UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

**Mecanismos de ação da anexina A1 na doença intestinal
inflamatória tratada com infliximabe**

Marina de Paula Silva

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Co-orientadora:

Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

**Mecanismos de ação da anexina A1 na doença intestinal
inflamatória tratada com infliximabe**

Marina de Paula Silva

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Co-orientadora:

Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

São Paulo

2020

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d586m de Paula Silva, Marina
Mecanismos de ação da anexina A1 na doença
intestinal inflamatória tratada com infliximabe /
Marina de Paula Silva. - São Paulo, 2021.
198 p. + xxi

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli
Coorientador: Olinari, Sonia Maria

1. Doença Intestinal Inflamatória. 2. Receptores
para peptídeos formilados. 3. Anexina A1. 4.
Infliximabe. 5. Doença de Crohn. I. T. II. Farsky,
Sandra Helena Poliselli, orientador. III. Olinari,
Sonia Maria, coorientador.

Marina de Paula Silva

**Mecanismos de ação da anexina A1 na doença intestinal
inflamatória tratada com infliximabe**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Sandra Helena Poliselli Farsky

Prof. Dr. Orientador/presidente

Raquel Franco Leal

1º examinador

Patrícia Castelucci

2º examinador

Cristiane Damas Gil

3º examinador

São Paulo, 18 de dezembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cássio e Tânia, e à minha irmã, Carolina, que foram meus pés quando eu não pude andar e minhas mãos quando não pude trabalhar; que tiraram de si tantas vezes para que eu tivesse a oportunidade de realizar meus sonhos. Vocês foram e sempre serão minha referência de respeito, amor e vontade de ser alguém melhor.

Ao meu marido, Leandro, meu melhor amigo e companheiro de toda e qualquer jornada, que me incentiva a desafiar meus limites e comemora cada conquista minha como se fosse sua. Obrigada por sempre compreender minhas ausências, cuidar de mim e dividir o fardo comigo. Nada disso seria possível sem você. Obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma!

Em memória da minha amada avó, Donézia, cuja coragem no momento mais difícil me inspirou a seguir a carreira científica em busca de trazer alento e esperança aos que precisam. Ela vive em todas as minhas escolhas, em cada pequeno esforço ou grande sacrifício que me trouxeram até aqui.

DEDICATÓRIA

À minha querida orientadora, profa. Dra. Sandra Farsky, que fez tudo ao seu alcance para me proporcionar a formação que tenho hoje, e que levarei para o resto de minha jornada científica. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata por todas as oportunidades, conversas e ensinamentos. Obrigada por me inspirar, acreditar em mim e me incentivar a ir onde jamais imaginei!

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro que tornou este estudo possível (Processo no. 2016/19682-2), e pela bolsa BEPE para realização de pesquisa no exterior (Processo no. 2019/02806-9). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP), por proporcionar a infraestrutura, o ensino e o contato com cientistas de alto nível, necessários para a minha formação.

À minha querida co-orientadora, profa. Dra. Sonia Oliani (IBILCE-UNESP), minha primeira referência científica, por me haver trazido até aqui e seguir fazendo parte da minha carreira.

À Dra. Andrea Vieira, gastroenterologista na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, por acreditar no meu trabalho desde a primeira reunião e abrir as portas para a coleta de amostras de pacientes. Seu entusiasmo e apoio foram muito importantes para a realização deste trabalho!

Às médicas da equipe do ambulatório de infusão da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Dra. Lígia, Dra. Bruna e Dra. Maria Luíza, por todo auxílio durante as coletas das amostras e prontuários dos pacientes.

Às enfermeiras do ambulatório de infusão da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Tatiana, Churi e Rose, por se disporem a realizar as coletas entre tantas tarefas, sempre se preocupando com o bem-estar dos pacientes em primeiro lugar.

A todos os pacientes do ambulatório de infusão da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo que aceitaram participar deste estudo. Obrigada por me inspirarem com suas histórias e sua coragem; obrigada por confiarem a mim o acesso a uma parte de suas vidas e de seu próprio corpo. Nunca esquecerei cada um daqueles que, apesar da dor e do medo, se propuseram a me ouvir e a contribuir com este estudo na esperança de que ele possa beneficiar a eles e a futuros pacientes. Espero poder retribuí-los ao longo da minha carreira.

Ao prof. Dr. Mauro Perretti (WHRI/QMUL), por me receber em seu grupo e me presentear com seu conhecimento e pensamento científico durante um ano. Sou grata por tudo que aprendi nesse período e pela realização do sonho de trabalhar com esta grande referência em anexina A1.

Às equipes das instalações da *Queen Mary University of London* e aos caros colegas e amigos que fiz durante minha passagem: Isobel, Shani, Millie, Pol, Silvia, Nur, Giorgia, Jianmin, Jordan, Hannah, Pepe, Beth, Francesco, Marco, Martin e Luiz. Em especial, à Manu e à Chiara, por compartilharem tantos momentos, alegrias e angústias comigo. Também, aos *PIs* Dra. Dianne Cooper, Dra. Lucy Norling e Dr. David Gouding, por todo auxílio na bancada e fora dela.

À querida Dra. Karin Greco (TGI/UCL), por me abrir as portas de seu laboratório e de sua casa tantas vezes. Karin, você mudou completamente o destino do meu projeto BEPE, de forma que sem você, a conclusão dele não teria sido possível. Obrigada por me proporcionar tantas oportunidades no meio acadêmico e, acima de tudo, obrigada por haver cuidado de mim e da Mab como suas filhas quando nós duas estávamos tão longe de nossas próprias famílias.

À toda a equipe do *The Griffin Institute*, em especial ao Dave e ao Mark, e aos meus estimados colegas: Ferdinand, Prasad e Kajal, pela convivência, apoio e cuidado diários.

Especialmente, à Mab Correa, com quem pude dividir momentos ímpares em uma terra distante. A maior e melhor coincidência de minha estada em Londres foi poder dividir esse tempo com você, que se tornou uma grande amiga. Obrigada por me proporcionar tantas risadas e lembranças felizes. Não poderia imaginar como teria sido essa experiência se você não estivesse lá para dividi-la comigo!

Aos valiosos amigos que passaram e que ainda permanecem no Laboratório de Imunotoxicologia e Inflamação: Cíntia Heluany, Cláudia Benis, Cristina Hebeda, Éric Barioni, Lorena Pantaleão, Luana Xavier, Milena Fronza, Pablo Scharf, Paula Gabriela, Rodrigo Loiola e Stephanie Duro. Sem a companhia e o apoio de vocês, esses quatro anos não teriam sido tão prazerosos. Obrigada pelas risadas, conselhos, pelas conversas sobre o trabalho, o futuro e a vida. Enfim, obrigada pela sua amizade!

Em particular, ao André Fabris e ao Gustavo Rocha, grandes amigos que fiz nesta jornada científica a qual compartilhamos desde 2016. Agradeço pelos momentos de risadas intermináveis, pelos aprendizados, por fazerem parte da minha vida e terem se tornado meus irmãos!

À Silvana Sandri, com quem aprendi muito sobre a bancada e sobre ciência. Sil, seus conhecimentos e sua paixão pelo questionamento me fizeram a cientista que sou hoje e me acompanharão eternamente. Para mim, é um orgulho muito grande ter sido sua “pupila” e, mais ainda, ser sua amiga!

Aos antigos e eternos amigos que fiz no Laboratório de Imunomorfologia, Laila Cardin, Heloísa Trindade, Alexandre Gimenes, Jusciéle Moreli, Kallyne Mimura e Cristiane Gil, pelo seu apoio, cuidado e presença constantes que nunca me permitem desanimar.

Aos queridos amigos Agnes, Arthur, Danilo, Diogo, Leonardo, Marcos e Renan, que não fazem a menor ideia do quanto sua companhia aos sábados renova minhas energias e torna minha vida mais divertida e leve. Obrigada pelas aventuras, risadas e companheirismo!

Aos meus amados avós: Emmanuel, Claudenir, Ademar e Helenir. Obrigada por se importarem tanto com o meu trabalho, muitas vezes não sabendo exatamente do que se trata, mas sempre expressando seu apoio e orgulho mesmo assim. Eu amo vocês com todo o meu coração!!!

Aos meus amados tios: Júnior, Sonia, Paulo e Rosana. O meu mais sincero agradecimento por sempre acompanharem a minha vida de perto e torcerem tanto pelo meu crescimento. Amo muito vocês!!!

Aos meus pequenos tesouros, meus primos Camila, Paula, Pedro e Luísa. Meus eternos bebês, dos quais cuidei um a um desde o nascimento, obrigada recarregarem minha bateria em cada abraço e tarde de conversar e brincadeiras. Obrigada, meus amores, por tornarem a minha vida mais bonita e cheia de vida!!!

À minha família por extensão, meus sogros Silvia e Frank, e meu cunhado Evandro, que mesmo antes do meu relacionamento com o Leandro já estavam presentes na minha vida, torcendo por mim e acreditando no meu futuro. Só posso ser grata a Deus por tê-los colocado em meu caminho para sempre! Como meu querido sogro previu há mais de 12 anos (e apesar de eu mesma não ter acreditado nessa previsão), eu serei doutora, e uma das minhas maiores alegrias é que vocês estão aqui para compartilhar esse momento comigo. Amo muito vocês!!!

EPÍGRAFE

“- Professor, isso tudo é real? Ou só está acontecendo na minha cabeça?

- Claro que está acontecendo na sua cabeça, Harry. Mas por quê isso significaria que não é real?”

Harry Potter e as Relíquias da Morte

(tradução livre)

Vienna - Billy Joel

(1977)

*Slow down, you crazy child
You're so ambitious for a juvenile
But then if you're so smart, then tell me why are you still so afraid?
Where's the fire, what's the hurry about?
You'd better cool it off before you burn it out
You've got so much to do and only so many hours in a day
But you know that when the truth is told
That you can get what you want or you can just get old
You're gonna kick off before you even get halfway through
When will you realize Vienna waits for you?*

*Slow down, you're doing fine
You can't be everything you want to be before your time
Although it's so romantic on the borderline tonight
Too bad, but it's the life you lead
You're so ahead of yourself that you forgot what you need
Though you can see when you're wrong, you know you can't always see when you're right
You've got your passion, you've got your pride
But don't you know that only fools are satisfied?
Dream on, but don't imagine they'll all come true
When will you realize Vienna waits for you?*

Vá devagar, sua criança louca
Você é tão ambiciosa para uma jovem
Mas se você é tão esperta, me diga porque ainda tem tanto medo?
Onde está o incêndio? Pra quê a pressa?
É melhor você aproveitar isso antes que você perca
Você tem tanto o que fazer e tão poucas horas em um dia
Mas sabe, quando a verdade é dita
Você pode conseguir o que quer ou pode apenas envelhecer
Você vai desistir antes mesmo de chegar na metade do caminho
Quando você vai perceber que Vienna espera por você?

Vá devagar, você está indo bem
Você não pode ser tudo o que quer ser antes do seu tempo
Embora isso seja tão romântico no limite desta noite
Uma pena, mas é a vida que você tem
Você está tão à frente de si mesma que esqueceu o que precisa
Embora você possa ver quando você está errada, você nem sempre vê quando está certa
Você tem sua paixão, você tem o seu orgulho
Mas você não sabe que apenas tolos ficam satisfeitos?
Sonhe, mas não pense que todos os seus sonhos se realizarão
Quando você vai perceber que Vienna espera por você?

(Tradução livre)

RESUMO

DE PAULA-SILVA, M. **Mecanismos de ação da anexina A1 na doença intestinal inflamatória tratada com infliximabe**. 2020. 198 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - SP, 2020.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são enfermidades crônicas desencadeadas por grave inflamação no trato gastrointestinal. Entre os mediadores imunes envolvidos na patogênese das DIIs, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é sugerido como citocina primordial. Assim, ferramentas de inativação da via do TNF- α , como o infliximabe (IFX), têm sido amplamente aplicadas no tratamento destas doenças. Embora o IFX seja eficaz na indução/manutenção de remissão das DIIs, ainda há relatos de efeitos adversos ou pacientes refratários à imunoterapia. Por esse motivo, é emergente a necessidade de identificar biomarcadores associados ao sucesso das terapias biológicas. Estudos prévios em pacientes com Doença de Crohn (DC) mostraram que a expressão da proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1) sistêmica e na mucosa intestinal é aumentada após IFX e correlacionada com a melhora da qualidade de vida. A AnxA1 e o seu peptídeo N-terminal, Ac2-26, desempenham suas funções na resolução da inflamação via receptores para peptídeo formilado (FPRs). No presente estudo, nós investigamos de que maneira os FPRs e a AnxA1 participam dos mecanismos do IFX. No modelo de colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos selvagens (WT) e deficientes para AnxA1 endógena (AnxA1^{-/-}), o IFX atenuou as manifestações clínicas da doença apenas em animais WT. O bloqueio dos FPRs com o antagonista Boc-2 reverteu a melhora observada nos animais tratados, enquanto a ausência da AnxA1 endógena revogou completamente a eficácia do tratamento. Ainda, a resposta inflamatória da colite foi exacerbada nos animais AnxA1^{-/-} após IFX, que apresentaram redução de células T regulatórias e aumento da MMP9 no cólon, encurtamento do intestino grosso, ausência de melhora histológica e mortalidade de 50%. Nos animais WT, por sua vez, o bloqueio dos FPRs impediu a melhora clínica e a regeneração das criptas mucosas, com desorganização da β -actina e da borda em escova. Nas células epiteliais do intestino da linhagem Caco-2 estimuladas por TNF- α *in vitro*, confirmamos que os efeitos protetivos do IFX nas junções celulares são perdidos após bloqueio do FPR1 e do FPR2, comprometendo a integridade desta barreira. No cólon, o IFX induziu a expressão e secreção da AnxA1 em células da lâmina própria após colite, e essa secreção foi dose-dependente em células da lâmina própria tratadas *ex vivo*, demonstrando que a secreção da AnxA1 por células do tecido conjuntivo pode constituir um dos mecanismos resolutivos desta terapia. Em humanos, o tratamento com IFX na DC não modificou as expressões de FPR1 e FPR2 nos leucócitos circulantes ou da AnxA1 plasmática, não permitindo a diferenciação de pacientes responsivos ou não. No entanto, a AnxA1 tecidual estava aumentada em pacientes que respondem ao IFX, e os níveis de AnxA1 e FPR1 foram negativamente correlacionados à remissão histológica. Por fim, análises de bioinformática revelaram expressões diferenciais dos mRNAs de FPR1, FPR2 e AnxA1 no cólon entre pacientes remissivos ou refratários mesmo antes do início das infusões, mas esse mesmo padrão não foi observado nos PBMCs do sangue. Em conclusão, sugerimos que a indução da AnxA1 pode ser um dos mecanismos de resolução do IFX, e que é complementado pela ativação de FPRs. Ainda, estes marcadores podem apresentar valor preditivo da eficácia do IFX, contribuindo para o alcance da remissão da DC de maneira mais rápida e permanente.

ABSTRACT

DE PAULA-SILVA, M. ***Annexin A1 pathways triggered in the inflammatory bowel disease treated with infliximab.*** 2020. 198 f. PhD thesis – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo - SP, 2020.

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic debilitating illnesses triggered by severe inflammation of the gastrointestinal tract. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is pointed out as a primordial mediator of IBD pathogenesis; thus, inactivating tools targeting this cytokine have been widely used to treat these diseases. Although IFX is very efficient in inducing/maintaining remission in patients with IBD, side effects and unresponsiveness are still reported, emerging the need for the identification of biomarkers linked to therapeutical efficacy. In the Crohn's disease (CD), systemic and tissue expressions of the anti-inflammatory protein, annexin A1 (AnxA1), are increased after IFX treatment and correlate with life quality improvement according to previous reports. AnxA1 and its N-terminal peptide, Ac2-26, act via formyl peptide receptors (FPRs); therefore, the present investigation aimed to understand how FPRs and AnxA1 participate in IFX mechanisms. In the experimental colitis model induced by dextran sulphate sodium (DSS) in wild-type (WT) and AnxA1-deficient mice (AnxA1^{-/-}), IFX attenuated the clinical manifestations only in the WT group. FPRs blockade using the antagonist, Boc-2, impaired IFX effects in WT mice, while AnxA1 absence completely abrogated its efficacy. Furthermore, the inflammatory response was exacerbated after IFX in AnxA1^{-/-} mice, with reduced T regulatory cells, increased tissue MMP9, large intestine shortening, lack of histological remission and 50% mortality. In WT mice, FPR blockade reverted the clinical recovery and mucosal crypts regeneration, with β -actina and brush border disorganization. Using the intestinal epithelial cell line Caco-2 stimulated with TNF- α in vitro, we confirmed that IFX protective effects on tight junctions are lost after FPR1 and FPR2 blockade, compromising the barrier integrity. In the colonic tissue, the expression and secretion of AnxA1 were induced by IFX after colitis. This secretion was shown to be dose-dependent in cells from the intestinal lamina propria treated ex vivo, demonstrating that secreted AnxA1 could constitute one of the resolutive mechanisms of that therapy. In humans with CD, IFX did not modify the expressions of FPR1 and FPR2 in circulating leukocytes or the plasma AnxA1 levels, not differentiating patients responsive or not. However, tissue AnxA1 expression was augmented in responsive patients, and AnxA1/FPR1 levels were negatively correlated with histological remission. Finally, bioinformatic analyses revealed differential expression of FPR1, FPR2 and AnxA1 mRNAs in the colon among remittent or refractory patients even before the beginning of infusions, which was not observed for samples of blood PBCM. In conclusion, we suggest that inducing tissue AnxA1 might be one of the resolution mechanisms of IFX, which is complemented by the activation of FPRs. Moreover, these markers could present predictive value of IFX efficacy, contributing to reaching an early and more permanent remission in IBD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da inflamação crônica intestinal.....	4
Figura 2. Abordagens terapêuticas em DII.....	8
Figura 3. Representações esquemáticas das estruturas primária..... e quaternária da proteína AnxA1	11
Figura 4. Estrutura e funções biológicas da AnxA1.....	12
Figura 5. Abordagens terapêuticas atuais e propostas para..... personalização do tratamento em DIIs	15
Figura 6. Desenho experimental do modelo <i>in vivo</i> de colite.....	21
Figura 7. Modelo de inflamação da barreira epitelial formada por..... células Caco-2 <i>in vitro</i>	26
Figura 8. Ausência da AnxA1 endógena revoga os efeitos..... resolutivos do IFX na colite experimental	37
Figura 9. Bloqueio dos FPRs reverte a melhora clínica induzida por..... IFX na colite induzida por DSS	41
Figura 10. Regeneração das criptas intestinais mediada por IFX..... requer sinalização via FPRs	43
Figura 11. FPR1 e FPR2 medeiam integridade da barreira epitelial..... de células intestinais após inflamação induzida por TNF- α tratamento com IFX	45
Figura 12. IFX induz aumento da produção e secreção de AnxA1..... por células da lâmina própria intestinal durante inflamação	47
Figura 13. Escores clínico e histológico de pacientes com DC.....	49
Figura 14. Níveis de FPR1, FPR2 e AnxA1 circulantes não são..... alterados pelo tratamento com IFX	50
Figura 15. FPR1, FPR2 e AnxA1 são diferencialmente expressos..... pelo cólon de pacientes com DC responsivos ou refratários a IFX e se correlacionam com a homeostase intestinal	52
Figura 16. Níveis transcricionais de FPR1, FPR2 e AnxA1 em..... PBMCs circulantes e no cólon de pacientes com DC	55
Figura 17. Ilustração dos fenômenos dependentes de FPR1, FPR2..... e mediados pela AnxA1 durante o tratamento da inflamação intestinal com IFX	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados para ensaio de citometria de fluxo em amostras de camundongo	22
Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados para ensaio de imuno-histoquímica e imunofluorescência em amostras de cólon de camundongo	23
Tabela 3. Kits comerciais para detecção de proteínas (ELISA) em sobrenadante de explante colônico cultivado por 24 h ou em homogenato de cólon de camundongo	24
Tabela 4. Kit comercial para detecção de AnxA1 (ELISA) em sobrenadante de células da lâmina própria intestinal murina cultivadas <i>ex vivo</i> por 24 h	24
Tabela 5. Anticorpos primários e secundários utilizados para ensaio de imunofluorescência em monocamadas de células epiteliais humanas Caco-2	27
Tabela 6. Kits comerciais para detecção de proteínas (ELISA) em sobrenadante de linhagem de células epiteliais humanas Caco-2 e no plasma de pacientes com DC	28
Tabela 7. Características dos pacientes com DC e dos doadores saudáveis	29
Tabela 8. Sistemas de quantificação dos escores clínicos e histológicos dos pacientes com DC	30
Tabela 9. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo em amostras de pacientes com DC	31
Tabela 10. Anticorpos primários e secundário utilizados para ensaio de imunofluorescência em biópsias de pacientes com DC	32
Tabela 11. Detalhamento dos estudos e marcadores selecionados a partir do repositório GEO-NCBI para análises de bioinformática	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolos

Ω	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

Unidades de medida

cm^2	Centímetro quadrado
g	Grama
h	Hora
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
min	minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
rpm	Rotação por minuto
μL	Microlitro

Abreviaturas

Ac2-26	Peptídeo N-terminal da anexina A1
ANOVA	Análise de variância
AnxA1	Anexina A1
AnxA1 ^{-/-}	Camundongos nocautes para o gene da anexina A1
APC	Aloficocianina
Boc-2	N-t-BOC-MET-LEU-PHE
BSA	Albumina do soro bovino
Caco-2	Linhagem de adenocarcinoma colorretal
CARD-	Domínio de Recrutamento da Caspase-9
CD-	Grupo de diferenciação
CDAI	Índice de Atividade da Doença de Crohn
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CO ₂	Gás carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclooxigenase-2
D2	Meio DMEM + soro fetal bovino a 2%
DAB	3,3'-diaminobenzidina

DAI	Índice de Atividade da Doença
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfuróxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFr	Tirosina-quinase do receptor de crescimento epidermal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FPR	Receptor para peptídeo formilado
GEO	<i>Gene expression Omnibus</i>
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank
HGFr	Tirosina-quinase do receptor de fator de crescimento do hepatócito
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ht	Hematócrito
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intercellular
IFX	Infliximabe
IgG	Imunoglobulina G
IL-	Interleucina
Log2	Logarítmo na base 2
LogFC	<i>Log Fold Change</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência
microRNA	Micro-ácido ribonucleico
MMP-	Metalloproteinase de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDII	Pacientes Não-DII
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
PAMP	Padrões Moleculares associados a patógenos

PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PDGFr	Tisarina-quinase do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PKC	Proteína-quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RCU	Retocolite Ulcerativa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S.D.	Desvio Padrão
S.E.M.	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT-	Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição
T-TBS	Tampão Tris contendo Tween 20
TBS	Tampão Tris
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEER	Resistência Elétrica Transepitelial
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral <i>alfa</i>
TNFR	Receptor do TNF- α
Treg	Linfócitos T reguladores
USP	Universidade de São Paulo
WRW4	WRWWWW
WT	<i>Wild-type</i> (camundongos selvagens)
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vii
Epígrafe.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
Doença Inflamatória Intestinal.....	2
Estratégias terapêuticas em DII: sucessos e falhas.....	6
Anexina A1 na DII: mediadora e potencial biomarcadora.....	10
Perspectivas futuras.....	14
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
<i>Ensaios in vivo e ex vivo</i>	20
Animais.....	20
Colite experimental, tratamento com IFX e/ou Boc-2.....	20
Citometria de fluxo para células de lâmina própria.....	22
Processamento histológico do cólon, histopatologia e imuno-histoquímica.....	22
Quantificação de mediadores inflamatórios em sobrenadante de cultivo de explante e em homogenato de cólon.....	23
Isolamento de células da lâmina própria e tratamentos <i>ex vivo</i>	24
<i>Ensaios in vitro</i>	25
Cultivo das linhagens de células epiteliais.....	25
Indução da inflamação e tratamentos.....	25
Ensaio de citotoxicidade.....	27

Imunofluorescência nas monocamadas de Caco-2.....	27
Quantificação da secreção de mediadores inflamatórios.....	28
<i>Pacientes com DC</i>	29
Participantes do estudo.....	29
Classificação da intensidade da DC segundo os parâmetros clínico e microscópico.....	29
Processamento das amostras de sangue para isolamento dos leucócitos e do plasma.....	31
Histopatologia e detecção de FPR1, FPR2 e AnxA1 em biópsias de DC.....	31
Análises de bioinformática.....	32
Análises estatísticas.....	33
RESULTADOS	34
IFX atenua a sintomatologia da colite induzida por DSS somente na presença da AnxA1.....	35
Bloqueio dos FPRs induz cronificação do dano epitelial após IFX.....	42
IFX induz expressão e secreção da AnxA1 durante a inflamação intestinal.....	46
Níveis de FPR1, FPR2 e AnxA1 não são diferencialmente modulados no sangue, mas constituem parâmetros preditivos de eficácia do IFX no cólon.....	48
FPR1, FPR2 e AnxA1 são diferencialmente expressos no cólon de pacientes responsivos ou refratários ao IFX, mesmo antes da terapia.....	54
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Introdução

Doença Inflamatória Intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são enfermidades crônicas e debilitantes caracterizadas por grave processo inflamatório no trato gastrointestinal (ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011). De maneira geral, Doença de Crohn (DC) e Retocolite ulcerativa (RCU) são as duas principais DIIs; porém, ambas possuem subtipos classificados de acordo com seus aspectos colonoscópicos, microscópicos, a idade do paciente e a região do trato gastrointestinal que acometem (EVERHOV et al., 2019). Os sintomas da DC e da RCU são semelhantes e incluem dor abdominal, fadiga, acentuada perda de peso, diarreia recorrente e sangramento retal. Em alguns casos, os pacientes podem apresentar manifestações extra-intestinais como artralgia, ulcerações orais, colangite esclerosante e hepatite autoimune (ADAMIAK et al., 2013).

Devido à sintomatologia compartilhada entre DC, RCU e seus subtipos, o diagnóstico diferenciado pode ser obtido somente com base na avaliação histológica e distribuição das lesões ao longo do trato gastrointestinal. Isto porque a DC produz lesões alternadas ao longo de todo o trato gastrointestinal e inflamação transmural, enquanto a RCU comumente lesiona o intestino grosso de maneira contínua e limitada à mucosa e submucosa, com maior intensidade no reto. Ainda, a resposta imune na DC é majoritariamente do tipo Th1, e existem alguns indicativos de que na RCU, essa mediação é, essencialmente, do tipo Th2 (KUMAR et al., 2010). No entanto, muitos pacientes apresentam aspectos mistos entre as manifestações clássicas de DC e RCU, sendo diagnosticados como DII inespecífica ou mesmo tendo seus diagnósticos alterados entre uma ou outra enfermidade ao longo da vida (EVERHOV et al., 2019).

A manifestação das DIIs resulta de um conjunto de fatores que incluem predisposição genética, disfunções epiteliais, resposta imunológica descontrolada e defeitos na interação microbiota-hospedeiro (KUMAR et al., 2010; MANN; SAEED, 2012). Pacientes com DII apresentam redução da produção de muco, aumento da permeabilidade intestinal e instabilidade de junções célula-célula, o que permite a translocação da microbiota para a lâmina própria, iniciando a resposta inflamatória (UHLIG, 2013; MICHIELAN; D'INCÀ, 2015). Tais eventos podem ser originados pela combinação da presença de genes de suscetibilidade genética e fatores ambientais. Com relação ao fator genético, mais de 200 genes de suscetibilidade às DIIs foram descritos até o momento, sendo a maioria associada a defeitos na estrutura da barreira epitelial, respostas inata e antimicrobiana; aspectos que estão intrinsecamente relacionados à patogênese dessas doenças (UHLIG, 2013; KAPLAN; NG, 2017). Fatores ambientais podem compreender uso de medicamentos (em especial antibióticos), tabagismo e a condição de higienização em que o paciente viveu/vive, sendo que alguns destes fatores podem ser protetivos ou deletérios dependendo do diagnóstico de DC ou RCU (KUMAR et al., 2010; KAPLAN; NG, 2017). Mais recentemente, estudos têm apontado a exposição a poluentes ambientais e a ingestão de partículas ultrafinas (por exemplo, dióxido de titânio) como fatores que induzem disbiose e favorecem a predominância de patobiontes sobre cepas pró-homeostáticas no lúmen intestinal (LAMAS; MARTINS BREYNER; HOUDEAU, 2020). De fato, a composição da microbiota constitui

um importante aspecto para a patogênese das DIIs: o próprio tecido epitelial hospedeiro geneticamente predisposto à maior permeabilidade produz mais mediadores inflamatórios, ajudando a selecionar espécies de bactérias de perfil pró-patogênico que, em troca, estimulam a permanente produção daqueles mediadores (KAPLAN; NG, 2017; NI et al., 2017). Esses fatores induzem uma resposta inflamatória descontrolada cujo exacerbado desbalanço entre mediadores pró- e anti-inflamatórios, bem como pró-resolutivos, retro-alimenta o dano epitelial e a translocação microbiana, perpetuando a desregulação imune (NEURATH, 2014).

O cenário da mucosa afetada pela DII é constituído por infiltrados celulares, que secretam e são ativados por uma ampla variedade de citocinas (FUSS; STROBER, 2008). Os linfócitos T produzem diversos mediadores pró-inflamatórios, que atuam na ativação de macrófagos e indução de morte epitelial. Juntamente com as células T, os macrófagos secretam IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que previnem a apoptose desses linfócitos, induzem a ativação de macrófagos e recrutamento/transmigração de células imunes para o local da inflamação (NEURATH, 2014), amplificando esta resposta. Neutrófilos também participam desse processo, secretando IL-6, IL-1 β e TNF- α após infiltração no tecido (SADIK; KIM; LUSTER, 2012). A cascata inflamatória desencadeada pelas células imunes induz a perda da integridade do epitélio, que aumenta a permeabilidade intestinal e altera a relação do hospedeiro com a microbiota, sustentando a inflamação e retardando a restituição tecidual (DABEK et al., 2009; ABRAHAM; MEDZHITOV, 2011). O panorama da patogênese das DIIs está ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1. Fases da inflamação crônica intestinal. (1) Após dano tecidual agudo ou crônico, uma inflamação aguda é iniciada; (2) Mediadores pró-inflamatórios atuam recrutando e ativando células imunes, na tentativa de conter a translocação bacteriana; (3) Para controlar o processo inflamatório, mediadores pró-resolutivos são secretados; (4) Mecanismos anti-inflamatórios insuficientes permitem a continuação e repetição do processo inflamatório, levando ao dano crônico (Fonte: adaptado de ROGLER, 2017).

Entre todos os mediadores envolvidos, o TNF- α é sugerido como citocina primordial na patogênese das DIIs (NEURATH et al., 1997; NENCI et al., 2007). O TNF- α é um mediador pró-inflamatório produzido e liberado, principalmente, por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e células endoteliais. Suas ações biológicas são mediadas pela ligação aos receptores TNFR1 ou TNFR2, membros de uma ampla família de proteínas presentes em praticamente todos os tipos celulares relacionados às respostas imunológicas (BROGIN MORELI et al., 2012). O TNFR1 está envolvido na mediação da morte celular e da produção de citocinas inflamatórias (BECK et al., 2009). O TNFR2, por sua vez, induz proliferação e sobrevivência em alguns tipos celulares via fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), mas também atua no rompimento de junções basolaterais após estímulo migratório em células epiteliais (WALLACH et al., 1999; SU et al., 2013). O TNF- α medeia uma vasta gama de doenças inflamatórias, infecciosas, autoimunes e malignas, sendo geralmente produzido em resposta a bactérias. Entre suas funções estão aumento da permeabilidade vascular permitindo a passagem de células e fluidos para o órgão; ativação de células endoteliais, neutrófilos e macrófagos; aumento da expressão de moléculas de adesão, como as moléculas de adesão intercelulares (ICAM)-1 e ICAM-2; e indução de danos ao epitélio intestinal, apoptose de enterócitos e células caliciformes, com consequente rompimento da barreira. Esses efeitos sugerem o envolvimento do TNF- α no início e manutenção da resposta inflamatória que caracteriza as doenças intestinais (KUMAR et al., 2010; PARHAM, 2014).

Embora as ações do TNF- α contra infecções sejam benéficas, a regulação de suas ações é necessária para proteger o hospedeiro de uma inflamação exacerbada local e sistêmica, visto que a superexpressão dessa citocina pode dar origem a outras doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (APOSTOLAKI et al., 2010). Assim, ferramentas de inativação da via TNF- α têm sido amplamente aplicadas em diversas doenças inflamatórias.

Estratégias terapêuticas em DII: sucessos e falhas

Após o diagnóstico da DIIs, inicia-se o processo de escolha do melhor tratamento que leva em consideração a região do trato gastrointestinal afetada, o nível de severidade da doença, a eficácia do agente e a necessidade de minimizar efeitos adversos (WILHELM; LOVE, 2017). A abordagem terapêutica convencional, também denominada *step up*, baseia-se na iniciação do paciente a tratamentos que oferecem maior segurança, porém, tendem a não apresentar taxas de eficácia satisfatórias, tais como os aminossalicilatos (por exemplo, a mesalamina e a sulfassalazina). Essa classe de medicamentos costuma ser utilizada para induzir a remissão da DII leve a moderada, porém, as baixas taxas de sucesso (42-46%) associadas à ocorrência de efeitos adversos como hepatotoxicidade, anemia hemolítica, pancreatite e nefrite podem implicar na necessidade de troca da estratégia terapêutica. Pacientes com histórico de falha a aminossalicilatos podem ser introduzidos aos corticosteroides que, embora eficazes no controle da resposta inflamatória, são bem-sucedidos em apenas 15-47% dos casos e podem induzir o aparecimento de infecções, diabetes, doenças ósseas e cardíacas. Em seguida, a abordagem terapêutica é escalada para o uso de imunossupressores, cujas taxas de sucesso são ligeiramente superiores às dos corticosteroides e aminossalicilatos (35-73%), mas casos de pancreatite, alergias, infecções e supressão da medula óssea emergem uma nova necessidade de troca de classe medicamentosa. (ALOI et al., 2014; WILHELM; LOVE, 2017; ARGOLLO et al., 2020). Enfim, o paciente pode ser iniciado às terapias biológicas, cujo primeiro representante foi liberado há pouco mais de duas décadas para tratamento da DC pelo órgão governamental estadunidense que regulamenta a liberação de alimentos e medicamentos, o *Food and Drug Administration* (FDA). Conhecido comercialmente como Remicade®, o anticorpo monoclonal anti-TNF- α , infliximabe (IFX), representou uma revolução no cenário terapêutico das DIIs e, também, de outras doenças autoimunes, ao fornecer uma prova de conceito de que a neutralização de um alvo imunológico é capaz de atenuar as manifestações de doenças inflamatórias (MELSHEIMER et al., 2019). Ao longo dos anos seguintes, outras terapias anti-TNF- α foram desenvolvidas (adalimumabe, certolizumabe, etnacept, entre outras) e, atualmente, outros alvos terapêuticos têm sido explorados por esta classe de medicamentos (por exemplo, $\alpha 4\beta 7$ integrina ou a subunidade p40 das citocinas IL-12/23). As terapias biológicas apresentam importantes taxas de indução de remissão e redução da necessidade de encaminhamento cirúrgico e, por isso, atualmente, propõe-se o uso da abordagem *top down* em DIIs, em que o paciente é introduzido aos tratamentos mais agressivos logo após seu diagnóstico, na tentativa de mudar o curso natural das doenças. Nesta estratégia, os biológicos são as primeiras classes a serem utilizadas e, no caso de sucesso, classes as mais fracas de medicamentos podem ser utilizadas apenas para manter a inatividade da doença (ALOI et al., 2014; ARGOLLO et al., 2020). No entanto, é recomendada cautela no ato da escolha da direção da abordagem terapêutica, pois mesmo a ordem de introdução dos medicamentos aos pacientes pode alterar o curso da doença de maneira negativa. Por exemplo, aproximadamente 20% dos pacientes com DC em estágios iniciais demonstram capacidade

espontânea de controle da doença mesmo sem a administração de tratamentos para induzir remissão, o que tornaria a estratégia *top down* um risco desnecessário de desenvolvimento de efeitos adversos. Por outro lado, a escolha do método *step up* em pacientes em estágios mais severos de DII pode causar complicações posteriores pela perda da janela terapêutica nas fases em que a doença poderia ter sido mais facilmente controlada com medicamentos mais agressivos, como os biológicos (COLOMBEL; NARULA; PEYRIN-BIROULET, 2017). As abordagens *step up* e *top down* estão ilustradas na **Figura 2**.

Figura 2. Abordagens terapêuticas em DII. (A) *Step up*: inicia-se com classes de medicamentos mais leves que, no caso de falha, são substituídas ou combinadas com terapias mais fortes e tóxicas. (B) *Top-down*: o paciente é introduzido às classes de medicamentos mais agressivas desde o estágio inicial da doença (Fonte: autoria própria, baseado em ALOI et al., 2013).

Estudos com seres humanos demonstraram a eficácia da terapia com o anticorpo anti-TNF- α , IFX, pela indução ou manutenção de remissão da RCU em pacientes refratários às terapias convencionais (CHEY, 2001; AKITAKE et al., 2010; KHAN; ASIM; LICHTENSTEIN, 2014). O IFX é um anticorpo monoclonal IgG com estrutura quimérica, ou seja, possui a porção constante (75%) de origem humana, enquanto a porção variável é murina (25%) (THALAYASINGAM; ISAACS, 2011). Esse anticorpo apresenta alta afinidade pelas formas solúvel e transmembrana do TNF- α , impedindo que essa citocina exerça suas atividades pró-inflamatórias. A inibição da sinalização do TNF- α desencadeia efeitos anti-inflamatórios diretos ou indiretos, incluindo a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e do influxo de neutrófilos e macrófagos na mucosa intestinal, além da indução de apoptose de células T (APOSTOLAKI et al., 2010). Por isso, o IFX é utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes como artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriásica, psoríase, DC, DC fistulizante e RCU (REMICADE, 2007).

Embora existam inúmeras evidências na literatura sobre a eficácia de tratamentos anti-TNF- α na indução e manutenção de remissão das DIIs, ainda há relatos de efeitos adversos ou pacientes refratários à imunoterapia (BERMEJO; GUERRA; BERMEJO, 2014). Reações agudas comuns incluem prurido, rubor, dispneia, desconforto torácico, hipertensão, mialgia, náusea, dor de cabeça, erupção cutânea e tonturas, têm início dentro de 2 horas a partir da infusão em 5 a 20% dos pacientes (CHOQUETTE et al., 2013; FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014). Reações tardias à infusão ocorrem em cerca de 2% dos pacientes dentro de 1 a 14 dias após infusão, e comumente estão associados a dor de cabeça, febre, fadiga, erupção cutânea, mialgia e artralgia (VERMEIRE; VAN ASSCHE; RUTGEERTS, 2009; MIEHSLER et al., 2010). Além das reações agudas e tardias ao IFX, alguns pacientes apresentam falha primária ou secundária, isto é, ausência de remissão desde a primeira infusão ou após um período bem-sucedido de tratamento, respectivamente. Alguns dos mecanismos de perda de responsividade central incluem produção de autoanticorpos anti-IFX, anti-nucleares e anti-DNA em fita dupla; baixa concentração de soro; fatores metabólicos e medicamentosos; perda de resposta periférica; características farmacogenômicas que afetam a farmacocinética e degradação do IFX por metaloproteinases de matriz (MMPs) e células da mucosa inflamada (SCALDAFERRI; PECERE, 2015). Atualmente, muitos estudos têm buscado compreender as características individuais de cada paciente que possam estar relacionadas às reações adversas e perda de resposta às terapias biológicas. Fatores como tabagismo, DII ativa há mais de dois anos e expressão de pelo menos um dos mais de 230 genes de suscetibilidade já descritos (IL-10, STAT3 e CARD9, entre outros), são conhecidamente desfavoráveis à resposta ao IFX (PARSI et al., 2002; ARNOTT; MCNEILL; SATSANGI, 2003). Neste cenário, o principal desafio para o sucesso das terapias em DIIs é prever a eficácia de cada paciente e individualizar a abordagem terapêutica a fim de acelerar o processo de remissão, prevenir a necessidade do uso prolongado de medicamentos e, futuramente, de cirurgias (FLAMANT; ROBLIN, 2018; VEYRARD et al., 2018). Por esse motivo, o estudo de biomarcadores associados ao sucesso das terapias biológicas tem sido cada vez mais requerido (VEYRARD et al., 2018).

Anexina A1 na DII: mediadora e potencial biomarcadora

Estudos recentes, incluindo produções do nosso grupo de pesquisa, têm demonstrado que o tratamento com IFX produz efeitos na expressão endógena da proteína anti-inflamatória anexina A1 (AnxA1) (SENA et al., 2013; DE PAULA-SILVA et al., 2016). A AnxA1, descrita por Flower e Blackwell em 1979, é induzida por glicocorticoides e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e de fosfolipase A₂ (PLA₂), o que confere propriedades anti-inflamatórias (FLOWER; BLACKWELL; BLACKWELL, 1979; FLOWER, 1988; PERRETTI; GAVINS, 2003). Sua ação protetora em condições de inflamação tem sido demonstrada em diversos modelos: endotoxemia, artrite, peritonite, encefalomielite, isquemia do miocárdio, neuroinflamação, entre outros (DAMAZO et al., 2005; GAVINS et al., 2007; D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; PATEL et al., 2012). A AnxA1 apresenta um domínio C-terminal com quatro repetições contendo 70 a 80 aminoácidos cada, altamente conservado entre as proteínas da superfamília das anexinas (MUNN; MUES, 1986) e responsável pela afinidade ao cálcio e ligação aos fosfolipídios. Já o domínio N-terminal da AnxA1 é responsável pelas atividades anti-inflamatórias da proteína e contém sítios para processos pós-traducionais como fosforilação, glicosilação e proteólise (RAYNAL; POLLARD, 1994; PERRETTI; FLOWER, 2004). A ação extracelular da AnxA1 é regulada por MMPs, que realizam a clivagem proteolítica da porção N-terminal liberando o peptídeo Ac2-26, responsável por inibir o desenvolvimento da inflamação e facilitar a resolução (LEONI et al., 2013). O peptídeo N-terminal Ac2-26 é constituído pelos primeiros 26 aminoácidos da proteína AnxA1 reproduz suas funções biológicas (CIRINO et al., 1993), motivo pelo qual é empregado em estudos de inflamação aguda (GIROL et al., 2013), crônica (PATEL et al., 2012) e sistêmica (DAMAZO et al., 2005). A representação da estrutura da AnxA1, de seu peptídeo N-terminal e suas funções biológicas, estão ilustradas nas **Figuras 3 e 4**.

Figura 3. Representações esquemáticas das estruturas primária e quaternária da proteína AnxA1. (A) Domínio N-terminal da AnxA1 (H₂N-) que, quando clivado, libera o peptídeo Ac2-26, responsável pelas propriedades anti-inflamatórias da proteína; domínio C-terminal (-COOH), cuja estrutura é compartilhada entre todos os membros da família das anexinas. (B) Estrutura quaternária da AnxA1 inativa em ausência de cálcio; (C) Na AnxA1 não-ativada, o domínio N-terminal fica mantido entre as hélices da repetição 3 C-terminal. (D) AnxA1 ativada na presença de cálcio; (E) Após ligar-se aos sítios de ativação, o cálcio induz mudanças na conformação da AnxA1 e o domínio C-terminal é exposto. (Fonte: autoria própria, baseado em GAVINS, HICKEY, 2012 – A; adaptado de ROSENGARTH, LUECKE, 2003 – B-E).

Figura 4. Estrutura e funções biológicas da AnxA1. A) A AnxA1 é positivamente regulada por glicocorticoides; B) Pode ser fosforilada por diversas quinases, estimulando proliferação celular; C) Inibe a atividade da PLA₂ citosólica (cPLA₂) e da cicloxigenase-2 (COX-2); D) Pode ser secretada via transportadores ABC ou E) por fusão de grânulos citoplasmáticos contendo AnxA1 com a membrana celular; F) Atua na organização do citoesqueleto, dependente de cálcio; Induz apoptose por G1) desfosforilação de BAD, permitindo sua entrada nas mitocôndrias; G2) Entrada no núcleo celular, que pode ser inibida por Bcl-2 ou G3) superexpressão. Após secretada ou externalizada, a AnxA1 pode agir por ativação H1) autócrina, estimulando a própria célula que a secretou; H2) parácrina, ativando um tipo celular distante da célula produtora ou H3) justácrina, em que se mantém ligada à superfície externa da membrana da célula produtora e exerce suas funções pela aproximação do receptor de outra célula; I) No meio extracelular, atua via FPR1 (apenas Ac2-26), FPR2 (Ac2-26 e proteína total) e FPR3 (apenas Ac2-26), induzindo influxo de cálcio celular, o que permite ativação de proteínas MAPK e, consequentemente, de suas ações biológicas. HGF: tirosina-quinase do receptor de fator de crescimento do hepatócito. PDGFr: tirosina-quinase do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas. PKC: proteína-quinase C. EGFr: tirosina-quinase do receptor de crescimento epidermal. (Fonte: autoria própria, baseado em BIZZARRO; PETRELLA; PARENTE, 2012; PERRETTI, D'ACQUISTO, 2009 e ERNEST et al., 2004).

A influência da proteína AnxA1 e do peptídeo Ac2-26 na resolução da inflamação requer a ligação desses mediadores aos receptores para peptídeo formilado (FPRs), que são receptores de superfície acoplados à proteína G e são representados por três membros em humanos, e oito membros em camundongos (MARTIN et al., 2008; RICHARD et al., 2009). FPR1, FPR2 e FPR3 compartilham sequências homólogas entre si e desempenham diversos papéis na iniciação, propagação e resolução da inflamação (DUFTON; PERRETTI, 2010). Tanto a AnxA1 quanto Ac2-26 são agonistas dos receptores FPR1 e FPR2, e sua ligação é especialmente importante para a resolução da inflamação e regeneração tecidual, uma vez que o uso de antagonistas desses receptores impede a recuperação do tecido lesado (LEONI et al., 2015). De fato, dados da literatura descrevem que a ligação da AnxA1/Ac2-26 ao FPR1 promove efeitos pró-resolutivos, como o reparo epitelial após lesão (LEONI et al., 2013), e que quando agem pelo FPR2, inibem a migração de neutrófilos, aumentam a taxa de apoptose dessas células e fagocitose de células mortas por macrófagos (LI et al., 2011; LEONI et al., 2013).

Sena e colaboradores (2013) observaram que pacientes com DC perderam a capacidade de expressar AnxA1 sistêmica e na mucosa intestinal, e que esses mesmos indivíduos apresentaram modulação positiva da transcrição e secreção de AnxA1 quando tratados com IFX, cujo efeito foi correlacionado com a melhora da qualidade de vida (SENA et al., 2013). Adicionalmente, um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a AnxA1 está relacionada com a eficácia do tratamento com IFX, uma vez que camundongos deficientes do gene da AnxA1 (AnxA1^{-/-}) não apresentaram melhora no quadro clínico e no perfil histológico após o bloqueio do TNF- α durante colite experimental induzida por DSS (DE PAULA-SILVA et al., 2016). Porém, os mecanismos envolvidos na modulação da AnxA1 endógena nas DIIs e na supressão da doença após o bloqueio do TNF- α permanecem desconhecidos.

Perspectivas futuras

Embora novos medicamentos e estratégias terapêuticas tenham sido desenvolvidos nos últimos anos para controle das DIIs, casos de refração e não-responsividade ainda assumem taxas preocupantes (ARGOLLO et al., 2020). Devido à dificuldade de se propor uma abordagem terapêutica que seja capaz de abranger todos ou a maioria dos pacientes em DII, o grande desafio atual no estudo destas enfermidades tem sido descrever novos biomarcadores de diagnóstico e eficácia que ajudem a otimizar os tratamentos disponíveis até o momento. A personalização das estratégias terapêuticas em DIIs tem ganhado grande destaque no cenário da pesquisa, e as principais abordagens propostas estão confrontadas com as atualmente utilizadas na **Figura 5**.

Figura 5. Abordagens terapêuticas atuais e propostas para personalização do tratamento em DIIs.
Abordagem atual (em violeta): uma vez diagnosticado com DII, o paciente será avaliado para seleção da terapia com base na gravidade e na predição do curso de sua doença. Enquanto pacientes de alto risco são encaminhados ao tratamento com diversas classes de medicamentos, os de baixo risco são iniciados em terapias menos danosas e escalados para as mais agressivas de acordo com falhas anteriores. Nos casos bem-sucedidos, o tratamento direcionado induz à remissão clínica e mucosa, mas deve ser monitorado frequentemente para que ações sejam tomadas rapidamente conforme alterações no curso da doença.
Propostas para personalização (em azul): novas ferramentas preditivas, como marcadores bioquímicos e moleculares, devem contribuir para a escolha da terapia de maneira individual. O objetivo desta abordagem é administrar o medicamento mais adequado possível, e que possa evitar a necessidade futura de cirurgia.
(Fonte: autoria própria, baseado em COLOMBEL, NARULA, PEYRIN-BIROULET, 2017).

A partir do trabalho colaborativo de grupos de estudo em DII de todo o mundo, foram recentemente propostas cinco prioridades para as investigações nesta área, sendo elas: 1) Descrever os mecanismos das DIIs utilizando ensaios pré-clínicos, 2) Gatilhos ambientais, 3) Novas tecnologias, 4) Medicina de precisão e 5) Pesquisa clínica pragmática (HELLER; OSSO, 2019). Nosso grupo de pesquisa vem produzindo dados a fim de contribuir para estes tópicos desde 2016, quando demonstramos pela primeira vez que a terapia com IFX é falha em camundongos deficientes para a expressão da AnxA1 endógena (DE PAULA-SILVA et al., 2016). No entanto, os mecanismos intracelulares da participação da AnxA1 no desenvolvimento da doença e na terapia com IFX ainda não haviam sido esclarecidos. Na presente investigação, demonstramos que o IFX induz a expressão e secreção da AnxA1 por células da lâmina própria intestinal e que este fator está associado à homeostasia tecidual, a qual também é mediada pelas vias desencadeadas por FPR1 e FPR2, especialmente no epitélio. Ainda, as expressões de FPR1 e AnxA1 na mucosa de pacientes com DC, tratados ou não com IFX, estão negativamente correlacionadas com o escore histológico das mesmas biópsias. Nosso conjunto de dados indica que a produção da AnxA1 pode ser um dos mecanismos de ação do IFX envolvidos na indução da remissão e complementado pela ativação de FPR2 e, principalmente, de FPR1. Com base nestas conclusões, sugerimos que o conhecimento sobre esta intrínseca relação pode vir a beneficiar pacientes refratários a terapias em DII no futuro.

Objetivos

O objetivo desse projeto foi investigar os papéis da AnxA1 endógena intracelular ou aquela ligada a FPRs na eficácia do infliximabe para o tratamento da doença inflamatória intestinal, e buscar evidências do potencial dos receptores formilados e da AnxA1 como biomarcadores de eficiência terapêutica.

Material & Métodos

Ensaio *in vivo* e *ex vivo*

Animais

Para o modelo experimental de colite, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL6 machos, selvagens (WT) e deficientes para AnxA1 (AnxA1^{-/-}), com 8-10 semanas ou 20-28 g. Para os ensaios *ex vivo*, camundongos C57BL6 machos, WT, com 16-18 semanas foram selecionados. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), mantidos em ciclo de 12 h claro/escuro, a 20-25°C, com água e ração *ad libitum*. A execução dos experimentos foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP - Protocolo n°. 540 - Anexo 1) e pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio - Protocolo n°. 0092017 - Anexo 2). Todos os procedimentos foram realizados conforme os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Colite experimental, tratamento com IFX e/ou Boc-2

Camundongos WT e AnxA1^{-/-} foram divididos em dois grupos: Controle e Dextran sulfato de sódio (DSS). O grupo Controle recebeu água sem aditivos, enquanto os demais grupos desenvolveram colite experimental pela ingestão de 2% de DSS veiculado na água. O DSS foi adicionado no dia 0 e trocado nos dias 2 e 4 do experimento, para manter a exposição constante do indutor de colite. No dia 6, o DSS foi retirado e os animais foram mantidos até o dia 10 sob administração de água sem aditivos.

Os grupos WT/DSS foram tratados ou não com o antagonista pan de receptores FPR, Boc-2 (N-t-BOC-MET-LEU-PHE, 10 µg/kg em 200 µL) dos dias 0 a 9 (WT/DSS+Boc-2). Injeção de IFX (1 mg/kg em 200 µL) foi administrada no dia 1 do experimento, isoladamente (WT/DSS+IFX e AnxA1^{-/-}/DSS+IFX) ou concomitantemente com Boc-2 (WT/DSS+IFX+Boc-2). Os grupos Controle e DSS, WT e AnxA1^{-/-}, receberam injeções de salina 0,9% durante os dias 0-9. Todos os tratamentos foram administrados via intraperitoneal (i.p.) e continham 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para solubilização do Boc-2. O protocolo de desenvolvimento da colite experimental e os respectivos tratamentos i.p. estão ilustrados na **Figura 6**.

Figura 6. Desenho experimental do modelo *in vivo* de colite. Para o modelo de colite induzida por DSS, foram utilizados camundongos WT e AnxA1^{-/-}, machos, com 8-10 semanas ou 20-28g. O DSS foi adicionado à água no dia 0, trocado nos dias 2 e 4, e retirado no dia 6. Os animais foram acompanhados até o dia 10, quando foram eutanasiados. Os grupos Controle e Boc-2 foram receberem diariamente injeções i.p. de veículo (salina a 0,9% + DMSO a 0,5%) ou Boc-2 diluído em veículo (10 µg/kg), respectivamente. Os grupos IFX receberam o anti-TNF- α (1 mg/kg) i.p., diluído em salina a 0,9%, apenas no dia 1 (Fonte: autoria própria).

Escores de peso corpóreo, diarreia e sangue oculto foram coletados dos Dias 0 a 10. O Índice de Atividade da Doença (DAI) foi calculado a partir da soma desses parâmetros. No dia 10, os animais foram eutanasiados após aprofundamento com o anestésico nasal Isoflurano (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoro-etano) e o cólon foi removido da junção ileocecal até a proximidade do ânus, lavado e avaliado macroscopicamente. Finalmente, o órgão foi fragmentado para análises histológicas (cólon distal), proteicas e de células (cólon médio/proximal).

Citometria de fluxo para células de lâmina própria

Amostras de cólon foram avaliadas por citometria de fluxo para o fenótipo CD4⁺CD25⁺ (T reguladores - Treg). Fragmentos de cólon médio foram imersos em 3 mL de PBS-gentamicina a 0,25%, em gelo. As amostras foram colocadas em 10 mL de solução de EDTA por 15 min, em agitação, para eliminação das células epiteliais. Esse procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante, descartado. Os fragmentos foram lavados em PBS para remoção do EDTA e, então, incubados com 2 mL de solução de colagenase a 37°C, sob agitação, por 1h30 min. Após centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS e as células foram distribuídas entre os respectivos tubos para as marcações com os anticorpos mencionados no item anterior. Para as análises, 10.000 eventos foram detectados e quantificados por porcentagem. Os anticorpos utilizados para definição das populações de interesse estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para ensaio de citometria de fluxo em amostras de camundongo.

	Proteína	Fonte	Diluição	Referência	Fornecedor	Conjugação
Anticorpos primários	CD4	Rato	1:100	553650	BD Biosciences	FITC
	CD25	Rato	1:100	17-0251-82	eBioscience	APC

Fonte: autoria própria. CD: *cluster of differentiation*; FITC: *fluorescein isothiocyanate*; APC: *allophycocyanin*.

Processamento histológico do cólon, histopatologia e imuno-histoquímica

Após lavagens em PBS, o cólon distal foi fixado em paraformaldeído a 4%, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Secções de 3 µm foram coradas com Hematoxilina-Eosina para histopatologia ou submetidas a imunomarcações.

Previamente às imunomarcações, os fragmentos foram aquecidos em estufa a 60 °C por 1 hora, desparafinizados e hidratados, permeabilizados em com solução de Triton-X-100 a 0,01% e submetidos à exposição de antígenos por incubação em tampão citrato (0,01 M; pH 6,0).

Imuno-histoquímica para AnxA1. Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio em água destilada (1:1) em três etapas de 10 min. O material foi incubado com anticorpo primário anti-AnxA1 (1:500, diluído em PBS-BSA a 1%) *overnight* a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário em câmara úmida e temperatura ambiente por 1 hora. A expressão dos substratos foi revelada por DAB (3,3-

diaminobenzidina, *Liquid DAB Substrate Kit*, Invitrogen, 3 min) e contracorada com hematoxilina. Após desidratação em gradiente de etanol e xilol, as lâminas foram montadas em entelan.

Imunofluorescência para β -actina e Vilina. Os epítomos inespecíficos foram bloqueados com PBS+soro fetal bovino (SFB) a 20% por 1 h, a temperatura ambiente, e incubados em solução contendo os anticorpos primários anti- β -actina (1:200) e anti-vilina (1:50), *overnight* a 4 °C. Após lavagens e incubação com coquetel de anticorpos secundários (1 h, temperatura ambiente), as lâminas foram montadas em meio de montagem *Fluoroshield* contendo DAPI.

As imagens das amostras descritas acima foram obtidas em microscópio de luz e fluorescência Zeiss Axio Imager.2A, utilizando o software Zen. Os anticorpos e as concentrações utilizados para as marcações descritas constam na **Tabela 2**.

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados para ensaio de imuno-histoquímica e imunofluorescência em amostras de cólon de camundongo.

	Proteína	Fonte	Diluição	Referência	Fornecedor	Conjugação
Anticorpos primários	AnxA1	Coelho	1:500	71-3400	Thermo Fisher	Purificado
	β -actina	Camundongo	1:200	ab6276	Abcam	Purificado
	Vilina	Coelho	1:50	ab97512	Abcam	Purificado
Anticorpos secundários	IgG anti-coelho	Cabra	1:200 (AnxA1)	ab6721	Abcam	HRP
	IgG anti-camundongo	Cabra	1:200 (β -actina)	DI-2594	Vector Labs	DyLight 594
	IgG anti-coelho	Cabra	1:200 (Vilina)	DI-1788	Vector Labs	DyLight 488

Fonte: autoria própria. AnxA1: *annexin A1*; FPR: *formyl peptide receptor*; HRP: *horseradish peroxidase*.

Quantificação de mediadores em sobrenadante de cultivo de explante e em homogenato de cólon Cultivo de explante. O protocolo de cultivo de explantes foi executado como descrito previamente (SENA et al., 2015; DE PAULA-SILVA et al., 2016). Fragmentos proximais do cólon foram abertos longitudinalmente, lavados em 4 mL de PBS estéril sob agitação e cultivados em 1 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado com SFB a 10%, L-glutamina a 1% e estreptomicina/anfotericina/penicilina a 1%. Essas amostras foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% durante 24 h e, após, o sobrenadante foi coletado e para quantificação da AnxA1 secretada por técnica de ELISA.

Homogenato. Amostras de cólon médio foram abertas longitudinalmente, lavadas em PBS e maceradas em 100 μ L de tampão RIPA contendo inibidor de protease (1:100) com o auxílio de homogeinizador Ultra Turrax (T10-Basic, IKA). Os macerados foram mantidos em gelo durante 20 min sob agitação, centrifugados para remoção dos *debris* teciduais (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) e utilizados para detecção da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) por ELISA.

ELISA. A detecção das proteínas de interesse foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas por leitor de densidade ótica (*Molecular Devices*)

sob comprimento de onda de 450 nm. Os valores foram normalizados pelas proteínas totais dosadas por ensaio de Bradford, sendo expressos em ng/mL/mg de proteína. Os kits utilizados para os ensaios supracitados estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Kits comerciais para detecção de proteínas (ELISA) em sobrenadante de explante colônico cultivado por 24 h ou em homogenato de cólon de camundongo.			
	Proteína	Referência	Fornecedor
Explante	AnxA1	MBS944251	My BioSource
Homogenato	MMP9	DY6718	R&D Systems

Fonte: autoria própria. AnxA1: annexin A1; MMP: metaloproteinase de matriz.

Isolamento de células da lâmina própria e tratamentos ex vivo

Para ensaios *ex vivo*, camundongos *naïve* foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia nasal (Isoflurano) e, após abertura ventral, o intestino grosso foi removido, lavado em PBS contendo antibióticos (penicilina/estreptomicina e gentamicina, 10.000 µg/mL e 50 µg/mL respectivamente, Gibco) e aberto longitudinalmente para retirada das fezes. Sob fluxo laminar, os intestinos foram submetidos a uma série de lavagens em solução de PBS + antibióticos, até que nenhum resíduo fecal fosse observado. Em seguida, os órgãos foram fragmentados em pedaços menores e incubados com Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) sem cálcio e magnésio em dois banhos de 10 min cada, para remoção das células epiteliais. Os fragmentos foram, então, digeridos em solução de collagenase II e IV derivadas de *Clostridium histolyticum* (0,5 mg/mL cada, Gibco) por 20 min e lavados em filtros de células de 40 µm duas vezes, para isolamento das células da lâmina própria. Estas células do intestino foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 1% de SFB e incubadas a 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços. Foram adicionados os seguintes tratamentos: lipopolissacarídeo (LPS, Sigma Aldrich) a 200 ng/mL e/ou IFX a 0,1, 1,0 ou 10,0 µg/mL. O LPS foi adicionado 30 min antes dos tratamentos com IFX. Células não-tratadas ou tratadas com IFX nas doses supracitadas sem adição de LPS constituíram os grupos controle destes ensaios. Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e separados para dosagem da AnxA1 (My BioSource), de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial, que consta na **Tabela 4**.

Tabela 4. Kit comercial para detecção de AnxA1 (ELISA) em sobrenadante de células da lâmina própria intestinal murina cultivadas <i>ex vivo</i> por 24 h			
	Proteína	Referência	Fornecedor
Sobrenadante de cultivo <i>ex vivo</i>	AnxA1	MBS944251	My BioSource

Fonte: autoria própria. AnxA1: annexin A1.

Ensaio in vitro

Cultivo das linhagens de células epiteliais

Manutenção das células epiteliais. A linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com SFB a 20%. As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. As trocas do meio foram realizadas a cada três dias e as células foram subcultivadas semanalmente com tratamento com 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA.

Cultivo da Caco-2 em *transwell*. Insertos *transwell* para placas de 24 poços (poro 0,4 µm, 0,33 cm², Corning) foram lavados com PBS e tratados com colágeno bovino tipo I diluído em PBS (1:10, BD Biosciences) antes do plaqueamento (37 °C, 1 hora). Após nova lavagem com PBS, 50.000 células/inserto foram adicionadas em DMEM+SFB 20%. Após 3-5 dias de plaqueamento, as monocamadas que apresentavam resistência transepitelial (TEER) superior a 400 Ω·cm² passaram a ser cultivadas em DMEM+SFB 2% 24 horas antes do início dos tratamentos.

Indução da inflamação e tratamentos

As monocamadas de Caco-2 foram expostas estimuladas com TNF-α recombinante humano (100 ng/mL, Sigma-Aldrich) no tempo inicial (t=0). Simultaneamente, foram administrados os tratamentos: PBS (Controle), IFX (10 µg/mL), Boc-2 (0,4 µM) em dose suficientemente baixa para bloquear seletivamente FPR1, ou WRW4 (0,4 µM), antagonista do FPR2. Todos os estímulos foram diluídos em DMEM+SFB 2% e adicionados ao compartimento basolateral do *transwell*. O resumo dos tratamentos, doses e testes para acompanhamento da integridade das camadas estão ilustrados na **Figura 7**.

Controle	TNF- α (100 ng/mL)
Meio de cultura (D2)	Meio de cultura (D2)
IFX (10 μ g/mL)	IFX
Boc-2 (0,4 μ M)	IFX+Boc-2
WRW4 (0,4 μ M)	IFX+WRW4

Figura 7. Modelo de inflamação da barreira epitelial formada por células Caco-2 *in vitro*. Monocamadas de células Caco-2 em confluência após 3-5 dias de cultivo sobre *transwells* cobertos com colágeno bovino (1:10 em PBS) foram estimuladas no tempo t=0 com: veículo (DMEM+SFB a 2% - D2) ou TNF- α (100 ng/mL em D2). Simultaneamente, foram adicionados os tratamentos: IFX (10 μ g/mL) e/ou Boc-2 (0,4 μ M) ou WRW4 (0,4 μ M). Após 48 h de cultivo, os sobrenadantes foram coletados e as células, preparadas para os ensaios de imunofluorescência. (Fonte: autoria própria).

Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar o potencial efeito citotóxico dos tratamentos utilizados nas monocamadas de Caco-2, foi utilizado brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após 48 h, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas e incubadas com MTT a 0,5 mg/mL diluído em PBS por 3 h a 37 °C. O precipitado púrpura de formazano obtido foi diluído em 200 µm de DMSO por 30 min e transferido para uma placa de 96 poços. As amostras foram lidas a 575 nm e viabilidade foi expressa como porcentagem da densidade ótica normalizada com o grupo controle.

Imunofluorescência nas monocamadas de Caco-2

Para análise dos efeitos dos tratamentos na ativação e integridade das monocamadas de Caco-2, as expressões do receptor TNFR2 e das proteínas de junção celular, *zonula occludens*-1 (ZO-1) e claudina-1, foram avaliadas por imunofluorescência. As células foram fixadas em metanol absoluto a -20 °C, 20 min. O excesso de metanol foi retirado e as placas contendo os insertos com monocamadas foram congeladas a seco a -20 °C até o momento de execução da técnica. Previamente à imunofluorescência, as monocamadas foram permeabilizadas em Triton-X-100 a 0,01% diluído em PBS e, após 20 min, lavadas com PBS. Após bloqueio em PBS+SFB 5%, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários anti-ZO-1 e anti-claudina-1 por 1 hora a 37 °C. Os anticorpos secundários anti-cabra e anti-coelho foram utilizados para detecção dos anticorpos primários anti-ZO1 e anti-claudina-1/anti-TNFR2, respectivamente. Por fim, os núcleos das células foram marcados com DAPI e as lâminas foram montadas com Fluoromount (Sigma-Aldrich). As análises de intensidade de fluorescência foram conduzidas em microscópio Imager.A2 Zeiss, utilizando objetiva de 100x e sob os filtros verde (claudina-1) ou vermelho (TNFR2 e ZO-1). Pelo menos 15 campos foram fotografados aleatoriamente para análise homogênea dos efeitos dos tratamentos nas monocamadas. Para densitometria da expressão de TNFR2, 10 campos foram analisados no software ImageJ. Os resultados foram expressos em valores arbitrários. A lista de anticorpos e diluições utilizadas nestes ensaios consta na **Tabela 5**.

Tabela 5. Anticorpos primários e secundários utilizados para ensaio de imunofluorescência em monocamadas de células epiteliais humanas Caco-2.

	Proteína	Fonte	Diluição	Referência	Fornecedor	Conjugação
Anticorpos primários	TNFR2	Coelho	1:50	ab7364	Abcam	Purificado
	Claudina-1	Coelho	1:50	ab15098	Abcam	Purificado
	ZO-1	Cabra	1:50	ab190085	Abcam	Purificado
Anticorpos secundários	IgG anti-coelho	Cabra	1:100	A11008	Thermo Fisher	Alexa Fluor 488
	IgG anti-coelho	Cabra	1:100	A11010	Thermo Fisher	Alexa Fluor 546
	IgG Anti-cabra	Burro	1:100	A11057	Thermo Fisher	Alexa Fluor 568

Fonte: autoria própria. TNFR: *tumor necrosis fator receptor*; ZO: *zonula occludens*; IgG: imunoglobulina G.

Quantificação da secreção de mediadores inflamatórios

Os sobrenadantes das monocamadas de Caco-2 tratadas durante 48 h foram armazenados e posteriormente utilizados para dosagem da AnxA1 e do TNF- α por ensaio de ELISA, conforme instruções do fabricante (Human Set OptEIA para TNF, BD Biosciences). Os kits utilizados estão listados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Kits comerciais para detecção de proteínas (ELISA) em sobrenadante de linhagem de células epiteliais humanas Caco-2 e no plasma de pacientes com DC.

	Proteína	Referência	Fornecedor
Sobrenadante de Caco-2	TNF- α	88-7346-88	Thermo Fisher
Sobrenadante de Caco-2 e plasma de pacientes	AnxA1	MBS704042	MyBioSource

Fonte: autoria própria. TNF: *tumor necrosis factor*, AnxA1: *annexin A1*.

Pacientes com DC

Participantes do estudo

Os participantes do estudo foram abordados no Serviço de Gastroenterologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (São Paulo, Brasil). Para análise de parâmetros sanguíneos, foram coletados 12 mL de sangue de pacientes com diagnóstico de DC tratados com IFX (n=23), não-tratados com IFX (n=1) e doadores saudáveis (n=5). Entre os pacientes com DC, foi possível obter apenas 12 blocos de parafina contendo biópsias de cólon obtidas previamente durante exame de colonoscopia. Ainda, todos os pacientes permitiram o acesso a seus históricos médicos (n=24). Todos os participantes receberam e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após total esclarecimento sobre o estudo, o qual foi conduzido segundo as recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e da Universidade de São Paulo. As informações relevantes sobre os doadores envolvidos neste estudo estão listadas na **Tabela 7**.

Tabela 7. Características dos pacientes com DC e dos doadores saudáveis.

Parâmetros	Doadores saudáveis	Amostras de sangue			Biópsias de cólon		
		DC					
		Não-tratado	Remissão	Falha	Não-tratado	Remissão	Falha
Média de idade (mín.-máx.)	32 (23-41)	24	35 (19-50)	39 (19-63)	28 (19-49)	43 (17-44)	38 (61-16)
Desvio padrão da idade	10,11	0,00	12,14	14,65	13,96	3,51	31,81
Mulheres	3	1	8	5	3	2	0
Homens	2	0	4	7	1	1	2
Total	5	1	12	11	4	3	2
Medicações							
Corticosteroides	-	-	-	3 (27,3%)	1 (25%)	-	1 (50%)
Mesalazina	-	1 (100%)	3 (25%)	6 (54,6%)	2 (50%)	2 (66,6%)	1 (50%)
Azatioprina	-	-	3 (25%)	4 (36,4%)	3 (75%)	-	2 (100%)
Anti-diarreico	-	-	1 (8,3%)	1 (9,1%)	-	1 (33,3%)	-
Anti-depressivo	2 (40%)	-	2 (16,6%)	-	-	1 (33,3%)	1 (50%)
Antibióticos	-	-	-	2 (18,2%)	1 (25%)	-	-
Hepáticos e pancreáticos	-	-	-	3 (27,3%)	1 (25%)	-	1 (50%)
Hidrocortisona pré-IFX	-	-	-	1 (9,1%)	-	-	-
Outros	2 (40%)	1 (100%)	2 (16,6%)	4 (36,4%)	2 (50%)	1 (33,3%)	2 (100%)

Fonte: autoria própria. DC: Doença de Crohn. IFX: infliximabe.

Classificação da intensidade da DC segundo os parâmetros clínico e microscópico

Os prontuários médicos mais recentes dos pacientes envolvidos no estudo foram utilizados para o cálculo do Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI), a fim de determinar a condição clínica dos indivíduos. Para quantificar o escore dos parâmetros microscópicos, secções de 3 µm das biópsias incluídas em parafina foram coradas com Hematoxilina-Eosina e fotografadas no

Escaner Digital NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics). Os sistemas de quantificação utilizados para o cálculo dos parâmetros clínico e histológico constam na **Tabela 8**.

Tabela 8. Sistemas de quantificação dos escores clínicos e histológicos dos pacientes com DC.	
CDAI (baseado no quadro clínico do paciente)	
Parâmetro	Escore
Média do número de evacuações líquidas/pastosas nos últimos 7 dias	(x2) 0 = sem dor 1 = dor leve 2 = dor moderada 3 = dor intensa (x5)
Média da intensidade da dor abdominal nos últimos 7 dias	0 = bom 1 = abaixo da média 3 = ruim 4 = muito ruim 5 = terrível (x7)
Média do escore de sensação de bem-estar nos últimos 7 dias	0 = não 1 = sim (x30)
Uso de anti-diarreicos	- Artrite ou artralgia - Irite ou uveíte - Eritema nodoso/pioderma gangrenoso/úlceras aftosas - Fissuras anais/fístula/abscessos perirretais - Febre durante a última semana (> 36.8 °C) (x20)
Número de complicações	0 = não 2 = questionável 5 = definitiva (x10)
Massa abdominal	Homem = 47 - Ht Mulher = 42 - Ht (x6)
Hematócrito (Ht)	100 x ((1) - (peso atual/peso ideal)) (x1)
Porcentagem de variação do peso corpóreo ideal	
Escore microscópico para DC (baseado na avaliação histológica de biópsias do cólon)	
Dano epitelial	0 = normal 1 = focal 2 = extensa
Alterações na histoarquitetura	0 = normal 1 = moderada 2 = grave
Células mononucleares na lâmina própria	0 = normal 1 = aumento moderado 2 = aumento intenso
Células polimorfonucleares na lâmina própria	0 = normal 1 = aumento moderado 2 = aumento intenso
Neutrófilos no epitélio	1 = epitélio de revestimento 1 = criptite 2 = abscesso de cripta
Erosão ou ulceração	0 = não; 1 = sim
Granuloma	0 = não; 1 = sim
Fonte: autoria própria. DC: Doença de Crohn. CDAI: <i>Crohn's Disease Activity Index</i> - baseado e adaptado de Best et al., 1976. Escore microscópico: baseado em Laharie et al., 2011 (adaptado de D'Haens et al. 1999).	

Processamento das amostras de sangue para isolamento dos leucócitos e do plasma

Amostras de 12 mL de sangue coletadas de pacientes (DC+IFX Remissão: n=12; DC+IFX Falha: n=11; DC não-tratada: n=1) e doadores saudáveis (Não-DII: n=5) foram centrifugadas (1500 rpm, 8 min) para separação das frações de células vermelhas, células brancas e plasma.

AnxA1 no plasma. Amostras de plasma foram utilizadas para detecção da AnxA1 circulante por ensaio de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. As informações sobre o kit utilizado constam na **Tabela 6**.

Leucócitos circulantes. Após retirada do plasma, 10 mL de NH₄Cl a 0,13 M foram adicionados às frações de células vermelhas e branca remanescentes. As amostras foram mantidas por 10 min em gelo para otimizar o processo de lise dos eritrócitos. Após centrifugação, essa etapa foi repetida duas vezes e o pellet final contendo leucócitos totais foi congelado a -80 °C em SFB + DMSO a 10%. Para detecção dos marcadores por citometria de fluxo, as células foram fixadas em PFA a 1% por 30 min e incubadas com anticorpos anti-FPR1 (PE) e anti-FPR2 (FITC) durante 30 min. Após lavagens, as células foram ressuspensas em PBS e 10.000 eventos por amostra foram obtidos em citômetro de fluxo BD Accuri. Populações positivas e negativas para a expressão dos marcadores de interesse foram determinadas a partir de amostras contendo os anticorpos separadamente. Para análise dos dados, foi utilizado software BD Accuri C6, e os resultados foram expressos em mediana da intensidade de fluorescência (MFI). Os anticorpos utilizados estão listados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo em amostras de pacientes com DC.

	Proteína	Fonte	Diluição	Referência	Fornecedor	Conjugação
Anticorpos primários	FPR1	Camundongo	1:10	FAB37440	R&D Systems	PE
	FPR2	Coelho	1:50	bs-3654R	Bioss	FITC

Fonte: autoria própria. DC: Doença de Crohn. FPR: formyl peptide receptor; PE: phycoerythrin; FITC: fluorescein isothiocyanate.

Histopatologia e detecção de FPR1, FPR2 e AnxA1 em biópsias de DC

Fragmentos de cólon coletados de pacientes com DC não-tratados com IFX (n=4), tratados e responsivos (n=3) ou não-responsivos a IFX (n=2) foram utilizados. As lâminas contendo seções de 3 µm destas amostras foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em solução de Triton-X-100 a 0,01% em T-TBS para permeabilização. Após lavagens com T-TBS e recuperação do antígeno com tampão citrato de sódio (pH 6,0, 30 min, 96 °C), os epítomos inespecíficos foram bloqueados com solução de SFB a 20% em TBS por 1 h, temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário policlonal feito em camundongo anti-FPR1 (1:25, BD Biosciences), anti-FPR2 (1:10, Sigma Aldrich) ou monoclonal anti-ANXA1 (1:50, clone 1B, 10 µg/mL) diluído em SFB a 10% em TBS, 4 °C, *overnight*. Para confirmar a especificidade da reação, um fragmento foi submetido ao mesmo protocolo, porém, incubado em solução de

bloqueio ao invés de anticorpo primário. Solução de anticorpo secundário cabra anti-camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) foi adicionada por 1h, lavada, e as secções foram tratadas com solução comercial para redução da autofluorescência (Vector TrueView, Vector Labs) por 4 min. Finalmente, as lâminas foram montadas em meio comercial contendo DAPI para detecção do DNA (Vector Labs). FPR1, FPR2 e AnxA1 foram fotografados em microscópio confocal (Zeiss LSM 800) utilizando *software* Zen 2.0. Para análises densitométricas, cinco campos de cada fragmento foram fotografados utilizando ferramenta de eixo-Z para capturar cinco camadas de tecido em profundidade. A camada central foi utilizada para a quantificação da intensidade de fluorescência no software Fiji ImageJ. Vale ressaltar que o grupo DC+IFX não-responsivo (Falha) não foi submetido a testes estatísticos devido ao baixo número de pacientes (n=2). Os detalhes dos anticorpos utilizados para este ensaio constam na **Tabela 10**.

Tabela 10. Anticorpos primários e secundário utilizados para ensaio de imunofluorescência em biópsias de pacientes com DC.

	Proteína	Fonte	Diluição	Referência	Fornecedor	Conjugação
Anticorpos primários	FPR1	Camundongo	1:25	556015	BD Biosciences	Purificado
	FPR2	Camundongo	1:10	SAB1402202	Sigma Aldrich	Purificado
	AnxA1	Camundongo	1:50	--	Produzido <i>in-house</i>	Purificado
Anticorpos secundários	IgG anti-camundongo	Cabra	1:200	A11001	Thermo Fisher	Alexa Fluor 488

Fonte: autoria própria. DC: Doença de Crohn. FPR: *formyl peptide receptor*. AnxA1: anexina A1. IgG: imunoglobulina.

Análises de bioinformática

Dois estudos (GSE42296 e GSE16879) contendo dados de transcriptoma publicamente disponíveis derivados de doadores saudáveis e/ou com DC foram selecionados no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO). A ferramenta de busca GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) foi utilizada para identificar os genes diferencialmente expressos e obter os valores de *p-value* e Log *fold-change* (LogFC). Os níveis transcricionais de FPR1, FPR2 e AnxA1 foram avaliados e considerados diferencialmente expressos para valores de LogFC maiores do que 1,25 e de *p-value* menores do que 0,05. Para comparações entre grupos, resultados para expressão de mRNA após transformação log2 foram plotados em gráficos de colunas. Por fim, para avaliar a distribuição dos dados em relação à media da população, os valores de transformação log2 foram utilizados para o cálculo do Escore-Z ((valor individual – média da população) / desvio padrão da população). Os dados referentes aos estudos selecionados estão reunidos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Detalhamento dos estudos e marcadores selecionados a partir do repositório GEO-NCBI para análises de bioinformática.

GEO número de acesso		GSE42296				
Organismo		Humano				
Fonte		PBMCs				
Estudo		<i>Distinct, non-overlapping gene panels of peripheral blood gene expression predict response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis and Crohn's disease</i>				
Plataforma		GPL6244 - [HuGene-1_0-st] Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array				
Amostras		DC responsivo – antes do tratamento	DC falha – antes do tratamento (vs DC responsivo)	DC+IFX responsivo (vs DC responsivo)	DC+IFX falha (vs DC falha)	DC+IFX falha (vs DC+IFX responsivo)
Número de pacientes		14	6	14	6	6
<i>p-value</i>	FPR1	--	0,66187760	0,04084200*	0,20070000	0,59446250
	ID=8038899	--	-0,1100	-0,4175	-0,4570	-0,1490
	FPR2	--	0,66715920	0,08390200	0,16134400	0,36623730
	ID=8030860	--	-0,1468	-0,4668	-0,6480	-0,3280
	AnxA1	--	0,12513480	0,30255700	0,99115000	0,39490700
LogFC	ID=8155849	-	-0,1310	-0,0601	-0,0013	-0,0723
GEO número de acesso		GSE16879				
Organismo		Humano				
Fonte		Cólon				
Estudo		<i>Mucosal expression profiling in patients with inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment</i>				
Plataforma		GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array				
Amostras		Controle	DC responsivo – antes do tratamento (vs Controle)	DC falha – antes do tratamento (vs Controle)	DC+IFX responsivo (vs Controle)	DC+IFX falha (vs Controle)
Número de pacientes		6	11	7	11	7
<i>p-value</i>	FPR1	--	0,00000006***	0,00000006***	0,19772128	0,00000184***
	ID=205119_s_at	--	2,391 [#]	5,210 [#]	0,7090	5,091 [#]
	FPR2	--	0,00007700***	0,00000444***	0,35319964	0,00000817***
	ID=210772_at	--	1,768 [#]	3,929 [#]	-0,698	3,572 [#]
	AnxA1	--	0,00000087***	0,00000256***	0,17469870	0,00000194***
LogFC	ID=201012_at	--	3,109 [#]	4,276 [#]	1,074	3,737 [#]
Fonte: autoria própria. GEO: <i>Gene Expression Omnibus</i> ; PBMC: <i>peripheral blood monocyctic cells</i> ; DC: Doença de Crohn; IFX: infliximabe; FPR: <i>formyl peptide receptor</i> ; AnxA1: <i>annexin A1</i> ; FC: <i>fold-change</i> ; ID: número de identificação. <i>p-value</i> : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. LogFC: [#] $FC > 1,25$.						

Análises estatísticas

Para avaliar a distribuição paramétrica ou não-paramétrica, foi utilizado teste de Kolmogorov-Smirnov. Após, análises de variância (ANOVA) foram utilizadas, seguidas de pós-teste de Tukey (paramétricas) ou Dunn (não-paramétricas). Para comparações entre dois grupos, foram utilizados teste t não-pareado (amostras independentes) ou teste t pareado (amostras repetidas). Análises de correlação foram analisadas por coeficiente de Pearson. Valores de probabilidade com $p < 0,05$ foram considerados significantes e os resultados foram expressos em média $\pm$ S.E.M. (ensaios *in vivo* e *in vitro*) ou média $\pm$ S.D. (amostras de pacientes).

Resultados

IFX atenua a sintomatologia da colite induzida por DSS somente na presença da AnxA1

Camundongos WT e AnxA1^{-/-} foram submetidos ao protocolo de colite experimental induzida por DSS e seus parâmetros clínicos foram acompanhados diariamente durante 11 dias (Figuras 8 e 8). A ausência da AnxA1 durante a colite experimental agravou a perda de peso (Figura 8A, dias 6-10) e os escores de diarreia (Figura 8B, dias 4-10) e de sangue oculto nas fezes (Figura 8C dias 5-9) em relação aos animais controles. Em comparação ao grupo WT/DSS, os camundongos AnxA1^{-/-}/DSS apresentaram perda de peso (Figura 8A, dias 5 e 7), escores de diarreia (Figura 8B, dia 7) e sangue oculto (Figura 8C, dia 8) mais acentuados, com piora constante do quadro clínico até o último dia do experimento (Figuras 8A-D). Em concordância com os resultados obtidos pelo nosso grupo anteriormente (DE PAULA-SILVA et al., 2016), o IFX não promoveu melhora de nenhum dos parâmetros clínicos nos animais AnxA1^{-/-}, confirmando a participação da AnxA1 na eficácia do tratamento. Além disso, 50% de mortalidade foi observada no grupo AnxA1^{-/-} DSS+IFX, enquanto o grupo AnxA1^{-/-}/DSS apresentou 25% de perda de animais (Figura 8E).

A maior intensidade da colite experimental em animais AnxA1^{-/-} e a importância dessa proteína para a resolução da inflamação após o tratamento com IFX foram confirmadas por citometria de fluxo para a população dos leucócitos de fenótipo pró-resolutivo T regulatório (Treg - CD4⁺CD25⁺) infiltrados no cólon (Figura 8F). Ao décimo dia do protocolo de colite experimental, não foram detectadas diferenças nas populações de Treg entre os tratamentos em animais WT. Esse resultado, em conjunto com os dados clínicos, demonstra que após quatro dias da retirada do DSS, os animais que sobreviveram à colite aguda evoluem espontaneamente para um quadro estável. Nos animais AnxA1^{-/-}, no entanto, foi observado menor número de Treg transmigrados para o intestino colítico não-tratado. Após tratamento com IFX, o processo inflamatório apresentou-se mais descontrolado, com diminuição de CD4⁺CD25⁺ ainda mais intensa. A partir desses dados, é possível evidenciar a relevância da AnxA1 endógena no controle do processo inflamatório, atuando no encaminhamento da resolução.

Em seguida, a morfologia do intestino grosso dos animais após colite tratada ou não com IFX e/ou Boc-2 foi avaliada (Figuras 8G e H). Nos animais AnxA1^{-/-}/DSS e DSS+IFX, o ceco apresentou coloração escurecida pela presença de sangue e aparência edemaciada (Figura 8G). Não houve alteração no peso do órgão entre os grupos (dados não mostrados), no entanto, o comprimento foi reduzido nos camundongos AnxA1^{-/-} expostos ao DSS com ou sem tratamento em relação ao grupo controle (Figura 8H). Simultaneamente à redução do comprimento intestinal, os níveis de MMP-9 tecidual dos grupos DSS e DSS+IFX deficientes para AnxA1 foram significativamente superiores do que os de animais controle (Figura 8I). Em conjunto, a análise do intestino grosso mostrou que, na ausência de AnxA1 endógena, o tratamento com IFX não preservou a morfologia do órgão após colite experimental.

Análises histológicas confirmaram as observações macroscópicas, uma vez que os grupos de animais cujos intestinos foram encurtados apresentaram acentuadas alterações na histoarquitetura do cólon distal (Figuras 8J-L). A ingestão do DSS induziu lesões, especialmente,

nas camadas mucosa e submucosa. Como consequência do dano causado pelo DSS ao epitélio de revestimento, porções da barreira intestinal foram destacadas da parede tecidual em direção ao lúmen, provocando ulcerações. Foi possível observar, ainda, degeneração vacuolar hidrópica, infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa, edema, displasia e abscessos no interior das criptas intestinais, decorrentes da perda das células glandulares e infiltração de células imunes (Figuras 8K). O tratamento com IFX na ausência total da AnxA1 endógena não promoveu nenhum efeito benéfico, sendo que os danos histológicos foram semelhantes aos observados no grupo sem tratamento, demonstrando o processo inflamatório contínuo no cólon (Figura 8L). Os dados clínicos, anatômicos e histopatológicos de animais AnxA1^{-/-} nos permitem concluir, de maneira consistente, que a eficácia do IFX no tratamento da colite experimental é comprometida em organismos que não são capazes de produzir AnxA1.

Figura 8. Ausência da AnxA1 endógena revoga os efeitos resolutivos do IFX na colite experimental. (A) Porcentagem de alteração do peso corpóreo. (B) Escore de diarreia. (C) Escore de sangue oculto. (D) Índice de Atividade da Doença (DAI). (E) Porcentagem de sobrevivência. (F) Valores relativos de linfócitos T reguladores no cólon. (G e H) Alterações anatômicas e do comprimento do intestino grosso. (I) Níveis de MMP-9 tecidual. Média dos valores dos animais WT e AnxA1^{-/-} (linhas contínuas); Média dos valores dos camundongos AnxA1^{-/-} (linhas pontilhadas). ^{aa} p < 0,01; ^{aaa} p < 0.001 DSS vs Controle; & p < 0,05 AnxA1^{-/-}/DSS vs WT/DSS (cinza) ou AnxA1^{-/-}/DSS+IFX vs WT/DSS+IFX (azul); * p < 0,05, *** p < 0,001. Resultados expressos como média ± S.E.M. (J-L) Histopatologia de camundongos AnxA1^{-/-}. Úlceras (setas pretas); Alterações de criptas (setas brancas); Degeneração vacuolar hidrópica (cabeças de seta pretas); Edema (Ed); infiltrado inflamatório (círculos). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Inclusão: parafina. Secções: 3 µm. Barras: 20 µm. n = 3-5 animais/grupo. (Fonte: autoria própria)

Após confirmada a falha do tratamento com IFX em resolver a inflamação intestinal em animais deficientes para AnxA1 endógena, o mesmo modelo foi aplicado a camundongos WT em que os receptores da AnxA1, FPR1 e FPR2, foram bloqueados pelo pan-antagonista Boc-2, permitindo a avaliar a participação de suas vias e, ainda, da AnxA1 secretada (Figura 9).

Os animais WT expostos ao DSS sem tratamento apresentaram redução do peso corpóreo nos dias 6 a 10 em comparação aos controles (Figura 9A). Quando administrado isoladamente, o IFX atenuou a perda de peso nos últimos dois dias do experimento (Figura 9A, dias 9 e 10). O bloqueio dos FPRs pelo antagonista Boc-2 não intensificou essa perda mas, quando realizado concomitantemente com IFX, reverteu a melhora promovida pelo anti-TNF- α (Figura 9A, dia 10). Assim, é possível concluir que as vias desencadeadas pelos ligantes de FPR participam da eficácia do IFX na proteção dos camundongos sobre a perda de peso corpóreo durante a colite.

Além da alteração do peso corpóreo, o DSS induziu aumento do escore de diarreia nos dias 3, 4 e 6-10 (Figura 9B) e perda de sangue acentuada nos dias 5-7 (Figura 9C). Na fase aguda da colite, o IFX adiantou a perda de sangue, que foi superior em relação aos grupos WT/DSS (Figura 9C, dia 4) e WT/DSS+IFX+Boc-2 (Figura 9C, dias 4 e 5). No entanto, após o dia 6, o tratamento com IFX reduziu a quantidade de sangue oculto nas fezes, efeito revertido pelo bloqueio dos receptores FPR (Figura 9C, dia 7).

A partir dos valores de DAI fornecidos pelo somatório dos parâmetros anteriores, foi possível observar que o DSS induziu a colite experimental de forma eficiente, aumentando a sua atividade dos dias 2-10 (Figura 9D). O tratamento com Boc-2, que impede a ativação de FPR durante a patogênese da colite, intensifica a atividade da doença (Figura 8D, dias 5 e 9), em relação ao grupo WT/DSS. Finalmente, o tratamento com IFX não induziu recuperação no período inicial (Figura 9D, dias 4 e 5), mas promoveu melhora tardia significativa no quadro clínico dos camundongos (Figura 9D, dia 8), que não foi observada durante o tratamento simultâneo com Boc-2. Em conjunto, verificamos que o tratamento com IFX melhora o quadro clínico dos animais após a retirada do estímulo inflamatório e observamos que o bloqueio dos FPRs piora a sintomatologia da doença e reduz a eficácia do tratamento com IFX nas fases mais tardias da sua evolução.

Em avaliação anatômica do intestino grosso após eutanásia dos animais e coleta dos órgãos, os cecos dos camundongos pertencentes aos grupos WT/DSS e WT/DSS+IFX+Boc-2 apresentaram redução e palidez, assumindo formato menos curvado do que o observado em animais controles (Figura 9E). Houve encurtamento do intestino nos grupos WT/DSS e WT/DSS+Boc-2 em comparação ao grupo controle (Figuras 9E e F), nos quais a MMP9 tecidual também foi detectada em níveis elevados (Figura 9G).

Considerando os aspectos histopatológicos, o grupo WT/DSS apresentou alterações da histoarquitetura semelhantes às descritas anteriormente para o grupo AnxA1^{-/-}/DSS (Figura 9I). O bloqueio dos FPRs com o antagonista Boc-2 induziu dano morfológico mais acentuado, com significativa perda da camada epitelial de revestimento, provocando úlceras extensas. Além da displasia e abscessos de criptas observados no grupo WT/DSS+Boc-2, foi possível observar áreas

maiores com desaparecimento dessas estruturas glandulares em relação ao grupo WT/DSS. Houve, ainda, aumento de degeneração vacuolar hidrópica, infiltrados inflamatórios mucoso e submucoso proeminentes e edema submucoso (Figura 9J).

O tratamento da colite experimental com o anti-TNF- α , IFX, protegeu significativamente o a integridade do tecido epitelial e atenuou a displasia e o desaparecimento de criptas (Figura 9K). Outras manifestações da inflamação intestinal induzida pelo DSS, como células imunes infiltradas na camada mucosa e edema submucoso também foram observadas, mas em intensidade muito menor em comparação à dos camundongos não-tratados (WT/DSS). Em tratamento simultâneo com Boc-2, alguns efeitos protetores do IFX permaneceram, representados pela preservação da barreira epitelial e prevenção do desaparecimento de criptas. No entanto, o cólon apresentou perturbações da histoarquitetura críptica, displasia e abscessos de criptas, bem como edema submucoso e infiltração de células imunes nas camadas mucosa e submucosa (Figura 9L). Com base nestes dados, é possível concluir que os efeitos da AnxA1 via FPRs, tal como a AnxA1 intracelular, estão envolvidos nos mecanismos resolutivos do IFX no contexto da inflamação intestinal.

Figura 9. Bloqueio dos FPRs reverte a melhora clínica induzida por IFX na colite induzida por DSS. (A) Porcentagem de alteração do peso corpóreo. (B) Escore de diarreia. (C) Escore de sangue oculto. (D) Índice de Atividade da Doença (DAI). (E e F) Alterações anatômicas e do comprimento do intestino grosso. (G) Níveis de MMP-9 tecidual. Média dos valores dos animais WT (linhas contínuas). ^{aa} $p < 0,01$ DSS vs Controle; ^b $p < 0,05$, ^{bbb} $p < 0,001$ DSS+IFX vs DSS; ^c $p < 0,05$ DSS+Boc-2 vs DSS; ^d $p < 0,05$, ^{ddd} $p < 0,001$ DSS+IFX+Boc-2 vs DSS+IFX. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (H-L) Histopatologia em animais WT. Úlceras (setas pretas); Alterações de criptas (setas brancas); Edema (Ed); Infiltrado inflamatório (círculos); Detalhes na morfologia das criptas. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Inclusão: parafina. Secções: 3 μ m. Barras: 20 μ m. $n = 4-6$ animais/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ S.E.M. (Fonte: autoria própria)

Bloqueio dos FPRs induz cronificação do dano epitelial após IFX

A malformação das criptas após bloqueio dos FPRs na colite tratada com IFX mostrou-se um achado inédito e, por isso, propusemo-nos a investigar este fenômeno mais profundamente. A relevância dos FPRs para a regeneração das criptas colônicas após tratamento com IFX ficou ainda mais evidente após imunomarcagem das proteínas estruturais β -actina e vilina (Figura 10). Nos fragmentos intestinais de camundongos do grupo controle, a conformação cilíndrica das células que compõem as criptas é delimitada em suas superfícies basal, laterais e apical por filamentos de β -actina (Figuras 10A-a1). Na superfície apical das células que possuem borda em escova, está presente a vilina (Figuras 10A-a2). Um padrão semelhante ao previamente descrito foi observado nas amostras do grupo WT/DSS+IFX (Figura 10B-b1 e b2). No entanto, como consequência do bloqueio dos FPRs durante a colite tratada com IFX, a conformação da β -actina revelou a perda de contato lateral entre as células crípticas, cuja forma cilíndrica deu lugar à morfologia deformada (Figura 10C-c1). Além disso, vilina foi detectada no lúmen das criptas e não apenas na borda em escova das células das criptas (Figura 10C-c2 e c3, Vilina), provavelmente derivada de restos celulares após morte do epitélio glandular, uma vez que a expressão da vilina foi co-localizada com resíduos de DNA marcados por DAPI (Figura 10C-c2 e c3, DNA). Nossos resultados corroboram relatos anteriores do envolvimento dos FPRs na migração/reparo epitelial e fechamento de feridas (LEONI et al., 2013, 2015) e, ainda, sugerem que estas ações são necessárias para os mecanismos de homeostasia intestinal desencadeados pelo IFX.

Figura 10. Regeneração das criptas intestinais mediada por IFX requer sinalização via FPRs. (A) Controle e (B) DSS+IFX: β -actina (a1 e b1) disposta no formato cilíndrico das células das criptas; vilina (a2 e b2) presente na superfície celular apical. (C) DSS+IFX+Boc-2: defeitos estruturais nas criptas, com morfologia deformada das células glandulares (c1); presença de vilina (c2 e c3 - Vilina) e resíduos de DNA (c2 e c3 - DNA) no lúmen das criptas (asteriscos). β -actina (vermelho). Vilina (verde). Núcleos (azul). Inclusão: parafina. Secções: 3 μ m. Barras: 20 μ m. n = 4-6 animais/grupo. (Fonte: autoria própria)

Uma vez demonstrado o envolvimento dos FPRs no reparo das criptas durante a inflamação intestinal *in vivo* tratada com IFX, utilizamos monocamadas de células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) em um modelo de inflamação *in vitro* para identificar a participação do FPR1 e do FPR2, separadamente, neste processo (Figura 11). Quando cultivadas sobre a superfície de insertos *transwell* cobertos com colágeno bovino do tipo I, as células Caco-2 crescem adjacentes umas às outras, formando uma monocamada altamente seletiva caracterizada por firmes junções. Embora sejam células tumorais, as características supracitadas permitem que a Caco-2 seja utilizada para o estudos de mediadores imunes, co-cultura com células inflamatórias e testes de fármacos (OHKAWARA et al., 2002; TAVELIN et al., 2002; LEONARD; COLLNOT; LEHR, 2010)

Após atingirem confluência em monocamada, as células Caco-2 receberam TNF- α por 48 h como estímulo inflamatório e foram tratadas com IFX. Simultaneamente, utilizamos o antagonista Boc-2 em concentração suficientemente baixa (0,4 μ M) para bloquear apenas o FPR1 que, de acordo com a literatura, é seletivamente neutralizado pelo Boc-2 em doses menores do que 1 μ M (STENFELDT et al., 2007). Para bloqueio do FPR2, o antagonista WRW4 foi utilizado (0,4 μ M).

Primeiramente, ressaltamos que não foi observada citotoxicidade após tratamento das monocamadas de Caco-2 com IFX, Boc-2 ou WRW4 (Figura 11A). Como esperado, a administração do TNF- α provocou redução de cerca de 30% da viabilidade celular, enquanto as monocamadas tratadas com IFX tiveram viabilidade superior ao grupo não-tratado, mesmo nas condições em que FPR1 ou FPR2 estavam bloqueados (Figura 11A). Ainda, a eficácia do IFX em bloquear o TNF- α não foi modificada por Boc-2 ou WRW4 (Figura 11B). As células Caco-2 demonstraram-se secretoras de AnxA1, tanto pela superfície basolateral (Figura 11C) quanto pela apical (Figura 11C). Porém, os níveis desta proteína foram reduzidos no compartimento basolateral das monocamadas estimuladas com TNF- α (Figura 11C).

Considerando a relevância da sinalização desencadeada pelo TNF- α via TNFRs para a integridade da barreira epitelial, quantificamos a expressão do TNFR2 por ensaio de imunofluorescência nas monocamadas de Caco-2 (Figuras 11G-K). O controle da reação confirmou a especificidade da técnica (Figura 11F). A inflamação mediada pelo TNF- α induziu o aumento da expressão do TNFR2 (Figura 11H). O tratamento com IFX (Figura 11H), quando isolado ou combinado com WRW4, manteve os níveis do TNFR2 semelhantes ao basal, no entanto, esse efeito não foi observado durante o bloqueio do FPR1 (Figura 11J). Esses dados foram confirmados estatisticamente após densitometria das imagens obtidas (Figura 11E).

Finalmente, as monocamadas de Caco-2 submetidas às diferentes condições acima foram analisadas quanto à sua integridade (Figuras 11L-U). As junções celulares claudina-1 e ZO-1 foram rompidas por ação do TNF- α (Figuras 11M e R), e o tratamento com IFX preveniu este efeito (Figuras 11N e S). Entretanto, os antagonistas Boc-2 (Figuras 11O e T) e WRW4 (Figuras 11P e U) revogaram as ações protetivas do IFX, demonstrando que as sinalizações via FPR1 e FPR2 contribuem para os efeitos benéficos do IFX sobre a integridade da barreira epitelial do intestino.

Figura 11. FPR1 e FPR2 medeiam integridade da barreira epitelial de células intestinais após inflamação induzida por TNF-α tratamento com IFX. (A) Viabilidade relativa. (B) Concentração basolateral do TNF-α. AnxA1 secretada no compartimento (C) basolateral ou (D) apical. (E) Análise densitométrica do TNFR2. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Média de todas as amostras (linhas contínuas). (F) Controle negativa da reação. (G-K) Expressão do TNFR2. (L-P) Claudina-1. (Q-U) ZO-1. Rompimento das junções celulares (setas brancas). TNFR2 (laranja). Claudina-1 (verde). ZO-1 (vermelho). Núcleos (azul). Barra: 100 μ m. $n = 4$ transwells/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ S.E.M. (Fonte: autoria própria)

IFX induz expressão e secreção da AnxA1 durante a inflamação intestinal

O conjunto de resultados apresentados até o momento indica, de maneira consistente, que a sinalização dos FPRs está envolvida nos mecanismos de homeostasia da barreira epitelial induzidos por IFX. Entre os agonistas destes receptores, a AnxA1 destaca-se, também, como um importante mediador de resolução e reparo tecidual em modelos experimentais de colite e em pacientes com DII (BABBIN et al., 2008; SENA et al., 2013). Desta forma, torna-se essencial investigar de que maneira o tratamento da inflamação intestinal com IFX influencia na expressão e secreção da AnxA1 pelo cólon (Figura 12).

A expressão da AnxA1 endógena na porção distal do intestino foi detectada por imunohistoquímica, cuja especificidade foi confirmada pela ausência de marcação no fragmento de controle da reação (Figura 12J). No epitélio dos animais controles, a AnxA1 foi detectada em baixa intensidade (Figura 12A). A colite experimental induziu a expressão intracelular da AnxA1 em regiões de lesão epitelial, como observado nos grupos WT/DSS e WT/DSS+IFX+Boc-2 (Figuras 12C e E). Nos animais tratados com IFX, independentemente do bloqueio dos FPRs, a AnxA1 foi detectada em baixos níveis, semelhante ao grupo Controle (Figuras 12D e F).

Ao contrário do padrão observado para células epiteliais, a AnxA1 nas células da lâmina própria intestinal dos animais colíticos não-tratados ou tratados com Boc-2 foi fracamente marcada (Figuras 12F e H). Esta expressão foi positivamente regulada na colite tratada com IFX (Figura 12G); porém, o bloqueio com Boc-2 reverteu esse efeito (Figura 12I).

A AnxA1 secretada pelo intestino também foi dosada (Figura 12K). Ao 11º dia da colite experimental não-tratada ou tratada com IFX, a secreção da AnxA1 aumentou em comparação ao grupo controle. O papel do IFX em induzir a secreção da AnxA1 foi confirmado por ensaio *ex vivo* (Figura 12L). Em culturas de células isoladas da lâmina própria do intestino de camundongos *naïve* e estimulados com LPS, o aumento da secreção de AnxA1 acompanhou uma curva de dose-resposta de IFX, atingindo o nível máximo da proteína secretada pelas células tratadas com 10 µg/mL, em comparação ao grupo LPS não-tratado. Este resultado indica que as células da lâmina própria do cólon são importantes fontes de AnxA1, cuja secreção pode ser induzida pelo tratamento com IFX.

Figura 12. IFX induz aumento da produção e secreção de AnxA1 por células da lâmina própria intestinal durante inflamação. (A-E) Expressão da AnxA1 na barreira epitelial do cólon distal de camundongos, aumentada nos grupos DSS e DSS+Boc-2 (setas brancas). (F-I) células da lâmina própria intestinal negativas (cabeças de seta brancas) ou positivas (cabeças de seta pretas) para expressão de AnxA1. (J) Controle negativo da reação. Inclusão: parafina. Secções: 3 µm. Contracoloração: Hematoxilina. Barras: 20 µm. (K) AnxA1 secretada por explantes intestinais. (L) AnxA1 secretada por células da lâmina própria intestinal cultivadas *ex vivo*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Média de todas as amostras (linhas contínuas). $n = 4-6$ animais/grupo. Resultados expressos como média $\pm$ S.E.M. (Fonte: autoria própria)

Níveis de FPR1, FPR2 e AnxA1 não são diferencialmente modulados no sangue, mas constituem parâmetros preditivos de eficácia do IFX no cólon

Os resultados expostos até o momento demonstram que a AnxA1 endógena, assim como seus receptores, FPR1 e FPR2, participam dos mecanismos de ação do IFX na indução da homeostase intestinal em condições inflamatórias. Utilizando ensaios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, propusemos que a ativação dos FPRs e a expressão/secreção da AnxA1 são eventos essenciais para o funcionamento adequado daquela terapia anti-TNF- α . Desta forma, tornou-se importante avaliar a presença e o padrão de expressão destes marcadores em pacientes com DII, a fim de extrapolar nossa hipótese para humanos.

FPR1, FPR2 e AnxA1 foram dosados no sangue e em biópsias do cólon de pacientes com DC. Foram utilizadas amostras de DC não-tratada, tratada com IFX sob remissão e refratária a esta terapia. Para comparação dos marcadores circulantes, sangue foi coletado de doadores saudáveis (não-DII - NDII) que gentilmente concordaram em participar deste estudo. Além das amostras biológicas, os pacientes também cederam o acesso aos seus prontuários médicos. Estes documentos foram utilizados para o cálculo do Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI), enquanto o cálculo do escore histológico foi baseado nas biópsias colônicas (Figura 13).

Como esperado, o CDAI dos pacientes não-responsivos ao IFX foi significativamente superior ao do grupo de pacientes em remissão (Figura 13A). No entanto, não foram detectadas diferenças na expressão do FPR1 (Figuras 14A e B) e do FPR2 (Figuras 14A e C) nos leucócitos circulantes entre esses grupos, bem como nos níveis de AnxA1 plasmática (Figuras 14A e D). Ainda, esses valores não apresentaram correlação com o CDAI de cada paciente (Figuras 14E-G), demonstrando que FPR1, FPR2 e AnxA1 circulantes não constituem bons parâmetros para predição da eficácia terapêutica do IFX em pacientes com DC.

Figura 13. Escores clínico e histológico de pacientes com DC. (A) Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI), baseado nos dados clínicos dos pacientes. (B) Escore histológico, calculado com base nas biópsias dos indivíduos. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Média de todas as amostras (linhas contínuas); Valor de CDAI de um único paciente não-tratado (linha pontilhada). CDAI: $n=12$ (DC+IFX Remissão); $n=11$ (DC+IFX Falha); $n=1$ (DC não-tratada). Escore histológico: $n=4$ (DC não-tratada); $n=3$ (DC+IFX Remissão); $n=2$ (DC+IFX Falha). Resultados expressos como média $\pm$ S.E.M. (Fonte: autoria própria)

Figura 14. Níveis de FPR1, FPR2 e AnxA1 circulantes não são alterados pelo tratamento com IFX. (A) *Heatmap* baseado nos valores de escore-Z de FPR1 e FPR2 nos leucócitos circulantes, e AnxA1 no plasma. Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de (B) FPR1 e (C) FPR2 nos leucócitos circulantes. (D) Níveis de AnxA1 plasmática. Média de todas as amostras (linhas contínuas); Valores referentes a um único paciente não-tratado (linha pontilhada). Análises de correlação entre os valores de CDAl e (E) FPR1, (F) FPR2 e (G) AnxA1. $n=5$ (Não-DII), $n=12$ (DC+IFX Remissão); $n=11$ (DC+IFX Falha); $n=1$ (DC não-tratada). Resultados expressos como escore-Z do MFI (A - FPR1 e FPR2), da concentração em ng/mL (A - AnxA1) ou em média $\pm$ S.D. (B-G). (Fonte: autoria própria)

Nas biópsias de cólon, o dano histológico dos pacientes com DC em remissão induzida por IFX foi significativamente menor do que o de pacientes que nunca receberam o anti-TNF- α (Figura 13B). Pacientes não-tratados com IFX ou que falharam em responder à terapia apresentaram úlceras, alterações/abcessos de cripta, e proeminente infiltrado inflamatório, que foram observados com menor frequência e intensidade na doença inativa (Figura 15A).

Nestas mesmas amostras, as expressões de FPR1 (Figura 15B), FPR2 (Figura 15C) e AnxA1 (Figura 15D) foram detectadas por imunofluorescência, cuja especificidade foi confirmada pela ausência de marcação no controle negativo (Figura 15E). Nos pacientes em remissão, a intensidade de fluorescência de FPR1 e FPR2 mostrou-se elevada, porém, apenas a expressão de AnxA1 foi significativamente maior neste grupo do que no grupo de pacientes não-tratados. As células epiteliais da barreira intestinal, das criptas e da lâmina própria foram identificadas como as principais fontes de expressão.

Por fim, foram realizadas análises de correlação entre o escore histológico e as expressões de FPR1 (Figura 15I), FPR2 (Figura 15J) ou AnxA1 (Figura 15K) para cada paciente. Os níveis de FPR1 e AnxA1 apresentaram correlação negativa moderada com o escore de dano tecidual, indicando que estes marcadores são mais expressos durante a homeostasia intestinal. Em conjunto, os dados acima sugerem que as expressões diferenciais de FPR1 e AnxA1 no cólon podem oferecer valor preditivo da eficácia terapêutica do IFX em pacientes com DC.

Figura 15. FPR1, FPR2 e AnxA1 são diferencialmente expressos pelo cólon de pacientes com DC responsivos ou refratários a IFX e se correlacionam com a homeostase intestinal. (A) Histopatologia das biópsias de pacientes não-tratados com IFX, tratados em remissão ou refratários à terapia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Úlceras (setas pretas); alterações de criptas (setas brancas); abscessos de cripta (cabeças de seta brancas); infiltrado inflamatório (círculos pretos). Expressões colônicas de (B) FPR1, (C) FPR2 e (D) AnxA1. (E) Controle negativo da reação. FPR1, FPR2 e AnxA1 (verde). Núcleos (azul). Inclusão: parafina. Secções: 3 µm. Barras: 500 µm (A); 20 µm (B-E). Análises densitométricas das intensidades de fluorescência de (F) FPR1, (G) FPR2 e (H) AnxA1. Análises de correlação entre o escore de dano histológico e a intensidade de fluorescência de (I) FPR1, (J) FPR2 e (K) AnxA1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n=4$ (DC não-tratada); $n=3$ (DC+IFX Remissão); $n=2$ (DC+IFX Falha). Resultados expressos como média $\pm$ S.D. (Fonte: autoria própria)

FPR1, FPR2 e AnxA1 são diferencialmente expressos no cólon de pacientes responsivos ou refratários ao IFX, mesmo antes da terapia

Após verificar o padrão da expressão proteica de FPR1, FPR2 e AnxA1 no sangue e no cólon de pacientes com DC, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para comparar nossos achados com os de outros grupos. Foram selecionados dois estudos cujos participantes e amostras correspondem aos utilizados em nossas análises do sangue (GSE42296) e do cólon (GSE16879), porém, considerando os níveis transcricionais daqueles marcadores.

Em PBMCs extraídos do sangue periférico, os valores de mRNA de FPR1, FPR2 e AnxA1 foram reduzidos após IFX nos pacientes responsivos à terapia, com diminuição dos valores de escore-Z após serem submetidos ao tratamento (Figura 16A). No entanto, nenhuma diferença foi observada entre pacientes responsivos e não-responsivos, antes ou após IFX, que apresentasse caráter preditivo da eficácia do anti-TNF- α .

Por sua vez, os valores de escore-Z para Log2 do mRNA de FPR1, FPR2 e AnxA1 no cólon mostraram-se aumentados nos pacientes refratários ao IFX, tanto antes quanto após o tratamento, sendo também superiores ao escore do grupo de pacientes em remissão induzida pela terapia (Figura 16B). Estes dados mostram que, mesmo antes do início das infusões com IFX em pacientes com DC, podem ser observadas diferenças na produção de FPR1, FPR2 e AnxA1 no cólon, as quais podem constituir potenciais marcadores de eficiência terapêutica para esta terapia biológica.

Figura 16. Níveis transcricionais de FPR1, FPR2 e AnxA1 em PBMCs circulantes e no cólon de pacientes com DC. (A) Valores de escore-Z calculados para FPR1, FPR2 e AnxA1 (GSE42296). (B) Distribuição dos escores-Z de FPR1, FPR2 and AnxA1 (GSE16879). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 vs NDII; #p < 0,05; ###p < 0,001 vs respectivo grupo responsivo; §p < 0,05; §§p < 0,01; §§§p < 0,001 vs respectivo grupo não-tratado. *PBMC*: n=6 (DC Falha - antes do tratamento; DC+IFX Falha); n=14 (DC responsivo - antes do tratamento; DC+IFX responsivo). *Cólon*: n=6 (NDII); n=7 (DC Falha - antes do tratamento; DC+IFX Falha); n=11 (DC responsivo - antes do tratamento; DC+IFX responsivo). Resultados expressos como escore-Z do log2 de mRNA. (Fonte: autoria própria, baseado nas tabelas obtidas dos dois estudos supracitados a partir do endereço <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)

Discussão

Diante da importante epidemiologia das DIIs, diversas terapias foram desenvolvidas a fim de suprir a baixa eficácia dos tratamentos convencionais como os corticosteroides e imunossupressores, que induzem remissão em apenas 50% dos pacientes, além de causar efeitos adversos (KLOTZ; TEML; SCHWAB, 2007). O surgimento das terapias biológicas há cerca de duas décadas representou um grande avanço na abordagem terapêutica em DI, pois passou a fornecer uma alternativa aos pacientes refratários às classes medicamentosas disponíveis naquele momento (ARGOLLO et al., 2020). Fármacos biológicos, como o IFX, são mais eficazes em induzir a remissão das DIIs, reduzir a hospitalização e a necessidade de cirurgia. No entanto, uma preocupante taxa de aproximadamente 33% dos pacientes tratados com anticorpos anti-TNF- α apresentam falha primária, enquanto outros indivíduos perdem a responsividade ao longo do tempo (RUTGEERTS et al., 2005; KUEK; HAZLEMAN; OSTÖR, 2007; COSTA et al., 2013). Atualmente, as soluções aplicadas para a ausência ou perda de resposta à terapia biológica incluem aumento/diminuição da dose e/ou da frequência de tratamento, troca do anticorpo utilizado ou mesmo do alvo a ser neutralizado (ARGOLLO et al., 2020). Estas estratégias, porém, tendem a ser pouco efetivas ou deixar de surtir efeito em um curto período de tempo, emergindo a necessidade da busca por novos alvos e moléculas preditivas de eficácia terapêutica (KAPLAN; NG, 2017). Na presente investigação, propusemos o estudo da mediação da proteína anti-inflamatória AnxA1 e de seus receptores, FPR1 e FPR2, na possível proteção da mucosa intestinal durante o desenvolvimento da colite experimental, bem como na eficácia do tratamento com IFX. Nosso grupo de pesquisa reportou anteriormente a relevância da AnxA1 para a eficácia do IFX durante a colite experimental aguda em camundongos Balb/c fêmea (DE PAULA-SILVA et al., 2016). Aqui, confirmamos o mesmo fenômeno utilizando camundongos de cepa e sexo diferentes, e focando na fase de cronificação da doença, além de elucidar o papel dos FPRs neste contexto. Ainda, a relação entre os FPRs, a AnxA1 e a responsividade ao IFX foi explorada em amostras de sangue e biópsias colônicas de pacientes com DC, confirmando os resultados obtidos nos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Ao longo da última década, a AnxA1 tem sido consistentemente apontada como um mediador crucial da resolução da inflamação intestinal no contexto das DIIs (VERGNOLLE et al., 2004; VONG et al., 2012; SENA et al., 2013) e da colite experimental (BABBIN et al., 2008; DE PAULA-SILVA et al., 2016). As principais funções atribuídas à AnxA1 nestes cenários envolvem fechamento de feridas (LEONI et al., 2013, 2015), inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios (SHEIKH; SOLITO, 2018) e da transmigração de leucócitos (PURVIS; SOLITO; THIEMERMANN, 2019), apoptose de células imunes infiltradas no tecido (DE PAULA-SILVA et al., 2016), fagocitose de restos celulares e teciduais e, conseqüentemente, remodelação tecidual após dano (MADERNA et al., 2005). O tratamento com IFX induz muitos destes fenômenos (SCALDAFERRI; PECERE, 2015), sugerindo, portanto, que os efeitos deste tratamento não são derivados somente do bloqueio do TNF- α mas, também, da participação de outros mediadores endógenos de resolução da inflamação intestinal. Com base em relatos anteriores, nós sugerimos

que a expressão da AnxA1 pode ser um dos mecanismos induzidos por IFX e que, por sua vez, regula os efeitos desta terapia em algum nível. De fato, a ausência de sinalização do TNF- α via seu receptor 1, TNFR1, favorece a expressão da AnxA1 no intestino e aumenta a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ positivos para AnxA1 em modelo de colite experimental (SENA et al., 2015). Ainda, camundongos deficientes para a produção de AnxA1 mantêm altos níveis de atividade da mieloperoxidase e menos apoptose de fagócitos teciduais, mesmo após tratamento com IFX (DE PAULA-SILVA et al., 2016).

No modelo de colite realizado neste estudo, a AnxA1 intracelular e a sinalização via FPR afetaram a eficácia do IFX por diferentes mecanismos. Enquanto o bloqueio dos FPRs comprometeu a regeneração epitelial, sobretudo das criptas, a ausência da AnxA1 endógena impactou os efeitos do IFX sobre o balanço da resposta imune. Este último resultado corrobora os achados de Babbín e colaboradores, que mostraram persistência da resposta inflamatória e, consequentemente, dos sintomas da colite experimental em camundongos AnxA1^{-/-} mesmo após a retirada do estímulo com DSS (BABBIN et al., 2008). No dia 10 do nosso modelo experimental, houve redução do número de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺) nos animais AnxA1^{-/-} após IFX, em comparação com o grupo WT tratado, demonstrando prolongado o processo inflamatório na ausência da AnxA1. Embora esta proteína seja um importante mediador de resolução da inflamação (PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009), seu envolvimento da diferenciação de linfócitos T no subtipo regulador não está claro. *In vitro*, AnxA1 recombinante humana aumentou a expressão de CD25 em linfócitos T, indicando que a AnxA1 dirige a diferenciação destas células imunes para o subtipo anti-inflamatório via FPRs (D'ACQUISTO et al., 2007). Diferentemente, a AnxA1 endógena, mas não a exógena recombinante, participa da transferência de sinais em neutrófilos placentários que medeiam a diferenciação de linfócitos T em T reguladores induzidos por esses neutrófilos (NADKARNI et al., 2016). Apesar dos conflitantes mecanismos descritos acima, ambos os estudos confirmam o papel pró-tolerogênico que a AnxA1 exerce sobre a inflamação dependente de células T (YANG et al., 2013).

Na inflamação intestinal, a barreira epitelial é danificada por mediadores imunes que causam a apoptose de enterócitos e o rompimento das junções celulares, permitindo a translocação de componentes da microbiota que retroalimentam as respostas imunes no local da ferida (ROGLER, 2017). Em resposta ao dano, vias de proliferação são ativadas nas células da base das criptas mucosas próximas à ferida (IIZUKA; KONNO, 2011). Nós observamos que a expressão da AnxA1 se concentra nas áreas de dano epitelial, sobretudo nos grupos WT/DSS e WT/DSS+Boc-2, nos quais as lesões da barreira intestinal são mais evidentes. Interessantemente, a expressão aumentada da AnxA1 no epitélio dos animais colíticos após bloqueio dos FPRs não impediu a formação de extensas úlceras, demonstrando que a inabilidade da AnxA1 em ativar seus receptores compromete os processos de migração epitelial e fechamento de feridas. Mesmo quando combinado com a administração do IFX, o bloqueio dos FPRs impede a completa regeneração da barreira epitelial do intestino. De fato, o peptídeo N-termina da AnxA1, Ac2-26,

e/ou a AnxA1 total estimulam a migração de células epiteliais do intestino e a cicatrização de feridas via FPR1 e FPR2, respectivamente (LEONI et al., 2013, 2015). A AnxA1 endógena, assim como o eixo AnxA1-FPR2, também controla a integridade das junções celulares epiteliais: a primeira age como uma âncora entre a β -actina citoplasmática e a membrana celular, enquanto a segunda inibe a atividade da RhoA GTPase via FPR2, estabilizando o citoesqueleto (CRISTANTE et al., 2013). Nas monocamadas de Caco-2 estimuladas com TNF- α , o efeito protetivo do IFX sobre a integridade do epitélio também foi perdido durante o bloqueio de FPR1 e FPR2, uma vez que a terapia anti-TNF- α não foi capaz de restaurar o rompimento das junções celulares. Adicionalmente, o bloqueio do FPR1 resultou em aumento da expressão de TNFR2, o qual está fortemente relacionado à ruptura daquelas junções e atividade das DILs (WANG et al., 2006; SU et al., 2013). Após estímulo de lesão e morte, o formato cilíndrico das células epiteliais do intestino dá lugar a uma morfologia achatada devido à perda de contato célula-célula (IIZUKA; KONNO, 2011). Em resposta a esse efeito, vias de migração celular são ativadas. Uma destas vias é desencadeada pela ligação do peptídeo Ac2-26 da AnxA1 ao FPR1 epitelial, induzindo inativação oxidativa da fosfatase homóloga a tensina e da proteína tirosina fosfatase-PEST (PTP-PEST), fosforilando a quinase de adesão focal (FAK) e a paxilina e, conseqüentemente, estimulando as células a migrarem (LEONI et al., 2013). De maneira similar, concentrações fisiológicas de TNF- α aumentam a migração celular via TNFR2 após lesão, que ocorre por ativação da via da proto-oncogene tirosina-proteína quinase (Src) e fosforilação da proteína-tirosina FAK (CORREDOR et al., 2003). Nós sugerimos que o bloqueio do FPR1 possa contribuir para a ativação de outras vias de migração, neste caso, aquela ativada por TNFR2. No entanto, a estimulação prolongada do TNFR2 induz a migração descontrolada, causando o rompimento das junções celulares e aumentando a permeabilidade da barreira intestinal (WANG et al., 2006). Nossos resultados *in vivo* corroboram essa observação, pois o tratamento com IFX não impediu o dano crônico causado nas criptas mucosas na ausência da sinalização dos FPRs. Desta forma, nossos dados indicam que os mecanismos de ação do IFX na proteção da barreira epitelial são complementados por vias que resultam da ligação da AnxA1 (bem como de outros agonistas endógenos) aos FPRs.

Ao contrário dos resultados obtidos para as células epiteliais, células da lâmina própria intestinal de camundongos com colite tratada por IFX apresentaram intensa imunomarcagem da AnxA1, a qual não foi observada nos demais grupos. Adicionalmente, a secreção da AnxA1 foi aumentada no grupo DSS+IFX. Em concordância com estes resultados, maiores concentrações da AnxA1 foram secretadas por células da lâmina própria intestinal estimulados com LPS e tratados com concentrações crescentes de IFX *ex vivo*. É sabido que células epiteliais são boas produtoras de AnxA1, especialmente após lesão, e que sua expressão intracelular está associada ao fechamento de feridas (LEONI; NUSRAT, 2016). No entanto, leucócitos são, em geral, a maior fonte de secreção da AnxA1, sobretudo em condições inflamatórias (COMÉRA et al., 1999; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009). Em conjunto, os resultados acima sugerem que as células da lâmina própria do intestino, majoritariamente representadas por células imunes, são a principal

fonte de AnxA1 secretada. Este poderia ser um dos mecanismos do IFX nunca antes descritos. Interessantemente, os grupos de animais que receberam Boc-2 durante a colite, independente do tratamento com IFX, tiveram baixos níveis de AnxA1 intracelular nas células da lâmina própria do intestino, bem como da proteína secretada. Este dado aponta para um mecanismo ainda mais complexo de ação do IFX, em que a sinalização adequada dos FPRs é necessária para a secreção da AnxA1 a qual, por sua vez, medeia o reparo histológico, a resolução de úlceras e a homeostase. Esta intrincada relação entre IFX, FPR e AnxA1 pode fornecer importantes informações em casos de falha a terapias biológicas em DIIs; portanto, merece atenção especial, sobretudo em pacientes.

Em 2013, Sena e colaboradores publicaram a primeira evidência de que a terapia com IFX em pacientes com DC modula a expressão da AnxA1 endógena (SENA et al., 2013). Mais recentemente, Reischl et al. também associaram o aumento da expressão da AnxA1 à redução da inflamação tecidual, restrição da doença ao sítio inflamado e menor necessidade do tratamento com corticosteroides antes de procedimentos cirúrgicos em pacientes com DC (REISCHL et al., 2020). Similarmente, nós observamos aumento da expressão da proteína AnxA1 no cólon de pacientes em remissão induzida por IFX, nos quais FPR1 e FPR2 também estavam aumentados. Ainda, os níveis de FPR1 e AnxA1 estão negativamente correlacionados com menos dano histológico. A princípio, este resultado parece ser contrário ao obtido a partir da análise de bioinformática do estudo GSE16879, o qual detectou aumento nos níveis de transcrição de FPR1, FPR2 e AnxA1 no cólon de pacientes que falharam em responder ao tratamento com IFX quando comparados aos respondedores. No entanto, os valores de mRNA de um determinado gene não necessariamente refletem seus valores proteicos (GUO et al., 2008). Diversas modificações pós-transcricionais e pós-traducionais podem explicar essas diferenças, incluindo a atividade de microRNAs (PARK et al., 2017), autoanticorpos (HERSZÉNYI; TULASSAY, 2012) ou clivagem de proteínas por proteases, as quais são expressas em altas concentrações nos sítios inflamatórios (VERGNOLLE, 2016). Em resumo, o principal fenômeno compartilhado entre os nossos resultados e as informações coletadas a partir das análises de bioinformática é que FPR, AnxA1 e potencialmente, FPR2, são diferencialmente expressos no cólon de pacientes responsivos a IFX em relação aos não-responsivos, tanto a nível transcricional quanto proteico.

Em geral, a literatura em DIIs até o presente momento sugere que durante a doença ativa, a expressão/secreção da AnxA1 endógena é induzida e que falhas neste mecanismo resultam em uma doença mais grave e prolongada (SENA et al., 2015; LEONI; NUSRAT, 2016). De maneira semelhante, estratégias terapêuticas tendem a ter melhores resultados quando capazes de aumentar os níveis de AnxA1 (SENA et al., 2013; DE PAULA-SILVA et al., 2016). No local da inflamação, a ligação da AnxA1 aos FPRs medeia a resolução desta resposta e a homeostasia da mucosa (BABBIN et al., 2008; LEONI et al., 2015). Os dados obtidos no presente estudo confirmam os mecanismos descritos acima e sugerem que FPR1, FPR2 e AnxA1 teciduais podem apresentar valor preditivo da eficácia terapêutica do IFX na DC.

Apesar da variedade de abordagens desenvolvidas neste estudo, limitações são esperadas e merecem destaque a fim de serem exploradas em pesquisas futuras. Nossas principais limitações foram referentes à disponibilidade de pacientes: baixo número de participantes com DC (n=24 para amostras de sangue e n=9 para biópsias) e ainda menor número de pacientes com RCU (n=4), o que impossibilitou a sua inclusão neste estudo. Para amostras de sangue, somente um indivíduo com DC sem tratamento com IFX foi recrutado durante todo o tempo disponível para abordagem dos pacientes. Ainda, nenhuma biópsia de pacientes saudáveis foi obtida devido à dificuldade de se encontrar pacientes que sejam submetidos a colonoscopia sem possuírem alguma pré-condição afetando o trato gastrointestinal. Limitações quanto à condição das amostras e da classificação clínica dos pacientes também foram encontradas. Biópsias frescas seriam preferenciais em relação a amostras incluídas em parafina, pois permitiriam a quantificação dos marcadores de interesse em níveis transcricionais (RT-PCR) e proteicos a partir outros métodos (western blot, ELISA) para validar os resultados de imunofluorescência. Finalmente, o parâmetro de CDAI é menos apurado do que o uso de marcadores séricos ou fecais (proteína C-reativa e calprotectina, por exemplo) para estabelecimento da atividade da doença. No entanto, o uso destes marcadores requereria a obtenção de mais amostras e o uso de *kits* de dosagem de alto custo, impossibilitando tal substituição.

As dificuldades supracitadas não invalidam o conjunto de resultados aqui apresentados, mas sim, fornecem interessantes perguntas a serem respondidas por novos estudos. Perspectivas futuras nas pesquisas em DII relacionadas ao eixo FPRs/AnxA1 podem incluir novos alvos e processos fisiológicos (por exemplo: autoanticorpos anti-AnxA1, regulação negativa por ação de microRNAs, dessensibilização dos FPRs e ação por outros agonistas). Com base neste estudo e em outros relatos da literatura, tais processos podem elucidar mecanismos de patogênese e apresentar novos marcadores de atividade das DIIs, além da eficácia terapêutica.

A abordagem terapêutica adequada representa um importante atalho para a remissão prolongada, além de conduzir a uma política farmacoeconômica mais parcimoniosa (COSTA et al., 2013). Falhas nesses processos não podem ser explicadas apenas pelos mecanismos de falta/perda de responsividade descritos até agora este momento (SCALDAFERRI; PECERE, 2015). Nós acreditamos que os dados aqui apresentados possam contribuir para a identificação de casos de não-responsividade, levando à remissão de longo-prazo baseada nos papéis centrais da AnxA1 via FPRs.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo apontam, pela primeira vez, a expressão e secreção da AnxA1 e a ligação a seus receptores FPRs como mecanismo envolvido no tratamento da doença inflamatória intestinal com IFX. Ao induzir a liberação desta proteína a partir de células da lâmina própria intestinal (sobretudo leucócitos), o IFX disponibiliza a AnxA1 para ativação dos FPRs das células que compõem a barreira epitelial, promovendo o fechamento de feridas e contribuindo para a integridade das junções celulares e a adequada regeneração de criptas, efeitos imprescindíveis para o alcance e manutenção da homeostasia a longo prazo. Ainda, os níveis proteicos de FPR1 e AnxA1 aumentados no cólon de pacientes com DC em remissão induzida por IFX sugerem que a eficácia desta terapia requer a produção e ativação destes marcadores. A investigação de possíveis biomarcadores de eficácia terapêutica pode auxiliar na escolha precoce da melhor terapia para portadores de DII e, conseqüentemente, em menores gastos e maior qualidade de vida para esses indivíduos desde o diagnóstico. Portanto, concluímos que FPR1, FPR2 e AnxA1 participam das vias resolutivas do IFX e podem constituir potenciais ferramentas preditivas da eficácia desta terapia biológica. A representação gráfica das conclusões obtidas no presente estudo pode ser encontrada na **Figura 17**.

Figura 17. Ilustração dos fenômenos dependentes de FPR1, FPR2 e mediados pela AnxA1 durante o tratamento da inflamação intestinal com IFX. A colite induz rompimento da barreira epitelial do intestino, com consequente ativação das células da lâmina própria e intensa resposta inflamatória que induz dano tecidual caracterizado por ulcerações, displasia/edema de criptas, infiltrado inflamatório e produção de mediadores imunes. O dano epitelial causado pelo TNF- α afeta as junções celulares, claudina-1 e ZO-1, e é possivelmente mediado via TNFR2, cuja expressão é aumentada. O IFX inibe o aumento do TNFR2 e protege a integridade da barreira intestinal, mas o bloqueio do FPR1 reverte essa melhora. Na ausência das vias de sinalização ativadas por FPR1 e FPR2, a recuperação das criptas intestinais promovida pelo IFX é parcialmente prejudicada. Nos leucócitos da lâmina própria intestinal, o IFX induz a expressão e secreção da AnxA1. Esta proteína também está envolvida no aumento de células T reguladores após tratamento com IFX. (Fonte: autoria própria)

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, C.; MEDZHITOV, R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1729–1737, 2011.

ADAMIAK, T. et al. Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: A population-based epidemiological study. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2013.

AKITAKE, R. . et al. Infliximab in ulcerative colitis is associated with an increased risk of postoperative complications after restorative proctocolectomy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 6, p. 1781–4, 2010.

ALOI, M. et al. **Advances in the medical management of paediatric IBD** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2014. .

APOSTOLAKI, M. et al. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 11, p. 1–26, 2010.

ARGOLLO, M. et al. Optimizing biologic therapy in IBD: how essential is therapeutic drug monitoring? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 2020.

ARNOTT, I. D. R.; MCNEILL, G.; SATSANGI, J. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 2003.

BABBIN, B. et al. Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5035–5044, 2008.

BECK, I. M. E. et al. Crosstalk in inflammation: The interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p. 830–882, 2009.

BERMEJO, F.; GUERRA, I. I.; BERMEJO, F. Management of inflammatory bowel disease in poor responders to infliximab. **Clinical and experimental gastroenterology**, v. 7, p. 359–67, 2014. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4171998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BROGIN MORELI, J. et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2012, p. 230742, 2012. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3302063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHEY, W. Y. Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 7, p. 30–33, 2001.

CHOQUETTE, D. et al. What are the implications of concomitant and pre-medication on infusion reactions to infliximab: Results from “remitrac infusion”, a prospective real-world community registry. **Arthritis and Rheumatism**, 2013.

CIRINO, G. et al. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **British journal of pharmacology**, v. 108, n. 3, p. 573–4, 1993. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1908051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

COLOMBEL, J.-F. F.; NARULA, N.; PEYRIN-BIROULET, L. Management Strategies to Improve Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 351- 361.e5, 2017. Disponível em:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851635171X>.

COMÉRA, C. et al. Inflammatory neutrophils secrete annexin 1 during experimentally induced colitis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, 1999.

CORREDOR, J. et al. Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. **AJP: Cell Physiology**, 2003.

COSTA, J. et al. Infliximab reduces hospitalizations and surgery interventions in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 10, p. 2098–2110, 2013.

CRISTANTE, E. et al. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 832–41, 2013. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3549094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

D’ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095–1102, 2007.

D’ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152–169, 2008.

DABEK, M. et al. Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 1, p. 207–214, 2009.

DAMAZO, A. S. et al. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 6,

p. 1607–1617, 2005.

DE PAULA-SILVA, M. et al. Role of the protein annexin A1 on the efficacy of anti-TNF treatment in a murine model of acute colitis. **Biochemical Pharmacology**, v. 115, p. 104–113, 1 set. 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295216301381>>.

DUFTON, N.; PERRETTI, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 127, n. 2, p. 175–188, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.010>>.

EVERHOV, Å. H. et al. Changes in inflammatory bowel disease subtype during follow-up and over time in 44,302 patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 2019.

FEUERSTEIN, J. D.; CHEIFETZ, A. S. **Miscellaneous Adverse Events with Biologic Agents (Excludes Infection and Malignancy)** *Gastroenterology Clinics of North America*, 2014. .

FLAMANT, M.; ROBLIN, X. Inflammatory bowel disease: towards a personalized medicine. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 11, p. 1–15, 2018.

FLOWER, R. J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, n. 8, p. 987–1015, 1988.

FLOWER, R. J.; BLACKWELL, G. J.; BLACKWELL, N. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A 2 inhibitor which prevents prostaglandin generation [13]. **Nature**, v. 278, p. 456–459, 1979.

FUSS, I. J.; STROBER, W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. **Mucosal immunology**, v. 1 Suppl 1, p. S31–S33, 2008.

GAVINS, F. N. E. et al. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 8, p. 1751–1758, 2007.

GIROL, A. P. et al. Anti-Inflammatory Mechanisms of the Annexin A1 Protein and Its Mimetic Peptide Ac2-26 in Models of Ocular Inflammation in Vivo and in Vitro. **J Immunol**, v. 190, p. 5689–5701, 2013.

GUO, Y. et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 2008.

HELLER, C.; OSSO, M. Challenges in IBD Research. **Inflammatory bowel diseases**, v. 25, n. June, p. 2–5, 2019.

HERSZÉNYI, L.; TULASSAY, Z. The role of autoantibodies in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases**, v. 30, n. 2, p. 201–207, 2012.

IIZUKA, M.; KONNO, S. **Wound healing of intestinal epithelial cells** *World Journal of Gastroenterology*, 2011. .

KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 313- 321.e2, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>>.

KHAN, N. N. .; ASIM, H. . H.; LICHTENSTEIN, G. R. Safety of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease during pregnancy. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 13, p. 1699–708, 2014.

KLOTZ, U.; TEML, A.; SCHWAB, M. Clinical pharmacokinetics and use of infliximab. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 46, n. 8, p. 645–660, 2007.

KUEK, A.; HAZLEMAN, B. L.; OSTÖR, A. J. K. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 978, p. 251–60, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2600039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KUMAR, V. et al. **Fundamentos de Robbins & Cotran - Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAMAS, B.; MARTINS BREYNER, N.; HOUDEAU, E. **Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis: Potential consequences for host health** *Particle and Fibre Toxicology*, 2020. .

LEONARD, F.; COLLNOT, E.; LEHR, C. articles A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes , Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. v. 7, n. 6, p. 2103–2119, 2010.

LEONI, G. et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 443–454, 2013.

LEONI, G. et al. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **J Clin Invest**, v. 125, n. 10, p. 1215–1227, 2015. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/76693/version/2/pdf/render>>.

LEONI, G.; NUSRAT, A. Annexin A1: Shifting the balance towards resolution and repair. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 10, p. 971–979, 2016.

LI, Y. et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. **Oncogene**, v. 30, n. 36, p. 3887–3899, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499310>%5Cn<http://www.nature.com/onc/journal/v30/n36/pdf/onc2011112a.pdf>>.

MADERNA, P. et al. Modulation of Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by

Supernatant from Dexamethasone-Treated Macrophages and Annexin-Derived Peptide Ac 2–26 . **The Journal of Immunology**, 2005.

MANN, E. A.; SAEED, S. A. Gastrointestinal infection as a trigger for inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n. 1, p. 24–29, 2012.

MARTIN, G. R. et al. Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 294, n. 3, p. G764–G769, 2008.

MELSHEIMER, R. et al. **Remicade® (Infliximab): 20 years of contributions to science and medicine** **Biologics: Targets and Therapy**, 2019. .

MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. **Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut** **Mediators of Inflammation**, 2015. .

MIEHSLER, W. et al. **A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease** **Journal of Crohn's and Colitis**, 2010. .

MUNN, T. Z.; MUES, G. I. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314–315, 1986.

NADKARNI, S. et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2016.

NENCI, A. et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 557–561, 2007.

NEURATH, M. F. et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. **European journal of immunology**, v. 27, n. 7, p. 1743–1750, 1997.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–42, 22 maio 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri3661>>.

NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.88>>.

OHKAWARA, T. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. **Gastroenterology**, v. 123, n. 1, p. 256–270, 2002.

PARHAM, P. **The Immune System**. 4. ed. New York: Garland Science, 2014.

PARK, J. H. et al. **IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules** *Autoimmunity Reviews*, 2017. .

PARSI, M. A. et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2002.

PATEL, H. B. et al. The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 71, n. 11, p. 1872–1880, 2012.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and Glucocorticoids as Effectors of the Resolution of Inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 1, p. 62–70, 2009.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *Journal of leukocyte biology*, v. 76, n. 1, p. 25–29, 2004.

PERRETTI, M.; GAVINS, F. N. E. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, v. 18, p. 60–64, 2003.

PURVIS, G. S. D.; SOLITO, E.; THIEMERMANN, C. Annexin-A1: Therapeutic potential in microvascular disease. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. APR, p. 1–8, 2019.

RAYNAL, P.; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1197, n. 1, p. 63–93, 1994.

REISCHL, S. et al. Annexin A1 Expression Capacity as a Determinant for Disease Severity in Crohn's Disease. *Digestive Diseases*, 2020.

REMICADE. Responsável técnico Bernardo Pinelli da Cunha. **Rio de Janeiro: Schering-Plough Produtos Farmacêuticos Ltda.**, n. Bula de remédio, 2007.

RICHARD, D. et al. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*, v. 61, n. 2, p. 119–161, 2009. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/61/2/119.short>>.

ROGLER, G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, v. 2, n. 7, p. 521–530, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30031-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30031-6)>.

RUTGEERTS, P. et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *New Engl J Med*, v. 353, p. 2462–2476, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa050516>>.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2012.

SCALDAFERRI, F.; PECERE, S. Emerging Mechanisms of Action and Loss of Response to Infliximab in Ibd: A Broader Picture. **Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v. 05, n. 02, 2015. Disponível em: <<http://www.omicsgroup.org/journals/emerging-mechanisms-of-action-and-loss-of-response-to-infliximab-inibd-a-broader-picture-2167-0501-1000206.php?aid=71955>>.

SENA, A. et al. Dysregulation of Anti-Inflammatory Annexin A1 Expression in Progressive Crohns Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

SENA, A. A. et al. Lack of TNFRI signaling enhances annexin A1 biological activity in intestinal inflammation. **Biochemical Pharmacology**, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629521500619X>>.

SHEIKH, M. H.; SOLITO, E. **Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein***International Journal of Molecular Sciences*, 2018. .

STENFELDT, A. et al. Cyclosporin H , Boc-MLF and Boc-FLFLF are Antagonists that Preferentially Inhibit Activity Triggered Through the Formyl Peptide Receptor. v. 30, n. 6, p. 224–229, 2007.

SU, L. et al. TNFR2 Activates MLCK-Dependent Tight Junction Dysregulation to Cause Apoptosis-Mediated Barrier Loss and Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v. 2, n. 9, p. 407–415, 2013.

TAVELIN, S. et al. Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. v. 188, 2002.

THALAYASINGAM, N.; ISAACS, J. D. Anti-TNF therapy. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 4, p. 549–567, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521694211000799>>.

UHLIG, H. H. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: Implications for the understanding of inflammatory bowel disease. **Gut**, 2013.

VERGNOLLE, N. et al. Annexin 1 is secreted in situ during ulcerative colitis in humans. **Inflammatory bowel diseases**, v. 10, n. 5, p. 584–592, 2004.

VERGNOLLE, N. **Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases***Gut*, 2016. .

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Serum sickness, encephalitis and other complications of anti-cytokine therapy. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, 2009.

VEYRARD, P. et al. Predictive Models of Therapeutic Response to Vedolizumab: A Novel Step into Personalized Medicine in Crohn's Disease? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1193–1195, 2018.

VONG, L. et al. Up-regulation of Annexin-A1 and lipoxin A4 in individuals with ulcerative colitis may promote mucosal homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–9, 2012.

WALLACH, D. et al. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms.

Annual review of immunology, v. 17, p. 331–67, 1999. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358762>>.

WANG, F. et al. IFN- γ -Induced TNFR2 Expression Is Required for TNF-Dependent Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. **Gastroenterology**, 2006.

WILHELM, S. M.; LOVE, B. L. Management of patients with inflammatory bowel disease: current and future treatments. **Clinical Pharmacist**, v. 9, n. 3, p. Online, 2017.

YANG, Y. H. et al. Deficiency of Annexin A1 in CD4 + T Cells Exacerbates T Cell–Dependent Inflammation . **The Journal of Immunology**, 2013.