Canovas JJ, Urbietta-Sanz E, Rentero-Redondo L, Onteniente-Candela M, Iñiesta-Navalon C. Comparison of drug survival between infliximab and adalimumab in inflammatory bowel disease. *Int J Clin Pharm*. 2020.
33. Long GH, Tatro AR, Oh YS, Reddy SR, Ananthakrishnan AN. Analysis of Safety, Medical Resource Utilization, and Treatment Costs by Drug Class for Management of Inflammatory Bowel Disease in the United States Based on Insurance Claims Data. *Adv Ther*. 2019;36(11):3079-95.
34. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.
35. Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*. 2009;44(5):328-34.
36. Sotak M, Mrnka L, Pacha J. Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1 mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J Pineal Res*. 2006;41(2):183-8.
37. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol*. 2011;17(34):3888-98.
38. Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*. 1995;18(1):28-31.
39. Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res*. 1995;41(5):391-5.
40. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*. 2003;34(4):233-41.
41. Migliori ML, Romanowski A, Simonetta SH, Valdez D, Guido M, Golombek DA. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res*. 2012;53(1):38-46.
42. Tosches MA, Bucher D, Vopalensky P, Arendt D. Melatonin signaling controls circadian swimming behavior in marine zooplankton. *Cell*. 2014;159(1):46-57.
43. Lee K, Zawadzka A, Czarnocki Z, Reiter RJ, Back K. Molecular cloning of melatonin 3-hydroxylase and its production of cyclic 3-hydroxymelatonin in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res*. 2016;61(4):470-8.

44. Kleszczynski K, Kim TK, Bilska B, Sarna M, Mokrzynski K, Stegemann A, et al. Melatonin exerts oncostatic capacity and decreases melanogenesis in human MNT-1 melanoma cells. *J Pineal Res.* 2019;67(4):e12610.
45. Heo JS, Pyo S, Lim JY, Yoon DW, Kim BY, Kim JH, et al. Biological effects of melatonin on human adiposederived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2019;44(6):2234-44.
46. Sanchez AB, Clares B, Rodriguez-Lagunas MJ, Fabrega MJ, Calpena AC. Study of Melatonin as Preventive Agent of Gastrointestinal Damage Induced by Sodium Diclofenac. *Cells.* 2020;9(1).
47. Luo J, Zhang Z, Sun H, Song J, Chen X, Huang J, et al. Effect of melatonin on T/B cell activation and immune regulation in pinealectomy mice. *Life Sci.* 2020;242:117191.
48. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18(3):537-9.
49. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000;28(4):193-202.
50. Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Calvo JR. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res.* 2010;62(3):282-7.
51. Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res.* 2004;37(1):48-54.
52. Raikhlin NT, Kvetnoy IM. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem.* 1976;55(1):19-24.
53. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia.* 1993;49(8):665-70.
54. Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res.* 2010;49(1):23-34.
55. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology.* 2001;74(3):178-84.
56. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, et al. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res.* 2001;30(1):1-12.
57. Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Riccardi L, Muia C, Di Bella P, et al. Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis. *J Pineal Res.* 2006;41(4):363-73.
58. Trivedi PP, Jena GB. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: investigation on possible mechanisms. *Dig Dis Sci.* 2013;58(12):3460-74.
59. Calvo JR, Guerrero JM, Osuna C, Molinero P, Carrillo-Vico A. Melatonin triggers Crohn's disease symptoms. *J Pineal Res.* 2002;32(4):277-8.
60. Maldonado MD, Calvo JR. Melatonin usage in ulcerative colitis: a case report. *J Pineal Res.* 2008;45(3):339-40.
61. Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, la de Lastra CA, Motilva V. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res.* 2006;40(1):48-55.
62. Paulose JK, Cassone VM. The melatonin-sensitive circadian clock of the enteric bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Gut Microbes.* 2016;7(5):424-7.
63. Paulose JK, Wright JM, Patel AG, Cassone VM. Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146643.
64. Song TY, Lin HC, Chen CL, Wu JH, Liao JW, Hu ML. Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Free Radic Res.* 2014;48(9):1049-60.

65. Ersoy OF, Ozkan N, Ozsoy Z, Kayaoglu HA, Yenidogan E, Celik A, et al. Effects of melatonin on cytokine release and healing of colonic anastomoses in an experimental sepsis model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2016;22(4):315-21.
66. Bento AF, Leite DF, Claudino RF, Hara DB, Leal PC, Calixto JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1213-21.
67. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159(2):574-81.
68. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J Pineal Res.* 1995;19(1):31-9.
69. Liu G, Jiang Q, Chen S, Fang J, Ren W, Yin J, et al. Melatonin alters amino acid metabolism and inflammatory responses in colitis mice. *Amino Acids.* 2017;49(12):2065-71.
70. Pahlavani MA, Harris MD. In vitro effects of melatonin on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in young and old rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1997;19(3):327-37.
71. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut.* 1993;34(12):1705-9.
72. Sabel R, Fronza AS, Carrenho LZB, Maes A, Barros ML, Pollo LAE, et al. Anti-inflammatory activity of the sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2019;245:112186.
73. Molander P, Kempainen H, Ilus T, Sipponen T. Long-term deep remission during maintenance therapy with biological agents in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol.* 2020;55(1):34-40.
74. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA, et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.* 2017;10(3):673-84.
75. Waldschmitt N, Kitamoto S, Secher T, Zacharioudaki V, Boulard O, Floquet E, et al. The regenerating family member 3 beta instigates IL-17A-mediated neutrophil recruitment downstream of NOD1/2 signalling for controlling colonisation resistance independently of microbiota community structure. *Gut.* 2019;68(7):1190-9.
76. Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD, Nelson RJ. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(5):R1476-82.
77. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
78. Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, et al. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature.* 2011;477(7363):216-9.
79. Bishu S, El Zaatari M, Hayashi A, Hou G, Bowers N, Kinnucan J, et al. CD4+ Tissue-resident Memory T Cells Expand and Are a Major Source of Mucosal Tumour Necrosis Factor alpha in Active Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2019;13(7):905-15.
80. Lim SM, Jeong JJ, Choi HS, Chang HB, Kim DH. Mangiferin corrects the imbalance of Th17/Treg cells in mice with TNBS-induced colitis. *Int Immunopharmacol.* 2016;34:220-8.
81. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. 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.* 2003;198(12):1875-86.
82. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H, Azuma M, Kubo M, et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation.* 2007;83(6):774-82.

83. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9):5852-60.
84. Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, Aggarwal P, Jia S, Charbonnier LM, et al. IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. *J Immunol.* 2012;189(12):5638-48.
85. Bing X, Xuelei L, Wanwei D, Linlang L, Keyan C. EGCG Maintains Th1/Th2 Balance and Mitigates Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium through TLR4/MyD88/NF-kappaB Signaling Pathway in Rats. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017;2017:3057268.
86. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012;5(4):354-66.
87. Ahmed AU, Yim HCH, Alorro M, Ernst M, Williams BRG. Integrin-Linked Kinase Expression in Myeloid Cells Promotes Inflammatory Signaling during Experimental Colitis. *J Immunol.* 2017.
88. Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(7):721-31.
89. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol.* 2014;15(10):929-37.
90. Shaw TN, Houston SA, Wemyss K, Bridgeman HM, Barbera TA, Zangerle-Murray T, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med.* 2018;215(6):1507-18.
91. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbati N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol.* 1998;160(3):1191-7.
92. Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol.* 1993;15(4):463-8.
93. Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999;65(20):2143-50.
94. Thieu VT, Yu Q, Chang HC, Yeh N, Nguyen ET, Sehra S, et al. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity.* 2008;29(5):679-90.
95. Yang F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, et al. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. *J Immunol Res.* 2017;2017:7047201.
96. Ho LKH, Tong VJW, Syn N, Nagarajan N, Tham EH, Tay SK, et al. Gut microbiota changes in children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathog.* 2020;12:6.
97. Eck A, Rutten N, Singendonk MMJ, Rijkers GT, Savelkoul PHM, Meijssen CB, et al. Neonatal microbiota development and the effect of early life antibiotics are determined by two distinct settler types. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228133.
98. Johnson BM, Gaudreau MC, Gudi R, Brown R, Gilkeson G, Vasu C. Gut microbiota differently contributes to intestinal immune phenotype and systemic autoimmune progression in female and male lupus-prone mice. *J Autoimmun.* 2020:102420.
99. Wan Y, Tang J, Li J, Li J, Yuan J, Wang F, et al. Contribution of diet to gut microbiota and related host cardiometabolic health: diet-gut interaction in human health. *Gut Microbes.* 2020:1-7.

ANEXOS

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

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

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal", registrada sob nº 17.1.1073.60.3, sob a responsabilidade de Lia Vezanfard Barbosa e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 13/06/2018 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

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

Colaboradores: Jefferson Luiz da Silva, Camila Figueiredo Pinzan, Murillo Duarte da Silva e Viviani Nardini.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 05/05/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico C57BL/6
Nº de animais	180
Sexo	Macho
Peso/Idade	20g/ 6 semanas
Origem	Biotério Central da PUSP RP

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2018.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

ANEXO B – Autorização do Adendo da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

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

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Estudo dos efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal", registrada sob nº 17.1.1073.60.3, sob a responsabilidade de Lia Vezenfard Barbosa e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião do dia 06/08/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

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

Colaboradores: Jefferson Luiz da Silva e Camila Figueiredo Pinzan.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 30/06/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	260
Peso/Idade	20 g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 09 de agosto de 2019.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP