

ANGÉLICA THOMAZ VIEIRA

**PAPEL DO EOSINÓFILO NA PATOGÊNESE DA
COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Instituto de ciências Biológicas – UFMG
Belo Horizonte - MG
2008

ANGÉLICA THOMAZ VIEIRA

**PAPEL DO EOSINÓFILO NA PATOGÊNESE DA
COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

(Dpto. De Bioquímica e Imunologia)

Instituto de ciências Biológicas – UFMG
Belo Horizonte - MG
2008

*A minha querida mãe e a
minha irmã, pelo amor e
incentivo.*

*Ao VV, por tanto carinho, pela
paciência, pela torcida, por
estar sempre presente e pela
imensa ajuda (sem você tudo
seria tão difícil!)*

AGRADECIMENTOS

À Dani Souza, por todo exemplo, carinho, dedicação, e risadas gostosas (bons tempos...) e a Dri Soares. (Obrigada por tudo que vocês me ensinaram!);

Às minhas amigas e companheiras de trabalho, mais que especiais: Dri (eae), Carols, Lets, Tiça, Valzita, Katita e Landinha (como vocês são queridas e como me ajudaram!);

A toda equipe do laboratório de Imunofarmacologia, em especial: Caio (por tudo), Norine (pela nova amizade), Flávio Lopes e Flávio Amaral (pela agradável companhia), Rafinha (pelo carinho), Cris (pela força), Livinha (pelas ajudas fora de hora), Dani Sachs (pelas palavras amigas), Ilma (sempre quebrando o meu galho!), Rodrigues e Remito (vixi, por várias coisas), Vivinha (sempre disposta a ajudar), Gisele e Ana (como vcs foram importantes nessa etapa final!) e ao Chico (quase do lab!).

Aos que já não estão presentes no laboratório, porém contribuíram muito na minha formação: Fá, Adriano, Ester, Mi, Lucíola, André Talvani... (saudades!)

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, professores e em especial à Celise, Grazziele e Polyanna;

À prof.^a Débora Negrão, pelo fornecimento dos animais GATA;

À prof.^a Tarcília Aparecida da faculdade de Odontologia, pela ajuda com a imunohistoquímica;

Ao prof. Geovani Dantas Cassali, pela ajuda com as histologias;

Agradecimento especial a Erica Leandro e a Ju do Labin, por estarem sempre dispostas a me ajudarem;

Aos profs. Pedro Paulo Gaspar Elsas e Maria Ignez Gaspar Elsas da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, por ter me acolhido em seu laboratório; e um agradecimento especial ao Túlio Queto por ter sido tão atencioso comigo durante todo o período que estive por lá;

À turma de bases, pela convivência!

Aos amigos do ICB,

Aos colegas da favela, pela compreensão;

A todos que de alguma forma ajudaram direto ou indiretamente;

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, professor Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade, pela acolhida, pelo exemplo, pela compreensão, pela paciência e, sobretudo pelos ensinamentos e inestimáveis contribuições na minha formação científica.

“Se vi mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

*"Os grandes acontecimentos
ocorrem sem terem sido
planejados. A sorte comete
bons erros e desfaz os
planos mais cuidadosos".*

Georg Lichtenberg

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Inflamação.....	18
1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais - IBD	20
1.3 Imunidade da mucosa intestinal frente às doenças inflamatórias intestinais	22
1.4 Colite Ulcerativa X Modelo experimental	24
1.5 Participação dos eosinófilos na Colite Ulcerativa	26
1.6 Animais Δ dblGATA são ferramentas importante no estudo da função dos eosinófilos.....	30
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
2. Justificativa.....	33
2.1 Objetivos	33
2.1.1 OBJETIVO GERAL:	33
2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35

3.1 Animais	36
3.2 Colite ulcerativa experimental	36
3.3 Determinação dos sinais clínicos	37
3.4 Avaliação da perda de peso.....	37
3.5 Quantificação da infiltração de eosinófilos no tecido pelo método de atividade da peroxidase eosinofílica - EPO	38
3.6 Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase - MPO	39
3.7 Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetilglicosaminidase - NAG.....	40
3.8 Análises histopatológicas	41
3.9 Determinação dos níveis de citocinas/quimiocinas (ELISA)	41
3.10 Cinética de células do sangue e do cólon.....	42
3.11 Imuno-histoquímica	43
3.12 Modelo experimental de artrite induzindo o recrutamento de neutrófilo na cavidade intrarticular.	43
3.13 Transferência adotiva de células mielóides	44
3.14 Estratégia experimental - I	45
3.15 Estratégia Experimental – II (<i>Cinética</i>).....	45
3.16 Estratégia Experimental – III (<i>Transferência de células da medula óssea</i>)	46
3.17 Análise estatística	46
3.18 Pesquisa bibliográfica	46

4. RESULTADOS	48
4.1 Caracterização do modelo de colite ulcerativa experimental.....	49
4.1.1 Patologia clínica da colite ulcerativa experimental.....	49
4.1.2 Participação de eosinófilos no modelo experimental de colite ulcerativa.....	51
4.2 Avaliação da colite ulcerativa em animais deficientes em eosinófilos	53
4.2.1 Análises clínicas.....	54
4.2.2 Análises histopatológicas.....	54
4.2.3 Cinética de eosinófilos no sangue e no cólon.....	57
4.2.4 Cinética da produção de eotaxina no cólon intestinal.....	59
4.2.5 Produção de citocinas.....	61
4.2.6 Participação de leucócitos no modelo de Colite Ulcerativa	63
4.3 Cinética de neutrófilos no sangue e no tecido	64
4.4 Animais Δ dblGATA recrutam neutrófilos normalmente.....	66
4.5 Produção de quimiocinas.....	68
4.6 Transferência de células mielóides para animais Δ dblGATA	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Modelos animais experimentais de IBD	25
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Interação entre células epiteliais e leucócitos regulando o sistema imune na homeostase tecidual em estado normal e na doença.....	23
Figura 2 Mecanismos envolvidos na maturação, diferenciação, recrutamento e ativação dos eosinófilos.	28
Figura 3 Fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dos eosinófilos e	30
Figura 4. Figura esquemática representando a deleção do locus genético do fator de transcrição Gata-1 para o desenvolvimento dos animais biologicamente modificados com fenótipo para deficiência de eosinófilos	31
Figura 5 Avaliação clínica da colite induzida por DSS em animais WT.	50
Figura 6 Participação de eosinófilos na UC.	52
Figura 7 Tratamento com DSS induz letalidade nos animais WT, mas não nos animais Δ dbIGATA.	53
Figura 8 Indução de colite ulcerativa experimental em animais Δ dbIGATA leva a uma diminuição dos sinais clínicos e da perda de peso.	55
Figura 9 Cortes histológicos representativos do cólon intestinal dos camundongos.	56
Figura 10 Cinética de eosinófilos no sangue e no cólon intestinal durante a indução da colite.	58
Figura 11 Caracterização da produção de CCL11/eotaxina no cólon intestinal dos animais WT durante a indução da UC.	60
Figura 12 Perfil da liberação de citocinas na Colite ulcerativa experimental.....	62
Figura 13 Participação dos leucócitos no modelo de colite ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrana – DSS.....	64
Figura 14 Cinética de neutrófilos no sangue e no cólon intestinal durante a indução da colite.	65
Figura 15 Recrutamento de neutrófilos na cavidade intraarticular dos animais WT e Δ dbIGATA.	67
Figura 16 Perfil da secreção de proteínas quimiotáticas KC e MIP1- α na colite ulcerativa experimental.	68

Figura 17 Transferência adotiva de células da medúla óssea de animais WT para
animais Δ dblGATA e induzidos a colite. 70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA - Soroalbumina bovina

CCL-11 - Quimiocina Eotaxina

CFU – Unidade formadora de colônia

Δ dbIGATA-1 - delta double Gata-1

DSS - "*Dextran Sulphate de Sodiu*" (Sulfato de sódio Dextran)

g - gramas

EDTA - "*EthyleneDiamineTetrAcetic acid*" (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - "*Enzyme- linked immunosorbent assay*" (Ensaio imunoenzimático)

EPO - Peroxidase eosinofílica

H&E - Ematoxilina e eosina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HTAB - Brometo de "*hexadecyltrimethylammonium*"

IBD - "*Inflammatory Bowel Disease*" (Doença inflamatória intestinal)

IL-4 - Interleucina - 4

IL-5 - Interleucina - 5

IL-6 - Interleucina – 6

INF- γ – Interferon gama

Kc - Quimiocina derivada de queratinócito

Kd – Quilo dalton

MCP-1(JE) - Proteína quimiotática de monócitos 1

mg - Miligramas

ml - Mililitros

mM - Milimolar

MPO - Mieloperoxidase

MIP - Proteína inflamatória de macrófagos

μl - Microlitros

NaCl - Cloreto de sódio

NAG - N-acetilglicosaminadase

NaPO₄ - Fosfato de sódio

O.D. - Densidade óptica

OPD – o-fenilenodiamina

°C - Graus Celsius

PAS – *"Periodic acid-Schiff"*

PBS - *"Phosphate-buffered saline"* (Tampão fosfato de sódio)

pg - picogramas

PMNs - Polimorfonucleares

rpm - Rotações por minuto

Th1 - linfócitos T helper tipo 1

Th2 - Linfócitos T helper tipo 2

TNF-α - Fator de necrose tumoral α

UC – *"Ulcerative Colitis"* (Colite Ulcerativa)

WT - *"Wild-type"* (animal selvagem)

RESUMO

Eosinófilos são células pró-inflamatórias multifuncionais, que participam de diversos processos inflamatórios, incluindo disfunções gastrintestinais. O seu papel na colite ulcerativa, no entanto, ainda é desconhecido.

Neste trabalho, avaliamos a participação do eosinófilo usando camundongos deficientes de eosinófilos (Δ dblGATA-1), utilizando o modelo de colite experimental induzida por Sulfato de Sódio Dextrana (DSS). A colite experimental induzida nos animais “*wild-type*” (WT) foi acompanhada de 100% de mortalidade, ao contrário dos animais deficientes de eosinófilos, que não morreram. Além disso, um grande acúmulo de eosinófilos foi observado no cólon intestinal dos animais WT com colite, detectado nas análises histopatológicas e no ensaio da atividade enzimática da peroxidase eosinofílica. O acúmulo de neutrófilos também estava aumentado, porém este aumento foi observado somente nos animais WT com DSS. Foi percebido uma elevação nos níveis das quimiocinas: Eotaxina/CCL11, KC/CXCL1-3 e MIP-1 α /CCL3 estava aumentado nos animais WT com colite, quando comparados aos animais controle. No entanto, nos animais Δ dblGATA-1, essas quimiocinas não apresentaram diferenças significativas, tanto no grupo com colite quanto no controle. Deste modo, podemos sugerir um importante papel dos eosinófilos no desenvolvimento de disfunções gastrintestinais no modelo experimental de colite ulcerativa, evidenciado pelo aumento da morbidade e mortalidade dos animais.

Palavras chaves: Colite ulcerativa, Doenças Inflamatórias intestinais, eosinófilo, resposta inflamatória

ABSTRACT

Eosinophils are multifunctional pro-inflammatory leukocytes implicated in the pathogenesis of numerous inflammatory processes, including gastrointestinal disorders, but its precise role in the development of Ulcerative colitis is unknown. The present study was conducted to determine this role by using a mouse model of eosinophil lineage ablation (Δ dblGATA-1) and we choose oral administration of dextran sulfate sodium (DSS) to induce colitis. All WT mice died after DSS-induced colitis has been installed, while eosinophil deficient mice did not. Furthermore, eosinophil lineage ablation in mice has a protective effect in dextran sulfate sodium- induced colitis. Eosinophil accumulation was higher in WT mice with colitis than in Δ dblGATA-1 mice, as assessed by histopathological analysis and eosinophil peroxidase activity, even with high IL-5 levels in the latter group. Neutrophils accumulation was also significantly increased only in WT-treated with DSS. Furthermore, Eotaxin/CCL11, KC/CXCL1-3 and MIP-1 α /CCL3 chemokines were increased in WT mice, compared to controls. However, these chemokines showed no significant differences in Δ dblGATA-1 with colitis and controls. Thus, we suggest that eosinophils are critical in the development of gastrointestinal dysfunction, and mortality increase of mice submitted to experimental ulcerative colitis.

Key words: Ulcerative colitis, Inflammatory Bowel Disease, eosinophil, inflammatory response.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um evento que ocorre em tecidos vascularizados após uma lesão (mecânica, física ou química), infecção ou estimulação imunológica, a fim de eliminar o agente agressor e, em última instância, restaurar a integridade tecidual (Abbas *et. al.* 2000). Esta resposta inflamatória é geralmente acompanhada pelos sinais e sintomas cardinais: edema, sensação de calor, dor e alterações funcionais do tecido acometido (Filho, 1998).

O processo inflamatório é um fenômeno no qual ocorre a participação orquestrada de diversos mediadores que se distribuem temporalmente e espacialmente, a fim de promover a iniciação, amplificação e resolução do evento inflamatório.

Quando ocorre lesão tecidual, uma série evolutiva de mecanismos é ativada. A reação inflamatória local caracteriza-se, primeiro, por uma vasoconstrição arteriolar passageira decorrente da contração do músculo liso vascular. Subseqüentemente, ocorre vasodilatação arteriolar que promove o aumento do fluxo de sangue para a área agredida, gerando hiperemia e fluxo sanguíneo rápido. Este fenômeno é seguido por um período em que a vasodilatação é mantida, mas a velocidade da circulação diminui. Já nas fases iniciais da hiperemia é possível observar alterações no endotélio vascular, culminando na exudação de líquidos para o tecido adjacente. Seguem-se, então, nas vênulas pós-capilares, a marginação leucocitária, processo em que os leucócitos deixam a região central da corrente de sangue e começam a se deslocar na margem do fluxo. Estes leucócitos rolam ao longo do endotélio e, posteriormente, migram de forma direcional e seletiva do leito vascular para o interstício, sendo este evento referido como diapedese (Filho, 1998).

Após o recrutamento celular os leucócitos presentes no tecido são ativados, tornando-se fontes importantes de vários mediadores inflamatórios. Os leucócitos produzem e secretam uma grande quantidade de substâncias que contribuem para a iniciação e manutenção das respostas inflamatórias. Os mediadores derivados dos grânulos de leucócitos podem levar à lesão tecidual e disfunção do

órgão. Uma vez que o agente causador (patógeno, lesão física, tumor, etc) seja eliminado, é importante que as células e mediadores presentes no local da lesão sejam também excluídos, restabelecendo a integridade do tecido (Cara *et al.*, 2000).

O influxo de células dos vasos sanguíneos para o tecido ocorre principalmente pela liberação de mediadores, tais como as quimiocinas que são produzidas por diferentes tipos celulares. Estas quimiocinas são proteínas pequenas, de 8 a 10 kd, que recrutam leucócitos por ativarem moléculas de superfície que medeiam a adesão (Integrinas) de leucócitos, dividindo-se em grupos pequenos, de acordo com a sua seqüência estrutural (Luster 1998).

As duas principais famílias de quimiocinas são as famílias C-X-C e a família C, que se distinguem pela presença ou ausência de um aminoácido entre os primeiros dois resíduos de cisteína (Luster 1998). A expressão destas quimiocinas e a ligação aos seus respectivos receptores atuam sobre um tipo celular, como, por exemplo, C-X-C, que é predominante nos neutrófilos, enquanto C-C são quimiotáticas para linfócitos, monócitos, mastócitos e eosinófilos (Baggioni 1998; Adams & Lloyd 1997).

Os leucócitos que entram pela primeira vez no sangue, provenientes da medula óssea (células da imunidade inata e células B) ou do timo (células T não estimuladas ou “naive”), expressam em sua membrana padrões de células de adesão que permitem ou restringem sua migração para certas regiões (Luster *et al.*, 2005).

Os granulócitos, grupo que inclui os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos, fazem parte das células de resposta imune inata. Eles expressam uma série de moléculas de adesão e acumulam-se rapidamente em áreas de inflamação através da interação entre essas moléculas e seus receptores em células endoteliais ativadas (Nigli, 2003). Dentre essas células, os neutrófilos, também denominados leucócitos polimorfonucleados (PMN), são capazes de migrar seguindo gradientes de concentração de substâncias químicas provenientes de tecidos lesados, produtos bacterianos, ou através de moléculas induzidas por agentes infecciosos (Foxman *et al.*, 1997). Os neutrófilos são

essenciais para o combate de infecções fúngicas e bacterianas e sua depleção durante o tratamento com quimioterápicos está associada com infecções de alta letalidade por esse patógenos, conforme demonstrado por Winn et al. (1995). Sua avaliação, entretanto, também pode liberar agentes citotóxicos, causando dano tecidual, como podemos observar nas doenças auto-imunes e nas doenças inflamatórias.

O recrutamento de leucócitos, todavia, pode participar de eventos importantes para a homeostase do organismo. Por exemplo, a manutenção do *pool* de células T de memória depende da regulação, mediada por citocinas, da sobrevivência e proliferação das células (Marsden *et al.*, 2006). Além disso, a recirculação de células do sistema imune depende da ativação de receptores de quimiocinas e, conseqüentemente, das vias de sinalização ligadas a ele (Sallusto & Mackay, 2004).

1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais - IBD

A colite Ulcerativa (UC) é uma doença com etiologia ainda desconhecida e, assim como a doença de Crohn (CD), pertence ao grupo das Doenças Inflamatórias Intestinais (IBD) que mais se destacam devido ao aumento da incidência em jovens (tanto homens quanto mulheres) de 20 a 30 anos. Ambas são caracterizadas por uma intensa resposta inflamatória no trato gastrointestinal muitas vezes acarretando em perda estrutural e perda de função. Além disso, essas doenças são, na grande maioria, remissivas, podendo evoluir para o câncer, agravando ainda mais o quadro clínico do paciente (Podolsky, D.K., 2002; Bouma & Strober, 2003).

A incidência das IBD, embora apresente altas taxas na América do norte e na região nordeste da Europa, tem aumentado muito nas últimas décadas nos países em desenvolvimento, afetando cerca de 0,1% da população dos países desenvolvidos (Baumgart & Carding, 2007; Bouma & Strober, 2003; Loftus 2004). Atribui-se isto a fatores múltiplos e complexos, tais como as mudanças dos hábitos

alimentares e a perda da homeostase entre antígenos do lúmen intestinal e a imunidade da mucosa (Thoreson & Cullen, 2007; Strober *et al*, 2002; Podolsky 2002). Vários fatores ambientais têm sido estudados por influenciarem no desencadeamento das doenças inflamatórias intestinais, incluindo a exposição ao cigarro, dietas, contraceptivos orais e agentes antiinflamatórios não estereodais (Tysk *et al*, 1988; Podolsky 2002; Danese & Fiocchi, 2006). Além dos fatores anteriormente citados, infecções, hereditariedade e anormalidade da resposta imune têm sido propostos como causa da doença. No entanto, nenhum desses fatores têm sido bem estabelecido como causa primária (Orholm *et al*, 1991; Xavier & Podolsky, 2007).

Apesar de existir muitas semelhanças entre a Colite ulcerativa e a doença de Crohn, apresentam elas vários aspectos imunológicos e patológicos distintos. A doença de Crohn, por exemplo, afeta todo o trato gastrointestinal, mais comumente na porção terminal do íleo, no ceco, e na área peri-anal, com infiltrado denso de células inflamatórias, principalmente, linfócitos e macrófagos. Além disso, a doença de Crohn é transmural (afetando todas as camadas do intestino), com presença de granulomas em mais de 60% dos pacientes afetados, e fissuras ulcerativas, podendo levar inclusive a complicações extra-intestinais, como fistulas na pele e em órgãos internos (Podolsky 2002; Strober *et al*, 2007).

A colite ulcerativa, por sua vez, tem sido caracterizada como uma intensa resposta inflamatória na superfície da mucosa do cólon, estendendo-se desde o cólon ascendente até o descendente, com um intenso infiltrado de células, destacando-se os linfócitos e granulócitos. Assim, desenvolve ulcerações da mucosa e destruição das criptas globulares.

Muitas complicações clínicas podem estar associadas com a UC, como, por exemplo, toxidade do megacólon, e perfuração, bem como o desenvolvimento de carcinomas do cólon (Podolsky 2002; Ullman *et al*, 2003; Greten *et al*, 2004).

1.3 Imunidade da mucosa intestinal frente às doenças inflamatórias intestinais

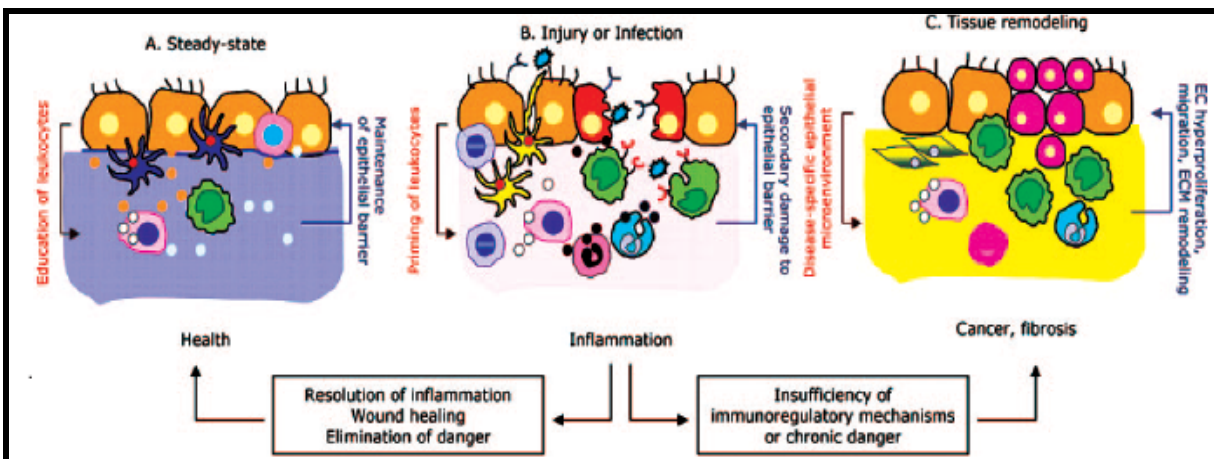
O intestino, em estado normal, consiste da barreira epitelial do sistema imune da mucosa, bem como das células estromais. Todos estes elementos são importantes, e juntos potencializam a resposta imune quando desencadeada.

A arquitetura especializada do epitélio intestinal forma uma forte barreira contra a invasão de microorganismo. O lúmen intestinal é composto de diversos microorganismos, sendo importante uma regulação ou tolerância entre a resposta imune do hospedeiro a estes organismos para a manutenção da homeostase intestinal. Segundo Rakoff-Nahoum e colaboradores (2004), este processo de manutenção da homeostase intestinal é feito através do reconhecimento da microbiota comensal aos receptores “*Toll Like Receptors*” (TLR), expressos nas células epiteliais.

O epitélio é composto por uma rede estrutural de mecanismos de proteção, tais como, células produtoras de muco, células apresentadoras de antígenos (APCs), células linfóides e fatores humorais, como a liberação de Imunoglobulina A (IgA), citocinas e quimiocinas (Abbas, 2000).

Por outro lado, alterações nestes elementos, como a inapropriada resposta imune a microorganismos comensais pode ser um dos fatores, dentre vários, que vai ocasionar a destruição da mucosa intestinal. Este processo desencadeará a colite ulcerativa, bem como a ruptura da barreira epitelial, exacerbando o processo inflamatório e o dano tecidual (Fig. 1).

Em relação ao intestino, além do dano tecidual, existe o risco de acometimento sistêmico, devido à possibilidade de translocação bacteriana (Macfie *et al.* 2006), ou da amplificação do processo para órgãos distantes (Swank & Deitch, 1996).



(Adaptado de Shaykhiev & Bals, 2007)

Figura 1 Interação entre células epiteliais e leucócitos regulando o sistema imune na homeostase tecidual em estado normal e na doença.

A interação leucócito – epitélio, previne a entrada de microorganismos para o interior do corpo, protegendo sua superfície. Em caso de lesão do tecido ou infecção, ocorre um processo inflamatório que, se bem resolvido, leva ao remodelamento do tecido. Caso ocorra uma deficiência dos mecanismos imunoregulatórios, esse processo pode se tornar crônico, ou até mesmo cancerígeno.

Os aspectos imunológicos que diferenciam a doença de Crohn e a Colite Ulcerativa têm sido discutidos por muitos pesquisadores, sendo observado que o perfil de liberação de citocinas pelos linfócitos T CD4+, denominados “*T helper*”, são distintos em uma e em outra patologia. Enquanto na doença de Crohn o processo inflamatório é geralmente considerado do tipo – Th1, devido à maior expressão de citocinas, tais como INF- γ , IL-2, IL-12, na colite ulcerativa, o perfil destas citocinas é atípico. Há, porém, uma maior expressão de IL-5 e IL-13, que estão mais comumente associadas à resposta do tipo - Th 2 (Pallone & Monteleone 1998; Fuss *et al*, 1996; Shanahan 2002; Macdonald *et al* 2000).

As doenças inflamatórias intestinais apresentam uma resposta inflamatória complexa, razão pela qual é de suma importância estudar e compreender os mecanismos imunológicos e inflamatórios, bem como a participação dos seus mediadores, para que, deste modo, possa-se desenvolver terapias eficazes no tratamento dessas doenças. Para uma melhor compreensão destacaremos a Colite Ulcerativa como alvo do nosso trabalho.

1.4 Colite Ulcerativa X Modelo experimental

O desencadeamento da colite ulcerativa ainda é alvo de questionamentos, como sugerido anteriormente. No entanto, os fatores envolvidos na patologia da doença estão sendo cuidadosamente estudados.

A presença de um intenso infiltrado de células inflamatórias sobre a mucosa intestinal com colite é um importante aspecto a ser estudado, visto que estas células têm um papel crucial no dano tecidual, e ao mediar as respostas imunológicas (Macdonald *et al.*, 2000).

As principais células que compõem este infiltrado são: mastócitos, neutrófilos, linfócitos T CD4⁺ e eosinófilos (Blumberg *et al.*, 1999; Strober *et al.*, 2002). Dentre as células polimorfonucleares que compõem esse infiltrado, os neutrófilos são os que parecem estar mais associado com a lesão tecidual e com a severidade dos sintomas clínicos (perda de peso e diarreia com presença de sangue e/ou muco). Além disso, estudo recente tem demonstrado que a migração destes neutrófilos é dependente da ativação do receptor de quimiocinas CXCR2 (Palmen *et al.*, 1995; Natsui *et al.*, 1997; Buanne *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos têm mostrado a participação e a liberação de algumas quimiocinas na colite ulcerativa, tais como, CXCL8/IL-8 ou seu análogo murino CXCL1/KC (Anekasi 1998 e Keshavarzian 1999) correlacionando a sua liberação com a severidade da inflamação (Daig 1996). As quimiocinas CCL-3/MIP-1 α e RANTES também têm sido encontrados na colite (Ajuebor *et al.* 2004 e Macdermott 1998 e 1999).

Muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo dos mecanismos associados à colite ulcerativa (Quadro1).

Quadro 1 Modelos animais experimentais de IBD

Administração de agentes exógenos		
Intra-Retal	Oral	Subcutâneo
TNBS	Indometacina	
Ácido Acético	Carageenina	Ciclosporina A
Oxazolone	Sulfato de sódio dextran	

(Adaptado de Blumberg et. al., 1999)

Dentre os modelos utilizados, iremos ressaltar o modelo de ingestão de Sulfato de Sódio Dextrana (DSS), escolhido para o nosso trabalho. O modelo de indução de colite por ingestão oral de Sulfato de Sódio Dextrana - DSS já encontra-se bem descrito na literatura. Muitos trabalhos sugerem a participação da imunidade inata na patogênese da doença, visto que a colite experimental por administração oral de DSS tem sido induzida em camundongos deficientes de Linfócitos-SCID (AXELSSON *et.al.*, 1996; DIELEMAN *et. al.*, 1994).

Além disso, a colite induzida por DSS apresenta manifestações clínicas semelhantes ao observado em pacientes com colite ulcerativa, tais como, perda de peso, diarreia com sangue, encurtamento do cólon e dor abdominal (Blumberg *et. al.*, 1999).

O mecanismo principal pelo qual o DSS induz colite no animal não é exatamente explicado. No entanto, vários estudos sugerem um possível efeito citotóxico direto do DSS nas células epiteliais da mucosa do cólon, danificando-as e, conseqüentemente, dando início a um processo inflamatório (Mashimo, Ni , 1996; Kitajima, 1999).

1.5 Participação dos eosinófilos na Colite Ulcerativa

Os eosinófilos são granulócitos derivados de células da medula óssea que estão presentes principalmente no sangue, onde compõem aproximadamente 1 a 3% dos leucócitos totais de um indivíduo saudável, e nos tecidos com interface epitelial com o ambiente, como trato respiratório e gastrointestinal. No sangue os eosinófilos circulam com uma meia vida de aproximadamente 18 h. No entanto, nos tecidos os eosinófilos podem sobreviver por semanas, dependendo das interações com a matriz celular e mediadores presentes no microambiente (Rothenberg *et al.*, 1987; Giembycz & Lindsay, 1999).

Estudos anteriores têm demonstrado uma associação entre eosinófilos e infecções parasitárias, contribuindo assim para a hipótese de que essas são células efetoras clássicas envolvidas na defesa do hospedeiro (Souza *et al.* 2006). No entanto, nos últimos anos os eosinófilos têm se mostrado envolvidos em numerosos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento de glândulas mamárias (parecendo ser responsáveis pela secreção local da citocina TGF- β , o que auxilia no crescimento do ducto das glândulas mamárias), proteção do útero durante a implantação do blastocisto (protegendo a gravidez de infecções), infecções virais, doenças inflamatórias alérgicas e neoplasias (Robertson *et al.* 1997 e De M *et al.* 1991).

Muitos trabalhos têm demonstrado um interesse especial no envolvimento dos eosinófilos na patogênese da colite (Jeziorska *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2004; Makiyama *et al.*, 1995). Apesar dos eosinófilos serem células residentes do trato gastrointestinal normal (Mishra *et al.*, 1999), em algumas doenças intestinais tais como, gastroenterite eosinofílica (Keshavarzian *et al.*, 1985), colite alérgica (Odze *et al.*, 1995), e refluxo gastroesofágico (Winter *et al.*, 1982), houve um acúmulo de eosinófilos na mucosa, intensificando a resposta inflamatória (Talley *et al.*, 1992; Torpier *et al.*, 1988). Foi observado, também, um número elevado destas células em biopsias realizadas com amostras do cólon de pacientes com colite ulcerativa. Este aumento estava correlacionado com a gravidade da doença e a disfunção gastrointestinal (Bischoff *et al.*, 1999; Saitoh, *et al.*, 1999 ; Sangfelt *et al.*, 2001).

Os eosinófilos são fontes relevantes de proteínas catiônicas como, por exemplo, peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica maior (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN); além de mediadores lipídicos (PAF e LC4), radicais derivados do oxigênio, citocinas e quimiocinas (IL-5, Eotaxina, RANTES), as quais contribuem para o dano tecidual (Rothenberg, ME, 1998; Cara *et al.*, 2000).

Análises clínicas de biópsia do intestino de pacientes com UC revelaram a presença aumentada dessas proteínas e demonstraram a correlação entre o seu aumento e o aumento do número de eosinófilos e a lesão tecidual (Jeziorska, 2001).

A Peroxidase de eosinofílica (EPO) constitui cerca de 25% dos grânulos secretados por eosinófilos que cataliza a oxidação de várias moléculas resultando em espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essa reação acarreta um *stress* oxidativo com subseqüentemente morte celular por apoptose e necrose (Rothenberg & Hogan 2006)

Forbes e colaboradores (2004), utilizando animais EPO^{-/-} ou administrando um inibidor reversível da EPO, observaram uma melhora da progressão da colite ulcerativa nestes camundongos, sugerindo que a presença dos eosinófilos no cólon intestinal poderia contribuir enormemente com a patologia desta doença.

Em resposta a vários estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para os focos inflamatórios, onde modulam a resposta imune através de uma variedade de mecanismos. Quimiocinas da família das Eotaxinas cooperam com IL-5 na indução de eosinofilia tecidual, sendo que, IL-5 aumenta a quantidade de células responsivas, e as Eotaxinas capacitam os eosinófilos a responderem aos ligantes de CCR3 - receptor de eotaxina (Chen *et. al.* 2001; Teixeira, *et. al.*, 1995).(Fig. 2)

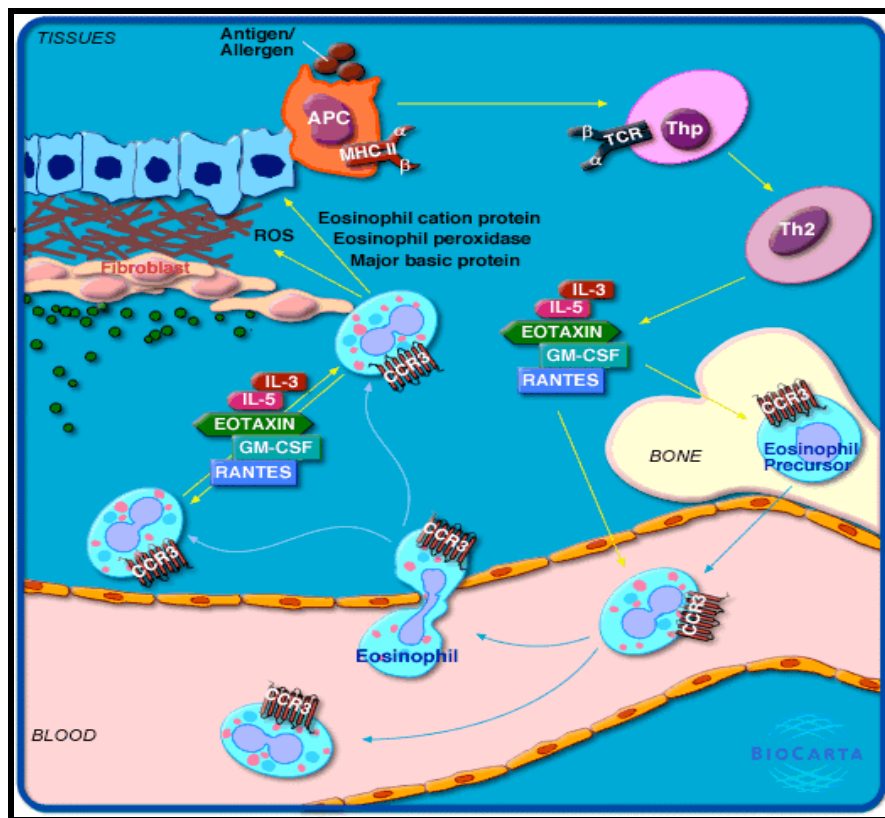


Figura 2 Mecanismos envolvidos na maturação, diferenciação, recrutamento e ativação dos eosinófilos. (http://www.biocarta.com/pathfiles/m_eosinophilspathway.asp)

Eosinófilos podem, ainda, iniciar a resposta imune específica, agindo como células apresentadoras de antígenos (APCs). Além disso, podem também polarizar a resposta imune por células T, através da síntese de IDO, uma enzima envolvida na conversão do triptofano em KYN, uma molécula reguladora do balanço TH1/TH2, através de apoptose de células TH1. Além disso, essas células parecem promover a proliferação de células T efetoras ativadas, mas não de células T naive. Eosinófilos murinos promovem secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 por células T CD4⁺, e, embora tanto eosinófilos quanto células T produzam IL-4, a produção desta citocina por células T é bem maior (Rothenberg & Hogan, 2006).

De fato, sabe-se que, a eotaxina/CCL11 é uma quimiocina constitutiva do trato gastrointestinal que resulta em migração contínua de eosinófilos para este tecido, permitindo, assim, que atuem na defesa contra parasitas (Garcia-Zepeda *et.al.*, 1996).

CCL11 é um quimiocina da família CC que tem sido considerada uma molécula quimioatrente relevante para o recrutamento de eosinófilos para locais de reação alérgica (Teixeira *et al.*, 1997; Rothenberg, 1999; Klein *et al.*, 2001), bem como para a manutenção basal dessas células em alguns tecidos (Humbles *et al.*, 1997; Rothenberg *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 1998). De maneira interessante, a atividade de CCL11 *in vivo* é aumentada pela presença de IL-5 (Collins *et al.*, 1995; Humbles *et al.*, 1997; Mould *et al.*, 1997). O sinergismo entre IL-5 e CCL11 provavelmente decorre do número aumentado de eosinófilos circulantes induzido por IL-5, e da habilidade desta citocina em primar os eosinófilos a uma resposta induzida por CCL11 (Lamkhroued *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos de CCL11 são mediados pelo receptor de quimiocinas CCR 3 (CCR3), que é um receptor acoplado à proteína G e expresso em vários tipos celulares incluindo eosinófilos, basófilos, “células T helper 2” (Th2) e mastócitos (Uguccioni *et al.*, 1997; Ochi *et al.*, 1999; Bandeira-Melo *et al.*, 2001a).

A sinalização de CCR3 para quimiotaxia envolve a fosforilação e ativação de tirosinas quinase (El-Shazly *et al.*, 1999) e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (Boehme *et al.*, 1999; Kampen *et al.*, 2000). Além de promover quimiotaxia, a ligação de CCL11 ao CCR3 ativa os eosinófilos.

As respostas efetoras mediadas por CCR3 em eosinófilos incluem produção de espécies reativas do oxigênio (Elsner *et al.*, 1996; Tenscher *et al.*, 1996), produção de leucotrieno C₄ (LTC₄) e formação de corpos lipídicos (Bandeira-Melo *et al.*, 2001b); liberação de grânulos contendo proteínas catiônicas (El-Shazly *et al.*, 1998; Kampen *et al.*, 2000); e liberação de interleucina-4 (IL-4) pré-formada (Bandeira-Melo *et al.*, 2001c).

Não obstante, dados da literatura indicam que pacientes com colite ulcerativa têm níveis aumentados dessa quimiocina no soro (Amparo, 2002). Além disso, na hipersensibilidade gastrointestinal alérgica, o aumento da liberação da eotaxina está relacionado com o aumento de eosinófilos no tecido e com a patologia dessa doença (Hogan *et al.*, 2001)

1.6 Animais $\Delta dbIGATA$ são ferramentas importante no estudo da função dos eosinófilos

A regulação da produção e diferenciação de eosinófilos na medula óssea, bem como a sua migração e sobrevivência no tecido, são fortemente influenciados pela presença de IL-5. Também IL-3 e GM-CSF atuam na proliferação e diferenciação de eosinófilos, seguindo instruções especificadas pelos fatores de transcrição GATA-1, PU.1 e C/EBP (Lampinem *et. al.*, 2004; MiYajima *et. al.*, 1993; Mcnagny *et. al.*, 1998). (Fig. 3)

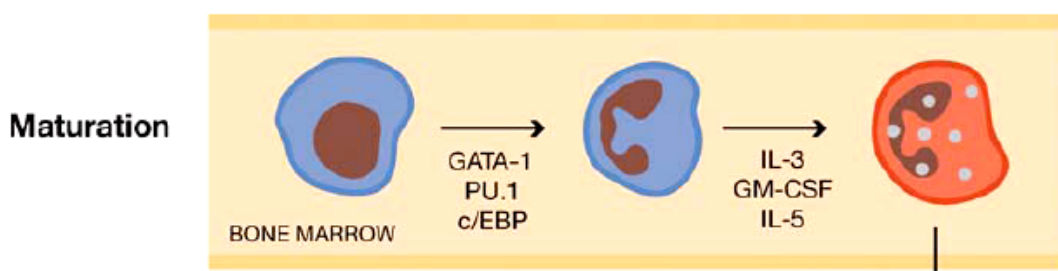


Figura 3 Fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dos eosinófilos e citocinas responsáveis pela maturação e ativação dessas células (Adaptado de Lampinem *et. al.*, 2004)

Os eosinófilos são produzidos a partir de células troncos pluripotentes que, primeiro se diferenciam em um precursor híbrido de basófilos e eosinófilos e, então, se diferenciam em eosinófilos, pela interação de três fatores: GATA-1, PU.1 e C/EBP. Embora estes fatores de transcrição sejam expressos em uma variedade de linhagens hematopoiéticas, seu mecanismo de ação nos eosinófilos é único. GATA-1 é claramente o mais importante para a especificação de eosinófilos, como revelado pela perda destas células em camundongos que tiveram deletado um sítio de ligação de alta afinidade no promotor GATA-1 (Yu *et al.*, 2002); e por experimentos de diferenciação *in vitro* (Hirasawa *et al.*, 2002).

Recentemente, Yu e colaboradores (2002) desenvolveram uma linhagem de camundongo Balb/c com deficiência completa e seletiva na diferenciação de eosinófilos, denominados ($\Delta dbIGATA$). O fator de transcrição GATA-1, expresso em quatro linhagens hematopoiéticas (eritrócitos, megacariócitos, mastócitos e

eosinófilos), reprograma as células mielóides para três diferentes linhagens: eritrócitos, megacariócitos e eosinófilos. A atividade específica de GATA-1 para eosinófilos parece ser mediada por um sítio palindrômico (duplo) de alta afinidade (Du et al., 2002). (Fig. 4)

A deleção deste sítio de ligação no promotor GATA-1, que deve intervir na auto-regulação positiva da expressão de GATA-1, leva à perda seletiva de eosinófilos in vivo. Deste modo, a utilização desses camundongos permitirá avaliar o papel dos eosinófilos na imunopatologia da Colite Ulcerativa.

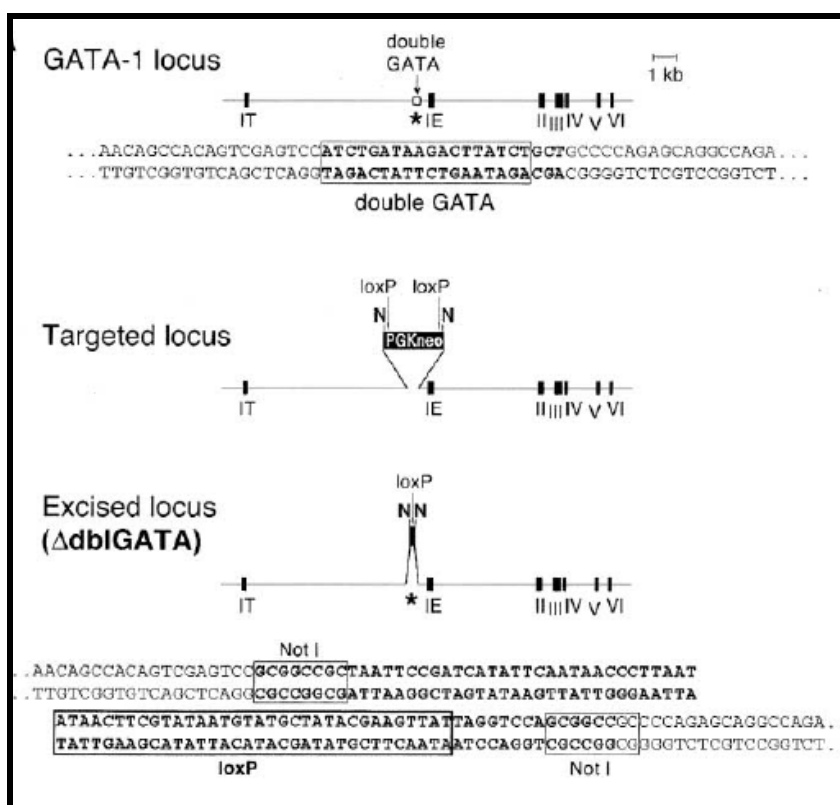


Figura 4. Figura esquemática representando a deleção do locus genético do fator de transcrição Gata-1 para o desenvolvimento dos animais biologicamente modificados com fenótipo para deficiência de eosinófilos (Adaptado de Du et al., 2002)

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. Justificativa

Visto que, a incidência da Colite Ulcerativa está aumentando progressivamente e mundialmente, e que, além disso, é uma doença com caráter remissivo e com tendência a cronicidade, é de fundamental relevância estudar e compreender os mecanismos que atuam neste processo para que novas estratégias de intervenção farmacológica sejam desenvolvidas. Sabendo que os eosinófilos participam deste processo, elucidar o seu papel é de suma importância, para isto, os animais $\Delta db1GATA$ representam ferramentas importantes.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo Geral:

Estudar o papel dos eosinófilos e a resposta inflamatória na colite ulcerativa experimental induzida por Sulfato de Sódio Dextrana – DSS, usando como ferramenta animais deficientes do fator de transcrição GATA-1.

2.1.2 Objetivos Específicos

- A. Avaliar a gravidade dos sinais clínicos, como perda de peso, sangue oculto nas fezes e diarreia, característicos da patologia em camundongos Balb/c (WT), no modelo de Colite Ulcerativa;
- B. Determinar a cinética de eosinófilos durante o curso da Colite Ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrana – DSS em camundongos Balb/c;
- C. Determinar o influxo de neutrófilos, bem como a produção dos mediadores envolvidos no recrutamento destas células durante o curso da UC em animais WT;

- D. Estudar em animais WT, a liberação das citocinas IL-5 e CCL11 que são mediadores chave dos processos inflamatórios e conhecidos por promoverem a sobrevivência e a ativação dos eosinófilos;
- E. Avaliar a taxa de letalidade dos animais WT durante o curso da UC induzida por Sulfato de Sódio Dextrana – DSS em camundongos Balb/c;
- F. Avaliar todos os parâmetros acima citados, nos animais deficientes de eosinófilos, Δ dblGATA, comparando-os com os animais WT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas, entre 7-9 semanas de idade (peso entre 18-23g), foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG e mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/ escuro de 12h) com livre acesso à ração e água.

Os animais Δ dblGATA utilizados nestes experimentos foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Débora Negrão Côrrea, do departamento de Parasitologia desta universidade e posteriormente criados em nosso laboratório.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): n^o do protocolo 193/07.

3.2 Colite ulcerativa experimental

De acordo com o modelo anterior sugerido por Okayasu et.al. 1990, para a indução da colite ulcerativa experimental, foi dissolvido Sulfato de Sódio Dextrana (DSS- peso molecular 36,000-50,000, MP Biomedicals, LLC, Aurora, OH), na dose de 4% (peso/volume), em água autoclavada e colocada ao bebedouro dos animais, para a ingestão "*ad libitum*". Essa solução era preparada e trocada dos bebedouros a cada 2 dias e o tratamento prosseguia durante 7 dias. A ingestão de água dos animais, tanto dos "*wild type*" (WT), quanto dos Δ dblGATA, foi monitorada e ambos os grupos apresentaram ingestão normal da água. Os animais do grupo controle foram colocados em gaiolas separadas das gaiolas dos animais que iriam desenvolver colite e estes receberam água autoclavada normal. No dia 7 após o tratamento inicial, os animais foram anestesiados (cetamina/xilazina) e sacrificados para a retirada do cólon intestinal para posterior análise do processo inflamatório através de parâmetros bioquímicos e histológicos. O influxo de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos foram avaliados indiretamente através da quantificação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO), mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG),

respectivamente. Os animais foram monitorados de 48 em 48 horas para avaliação do peso e dos sinais clínicos, descritos abaixo. Para os dados de letalidade, os animais foram acompanhados durante 21 dias após o início do tratamento com DSS.

3.3 Determinação dos sinais clínicos

Os camundongos foram monitorados clinicamente a cada dois dias. Para isso, os animais eram colocados individualmente em gaiolas de acrílico brancas por cerca de 10 minutos para análise da consistência e da presença de sangue e muco nas fezes.

Para a análise da presença de sangue oculto, as fezes foram coletadas e maceradas em cartelas (INLAB - Diagnostica São Paulo, BR). A quantificação numérica dos sinais clínicos foi feita seguindo as seguintes características:

- fezes normais e ausência de sangue – sem pontuação;
- fezes normais e teste de sangue oculto positivo – 1 ponto;
- fezes de consistência cremosa e traços de sangue – 2 pontos;
- fezes de consistência pastosa e teste de sangue oculto positivo com intensa coloração – 3 pontos;
- fezes sólidas com muco e teste de sangue oculto positivo – 4 pontos;
- diarreia e traços de sangue anal – 5 pontos;
- diarreia e presença de gotas de sangue na caixa – 6 pontos;
- diarreia e hemorragia – 7 pontos;
- diarreia, hemorragia e sinais de morbidade, incluindo postura encurvada e pelos arrepiados – 8 pontos.

3.4 Avaliação da perda de peso

A medida da perda de peso corporal dos animais foi realizada a cada 2 dias a partir da indução inicial da colite. Os camundongos foram pesados e

identificados individualmente. Para calcular a porcentagem da perda de peso, foi realizado o seguinte cálculo: $\text{Peso do dia observado} / \text{Peso inicial (dia 0)} \times 100$. Os resultados foram expressos em porcentagem da perda de peso durante o período de indução da colite.

3.5 Quantificação da infiltração de eosinófilos no tecido pelo método de atividade da peroxidase eosinofílica - EPO

A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido foi utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia intestinal. Para tanto, para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1.9 ml de PBS (pH 7.2), em seguida o tecido foi homogeneizado no homogenizador de tecido e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos (12.000 g) e o sobrenadante foi posteriormente desprezado. O *sedimento* foi sujeito à lise hipotônica por adição de 1.5 ml de salina 0,2%, seguido pela adição de 1.5 ml de salina 1,6% e glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi novamente desprezado e o *sedimento* ressuspense em 1.9 ml de PBS (pH 7.4), contendo HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide; Sigma) 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato foi separado em alíquotas de 1 ml / *ependorf*, congelado 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75µl de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75µl de substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD em tampão Tris-HCl - 0,075µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ 1M e a leitura era realizada em leitor de Elisa com filtro de 492 nm. As amostras dos tecidos foram analisadas na diluição 1:3 em PBS.

Este ensaio foi conduzido assim como descrito anteriormente por (Strath et. al. 1985).

3.6 Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase - MPO

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no cólon intestinal foi mensurada pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase como descrito anteriormente (Souza et. al., 2002).

Sumariamente, fragmentos do cólon dos animais submetidos à colite experimental foram removidos e congelados a 20°C. Após o descongelamento, o tecido (100 mg de tecido em 1.9 ml de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0.1 M NaCl, 0.02 M Na PO₄, 0.015 M NaEDTA), utilizando-se homogenizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos (Centrifuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado é submetido à lise hipotônica (1.5 ml de solução de NaCl 0.2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1.6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação o precipitado foi ressuspendido em tampão NaPO₄ 0.05 M (pH 5,4) contendo brometo de "*hexadecyltrimethylammonium*" (HTAB) 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1ml da suspensão foram transferidas para tubos Eppendorf (Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 ml e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm e foi recolhido o sobrenadante. As amostras dos tecidos foram diluídas em PBS previamente à análise na razão 1:3.

A Atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspendido foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando "*tetramethylbenzidine*" (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados

foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido e comparados com neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade peritoneal foi realizada pela injeção de 3 ml de caseína 5%.

Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) como descrito acima e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase.

3.7 Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetilglicosaminidase - NAG

Fragmentos do cólon intestinal foram pesados e ressuspendido, na proporção de 1.9 ml de solução para cada 100mg de tecido, em solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida foi homogeneizada em homogenizador de tecido e, em seguida, centrifugada a 4°C por 10 min. a 10.000 rpm (1.500 g). Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL de *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-*D*-glicosaminidase (Sigma-Aldrich), dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4.5), a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação do tecido. A reação se processou a 37°C por 10 min, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0.2 M (pH 10,6) e quantificada em espectrofotômetro a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, mediante injeção de uma solução de tioglicolato de sódio a 3%. O lavado peritoneal foi realizado após um tempo máximo de 4 dias pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido. A unidade obtida por este procedimento é expressa como “unidade relativa de macrófagos”.

3.8 Análises histopatológicas

O cólon intestinal dos animais foi removido logo após o sacrifício dos mesmos e fixados em solução 10% formol em PBS, pH 7.4. Após tempo mínimo de fixação por 48 horas, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas foram coradas com H&E. Os cortes foram examinados ao microscópio óptico e fotografados.

3.9 Determinação dos níveis de citocinas/quimiocinas (ELISA)

Níveis de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, CXCL1-3/KC, CCL11/Eotaxina e CCL3/MIP-1 α , foram medidos no cólon intestinal de acordo com a descrição de publicação anterior de minha autoria (Vieira et. al. 2005) utilizando - se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado.

Para dosagem de citocinas, amostras de tecido do colon intestinal, foram homogeneizadas em uma solução tampão de fosfato ("*phosphate-buffered saline - PBS*") (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO₄) contendo inibidor de proteases (0.1 mM "*phenylmethanesulfonyl fluoride*", 0.1 mM "*benzethonium chloride*", 10 mM "EDTA" e 20 KI aprotinina A) e 0,05% "Tween 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada ml de solução; foi utilizado homogenizador de tecidos (Power Gen 125 - Fischer Scientific Pennsylvania, USA). As amostras foram mantidas a - 20°C para posterior utilização no ensaio enzimático.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 100 μ l /poço de solução de anticorpo monoclonal anti-camundongo para citocina/quimiocina a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após quatro lavagens (400 μ l/poço - Bio-Tek *Instruments*, INC) em Tween 20 0,05% em PBS, pH 7.4, adicionou-se às placas o tampão bloqueio (1% BSA em PBS pH 7.4) e estas foram, então, incubadas por 1 hora. Após nova

etapa de lavagem, adicionou-se 100ul/poço dos padrões (15-1000 pg/ml) e das amostras diluídos em 0,1% BSA e 0,05% Tween 20 em PBS pH 7.4 e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight*. Após lavagem das placas, adicionou-se 100ul/poço de solução de anticorpo biotilado anti-camundongo para a citocina/quimiocina em questão e incubou-se as placas por 2 horas. Após nova lavagem, procedeu-se reação cromogênica com o substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) (100µl/poço) diluído em tampão citrato (acrescido de H₂O₂- 30 v/v), pH 5.0, e as placas foram encubadas, ao abrigo da luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50ul/poço de H₂SO₄ 1M e a leitura das placas foi feita no leitor de ELISA (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Todos os passos de incubação (exceto aqueles *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente. As amostras dos tecidos foram analisadas na diluição 1:3 em PBS.

3.10 Cinética de células do sangue e do cólon

Para o experimento de cinética os animais foram sacrificados nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 após o tratamento inicial com DSS. Para contagem das células sanguíneas, os animais foram sacrificados por anestesia pela cetamina/xilazina seguida de deslocamento cervical, 20 µl de sangue foram recolhidos do plexo braquial e adicionados a 180 µl de solução de Turk para a contagem total do número de células. Um esfregaço foi preparado e corado pelas soluções de Giemsa e May-Grümmald que contêm os corantes eosina e hematoxilina. O esfregaço foi utilizado para a contagem diferencial de células do sangue sendo distinguidas células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Um total de 300 células foi contado por animal. Fragmentos do cólon intestinal foram removidos para os ensaios de EPO e MPO descritos anteriormente. Foi coletado cerca de 500 µl de sangue para a retirada do soro e posteriores ensaios de ELISA.

3.11 Imuno-histoquímica

Para avaliar o perfil de produção da quimiocina CCL11/Eotaxina no cólon intestinal dos animais, estes foram sacrificados nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 após o tratamento inicial com DSS, tendo o cólon removido e fixados em solução 10% formol em PBS, pH 7.4. Após tempo mínimo de fixação por 48 horas, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Cortes longitudinais foram montados em lâminas gelatinizadas (2 cortes/lâminas). As lâminas foram cobertas com 2% de “3-aminopropyltriethylsilane” (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO). As lâminas foram desparafinizada e imersas em xilol, em seguida, álcool e posteriormente incubada com 3% de peróxido de hidrogênio diluído em Tris-buffered salina (TBS) (pH 7.4) por 40 minutos. Em seguida, os tecidos foram imersos em citrato buffer citrate (pH 6.0; Sigma, P4809) durante 20 min. à 95°C. Posteriormente, as lâminas eram incubadas com 3% BSA diluídos em água destilada, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Os tecidos foram então, incubados com anticorpo primário: anticorpo policlonal de coelho anti-CCL11 murino (Prof. Mauro Martins Teixeira), na diluição 1:1000, a 4°C “overnight” na câmara humidificadora. Após lavagem em TBS, as lâminas eram cobertas com streptavidina-biotina (LSAB kit, K0492, Dako, Carpinteria, CA). Em seguida incubadas em 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) em solução cromógena (K3468, Dako) por 2 à 5 minutos na temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas eram coradas com Hematoxilina de Mayer e analisadas em microscópio óptico. Controles negativos eram obtidos pela substituição do anticorpo primário por 1% de PBS-BSA.

3.12 Modelo experimental de artrite induzindo o recrutamento de neutrófilo na cavidade intrarticular.

Para avaliar o recrutamento de neutrófilos neste modelo, os camundongos foram anestesiados e cada animal recebeu uma injeção de 10 µl de

solução contendo (PBS pH 7.4 estéril e KC 30ng/cavidade). Após 4 horas do desafio, os animais foram sacrificados e a seguir foi realizado lavado intra-articular (2 vezes) com 5µL de solução de albumina bovina 3%. Este lavado foi diluído em 90µL de albumina bovina 3% e em seguida foram realizadas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Alíquotas de 30µL do lavado articular foram diluídas em 60µL de líquido de Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual.

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado intra-articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), sendo contadas 100 células por lâmina diferenciando-se 3 tipos celulares, neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. A quantificação dos neutrófilos presentes na cavidade articular foi calculada pela percentagem dessas células contadas nas lâminas e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ / cavidade articular.

3.13 Transferência adotiva de células mielóides

A medula óssea foi isolada do fêmur esquerdo e direito dos animais WT, assepticamente. A cabeça femoral e os côndilos foram removidos e, as células de cada fêmur foram recolhidas com 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina e penicilina- streptomomicina (Gibco, Europa). As células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços durante 7 dias em estufa de CO₂ (5%) à 37°C. Ao final da cultura as células foram coletadas, centrifugadas e ressuspensadas em 1 ml de salina 0.9%. A contagem total foi feita em câmara de Neubauer usando corante de Turk.

Foram injetados cerca de $0,5 \times 10^6$ células na cauda de cada camundongo.

3.14 Estratégia experimental - I

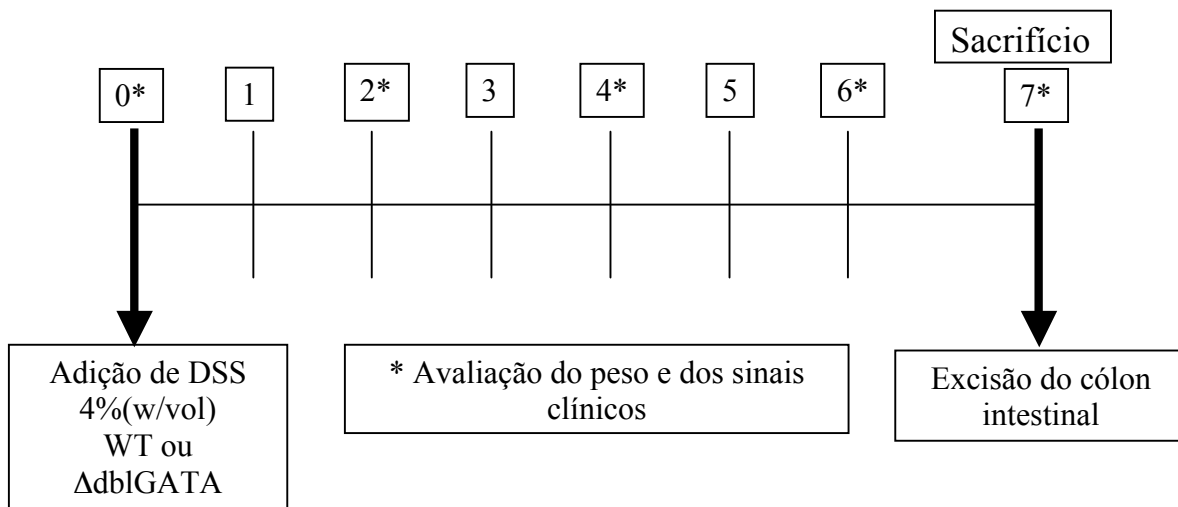
Grupos:

WT + H₂O

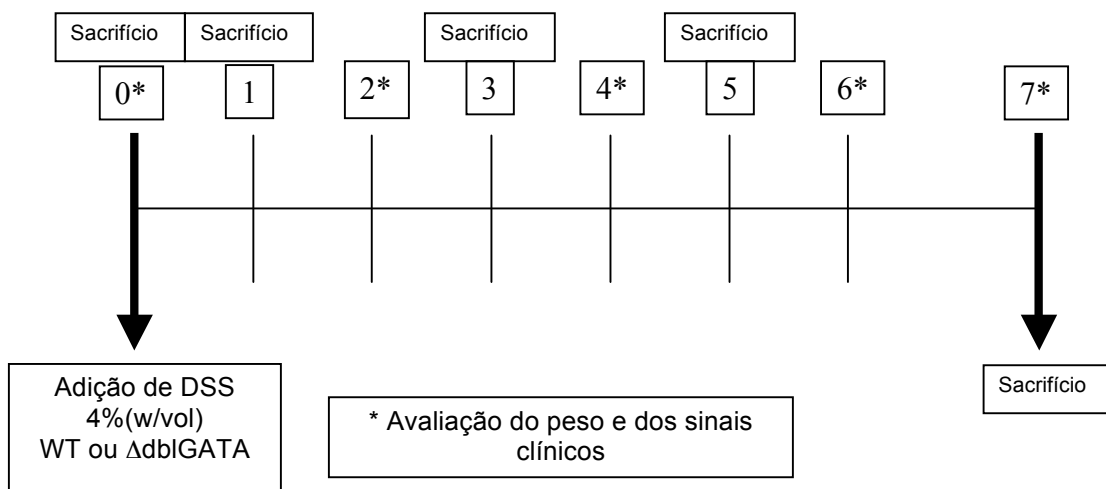
WT + DSS

Δ dblGATA + H₂O

Δ dblGATA + DSS

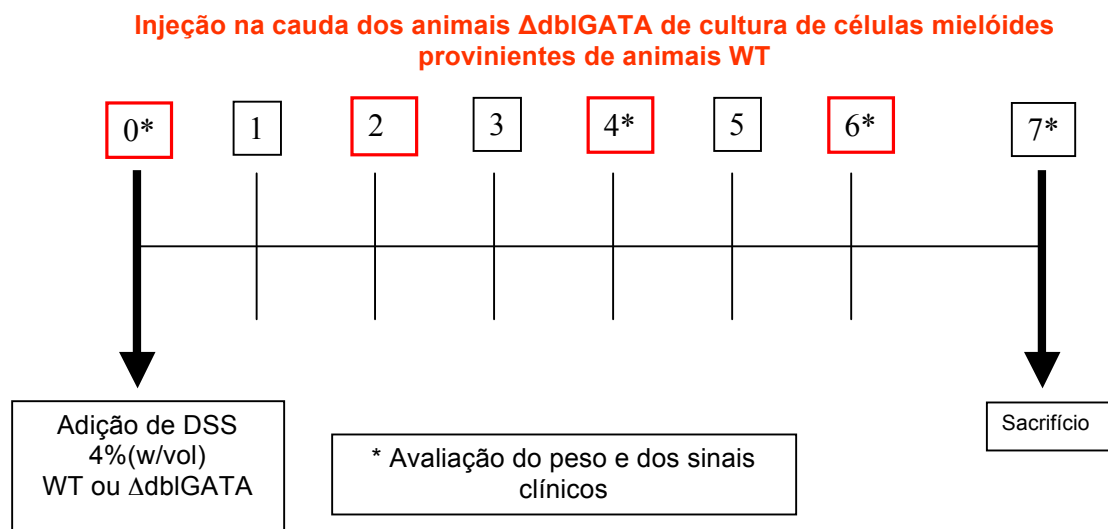


3.15 Estratégia Experimental – II (*Cinética*)



OBS: Nos dias de sacrifício, foram coletadas amostras de sangue para a realização da lâmina de esfregaço e contagem total de leucócitos. O cólon foi retirado para dosagem de MPO, EPO e citocinas.

3.16 Estratégia Experimental – III (*Transferência de células da medula óssea*)



3.17 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m) de cada grupo de animais.

As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizado o teste t de student.

Software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.18 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica e a obtenção de artigos em formato eletrônico foi feita através da base de dados do portal Medline/Pubmed, no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

A obtenção de artigos em formato eletrônico também foi feita através da

base de dados do portal Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes/Mec), no endereço:

<<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>>

Foram avaliados artigos originais, de revisão ou atualizações e capítulos de livro-texto, conforme sua relevância para o tema de estudo, escritos em português e inglês.

As palavras chaves utilizadas foram: "*Inflammatory Bowel Disease*", *Ulcerative colitis*, *inflammation*, *gut*, *intestine*, *eosinophil(s)*, *neutrophil(s)*, *eotaxin*, *cytokine(s)* *chemokine(s)*".

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo de colite ulcerativa experimental

O processo de caracterização do modelo de colite ulcerativa induzida por DSS foi conduzido através de estudos de cinética de perda de peso durante a indução da colite, e dos sinais clínicos da doença, que consistia na análise da consistência das fezes e presença ou não de sangue nas mesmas. Além disso, avaliou-se a participação de eosinófilos ao final da indução da colite, bem como a análise histopatológica e a presença de infiltrado celular no cólon intestinal.

4.1.1 Patologia clínica da colite ulcerativa experimental

A ingestão de DSS pelos animais WT durante 7 dias consecutivos provocou uma perda de peso corporal progressiva a partir do 2º dia após a indução da colite (Fig. 5A), enquanto os animais controles, que ingeriram água normal, não perderam peso em nenhum momento. Ao final do tratamento, os animais com colite perdiam cerca de 25% do peso corporal, enquanto nenhuma mudança foi observada nos animais controles. Já os sinais clínicos apresentados pelos animais com colite agravavam-se a cada dia após a indução da doença alcançando o pico no dia 6 (Fig. 5 B). O grau de morbidade dos animais ao final do tratamento era alto, caracterizando-se por intenso sangramento anal desses animais, enquanto que nenhum desses sinais foi observado nos animais controles.

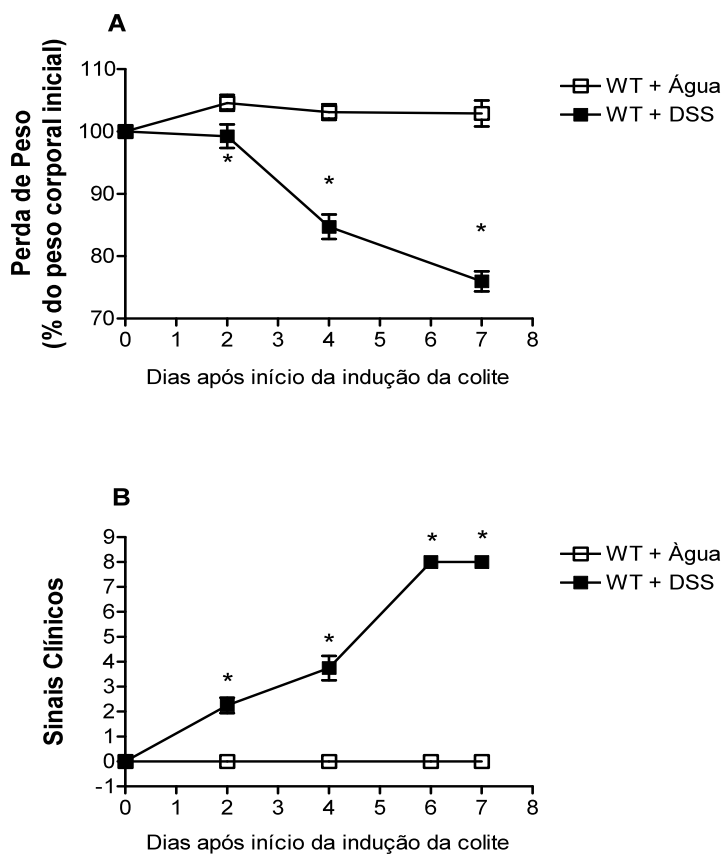


Figura 5 Avaliação clínica da colite induzida por DSS em animais WT.

A progressão clínica da colite foi avaliada pela perda de peso corporal durante o período de sete dias de indução da doença (A) e pela análise da consistência e/ou presença de sangue nas fezes desses animais (B), quantificado de acordo com a pontuação descrita anteriormente.* $P < 0.05$ comparando-se animais WT controles com animais tratados com DSS. Os resultados representam a média \pm e.p.m de cada grupo no dia indicado.

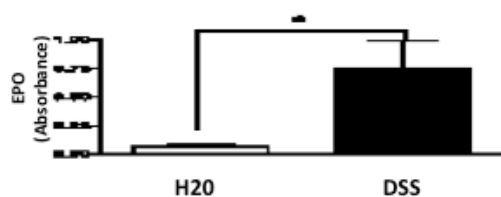
Os eosinófilos estão presentes no modelo de UC experimental induzida por DSS?

4.1.2 Participação de eosinófilos no modelo experimental de colite ulcerativa

Para verificarmos se os eosinófilos participavam da UC experimental em camundongos, foi mensurada a atividade da enzima peroxidase eosinofílica (presente em eosinófilos), como medida da quantificação de eosinófilos no cólon intestinal dos animais, e através de cortes histológicos do cólon.

Após sete dias de indução da colite, animais WT que receberam DSS na água apresentaram um aumento significativo na atividade da EPO no cólon intestinal (Fig.6A). A figura 6B apresenta um corte histológico transversal do cólon intestinal, representativo do grupo dos animais WT com colite ao final do 7º dia de indução. Neste corte podemos notar uma extensa lesão que destruiu-se por toda a mucosa tecidual, com grande infiltrado de células inflamatórias. A presença de eosinófilos no cólon desses animais é confirmada pela análise microscópica da morfologia dessas células nas histologias coradas por H&E, como observada no quadro menor (Fig. 6B).

A



B

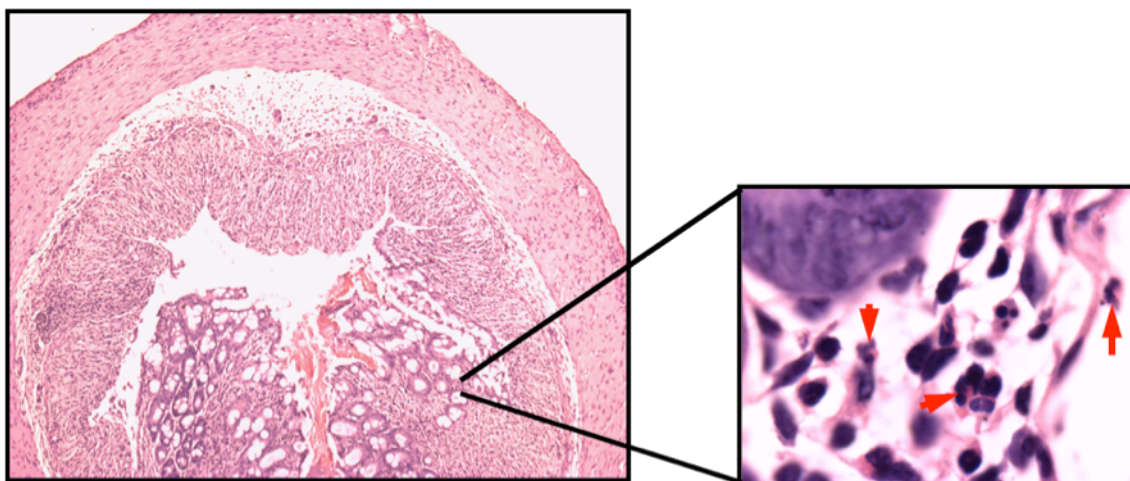


Figura 6 Participação de eosinófilos na UC.

(A) A ingestão de DSS promove um aumento de eosinófilos no cólon intestinal dos animais WT em relação aos animais WT tratados com água, após sete dias de indução da doença. O número de eosinófilos foi acessado por medida da atividade da EPO. (B) Corte transversal do cólon intestinal representativo do grupo dos animais com colite após sete dias de indução da doença. O quadro à direita caracteriza a extensa lesão, com destruição da mucosa e grande infiltrado celular (aumento de 40x). Dentre as células presentes, destacam-se os eosinófilos, como indicado pelas setas vermelhas no quadro à esquerda (aumento de 1000x). Em A, os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 7$). * $P < 0.05$.

Visto que os eosinófilos estão aumentados no modelo de UC nos animais WT, o que poderia ocorrer se esse modelo fosse aplicado nos animais com fenótipo para deficiência de eosinófilos?

4.2 Avaliação da colite ulcerativa em animais deficientes em eosinófilos

A taxa de mortalidade dos animais WT com colite ulcerativa foi bastante elevada. Cerca de 100% de mortalidade foi observado nos animais WT com DSS já no 8º dia após a indução da colite (Fig. 7). Surpreendentemente, animais Δ dblGATA, que têm como fenótipo deficiência de eosinófilos e que receberam DSS, não morreram. Os animais foram acompanhados até 21 dias após o término do tratamento com DSS.

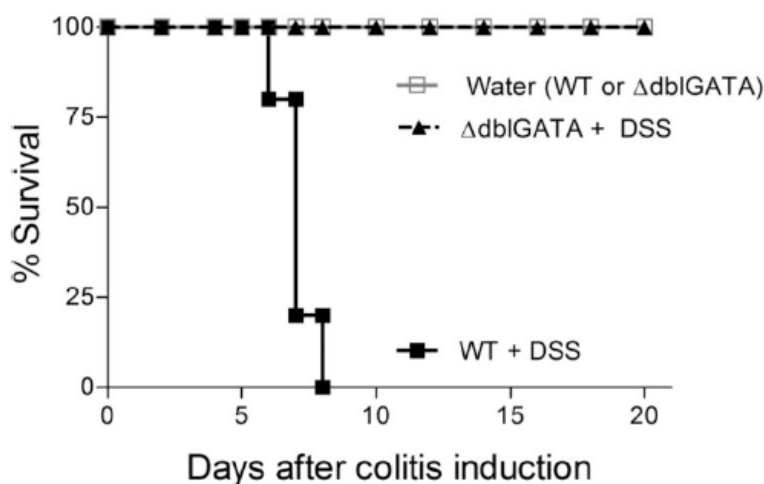


Figura 7 Tratamento com DSS induz letalidade nos animais WT, mas não nos animais Δ dblGATA.

Todos os camundongos com colite morreram ao final do 8º dia após início da indução da colite com DSS, enquanto que os animais deficientes de eosinófilos apresentavam 100% de sobrevivência (n = 8-12 em cada grupo).

4.2.1 Análises clínicas

A sobrevivência dos animais Δ dblGATA com colite está associada com a redução dos sinais clínicos, tais quais, diarreia e sangramento anal quando comparado com os animais WT com colite (Fig. 8A). Enquanto os animais WT alcançaram o escore máximo até o final do tratamento com DSS, os animais deficientes de eosinófilos alcançaram escore de grau quatro. Além disso, a perda de peso foi constante durante a indução da doença, tanto no grupo dos animais WT quanto no grupo de animais Δ dblGATA com colite. Entretanto, a perda de peso nos animais deficientes de eosinófilos é bem menor do que a observada nos animais WT com colite (Fig. 8B). Desta forma, a deficiência de eosinófilos leva a uma diminuição da severidade induzida pela ingestão de DSS.

4.2.2 Análises histopatológicas

Corroborando com os dados anteriores, as análises histopatológicas realizadas em cortes transversais do cólon intestinal dos camundongos mostraram que ao final do tratamento com DSS, o cólon dos animais selvagens apresentou uma extensa lesão, caracterizada por uma grande destruição das células globulares, bem como de toda a mucosa. Um intenso infiltrado celular também foi observado no cólon desses animais (Fig. 9B). Entretanto, foi observada uma lesão menor no cólon dos animais deficientes de eosinófilos que receberam DSS na água e ainda, um menor infiltrado de células (Fig. 9D). Nenhuma diferença morfológica foi observada entre o cólon dos animais controles, tanto selvagens quanto Δ dblGATA (Fig. 9A e 9C, respectivamente).

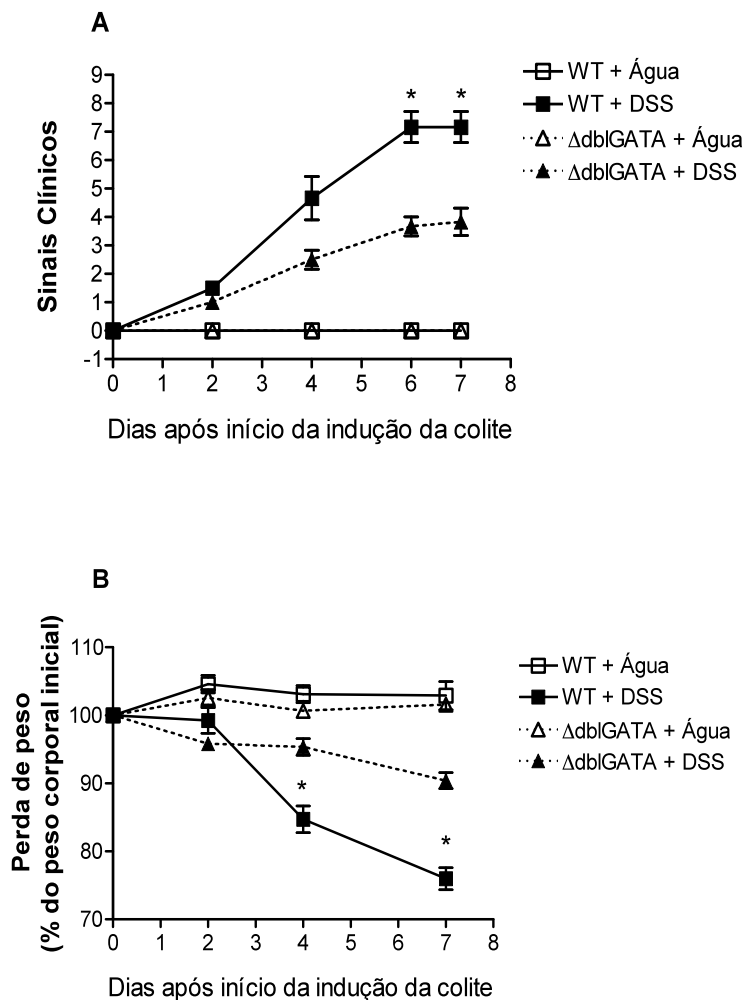


Figura 8 Indução de colite ulcerativa experimental em animais Δ dblGATA leva a uma diminuição dos sinais clínicos e da perda de peso.

Animais Δ dblGATA quando tratado com DSS 4% durante 7 dias, tinham diminuição na severidade da doença, como observado pelos sinais clínicos (A) e da redução na perda peso comparados com os animais WT com colite (B). Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 -7). * P < 0.05.

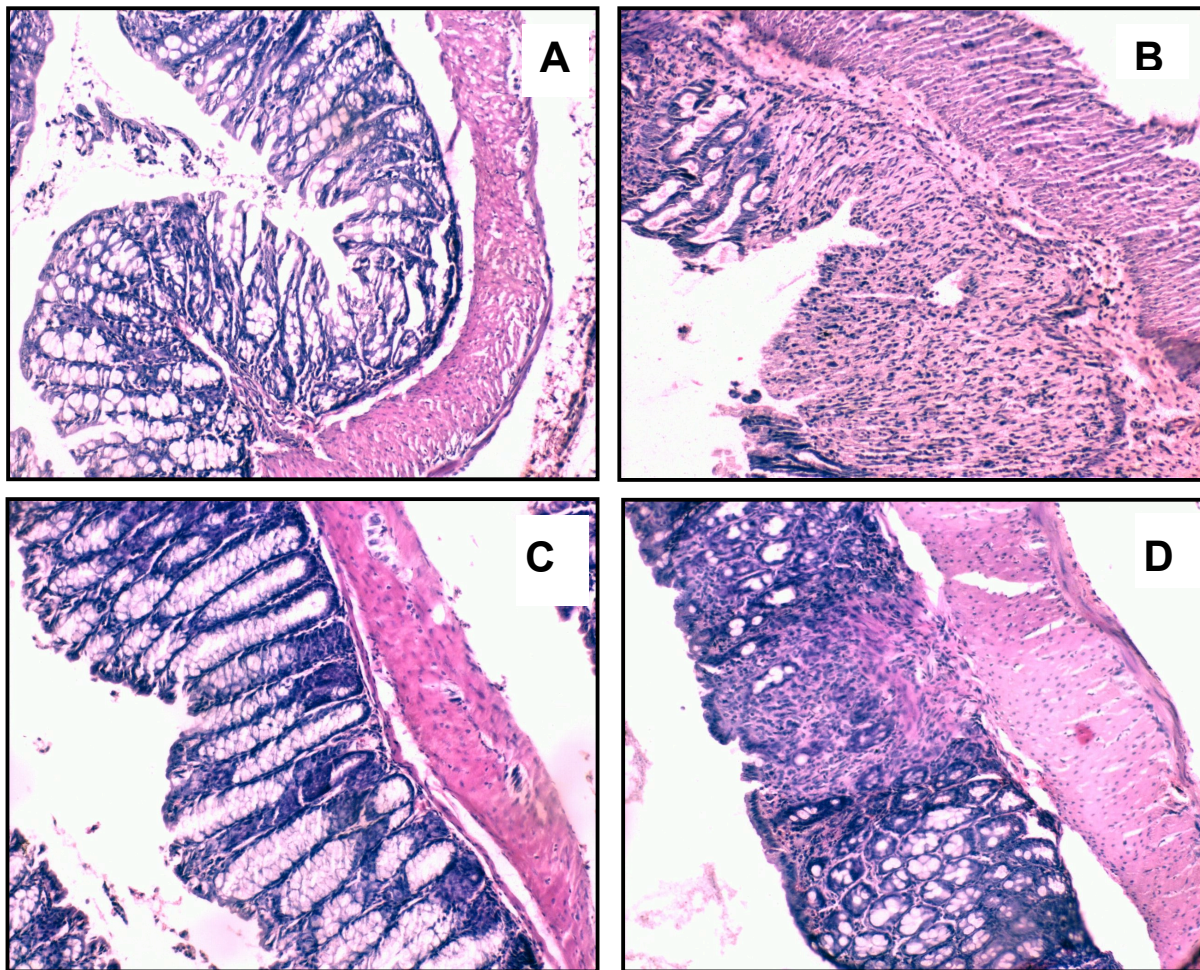


Figura 9 Cortes histológicos representativos do cólon intestinal dos camundongos.

(A) WT controle, (B) WT com DSS, (C) Δ dbIGATA controle e (D) Δ dbIGATA com DSS. Todos os cortes foram feitos a partir do cólon removido no 7º dia após início da indução da colite e corados por hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos estão apresentados no aumento de 100x.

4.2.3 Cinética de eosinófilos no sangue e no cólon

Utilizando-se o esfregaço sanguíneo, observamos que o tratamento com DSS provocou uma intensa eosinofilia nos animais WT, e esta perdurou até o 3° dia de tratamento, com posterior declínio (Fig. 10 A). Através da mensuração da enzima peroxidase eosinofílica dos animais WT, observamos também um progressivo aumento desta enzima no cólon intestinal desses animais após o 3° dia até o fim do tratamento (Fig. 10 B). Visto que, houve aumento no número de eosinófilos no cólon intestinal dos animais selvagens, nós resolvemos quantificar a produção da quimiocina CCL11/eotaxina importante no recrutamento dessa célula. Associado aos dados acima, pôde-se observar através do ensaio de ELISA, que os níveis de CCL11/eotaxina no cólon intestinal dos animais WT foi crescente após o terceiro dia de tratamento com DSS (Fig. 10C). Nenhum desses eventos foi observado nos animais Δ dblGATA (Fig. 10 A, 10 B e 10C)

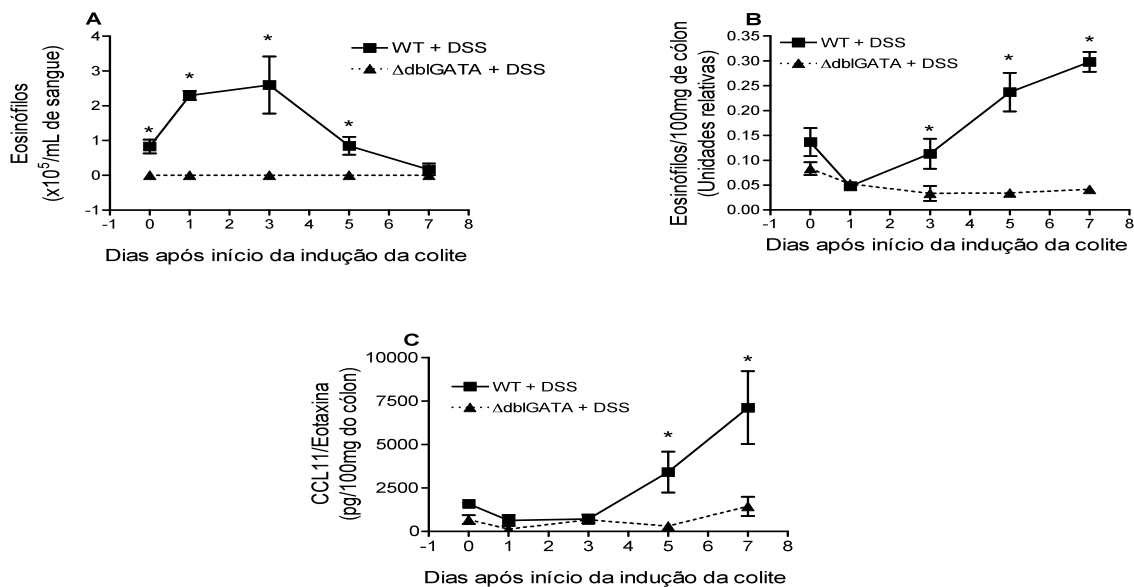


Figura 10 Cinética de eosinófilos no sangue e no cólon intestinal durante a indução da colite.

Os animais foram sacrificados nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 após o início do tratamento com DSS e tiveram o sangue coletado para contagem de eosinófilos (A) em uma lâmina de esfregaço corada com H&E. Além disso, foram coletadas porções do cólon para quantificação de eosinófilos (B) no tecido. Para isso, foi dosada a atividade da enzima EPO. As concentrações da quimiocina CCL11/eotaxina foi realizada no homogenato do tecido retirado nos dias 0, 1, 3, 5 e 7, pelo método de ELISA. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 -7). * P < 0.05 em relação ao dia 0, segundo teste *t* não paramétrico.

Já que há um aumento constante da produção de CCL11/eotaxina durante a indução da colite, quais células estariam produzindo esta quimiocina no cólon?

4.2.4 Cinética da produção de eotaxina no cólon intestinal

A caracterização da cinética da produção da quimiocina CCL11/eotaxina, durante o processo de colite induzida por Sulfato de Sódio Dextrana-DSS foi feita através do ensaio de imunohistoquímica no cólon intestinal dos animais WT.

De acordo com os dados obtidos, observou-se que a liberação de CCL11/eotaxina no colon, foi inicialmente realizada pelas células epiteliais, como indicado na figura 11, nos dias 0 e 3 após tratamento com DSS. Após este período, nos dias 5 e 7, pode-se observar que a liberação dessa quimiocina se deu exclusivamente pelas células que compõem o infiltrado celular presente neste tecido. Grupos de animais WT, foram sacrificados nos dias 0, 3, 5 e 7 para a retirada do cólon intestinal.

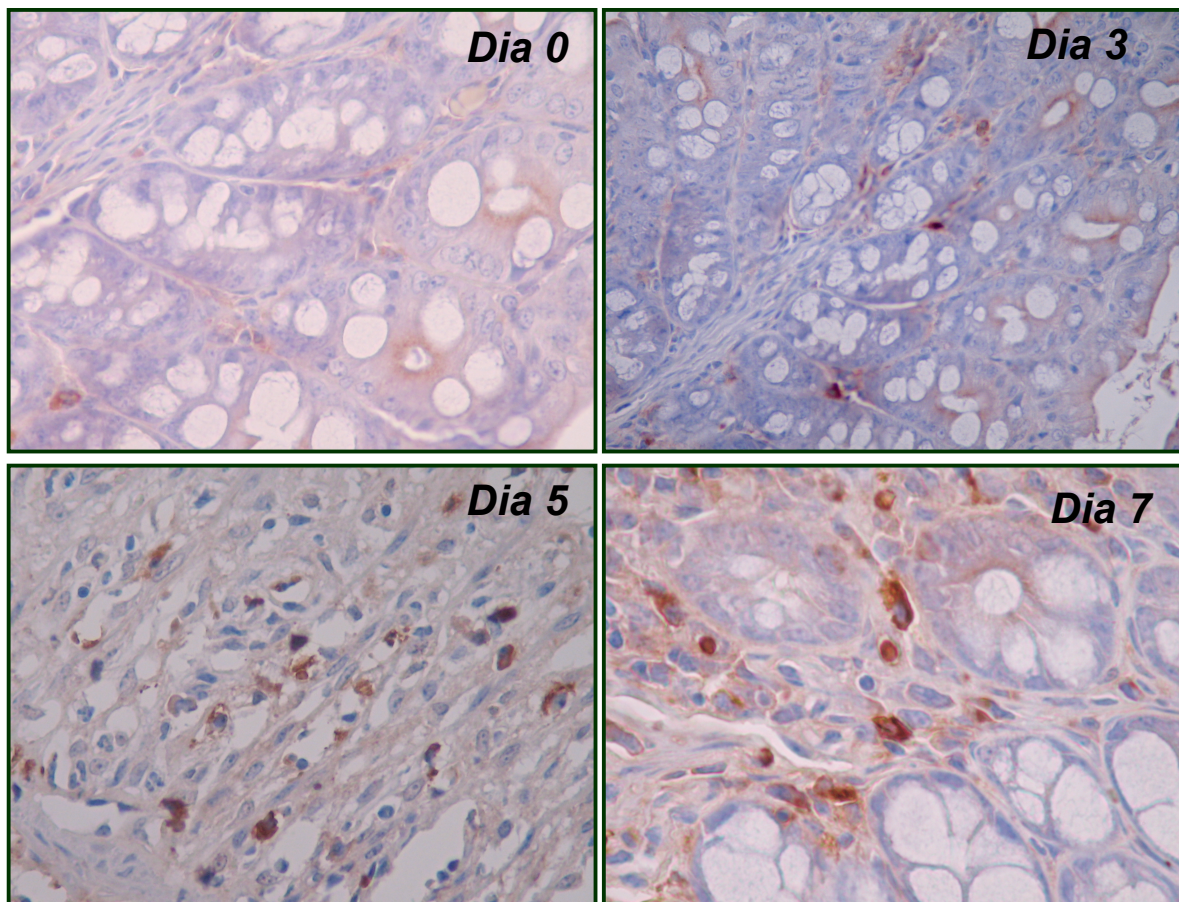


Figura 11 Caracterização da produção de CCL11/eotaxina no cólon intestinal dos animais WT durante a indução da UC.

Animais selvagens tratados com DSS foram sacrificados nos dias 0,3,5 e 7 após o início do tratamento e tiveram porções do cólon coletadas para análise da produção de CCL11 por imunohistoquímica. Os cortes estão apresentados no aumento de 1000 X.

Com a redução do número de eosinófilos, houve alguma diferença na concentração das citocinas envolvidas no modelo de UC?

4.2.5 Produção de citocinas

Segundo McCormack *et al.* (2001), há produção das citocinas IL-5, IL-6 e IL-13 no processo de colite ulcerativa. Uma vez que, os eosinófilos são capazes de modular direta ou indiretamente a produção dessas citocinas, nós resolvemos quantificá-las.

A Interleucina-4 participa nos processos de diferenciação e maturação dos eosinófilos, bem como, na diferenciação dos linfócitos T CD4+ para linhagem Th2 (Ansel *et al.* 2006). Nenhuma diferença significativa nos níveis de IL-4 foi encontrada entre os grupos experimentais tanto com colite, quanto controles (Fig. 12 A). Além disso, a produção da citocina IL-13 também não foi diferente em nenhum grupo estudado (Fig. 12 B).

Com relação às citocinas IL-5 e IL-6 (Fig. 12 C e D), não houve alteração do nível dessas citocinas no grupo dos animais WT com colite em relação ao grupo controle. Entretanto, no grupo dos animais Δ dbiGATA com colite, foi observado um aumento da produção dessas citocinas com relação aos animais Δ dbiGATA controles. No entanto, estes níveis não foram diferentes entre o grupo dos animais Δ dbiGATA e WT com colite.

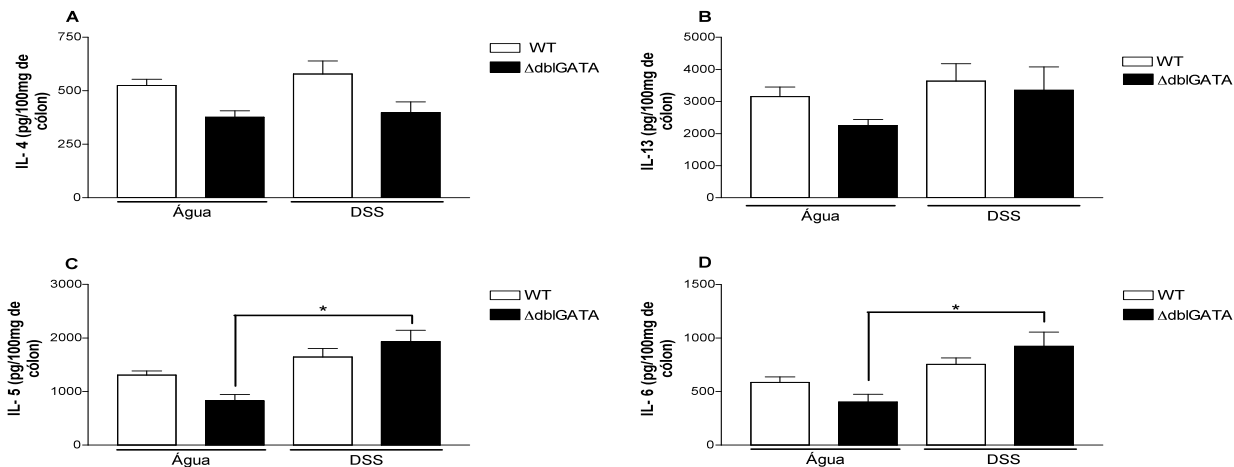


Figura 12 Perfil da liberação de citocinas na Colite ulcerativa experimental.

Os animais foram sacrificados no dia 7^o após início do tratamento com DSS, para a retirada do cólon intestinal. As citocinas foram quantificadas através de ensaio ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de cada grupo de animais (n = 6 – 8). * P < 0.05.

Será que outros leucócitos estariam participando do modelo de UC induzida por DSS? E, ainda, animais com fenótipo para ausência de eosinófilos teriam alguma modificação neste aspecto?

4.2.6 Participação de leucócitos no modelo de Colite Ulcerativa

A medida da atividade das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) no cólon intestinal dos camundongos foi utilizada como indicativo da presença no tecido de macrófagos e neutrófilos, respectivamente. Os resultados mostraram que, no que tange aos macrófagos, não houve diferença entre os grupos tratados com DSS e os controles, tanto WT quanto Δ dblGATA. Além disso, a quantidade basal de macrófagos no cólon intestinal desses animais já é bastante alta (Fig. 13 A). No entanto, o número de neutrófilos estava significativamente aumentado no cólon dos animais WT tratados com DSS no 7º dia após início da indução da colite (Fig.13 B). De maneira interessante, o aumento de neutrófilos observado nos animais WT com colite, não foi notado nos animais deficientes de eosinófilos tratados com DSS, ao final do tratamento (Fig. 13 B).

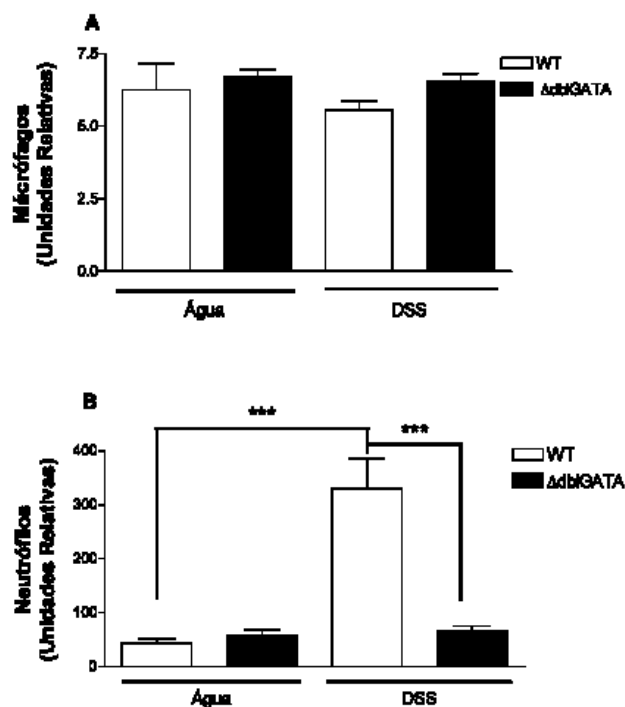


Figura 13 Participação dos leucócitos no modelo de colite ulcerativa induzida por Sulfato de Sódio Dextrana – DSS.

A migração de macrófagos (A) e de neutrófilos (B) foi avaliada pela mensuração dos níveis teciduais das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO), respectivamente. Os cólons foram retirados dos camundongos no dia sete após o início do tratamento com DSS. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5 -7). * P < 0.05 e *** P < 0.001.

4.3 Cinética de neutrófilos no sangue e no tecido

Em relação a cinética de neutrófilos, os resultados apresentados nas figuras 14 A e B, mostram que houve um aumento significativo de neutrófilos no sangue dos animais $\Delta dbiGATA$ logo no primeiro dia de indução da colite e, posteriormente, ocorreu uma redução dessas células alcançando-se, até mesmo, os níveis basais. Esse aumento não foi observado no sangue dos animais WT (Fig.14 A). Através da quantificação da mieloperoxidase (MPO), observamos, no

entanto, um aumento constante desta enzima nos cólons intestinais dos animais WT desde o início do tratamento com DSS até o 5° dia (Fig. 14 B). Não foram observadas diferenças significativas no número de neutrófilos presentes no cólon intestinal dos animais deficientes de eosinófilos durante todo o tempo de indução da colite (Fig. 14 B).

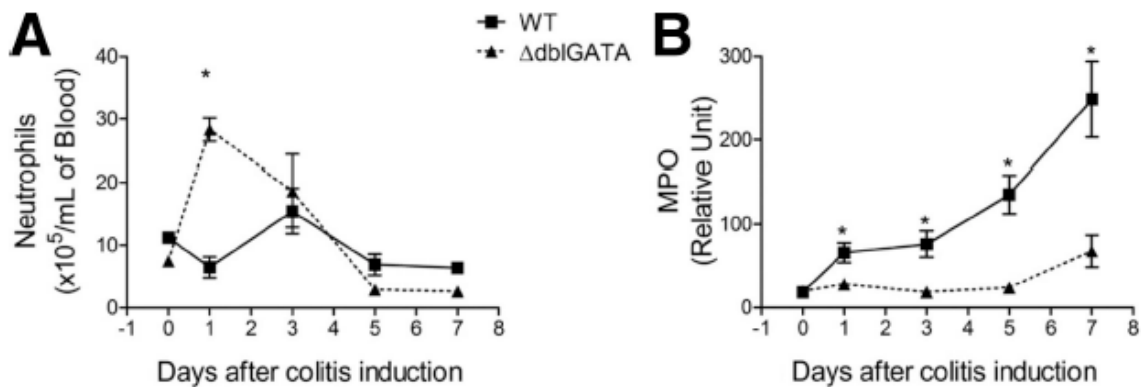


Figura 14 Cinética de neutrófilos no sangue e no cólon intestinal durante a indução da colite.

Os animais foram sacrificados nos dias 0,1,3,5 e 7 após o início do tratamento com DSS e tiveram o sangue coletado para contagem de neutrófilos (A) em uma lâmina de esfregaço corada com H&E. Além disso, foram coletadas porções do cólon para quantificação de neutrófilos (B) no tecido. Para isso, foi dosada a atividade da enzima MPO. Resultados são expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 5 - 7$). * $P < 0.05$ em relação ao dia 0, segundo teste t não paramétrico.

O número de neutrófilos reduzido, como observado nos animais Δ dbIGATA com colite, poderia ser por causa de alguma deficiência que estes animais apresentam com relação ao recrutamento de neutrófilos ?

4.4 Animais Δ dbIGATA recrutam neutrófilos normalmente

Para se saber se os animais deficientes de eosinófilos teriam alguma carência no recrutamento de neutrófilos, foi realizado um experimento que consistiu na injeção intra-articular da proteína quimiotática para neutrófilos, KC. Após 6 horas do desafio, esta cavidade foi submetida a lavagem e o líquido sinovial foi recolhido para contagem das células totais e diferenciais. Os animais controles receberam a injeção de solução salina 0.9%.

Como observado na figura 13, foi observado um aumento no número de neutrófilos no lavado dos animais WT após o desafio com KC. Animais Δ dbIGATA desafiados com KC, também foram capazes de recrutar neutrófilos, como visto pelo aumento da contagem dessas células na cavidade intraarticular desses animais. Esse aumento não foi evidenciado nos animais controles que receberam apenas injeção de salina.

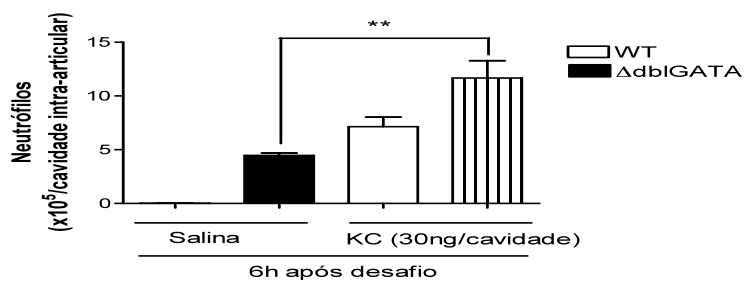


Figura 15 Recrutamento de neutrófilos na cavidade intraarticular dos animais WT e Δ dbiGATA.

Após 6 horas da injeção intra-articular de KC, esta cavidade foi submetida a lavagem e o líquido sinovial foi recolhido para contagem das células totais e diferenciais. Os animais controles receberam a injeção de solução salina 0.9%. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 5 -7). ** P < 0.01

Existe participação de quimiocinas responsáveis, principalmente, pelo recrutamento de neutrófilos no modelo de UC induzida por DSS?

4.5 Produção de quimiocinas

Para a caracterização da secreção proteica de quimiocinas e citocinas relevantes para o processo inflamatório da colite ulcerativa, utilizou-se o ensaio imunoenzimático – ELISA. Inicialmente, foi analisada a liberação das quimiocinas CCL3/MIP1- α e CXCL1-3/KC) que são importantes no recrutamento de neutrófilos.

Tanto as quimiocinas CXCL1-3/KC e CCL3/MIP1- α (Fig. 16 A e B, respectivamente), ocorreu um aumento significativo da concentração destas no cólon intestinal dos animais WT com colite. Interessantemente, este aumento não foi detectado no cólon dos animais deficientes em eosinófilos.

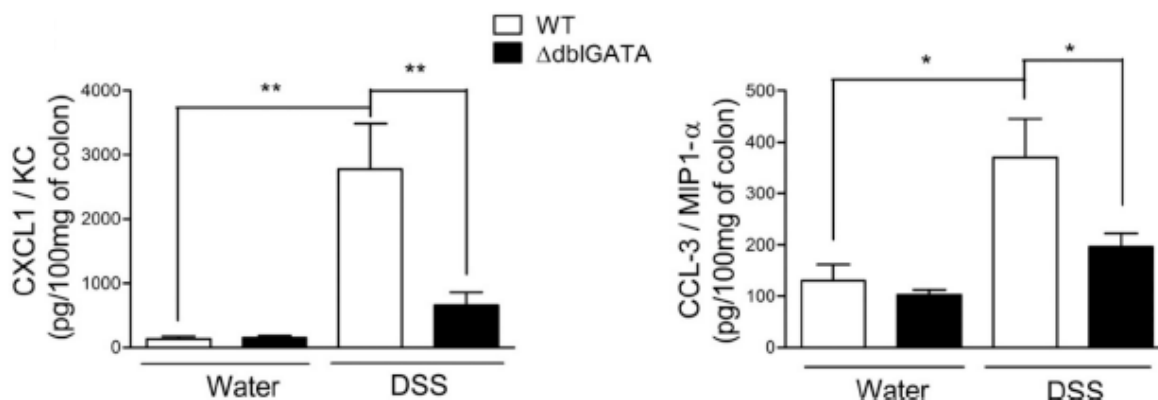


Figura 16 Perfil da secreção de proteínas quimiotáticas KC e MIP1- α na colite ulcerativa experimental.

O cólon intestinal dos animais foi removido no dia 7 após o tratamento com DSS. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de cada grupo de animais (n = 6-8). * P < 0.05 e ** P < 0.01.

Se transferíssemos células da medula óssea de camundongos selvagens para os camundongos Δ dbIGATA e induzíssemos colite nestes animais, o fenótipo para deficiência de eosinófilos poderia ser revertido?

4.6 Transferência de células mielóides para animais Δ dbIGATA

Para sabermos se as diferenças parâmetros inflamatórios causados pela colite ulcerativa nos animais Δ dbIGATA poderia ser revertido foi realizada a retirada das células da medula óssea dos animais WT e transferidos para os animais Δ dbIGATA nos dias 0, 2, 4 e 6, após o início do tratamento desses com DSS. Podemos observar que logo no 2° dia de indução da colite, os sinais clínicos começam a aparecer de maneira semelhante para todos os grupos. Entretanto, no 6° dia de tratamento com DSS foi observado uma diferença significativa no aumento dos sinais clínicos entre os animais Δ dbIGATA que receberam a transferência de células mielóides e os animais Δ dbIGATA apenas tratados com DSS (Fig. 17A). Também foi observado, no sétimo dia de tratamento com DSS, um grande aumento do número de eosinófilos no cólon intestinal dos animais deficientes em eosinófilos que receberam a transferência das células mielóides quando comparados com os animais Δ dbIGATA que receberam apenas DSS (Fig. 17B).

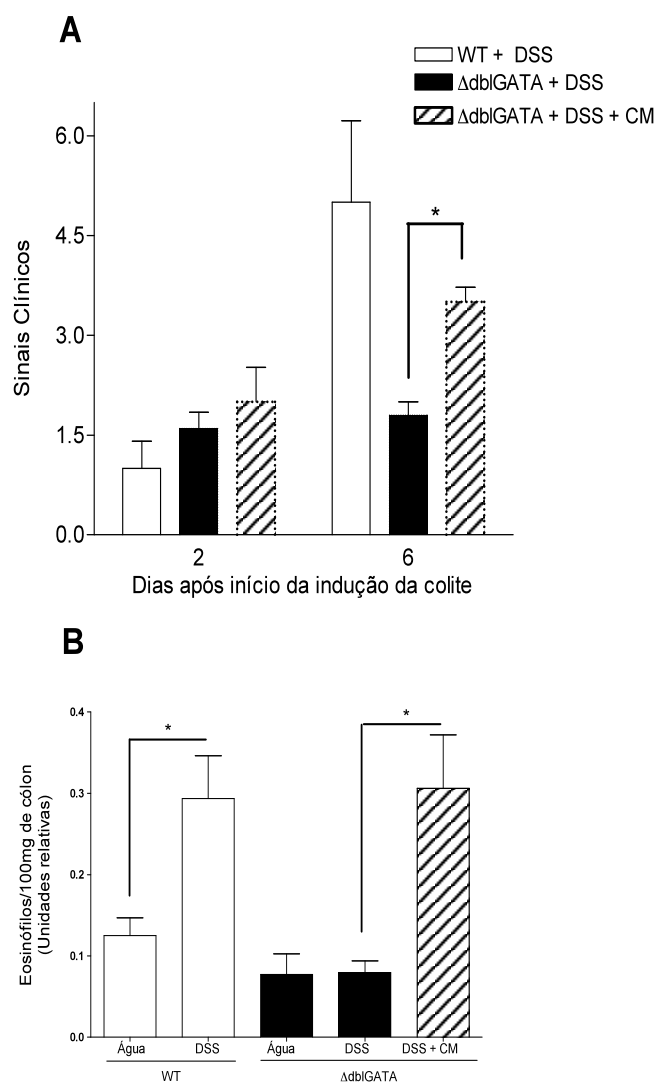


Figura 17 Transferência adotiva de células da medúla óssea de animais WT para animais Δ dblGATA e induzidos a colite.

(A) Escore clínico dos animais nos dias 2 e 6 após a indução inicial da colite. (B) A migração de eosinófilos para o cólon intestinal dos animais, foi mensurada pela presença da peroxidase eosinofílica (EPO). O cólon dos animais foi removido no 7º dia após o início do tratamento com DSS. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (n=6-8). * $P < 0.05$.

5. DISCUSSÃO

A Colite Ulcerativa é uma doença inflamatória do trato gastrointestinal que afeta cerca de 0.1% da população nos países desenvolvidos e sua incidência tem crescido muito nos últimos anos. É uma doença de caráter remissiva e com etiologia variada. Portanto, a importância em compreender os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória da UC é evidente. Neste estudo, definimos um desses mecanismos envolvendo a participação do eosinófilo na patologia da colite.

Nesse trabalho, utilizamos como modelo para indução de colite a administração de DSS por via oral, em água. O DSS é um composto poli-ânionico que induz diarreia e perda de peso em roedores, similar ao observado nas IBD humanas. Esse modelo é caracterizado também pelo encurtamento do cólon, ulcerações na camada mucosa e infiltrado inflamatório, composto principalmente por neutrófilos durante um período de 8 a 9 dias. Muitas das citocinas geradas no modelo de DSS são também encontradas no cólon intestinal de pacientes com IBD (Kurtovic & Segal, 2004).

Corroborando estes achados anteriores, nosso estudo demonstrou que a administração oral de sulfato de sódio dextrana foi capaz de induzir colite nos camundongos, observando-se perda de peso corporal e aumento progressivo dos sinais clínicos, tais como diarreia com muco e sangue. Foi observado também que os eosinófilos estão presentes em grande quantidade no cólon dos animais WT com colite, como notado pela análise histológica e pela quantificação de EPO, demonstrando que há recrutamento dessas células no sítio inflamatório na colite ulcerativa, o que vai de encontro ao estudo que demonstrou aumento dessas células no tecido (Stevens *et al.* 2007).

Os eosinófilos são potentes células pró-inflamatórias que participam da patogênese de numerosos processos inflamatórios, tais quais, alergias, asma, infecção helmíntica e, também, doenças gastrointestinais, incluindo a Colite Ulcerativa (Rothenberg *et al.* 2001; Bischoff *et al.* 1996). A presença de eosinófilos na UC está associada a consequências clínicas, como perda de peso, mau absorção e mudanças arquiteturais, como achatamento das vilosidades e

diminuição das criptas do cólon (Rothenberg, Mishra *et al.*, 2001; Rothenberg, 2004).

Apesar dos eosinófilos, sob condições normais, migrarem para o trato gastrointestinal (onde eles residem, dentro da lamina própria), em situação de injúria, como demonstrado neste trabalho, o recrutamento dessas células para o cólon de animais WT com colite está significativamente aumentado, corroborando com dados da literatura. Entretanto, o papel específico dos eosinófilos na patogênese da colite ainda permanece obscuro.

Para explorarmos a função dos eosinófilos na Colite Ulcerativa, utilizamos como ferramenta animais geneticamente modificados que têm como fenótipo a completa ablação da linhagem eosinofílica. Os camundongos $\Delta db1GATA$ têm uma deleção no promotor do sítio de ligação para o GATA-1. A remoção dessa região limitada do promotor que contém o sítio duplo para o GATA-1, impede o desenvolvimento dos eosinófilos (Yu *et al.* 2002). O fator de transcrição GATA-1 (um membro da família de dedos de zinco) re-programa células mielóides imaturas para se diferenciarem em três linhagens hematopoiéticas – células eritróides, megacariócitos e eosinófilos (Hirasawa *et al.* 2002) No entanto, muitos trabalhos têm demonstrado que a deficiência de GATA-1 não altera a função dessas outras linhagens celulares. Desta forma, camundongos contendo esta alteração têm sido utilizados para estudos em outros modelos de doenças dependentes de eosinófilos (Humbles *et al.* 2004; Swartz *et al.* 2006).

De maneira interessante, nossos resultados revelaram que a deficiência da linhagem eosinofílica é protetora para a colite ulcerativa induzida por DSS. Forbes e colaboradores (2004), utilizando este mesmo modelo de administração de DSS, demonstraram que há uma melhora na patologia causada pela colite em camundongos deficientes na enzima EPO ($EPO^{-/-}$). Corroborando com estes dados, nossos resultados mostraram que os animais $\Delta db1GATA$ com colite apresentaram uma menor lesão e menor perda de peso, e isso acarretou em aumento da sobrevivência desses animais. Esses resultados, associados com os dados de Forbes e colaboradores (2004), sugerem que os eosinófilos são células importantes na patogênese da colite.

Elevados níveis de eotaxina têm sido encontrados no soro e em biopsias de pacientes com UC, o que é consistente com a acumulação de eosinófilos para o trato gastrintestinal durante esta patologia (Jeziorska *et al.* 2002; Chen *et al.* 2001; Mir *et al.* 2002; Garcia-Zepeda *et al.* 1996). Desta forma, parece que a migração dos eosinófilos para o cólon intestinal dos animais com colite parece ser dependente da liberação de quimiocinas, particularmente, de CCL11/eotaxina. Os resultados aqui apresentados reforçam tal hipótese. A concentração dessa quimiocina apresentou-se aumentada nos animais WT com colite e sua produção, nos animais Δ dblGATA tratados com DSS ou controles, permaneceu em níveis basais durante todo o tratamento. É interessante observar que durante a indução da colite, as células inicialmente responsáveis pela liberação de CCL11 nos animais WT, são as células epiteliais. Posteriormente, coincidindo com a chegada de eosinófilos no cólon intestinal, a liberação de CCL11 passa a ser predominantemente feita por estes leucócitos.

A importância da CCL11/eotaxina no modelo de UC é também observada no trabalho de Forbes *et al.* (2004), em que camundongos deficientes na expressão de eotaxina, apresentaram diminuição do infiltrado eosinofílico no cólon intestinal, após indução da colite, e conseqüente redução dos sinais patológicos (diarréia, sangramento retal e encurtamento do cólon). Acredita-se que a eotaxina também pode participar de processos que regulam a função dos eosinófilos, como ativação e desgranulação desta célula (Elsnier *et al.* 1998).

Em resposta a estímulos diversos, os eosinófilos podem modular a resposta imune através de vários mecanismos. Por exemplo, a expressão de receptores para citocinas, imunoglobulinas e complemento, pode levar a indução da secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais quais, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, e quimiocinas (RANTES e eotaxina-1) (Rothenberg & Hogan, 2006; Kita *et al.* 1996). No nosso modelo não foi constatado diferenças significativas das citocinas citadas acima.

Alguns estudos demonstraram que diferentemente da doença de Chron, o perfil de citocinas apresentado pelos pacientes com UC é o da resposta imunológica do tipo Th2 (Hendrickson, Gokhale *et al.* 2002). Contudo, os nossos

resultados contradizem esse padrão, uma vez que, não houve alteração nos níveis das citocinas acima citados. De maneira interessante, alguns trabalhos reportam que na lâmina própria dos pacientes com UC não há aumento dos níveis de IL-4, o que seria esperado para uma resposta de perfil Th2 (MacDonald & Monteleone *et al.* 2000; Hendrickson & Gokhale *et al.* 2002). Este trabalho vai de encontro com os nossos dados. Além disso, a participação de linfócitos neste modelo não parece ser crucial, já que, animais SCID e RAG^{-/-}, ausentes de linfócitos T e/ou B, desenvolvem a doença normalmente (Axelsson *et al.* 1996; Dieleman *et al.* 1994). Desta forma, o modelo em questão parece envolver principalmente células que participam da resposta inata. Assim, nosso próximo passo foi analisar se haveria alterações na migração dessas células para o sítio inflamatório.

No presente trabalho, não foi encontrado diferenças entre os grupos na quantificação da atividade da NAG, sugerindo, dessa maneira, que não há aumento da migração de macrófagos para o sítio inflamatório com o decorrer da UC. Apesar disso o envolvimento dos macrófagos na patogênese da colite não pode ser descartado. Trabalhos de outros grupos têm demonstrado que os macrófagos participam da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como, IL-1 β , IL-6, TNF- α e KC, tanto nos pacientes com IBD quanto nos modelos animais de colite (Autschbach *et al.* 2002 e Rogler *et al.* 1998). Outros trabalhos, atribuem a importância dos macrófagos em estágios mais tardios da colite, devido a produção diferencial de fatores imunossupressores, ou até mesmo da liberação de mediadores que irão participar no reparo do dano causado na mucosa (Qualls *et al.* 2006; Smythies *et al.* 2005). No entanto, no nosso modelo caracterizado por uma intensa resposta inflamatória aguda, essas células inicialmente não parecem participar de nenhum evento. Além disso, a ausência de eosinófilos nos animais geneticamente modificados para o fator de transcrição GATA-1 não alterou o perfil de macrófagos constituintes do cólon intestinal, mesmo sob situação de injúria, como demonstrado nesse trabalho.

Os neutrófilos chegam até a mucosa inflamada por mecanismos quimiotáticos. São as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório, e provavelmente têm um papel significativo na amplificação da inflamação e

destruição tecidual, estando em grande número na lâmina própria e nas criptas, onde formam micro-abscessos na UC, devido à liberação da enzima mieloperoxidase (MPO) (Xavier and Podolsky 2007). A MPO catalisa reações de peróxido de hidrogênio com íon cloreto, produzindo ácido hipocloroso, que é utilizado para matar microrganismos por células fagocitárias, principalmente os neutrófilos (Aratani 2006; Malle, Marsche et al. 2006).

Modelos de UC, em camundongos, induzidos por drogas como DSS e TNBS são caracterizados pela grande migração de neutrófilos para o cólon (Elson, Sartor et al. 1995; Wirtz and Neurath 2007). Em humanos, o acúmulo de neutrófilos tem sido observado em biopsias retal de pacientes com colite ulcerativa. Nossos dados, associados a outros trabalhos, revelaram que o tratamento com DSS promove grande infiltrado neutrofilico no cólon intestinal dos animais WT. Surpreendentemente, nos animais Δ dblGATA com colite, este aumento não é observado. A ausência de neutrófilos no cólon intestinal dos animais Δ dblGATA com colite, não é devido há uma deficiência migratória dos neutrófilos desses animais uma vez que injeção intra-articular de KC promoveu a migração dos leucócitos em questão em níveis semelhantes aos encontrados em animais WT desafiados.

A diminuição dos neutrófilos no cólon intestinal dos animais Δ dblGATA em relação aos WT com colite, pode ser explicada em parte, pela diminuição dos níveis das quimiocinas CXCL1-3/KC e CCL3/MIP1- α observadas no nosso trabalho. Muitos estudos têm associado a produção local da citocina IL-8, cujo análogo murino é o KC, com o aumento de neutrófilos no cólon de pacientes com UC (Anekasi et al. 1998; Keshavarzian et al. 1999).

Estudos anteriores também demonstraram a participação da quimiocina MIP1- α no recrutamento de neutrófilos (Ramos et al. 2005), bem como da participação dessa quimiocina nos modelos de UC (Ajuebor et al. 2004; Pender et al. 2005). Complementando esses dados, trabalhos anteriores demonstram que os eosinófilos são fontes relevantes da produção tanto de MIP1- α quanto de IL-8 (Costa et al. 1993; Nakajima 1996). Podemos sugerir, dessa forma, que os eosinófilos são células importantes que participam do recrutamento dos

neutrófilos, seja pela produção direta dos mediadores envolvidos na migração dos neutrófilos, como por exemplo KC e MIP1- α , ou pela liberação de mediadores que virão a ativar outras células responsáveis por esse processo. Novos estudos, no entanto, são necessários para confirmar esta hipótese.

Para comprovar que os eosinófilos são responsáveis pelo desencadeamento da lesão causado pela da colite ulcerativa, reconstituímos os animais Δ dblGATA com células mielóides provenientes dos animais WT. De fato, pudemos observar que a reposição de eosinófilos foi suficiente para restabelecer a inflamação após a administração de DSS. Nesse contexto, Dyer *et al.* (2007) realizando transplantes de medula de animais WT para animais Δ dblGATA, demonstrou que a contribuição estromal do doador não tem impacto na capacidade dos animais WT e Δ dblGATA em gerar eosinófilos. E que a habilidade (ou não) de desenvolvimento dos eosinófilos está somente ligada a natureza das células progenitoras. Sendo assim, a incapacidade dos animais Δ dblGATA em gerar eosinófilos é devido a defeitos intrínsecos nas células progenitoras deste animal. Dessa maneira, o transferência de células da medula óssea de camundongos selvagens para os animais deficientes de eosinófilos, foi capaz de reverter o fenótipo destes animais .

Em suma, os dados apresentados neste trabalho claramente apontam para uma participação essencial dos eosinófilos na patogênese da colite ulcerativa. Os dados aqui presentes também permitem sugerir que os eosinófilos estão associados à indução do recrutamento de neutrófilos para o cólon durante a UC. Os eosinófilos são, portanto, potenciais células alvos para o desenvolvimento de novas terapias, e mecanismos que interfiram no recrutamento e/ou ativação destas células representam estratégias terapêuticas importantes interessantes no tratamento da colite.

6.CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra que animais, Δ dblGATA-1 que são deficientes em eosinófilos, são menos susceptíveis a colite ulcerativa experimental induzida por sulfato de sódio dextrana. Além disso, estes animais tiveram o recrutamento de neutrófilos diminuído na colite ulcerativa, bem como dos seus mediadores. Isso sugere que os eosinófilos poderiam ter um papel importante na produção indireta ou direta dos mediadores inflamatórias responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos para o cólon intestinal. Desta forma, os eosinófilos estariam contribuindo para a patogênese desta doença, e poderia assim, ser alvo de futuras estratégias farmacológicas.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. Cellular and molecular Immunology, 4th. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

ADAMS, D.H. & LLOYD, A. R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet**. 349, p490-495, 1998.

ANEZAKI, K. et. al. Correlations between interleukin-8, and myeloperoxidase or luminal-dependent chemiluminescence in inflamed mucosa of ulcerative colitis. **Intern. Med.** 37, p253, 1998.

AJUEBOR MN, KUNKEL SL, HOGABOAM CM. The role of CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha in experimental colitis. **Eur J Pharmacol.** 497(3),p343-9. 2004

AUTSCHBACH F, GIESE T, GASSLER N, SIDO B, HEUSCHEN G, HEUSCHEN U, ZUNA I, SCHULZ P, WECKAUF H, BERGER I, OTTO HF, MEUER SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Virchows Arch.** 441(5):500-13.2002

AXELSSON, L.G. et.al. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+)-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. **Inflamm. Res.**, 45, p181-191,1996.

BANDEIRA-MELO, C., PHOOFOLO, M. & WELLER, P.F. (2001). Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. **J Biol Chem.**, v.276, p.22779-87, 2001.

BANDEIRA-MELO, C., SUGIYAMA, K., WOODS, L.J. & WELLER, P.F. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. **J Immunol.**, v.166, p.4813-7, 2001.

BAGGLIONI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, 392, p565-568, 1998.

BISCHOFF S.C., MAYER J., NGUYEN Q.T., STOLTE M.& MANN S.M.P. Immunohistological assessment of intestinal eosinophil activation in patients with eosinophilic gastroenteritis and inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.** 94, p3513, 1999.

BLUMBERG, R. S., SAUBERMANN, L.J. & STROBER, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Immunol.**,11, p648, 1999.

BOEHME, S.A., SULLIVAN, S.K., CROWE, P.D., SANTOS, M., CONLON, P.J., SRIRAMARAO, P. & BACON, K.B. Activation of mitogen-activated protein kinase regulates eotaxin-induced eosinophil migration. **J Immunol.**, v.163, p.1611-8, 1999.

BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews**, 3, p521-533, 2003.

BUANNE P, DI CARLO E, CAPUTI L, BRANDOLINI L, MOSCA M, CATTANI F, PELLEGRINI L, BIORDI L, COLETTI G, SORRENTINO C, FEDELE G, COLOTTA F, MELILLO G, BERTINI R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. **J Leukoc Biol.** 82(5),p1239-46.2007

CARA, D.C., NEGRAO-CORREA, D. & TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. **Histol. Histopathol.** 15: p899-920, 2000.

CHEN, W.; PAULUS, B.; SHU, D.; WILSON, CHADWICK, V. Increased serum levels of eotaxin in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol.**,5, p515-20; 2001.

COLLINS PD, MARLEAU S, GRIFFITHS-JOHNSON DA, JOSE PJ, WILLIAMS TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **J Exp Med.**182(4),p1169-74. 1995

COSTA JJ, MATOSSIAN K, RESNICK MB, BEIL WJ, WONG DT, GORDON JR, DVORAK AM, WELLER PF, GALLI SJ. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **J Clin Invest.**;91(6),p2673-84. 1993

DAIG, R. et.al. Increased interleukin-8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. **Gut.** 38, p216, 1996.

DANESE, S. & FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J. Gastroenterol.** 12(30), p4807- 4812, 2006.

DE M, CHOUDHURI R, WOOD GW. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. **J Leukoc Biol.**, 50(3),p252-62. 1991

DIELEMAN, L.A. et.al. Dextran sulfate sodium - induced colitis occurs in severe combined

immunodeficient mice. **Gastroenterology**, 107, p1643-1652, 1994.

DYER KD, CZAPIGA M, FOSTER B, FOSTER PS, KANG EM, LAPPAS CM, MOSER JM, NAUMANN N, PERCOPO CM, SIEGEL SJ, SWARTZ JM, TING-DE RAVIN S, ROSENBERG HF. Eosinophils from lineage-ablated Delta dβGATA bone marrow progenitors: the dβGATA enhancer in the promoter of GATA-1 is not essential for differentiation ex vivo. **J Immunol.** 1;179(3):1693-9. 2007

EL-SHAZLY A, YAMAGUCHI N, MASUYAMA K, SUDA T, ISHIKAWA T. Novel association of the src family kinases, hck and c-fgr, with CCR3 receptor stimulation: A possible mechanism for eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. **Biochem Biophys Res Commun.** 14;264(1),p163-70. 1999

ELSON, C.O. et.al. Experimental models of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology.** 109, p1344-1367, 1995.

ELSNER, J., HOCHSTETTER, R., KIMMIG, D. & KAPP, A. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. **Eur J Immunol.**, v.26, p.1919-25, 1998.

FORBES E., MURASE T., YANG M., MATTHAEI K.I., LEE J.J, LEE N.A., FOSTER P.S & HOGAN S.P. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. **J. Immunol.** 172, p5664-5675, 2004.

FOXMAN, E.F, CAMPBELL, J.J, BUTCHER, E.C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J Cell Biol.** ,139(5):1349-60, 1997.

FUSS, I. et.al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. **J. Immunol.**, 157, p1261-1270, 1996.

GARCIA-ZEPEDA ,E.A.; ROTHENBERG,M.E; OWNBEY, R.T., CELESTIN, J.; LEDER, P.; LUSTER, A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. **Nat Med.** 4, p449-56, 1996.

GIEMBYCZ MA, LINDSAY MA. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacol Rev.**,51(2):213-340. 1999. Review.

GRETEN, F. R. et.al. IKKβ links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, 118, p285-296, 2004.

HOGAN SP, ROTHENBERG ME. Review article: The eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease. **Aliment Pharmacol Ther.**;20(11-12):1231-40. 2004.

HOGAN SP, MISHRA A, BRANDT EB, ROYALTY MP, POPE SM, ZIMMERMANN N, FOSTER PS, ROTHENBERG ME. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. **Nat Immunol.**2(4),p 353-60. 2001

HUMBLES, A.A., CONROY, D.M., MARLEAU, S., RANKIN, S.M., PALFRAMAN, R.T., PROUDFOOT, A.E., WELLS, T.N., LI, D., JEFFERY, P.K., GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., WILLIAMS, T.J. & JOSE PJ. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. **J. Exp. Med.**, v.186, p.601-12, 1997.

HUMBLES AA, LLOYD CM, MCMILLAN SJ, FRIEND DS, XANTHOU G, MCKENNA EE, GHIRAN S, GERARD NP, YU C, ORKIN SH, GERARD C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. **Science.** ;305(5691),p1776-9. 2004

JEZIORSKA M., HABOUBI N., SCHOFIELD P. & WOOLEY D.E. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **J. Pathol.** 194, p484; 2001.

KAMPEN, G.T., STAFFORD, S., ADACHI, T., JINQUAN, T., QUAN, S., GRANT, J.A., SKOV, P.S., POULSEN, L.K. & ALAM, R. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. **Blood**, v.95, p.1911-7, 2000.

KESHAVARZIAN, A. et. al. Increased interleukin-8 in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. **Am. J. Gastroenterol.** 94, p704, 1999.

KESHAVARZIAN A, et al. Activated eosinophils in familial eosinophilic gastroenteritis. **Gastroenterology.** 88, p1041-1049, 1985.

KITA, H., WEILER, D.A., ABU-GHAZALEH, R., SANDERSON, C.J. & GLEICH, G.J. Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5. **J Immunol.**, v.149, p.629-635, 1996.

KITA H & GLEICH GJ. Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. **J Exp Med.** 183(6):2421-6.1996.Review.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S. & MARIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulphate sodium. **Exp. Anim.**, 48, p137-143, 1999.

KLEIN A, TALVANI A, SILVA PM, MARTINS MA, WELLS TN, PROUDFOOT A, LUCKACS NW, TEIXEIRA MM. Stem cell factor-induced leukotriene B4 production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. **J Immunol.**,167(1),p524-31; 2001.

KURTOVIC J,& SEGAL I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. **Trop Gastroenterol.** ,25(1):9-14.2004.

LAMPINEM M., CARLSON M., SANGFELT P., TAHA Y., THORN M., LOOF L., RAAB Y. & VENGE P. IL-5 and TNF- α participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis. **Dig. Dis. Sci.** 46: 2004; 2001

LAMKHIUED, B., RENZI, P.M., ABI-YOUNES, S., GARCIA-ZEPADA, E.A., ALLAKHVERDI, Z., GHAFFAR, O., ROTHENBERG, M.D., LUSTER, A.D. & HAMID, Q. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. **J Immunol.**, v.159, p.4593-601, 1997.

LOFTUS, EV. Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterol.** 126, p1504 – 1517, 2004.

LUSTER, A.D. Chemokines- Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **NEJM**, 338, p436-445,1998.

LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation, present and future therapeutic targets. **Nat. Immunol.** 6(12), p1182-90, 2005.

MACDONALD, T.T.; MONTELEONE, G. & PENDER, S.L.F. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. **Scand. J. Immunol.**, 51, p02-09, 2000.

MACDERMOTT, R.P.; SANDERSON I.R. & REINECKER, H.C. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and crohn`s disease. **Inflamm. Bowel Dis.**,4, p54-67, 1998.

MACDERMOTT, R.P. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. **J. Clin. Immunol.** 19, p266-272, 1999.

MACFIE J, REDDY BS, GATT M, JAIN PK, SOWDI R, MITCHELL CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. **Br J Surg.** 93(1),p87-93 2006.

MAKIYAMA K., KANZAKI S., YAMASAKI K., et al. Activated of eosinophils in the pathophysiology of ulcerative colitis. **J Gastroenterol.** 30(suppl 8), p64-69,1995.

MARSDEN VS, KAPPLER JW, MARRACK PC. Homeostasis of the memory T cell pool. **Int Arch Allergy Immunol.** 139(1),p63-74,2006.

MASHIMO,H.; WU, D.C.; PODOLSKY,D.K.; FISCHMAN, M.C. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. **Science.** 274, p262-265, 1996.

MATTHEWS, A.N., FRIEND, D.S., ZIMMERMANN, N., SARAFI, M.N., LUSTER, A.D., PEARLMAN, E., WERT, S.E. & ROTHENBERG, M.E. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.95, p.6273-8, 1998.

MCCORMACK G, MORIARTY D, O'DONOGHUE DP, MCCORMICK PA, SHEAHAN K, BAIRD AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. **Inflamm Res.** 50(10),p491-5. 2001

MCNAGNY, K.M. et.al. Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. **EMBO J.**, 17,p3669-3680, 1998.

MIR A., MINGUEZ M., TATAY J., et al. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.** 94,p3521-3529, 2002.

MISHRA A., HOGAN SP., LEE JJ., et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. **J. Clin. Invest.** 103,p1719-1727,1999.

MIYAJIMA A, MUI AL, OGOROCHI T, SAKAMAKI K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. **Blood.**;82(7):1960-74. 1993.Review.

NATSUI M, KAWASAKI K, TAKIZAWA H, HAYASHI SI, MATSUDA Y, SUGIMURA K, SEKI K, NARISAWA R, SENDO F, ASAKURA H. Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. **J Gastroenterol Hepatol.**,12(12), p801-8. 1997

NAKAJIMA H, MUNAKATA A, YOSHIDA Y. Adverse effects of sulfasalazine and treatment of ulcerative colitis with mesalazine. **J Gastroenterol.** 30 Suppl 8:p115-7. 1995

NI, J.; CHEN, S.F. & HOLLANDER, D. Effects of Dextran sulphate sodium on epithelial intestinal cells and intestinal lymphocytes. **Gut.** 39, p234-241, 1996.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils, importance of local

ODZE R.D., WERSHIL B.K., LEICHTNER A.M. & ANTONIOLI D.A. Allergic colitis in infants. **J. Pediatr.** 126, p163-170, 1995.

OKAYASU et.al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterol.** 98, p694-702, 1990.

ORHOLM, M. et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, 324, p84-88, 1991.

PALLONE, F. & MONTELEONE, G. Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease. **Gut**, 43, p735-736, 1998.

PALMEN MJ, DIELEMAN LA, VAN DER ENDE MB, UYTERLINDE A, PEÑA AS, MEUWISSEN SG, VAN REES EP. Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. **Clin Exp Immunol.**,99(2),p226-32, 1995.

PENDER SL, CHANCE V, WHITING CV, BUCKLEY M, EDWARDS M, PETTIPHER R, MACDONALD TT. Systemic administration of the chemokine macrophage inflammatory protein 1alpha exacerbates inflammatory bowel disease in a mouse model. **Gut.** 54(8),p1114-20. 2005

PODOLSK, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**,347, p417-429,2002.

QUALLS JE, KAPLAN AM, VAN ROOIJEN N, COHEN DA. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol.** 80(4):802-15. 2006

RAMOS CD, FERNANDES KS, CANETTI C, TEIXEIRA MM, SILVA JS, CUNHA FQ. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). **Eur J Immunol.** 36(8),p2025-34, 2006.

RAKOFF-NAHOUM, S. et.al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, 118, p229-241, 2004.

ROGLER G, HAUSMANN M, VOGL D, ASCHENBRENNER E, ANDUS T, FALK W, ANDREESEN R, SCHÖLMERICH J, GROSS V. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. **Clin Exp Immunol**. 112(2):205-15.1998

ROTHENBERG M.E., et al. Eotaxin triggers eosinophil-selective chemotaxis and calcium flux via a distinct receptor and induces pulmonary eosinophilia in the presence of interleukin 5 in mice. **Mol. Med.** 2: 334-348; 1997

ROTHENBERG, M.E., MACLEAN, J.A., PEARLMAN, E., LUSTER, A.D. & LEDER, P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. **J Exp Med.**, v.185, p.785-90, 1997.

ROTHENBERG, M.E. Eosinophilia. **N. Engl. J. Med.** 338, p1592,1998.

ROTHENBERG, M.E. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.21, p.291-5, 1999.

ROTHENBERG ME, OWEN WF JR, SILBERSTEIN DS, SOBERMAN RJ, AUSTEN KF, STEVENS RL. Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties. **Science**. 237(4815),p645-7. 1987

SAITOH O., KOJIMA K., SUGI K., MATSUSE K., UCHIDA K., TABATA K.& KATSU K. Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol**. 94:3513; 1999

SANGFELT P.M., CARLSON M., THORN M., LOOF L. & RAAB Y. Neutrophil and eosinophil granule proteins as markers of response to local prednisolone treatment in distal ulcerative colitis and proctitis. **Am. J. Gastroenterol**. 96, p1085, 2001.

SALLUSTO F, MACKAY CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Curr Opin Immunol**. 16(6),p724-31,2004.

SANDLER, R. & LOFTUS, E. Jr. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Sartor R, Sandborn W, editors. Kirsner`s inflammatory bowel diseases. 6th edition. Philadelphia: Saunders; p 245-262, 2004.

SHANAHAN, F. Crohn`s disease. **Lancet**, 359, p62-69, 2002.

SHAYKHIEV R, BALS R. Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. **J Leukoc Biol.**, 82(1), p1-15 Review, 2007.

SMYTHIES LE, SELLERS M, CLEMENTS RH, MOSTELLER-BARNUM M, MENG G, BENJAMIN WH, ORENSTEIN JM, SMITH PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **J Clin Invest.** 115(1):66-75. 2005

SWANK GM, DEITCH EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. **World J Surg.** 20(4), p411-7. 1996.Review.

SWARTZ JM, DYER KD, CHEEVER AW, RAMALINGAM T, PESNICAK L, DOMACHOWSKE JB, LEE JJ, LEE NA, FOSTER PS, WYNN TA, ROSENBERG HF. Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood.** 108(7):2420-7. 2006

SOUZA AL, SOUSA-PEREIRA SR, TEIXEIRA MM, LAMBERTUCCI JR, TEIXEIRA AL. The role of chemokines in Schistosoma mansoni infection: insights from human disease and murine models. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1,p333-8. Review. 2006

SOUZA, D.G. et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am. J. Pathol.**, 160, p1755-1765, 2002.

STEVENS R, OLIVER M, BROGAN M, HEISERODT J, TARGANS. Defective generation of tetanus-specific antibody-producing B cells after in vivo immunization of Crohn's disease and ulcerative colitis patients. **Gastroenterology.** 88(6),p1860-6. 1985

STRATH, M., WARREN, D.J., SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J. Immunol. Methods**, 83(2), p209-215, 1985.

STROBER, W.; FUSS I.J & BLUMBERG R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.** 20, p495-549; 2002.

STROBER, W; FUSS I.J & MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, 117, p-514-521, 2007.

TALLEY N.J., KEPHART G.M., MCGOVERN T.W., CARPENTER H.A. & GLEICH G.J. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. **Gastroenterology**.103:137-145; 1992

TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. **Trends Pharmacol Sci**.16:418-423; 1995

TEIXEIRA, M.M., WELLS, T.N., LUKACS, N.W., PROUDFOOT, A.E., KUNKEL, S.L., WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. **J. Clin. Invest.**, v.100, p,1657-66, 1997.

TENSCHER, K., METZNER, B., SCHOPF, E., NORGAUER, J. & CZECH, W. Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. **Blood**, v.88, p.3195-9, 1996

THORESON, R. & CULLEN J.J. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: An Overview. **Surg. Clin. N. Am.**, 87,p 575-585, 2007.

TORPIER G, et al. Eosinophilic gastroenteritis: ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. **Clin. Exp. Immunol**. 74,p 404-408, 1988.

TYSK, C.; LINDBERG, E.; JARNEROT, G. & FLODERUS-MYRHED, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. **Gut**, 29, p990-996, 1998.

ULLMAN, T. et.al. Progression of flat low-grade dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, 125, p1311-1319, 2003.

VIEIRA, A. T. et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, 146, p224-251, 2005.

XAVIER, R. J. & PODOLSKY, D. K. Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews**, 448, p427-434, 2007.

WINN, R.J. The role of oncology clinical practice guidelines in the managed care era. **Oncology**

(Williston Park). (11 Suppl),p177-83. 1995.Review.

WINTER HS, MADARA JL, STAFFORD RJ, GRAND RJ, QUINLAN JE, GOLDMAN H. Intraepithelial eosinophils: a new diagnostic criterion for reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 83(4),p818-23. 1982

WIRTZ, S. & NEURATH, M.F. Mouse models of Inflammatory Bowel Disease. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 2007.

YU, C.; CANTOR, AB.; YANG, H.; BROWNE, C.; WELLS, RA.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, SH. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. **J Exp Med**. 195, p1387-1395,2002.