

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia**

Tamara Cristina Moreira Lopes

**MACRÓFAGOS REGULATÓRIOS CONTROLAM A INFLAMAÇÃO E PROMOVEM  
A RECUPERAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA  
INTESTINAL**

Belo Horizonte

2020

Tamara Cristina Moreira Lopes

**MACRÓFAGOS REGULATÓRIOS CONTROLAM A INFLAMAÇÃO E PROMOVEM  
A RECUPERAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA  
INTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração em Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. David M. Mosser

Belo Horizonte

2020

043

Lopes, Tamara Cristina Moreira.

Macrófagos regulatórios controlam a inflamação e promovem a recuperação em modelo experimental de doença inflamatória intestinal [manuscrito] / Tamara Cristina Moreira Lopes. - 2020.

127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. David M. Mosser.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Doenças Inflamatórias Intestinais. 3. Colite Ulcerativa. 4. Sulfato de Dextrana. 5. Macrófagos. I. Gonçalves, Ricardo. II. Mosser, David M. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. IV. Título.

CDU: 616

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**“MACRÓFAGOS REGULATÓRIOS CONTROLAM A INFLAMAÇÃO E  
PROMOVEM A RECUPERAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA  
INFLAMATÓRIA INTESTINAL”**

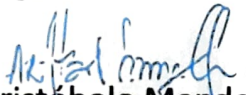
**TAMARA CRISTINA MOREIRA LOPES**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

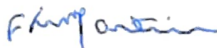
Aprovada em 30 de abril de 2020, pela banca constituída pelos membros:



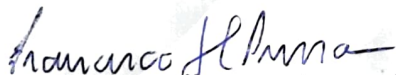
**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Maria Caetano de Faria**  
**Departamento de Bioquímica de Imunologia – ICB/UFMG**



**Prof. Dr. Aristóbolo Mendes da Silva**  
**Departamento de Morfologia – ICB/UFMG**



**Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins**  
**Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG**



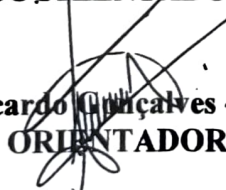
**Dr. Francisco Guilherme Cancela e Penna**  
**Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatologia do IPSEMG**



**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Samantha Ribeiro Béla**  
**Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – UFOP/MG**



**Prof. Dr. David M. Mösser - University of Maryland University College (USA)**  
**COORIENTADOR**



**Prof. Dr. Ricardo Gonçalves - ICB/UFMG**  
**ORIENTADOR**

**Belo Horizonte, 30 de abril de 2020.**

Faculdade de Medicina - UFMG  
**Campus Saúde**

Centro de Pós-Graduação  
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5º andar  
Centro - Cep: 301300100  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-9640 - 3403-9641

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG  
**Campus Pampulha**

Departamento de Patologia Geral  
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627  
Pampulha - Cep: 31270-901  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-2878

## **AGRADECIMENTOS**

A carreira acadêmica é uma escolha de vida, embalada por um amor que nos envolve e nos impulsiona a buscar o conhecimento, aprimorá-lo e compartilhá-lo. Entretanto, somos desafiados diariamente durante a nossa trajetória, por vezes nos deparamos com obstáculos em nossos caminhos, que ao final de cada ciclo nos proporcionam crescimento pessoal e profissional.

Então é chegado o final de mais um ciclo! Aquele momento de felicidade onde você se depara com a materialização de quatro anos de trabalho e se sente profundamente grata a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da realização desse sonho.

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar viver todos esses momentos e permitir que pessoas tão especiais fizessem parte da minha vida. Que ele continue sempre me inspirando e fortalecendo para que eu permaneça perseverante nos caminhos da educação e da pesquisa.

Gratidão à minha família maravilhosa! Minha mãe Andréia, meu primeiro exemplo de mulher batalhadora e determinada, que equilibrou durante toda a vida, os estudos, o trabalho e a dedicação à nossa família. Obrigada por sempre me incentivar e apoiar em minhas escolhas. Ao meu pai Savinho, que com todo amor e paz sempre me amparou e trouxe leveza e sorrisos aos meus dias. Meu amado, amigo e irmão, Ramon, pelo companheirismo e pelo dia a dia que docemente temos o prazer de compartilhar. À minha vovó Imaculada, que sempre fez questão de me lembrar que eu só construiria uma carreira de sucesso se eu me “agarrasse” com os estudos e que a educação é, e sempre será, a base para a prosperidade de um país. Minhas tias Aline e Maria Teresa que tanto me ajudaram e me incentivaram nos estudos. Estendo também os meus agradecimentos a todos os demais familiares.

Gratidão a todos os professores que tive o prazer de conhecer e que compartilharam comigo um pouquinho do vasto conhecimento que detêm. Nesse momento aproveito para agradecer ao prof. Ricardo Gonçalves, que está presente em minha vida há quase 10 anos, desde a disciplina de Imunologia cursada na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Sou imensamente grata pela oportunidade do trabalho, por todo conhecimento compartilhado e por ótimos quatro anos de convívio e amizade. Boss, você é nota 10! Estendo meus agradecimentos a cada profissional presente no departamento de Patologia, vocês foram fundamentais

nesse caminho. Em especial à prof. Rosa Arantes por toda sua brilhante contribuição no nosso trabalho.

Agradeço imensamente aos colegas do laboratório, aos colaboradores e às minhas queridas ICs, que também muito ajudaram na execução desse trabalho.

Agradeço também ao Dr. David Mosser, meu co-orientador, que me abriu as portas do seu laboratório e da sua casa em Maryland – EUA, e que sempre fez questão de acompanhar os trabalhos realizados no nosso laboratório aqui no Brasil.

Agradeço ao meu companheiro e amor, Álisson, que não mede esforços para ser o melhor par dessa vida! Que caminha comigo nesse meio acadêmico, me encoraja e me inspira a ser uma pessoa e uma profissional melhor a cada dia.

Gratidão a todos os meus queridos amigos, em especial ao Greg, Mayra, Denise, Marcela, Wanderson e Pedro. Vocês certamente tornaram esses anos mais felizes e leves.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Ao final desses agradecimentos deixo aqui registrado o meu desejo de dias melhores para a ciência e para a educação pública de qualidade do nosso país, que vivem um triste momento de sucateamento e desmonte. Acalentando meu coração fico com as palavras de Quintana “Todos esses que aí estão atravancando meu caminho, eles passarão... Eu passarinho!”

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.

Paulo Freire

## Resumo

As doenças inflamatórias intestinais são um grupo de doenças do sistema digestório de patogênese complexa, multifatoriais e de tratamento sintomático, não havendo ainda um tratamento curativo eficaz. O desequilíbrio da resposta imune local, parece ser o principal desencadeador da doença, em pacientes geneticamente susceptíveis. Neste contexto os macrófagos têm papel fundamental na patogênese, e de forma paradoxal, na manutenção da homeostase do intestino. Sendo assim, neste trabalho, avaliamos o papel dos macrófagos por meio da sua reprogramação funcional para diferentes perfis de ativação, e utilizamos o perfil regulatório como proposta de terapia para controlar a doença. A colite experimental foi induzida pela administração de dextrana sulfato de sódio (DSS 3%) aos camundongos, por 7 dias. Os animais submetidos à indução de colite apresentaram importantes alterações clínicas, medidas pelo Índice de Atividade da Doença (IAD), além de lesões macroscópicas e microscópicas. Na avaliação do papel dos macrófagos na patogênese da doença, os animais com colite receberam tratamento com duas doses de macrófagos reprogramados *in vitro*, por via intraperitoneal. Os resultados demonstraram que os grupos tratados com macrófagos classicamente ativados apresentaram uma doença ainda mais grave. Histologicamente, pode-se observar extensas áreas de edema com intenso infiltrado inflamatório transmural, presença de abscessos e fusão das criptas, resultando em perda da arquitetura do cólon. Já os animais tratados com macrófagos regulatórios, apresentaram significativa melhora em todos os parâmetros analisados, resultando em menor IAD. Foi observado macroscopicamente o cólon com aspecto normal e microscopicamente áreas de arquitetura do cólon preservadas, com poucas áreas de lesão da mucosa e submucosa. Imagens de fluorescência mostraram a migração dos macrófagos para o cólon inflamado após a injeção intraperitoneal dessas células. Desta forma, nossos resultados demonstram que a polarização dos macrófagos para um perfil regulatório foi determinante em controlar a colite experimental em camundongos, e que os macrófagos são um potencial alvo terapêutico a ser explorado no controle das doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias intestinais. Colite ulcerativa. DSS. Macrófagos.



## **Abstract**

Inflammatory bowel disease is a group of digestive system diseases of complex pathogenesis, multifactorial and symptomatic treatment, and there is still no effective curative treatment. The imbalance of the local immune response seems to be the main trigger of the disease. In this context, macrophages play a fundamental role in pathology, and paradoxically, in the maintenance of intestinal homeostasis. Therefore, in this work, we evaluated the role of macrophages through their functional reprogramming for different activation profiles and used the regulatory profile in a therapy proposal to control the disease. The colitis model was reproduced by the administration of dextran sodium sulfate (DSS 3%) to the mice for 7 days. The animals submitted to colitis induction showed important clinical changes, measured through the Disease Activity Index (DAI), in addition to macroscopic and microscopic lesions. In assessing the role of macrophages in the pathogenesis of the disease, animals with colitis received treatment with two doses of macrophages reprogrammed in vitro, intraperitoneally. The results showed that groups treated with classically activated macrophages had even more severe disease. Histologically, it is possible to observe extensive areas of edema with intense transmural inflammatory infiltrate, presence of abscesses and fusion of the crypts, resulting in loss of colon architecture. On the other hand, animals treated with regulatory macrophages showed a significant improvement in all parameters analyzed, resulting in a lower DAI. It was observed macroscopically the colon with normal aspect and microscopically preserved areas of colon architecture, with few areas of lesion of the mucosa and submucosa. Fluorescence images showed the migration of macrophages to the inflamed colon after intraperitoneal injection of these cells. Thus, our results demonstrate that the polarization of macrophages to a regulatory profile was decisive in controlling experimental colitis in mice and that macrophages are a potential therapeutic target to be explored in the control of inflammatory bowel diseases.

Key words: Inflammatory bowel diseases. Ulcerative colitis. DSS. Macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais (DII). .....	21
Figura 2: Terapia atual de controle das doenças inflamatórias intestinais (DII) direcionada aos macrófagos. ....	24
Figura 3: Representação esquemática do modelo de colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS). ....	28
Figura 4: Três subpopulações de macrófagos, com respectivas propriedades bioquímicas e fisiológicas.....	30
Figura 5: Alteração dos monócitos e macrófagos em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. ....	33
Figura 6: Macrófagos na inflamação intestinal em quadro de colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS).....	34
Figura 7: Rolo do intestino grosso (cólon). ....	49
Figura 8: Dosagens de IL-10 (A) e IL-12 (B) no sobrenadante de cultura de macrófagos submetidos a diferentes estímulos. ....	55
Figura 9: Avaliação da massa corporal. ....	56
Figura 10: Comprimento do cólon. ....	57
Figura 11: Índice de atividade de doença (IAD). ....	58
Figura 12: Histologia do cólon. ....	60
Figura 13: Avaliação da massa corporal. ....	61
Figura 14: Comprimento do cólon. ....	62
Figura 15: Índice de atividade de doença (IAD). ....	63
Figura 16: Histologia do cólon. ....	65
Figura 17: Avaliação da massa corporal. ....	67
Figura 18: Variação da massa corporal. Comparação entre o dia 7 e o dia 0.....	68
Figura 19: Medida do consumo de ração. ....	69
Figura 20: Comprimento do cólon. ....	70
Figura 21: Aspectos macroscópicos do cólon. ....	71
Figura 22: Avaliação macroscópica do cólon. ....	72
Figura 23: Índice de atividade de doença (IAD). ....	73
Figura 24: Histologia do cólon. ....	76
Figura 25: Histologia do cólon. ....	77
Figura 26: Histologia do cólon. ....	78
Figura 27: Índice histológico.....	79

Figura 28: Concentração de citocinas no soro de camundongos.....	82
Figura 29: Macrófagos regulatórios presentes no intestino inflamado. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontuações dos sinais clínicos para cálculo do índice de atividade de doença (IAD). .....	45
Tabela 2: Critérios para pontuação de lesões macroscópicas. ....	48
Tabela 3: Critérios para pontuação de lesões microscópicas. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-ASA – Aminossalicilatos
- AA-M $\phi$  – Macrófagos alternativamente ativados
- ASCs – Células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo
- BSA – Albumina sérica bovina
- CAM $\phi$ s – Macrófagos classicamente ativados
- CBA – *Cytometric Bead Array*
- CD – Grupo de diferenciação
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- DAMP – Padrão molecular associado ao dano
- DAPI – 4',6- diamino-2-fenilindol
- DC – Doença de Crohn
- DII – Doenças inflamatórias intestinais
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio de cultura celular)
- DNBS – Ácido dinitrobenzeno sulfônico
- DSS – Dextrana sulfato de sódio
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)
- ERK – Quinase regulada pela sinalização extracelular
- Fc $\gamma$ RI – *Fc-gamma receptor 1*
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico
- HRP – Peroxidase de rabanete (*Horseradish peroxidase*)
- IAD – Índice de atividade de doença
- ILCs – Células linfoides inatas
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
- IP – Intraperitoneal
- KC – Quimiocina derivada de queratinócitos (Proteína quimiotática de neutrófilos)
- KO – *Knockout*
- LPS – Lipopolissacarídeo
- M $\phi$  – Macrófagos sem estímulo

MCP – *Monocyte Chemoattractant Protein* (Proteína quimiotática de monócitos)

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

MEC – Matriz extracelular

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MMP – Metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase

OVA – Ovoalbumina

p38 MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno

PAS – Ácido periódico de Schiff

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

PFA – Paraformaldeído

PGE2 – Prostaglandina E2

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão

Rag – Gene ativador da recombinação

RM $\phi$  – Macrófagos regulatórios

REMAC – *Regulatory Macrophage Cell Therapy*

RCU – Retocolite ulcerativa

SFB – Soro fetal bovino

SPF – *Specific Pathogen Free*

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador beta

Th – Linfócitos T auxiliares

TLR – Receptor do tipo Toll

TMB – Tetrametilbenzidina

TMF – Transplante de microbiota fecal

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR – Receptor de fator de necrose tumoral

TNBS – Ácido trinitrobenzeno sulfônico

Treg – Linfócitos T regulatórios

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 Doenças inflamatórias intestinais</b> .....	17
<b>1.2 Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais</b> .....	19
<b>1.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais</b> .....	22
<b>1.4 Modelos experimentais das doenças inflamatórias intestinais</b> .....	26
<b>1.5 Macrófagos</b> .....	28
<b>1.6 Participação dos macrófagos e da IL-10 na colite</b> .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3. OBJETIVO</b> .....	38
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>4.1. Animais</b> .....	39
<b>4.2. ETAPA 1 – Isolamento e estímulos de macrófagos (Experimentos <i>in vitro</i>)</b> .....	39
<b>4.2.1. Cultivo de macrófagos derivados de medula óssea</b> .....	39
<b>4.2.2. Estímulo de macrófagos derivados de medula óssea</b> .....	40
<b>4.2.3. Produção de macrófagos regulatórios utilizando OVA/ IgG anti-OVA</b> 41	
<b>4.2.4. Produção de macrófagos regulatórios utilizando Beads/IgG de coelho</b> 41	
<b>4.2.5. Produção de macrófagos regulatórios utilizando Prostaglandina (PGE2)</b> 42	
<b>4.2.6. Determinação dos níveis de IL-10 e IL-12 em sobrenadante de cultura (ELISA)</b> .....	42
<b>4.3. ETAPA 2 – Modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo DSS</b> .....	43
<b>4.3.1. Modelo de colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6</b> .....	43

4.3.2.	Delineamento experimental .....	44
4.4.	Avaliação dos sinais clínicos e determinação do índice de atividade da doença (IAD) .....	44
4.5.	Comprimento do cólon .....	45
4.6.	ETAPA 3 – Colite com Imunoterapia – Uma dose de macrófagos. ....	45
	Delineamento experimental .....	45
4.7.	ETAPA 4 – Colite com Imunoterapia – Duas doses de macrófagos. ....	46
	Delineamento experimental .....	46
4.8.	Avaliação do consumo de ração.....	47
4.9.	Coleta de sangue e soro .....	47
4.10.	Avaliação macroscópica do cólon .....	47
4.11.	Análises histológicas .....	48
4.12.	Detecção de citocinas no soro por citometria de fluxo.....	50
4.13.	ETAPA 5 – Avaliação da migração de macrófagos regulatórios para o intestino .....	51
4.14.	Análises estatísticas.....	52
5.	RESULTADOS .....	54
5.1.	ETAPA 1 – Determinação dos níveis de IL-10 e IL-12 em sobrenadante de cultura de macrófagos .....	54
5.2.	ETAPA 2 – Padronização do modelo de colite .....	55
5.2.1.	Avaliação da perda de massa corporal .....	56
5.2.2.	Comprimento do cólon .....	56
5.2.3.	Índice de atividade da doença (IAD) .....	57
5.2.4.	Avaliações histopatológicas.....	58
5.3.	ETAPA 3 – Avaliação do protocolo de terapia celular – Uma dose de macrófagos.....	61
5.3.1.	Avaliação da perda de massa corporal .....	61
5.3.2.	Comprimento do cólon .....	62



5.3.3. Índice de atividade da doença (IAD) .....	63
5.3.4. Avaliações histopatológicas.....	63
5.4. ETAPA 4 – Avaliação do protocolo de terapia celular – Duas doses de macrófagos.....	66
5.4.1. Avaliação da perda de massa corporal .....	66
5.4.2. Avaliação do consumo alimentar .....	68
5.4.3. Avaliação macroscópica do cólon .....	69
5.4.4. Índice de atividade da doença (IAD) .....	73
5.4.5. Avaliações histopatológicas.....	74
5.4.6. Avaliação do perfil de citocinas no soro .....	80
5.5. ETAPA 5 – Avaliação da migração de macrófagos regulatórios para o intestino inflamado .....	83
6. DISCUSSÃO .....	86
7. CONCLUSÃO .....	99
8. REFERÊNCIAS .....	100
9. ANEXOS .....	127

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Doenças inflamatórias intestinais**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são um grupo de doenças inflamatórias do sistema digestório com grande impacto na saúde pública mundial. Estudos têm mostrado uma tendência para o aumento da incidência das DII, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (TORRES et al., 2011).

Os dados populacionais relacionados aos aspectos epidemiológicos das DII no Brasil ainda são escassos. Dificuldades de acesso a métodos de diagnóstico em algumas localidades do país, possível limitação da qualificação profissional das equipes de saúde que atendem os pacientes com DII, realização de diagnósticos diferenciais incorretos (causas infecciosas), somado ao diagnóstico tardio em alguns casos devido à evolução insidiosa das DII e complicações fatais sem a caracterização da doença registrada, são fatores que dificultam o levantamento epidemiológico dessas doenças (KAPLAN, 2015).

A prevalência das DII está relacionada ao diagnóstico de novos casos e pela duração da doença, tendo em vista que as DII não possuem cura e afetam principalmente a população jovem (NG et al., 2013). As duas principais formas de apresentação deste grupo de doenças são a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Estudos retrospectivos que avaliaram dados de prevalência e incidência da RCU e da DC, do ano de 1990 até 2016, apontam para o aumento do número de pacientes acometidos pelas DII em países recém-industrializados, dentre eles o Brasil (NG et al., 2017). O aumento da incidência ao longo do tempo e a maior prevalência atual das DII são indicativos de uma progressão histórica em relação ao número de pacientes com RCU e DC em nosso país (QUARESMA; KAPLAN; KOTZE, 2019).

A DC é caracterizada pelo acometimento salteado, assimétrico e transmural (podendo acometer todas as camadas teciduais) de qualquer porção do sistema digestório, da boca ao ânus, além de poder apresentar manifestações extra intestinais (LICHTENSTEIN; HANAUER; SANDBORN, 2009). Os sintomas clínicos da DC incluem perda de peso, diarreia ou obstrução intestinal, febre, dor abdominal, e presença de sangue e/ou muco nas fezes. Já a RCU atinge predominantemente a

mucosa do cólon e do reto, porém alguns pacientes podem desenvolver ileíte terminal (HAMILTON et al., 2016). A RCU apresenta como sinais e sintomas, dor abdominal, diarreia e eliminação de sangue, pus e/ou muco durante as evacuações (WEYLANDT et al., 2007).

As DII têm etiologia multifatoriais e complexas que envolvem interações entre suscetibilidade genética, respostas imunes do hospedeiro, fatores ambientais, antígenos microbianos luminiais (XAVIER; PODOLSKY, 2007) e até distúrbios de ansiedade e humor (GRAFF; WALKER; BERNSTEIN, 2009).

A teoria da higiene tem sido apontada como uma forte hipótese para o entendimento das interações genético-ambientais associadas ao desenvolvimento das DII. Segundo a teoria da higiene, ambientes “menos limpos” desempenham um papel protetor em relação a este grupo de doenças. Fatores relacionados a menores taxas de uso de antibióticos, contato com animais de estimação, exposição a patógenos entéricos, dentre outros, são inversamente relacionados a incidência das DII (PONDER; LONG, 2013).

A microbiota também possui importante papel na manutenção da homeostase intestinal. A disbiose está diretamente relacionada a respostas imunes inadequadas e inflamação do intestino (HISAMATSU et al., 2013; NELL; SUERBAUM; JOSEPHANS, 2010; PLATT; MOWAT, 2008). A disbiose observada em pacientes com RCU tem por consequência uma menor produção e oxidação de butirato, um importante metabólito energético essencial para a integridade das células epiteliais intestinais e manutenção da homeostase da interface intestinal (KOBOZIEV et al., 2014).

O diagnóstico e o acompanhamento de pacientes com DII são de complexa condução, realizados com base na combinação de aspectos clínicos, laboratoriais, histopatológicos, endoscópicos e radiológicos (BERNSTEIN et al., 2010; VILELA et al., 2012). Atualmente a busca por biomarcadores que determinem a gravidade dessas doenças, que sejam indicativos da resposta terapêutica, de quadros de remissão e que se correlacionem com o prognóstico tem sido um desafio para os pesquisadores e especialistas da área. Nesse cenário da busca por um biomarcador ideal, a dosagem de calprotectina fecal em pacientes com DC tem se mostrado de grande relevância, apresentando precisão diagnóstica, correlação moderada com escores endoscópicos, aplicabilidade como preditor de remissão, além de avaliar a atividade inflamatória intestinal de forma não invasiva (PENNA et al., 2020).

## 1.2 Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais

Em um perfeito quadro de homeostase, o sistema imune mantém o equilíbrio entre a tolerância à microbiota, os antígenos provenientes da dieta e a necessária resposta a possíveis patógenos entéricos. Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa são de extrema importância na patogênese das DII (WALLACE et al., 2014).

As respostas imunes inata e adaptativa são reações imunológicas complexas que envolvem uma série de mediadores químicos, citocinas, quimiocinas e células. Nas DII, tanto a imunidade inata, quanto a imunidade adaptativa, têm papéis fundamentais na sua patogênese, com importante envolvimento de diversos tipos celulares, como as células epiteliais intestinais, os macrófagos, as células dendríticas, os neutrófilos, as células linfóides inatas (ILCs) e os linfócitos T e B (HISAMATSU et al., 2013).

As camadas de muco e o epitélio intestinal fornecem uma interface entre bactérias luminais, patógenos, antígenos alimentares e o sistema imunológico presente na mucosa. As células epiteliais auxiliam na produção de muco (SHIRAZI et al., 2000) e na secreção de peptídeos antimicrobianos (WEHKAMP; SCHMID; STANGE, 2007), formando assim a primeira linha de defesa do intestino.

O epitélio da mucosa intestinal é formado por diferentes tipos celulares, dentre eles destacam-se: os enterócitos, as células caliciformes, as células de Paneth e as células enteroendócrinas (KIM; HO, 2010). As células caliciformes são responsáveis pela formação das camadas de muco, pela produção de mucina. As camadas de muco desempenham importante papel no estabelecimento da microbiota intestinal e na proteção da colonização e invasão por microrganismos patogênicos (SHIRAZI et al., 2000). A inflamação intestinal está diretamente relacionada com a depleção das células caliciformes tanto em pacientes com RCU (MCCORMICK; HORTON; MEE, 1990), quanto na doença experimental em diferentes modelos de colite (JOHANSSON; HANSSON, 2013; JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004).

A perda da integridade da interface epitelial propicia a invasão por microrganismos patogênicos, comensais e antígenos alimentares. Pacientes com DII apresentam aumento da permeabilidade intestinal em consequência de defeitos e alterações nessa interface composta pelo epitélio intestinal e o muco (GEREMIA et al., 2014; SALIM; SÖDERHOLM, 2011).

As células epiteliais possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos e aos danos, PAMPs e DAMPs, respectivamente. Ao serem ativadas, essas células secretam citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias, amplificando a resposta inflamatória (GEREMIA et al., 2014; HISAMATSU et al., 2013).

Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa leucocitária do intestino. Tais células apresentam diferentes funções na imunopatogênese das DII, entre elas destacam-se a secreção de citocinas e quimiocinas, importantes mensageiros que modulam as respostas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12 e o fator de necrose tumoral (TNF). Além da produção de metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio. Os macrófagos também estão relacionados com produção de metaloproteinases (MMP), levando à degradação do colágeno e outros componentes da matriz extracelular (MEC) (MAHIDA, 2000).

As células linfoides inatas são células da imunidade inata procedentes do mesmo progenitor linfoide comum aos linfócitos da imunidade adaptativa. Essas células possuem funções homólogas às células T auxiliares (Th), dentre elas destacamos as células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) que apresentam homologia de função à resposta Th17, que está intimamente relacionada ao desenvolvimento das DII (AGUIAR et al., 2018; FORKEL; MJÖSBERG, 2016; SPITS et al., 2013).

A imunidade adaptativa também possui importante função na patogênese das DII. O desequilíbrio entre células T regulatórias (Treg) e células inflamatórias Th1, Th2 e Th17 está intimamente relacionado à patogênese das DII. As células Th1 são diferenciadas na presença de IL-12 e como resultado produzem grandes quantidades de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF, que exacerbam a inflamação (ROMAGNANI, 1994). O IFN- $\gamma$ , por sua vez, ativa macrófagos teciduais para produzir TNF adicional, o que leva a apoptose das células epiteliais e lesão tecidual (NEURATH, 2014; WALLACE et al., 2014). As células Th2 são caracterizadas pela alta secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL13 (ROMAGNANI, 1994). A IL-13 produzida por esse subtipo de linfócito está relacionada com o aumento da permeabilidade intestinal e indução da apoptose do epitélio (HELLER et al., 2005).

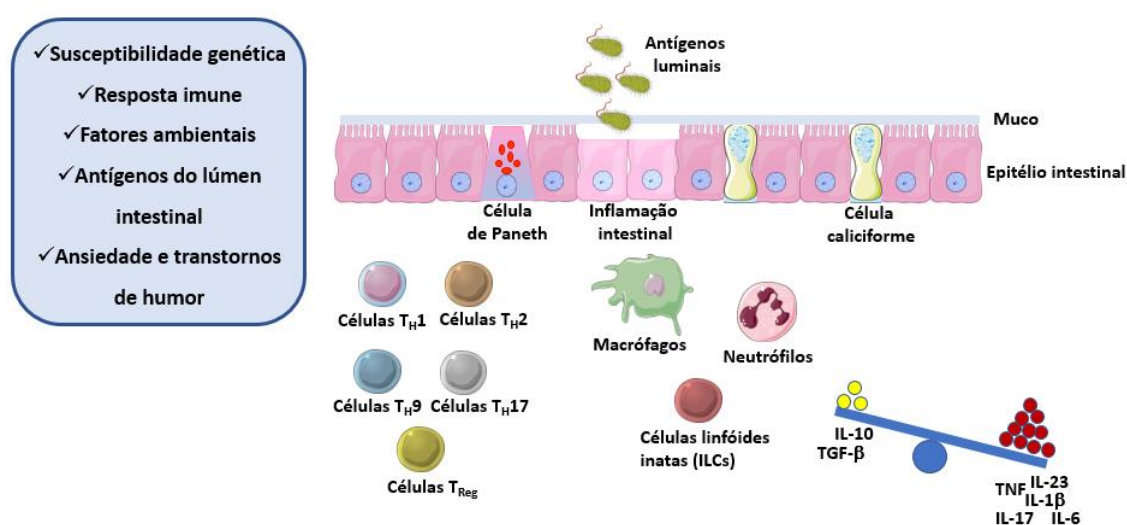
As observações a respeito do perfil de citocinas presentes na mucosa de pacientes com DII têm demonstrado a fragilidade do paradigma Th1/Th2 e propiciado reconsiderações a respeito de uma resposta imunológica mais envolvida

com o perfil Th17, na patogênese das DII (DI SABATINO et al., 2012). A IL-17 é uma importante citocina pró-inflamatória secretada pelas células Th17, envolvida na ativação de quimiocinas que atraem e ativam leucócitos, como monócitos e neutrófilos induzindo forte inflamação local (AHLUWALIA et al., 2018). Diversos trabalhos têm demonstrado que pacientes com RCU e DC possuem uma expressão aumentada de citocinas relacionadas à resposta Th17 (KANAI et al., 2012; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010; MALOY; KULLBERG, 2008; SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). Assim como a citocina IL-17, a IL-23 também é de grande importância nas DII. Ambas se encontram aumentadas nos tecidos de indivíduos acometidos pela doença, reforçando o importante papel da resposta Th17 (FUJINO et al., 2003; YEN et al., 2006).

As células Th9 também têm sido descritas na patogênese das DII. Esse subtipo de linfócito secreta IL-9 que pode prejudicar a interface intestinal e impedir a cicatrização de feridas (GERLACH et al., 2014; NALLEWEG et al., 2014).

Os linfócitos T regulatórios auxiliam na manutenção da homeostase da mucosa intestinal, por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) (VALENCIA et al., 2006). Pacientes com DII apresentam número reduzido de linfócitos Treg no sangue periférico (MAUL et al., 2005).

Na Figura 1 podemos observar de forma simplificada a importância do sistema imune no desenvolvimento das DII.



Fonte: (Autoria própria).

Figura 1: Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais (DII).

Esta imagem foi criada com o auxílio do Medical ART (<https://smart.servier.com/>).

Tal como ocorre em outros estados inflamatórios, as lesões teciduais observadas nas DII são causadas pelo próprio sistema imune, chamadas de lesões imunopatológicas. O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias possui importante papel na patogênese e manutenção deste conjunto de doenças. Uma resposta imune desregulada, é o que determina o desequilíbrio entre estas citocinas, ativando células e desencadeando intenso quadro inflamatório (POWRIE, 1995; RIZZO et al., 2012).

Dentre várias citocinas envolvidas na patogênese das DII, a IL-10 é uma citocina imunomoduladora importante na manutenção da homeostase intestinal. O desenvolvimento das DII nos primeiros anos de vida pode ocorrer devido a mutações em um único gene relacionado a IL-10. Por exemplo, mutações nos genes para o receptor da IL-10  $\alpha$  e  $\beta$ , estão correlacionados ao desenvolvimento de DC (GLOCKER et al., 2009). Experimentalmente, macrófagos murinos deficientes na sinalização do receptor de IL-10 (IL-10R) estão intimamente envolvidos na patogênese da colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) (ZIGMOND et al., 2014). A IL-10 tem um papel muito importante nas DII, e esses aspectos serão melhor explorados no final desta introdução, juntamente com os macrófagos.

### **1.3 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais**

Atualmente o tratamento das DII é realizado com base em três pilares principais, sendo eles: manutenção de hábitos de vida saudável, tratamento farmacológico e cirúrgico (WRIGHT; KAMM, 2015).

Um melhor prognóstico das DII está relacionado a condutas terapêuticas que têm por objetivo controlar a inflamação dos tecidos promovendo a cicatrização da mucosa (DARR; KHAN, 2017; LICHTENSTEIN; HANAUER; SANDBORN, 2009).

Os medicamentos convencionais utilizados são pertencentes às classes dos aminossalicilatos (5-ASA), corticosteroides, antibióticos, imunomoduladores/ imunossupressores e imunobiológicos. Os objetivos terapêuticos são: reduzir a inflamação, controlar os sintomas e evitar complicações em casos de reativação da doença.

A intervenção cirúrgica é indicada em casos de obstruções, complicações supurativas e doença refratária ao tratamento medicamentoso (VAN ASSCHE et al., 2010). Entretanto, em 90% dos pacientes com DC que passaram por procedimentos

cirúrgicos (ileocolectomia direita) foi observada recorrência endoscópica, no período de um ano pós-operatório. Além disso, 30% dos pacientes apresentaram recorrência clínica e 5% a 10% dos pacientes necessitaram de novas cirurgias (DE CRUZ et al., 2012).

Atualmente o tratamento das DII visa o controle da inflamação e a cicatrização, resultando em melhora da condição clínica do paciente, de sua qualidade de vida, a promoção e manutenção da remissão, bem como a redução do número de hospitalizações e cirurgias, já que a possibilidade de cura para esse grupo de doenças inflamatórias do intestino é até o momento inexistente (DARR; KHAN, 2017).

A escolha apropriada da conduta terapêutica é a que melhor se adapta às necessidades de determinado indivíduo, dado ao fato da ampla heterogeneidade dos pacientes com DII (COLOMBEL; NARULA; PEYRIN-BIROULET, 2017).

Os 5-ASA são medicamentos anti-inflamatórios, que têm como principais representantes a mesalazina e a sulfassalazina. Os 5-ASA, administrados por via oral, são comumente a terapia mais prescrita para a DC, sendo que aproximadamente 60% dos pacientes com DC, recebem esses medicamentos em algum momento do curso da doença (SCHOEPFER et al., 2014). Os aminossalicilatos demonstraram ser superiores ao placebo na manutenção da remissão em pacientes com DC que passaram por intervenções cirúrgicas (GJULADIN-HELLON et al., 2019). Embora os 5-ASA tenham um perfil de segurança relativamente favorável, alguns eventos adversos raros, porém graves, como pancreatite, nefrite intersticial, pleurite e miopericardite têm sido relacionados ao seu uso (RANSFORD; LANGMAN, 2002).

Os corticosteroides são anti-inflamatórios esteroides com características imunossupressoras, que visam controlar a resposta imune inadequada nestas doenças. Um medicamento representante dessa classe é a budesonida, utilizada na indução de remissão na DC ileocecal. Sua ação é superior ao placebo e aos medicamentos do grupo dos 5-ASA, como a mesalazina (KUENZIG et al., 2014).

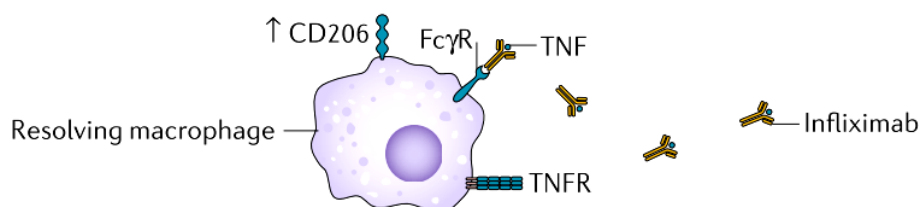
Alguns antibióticos podem ser adicionados como terapia medicamentosa para o controle de infecções do sistema digestório, além de controlar abscessos e fístulas perianais. São exemplos dessa classe o metronidazol e o ciprofloxacino (DC et al., 1995; THIA et al., 2009).



Os agentes imunomoduladores/ imunossupressores são fármacos utilizados no tratamento de fístulas e na manutenção de recorrências clínicas e cirúrgicas. A azatioprina e o metotrexato são os principais representantes dessa classe (ITAGAKI et al., 2012). A imunossupressão induzida pelo metotrexato pode resultar em efeitos adversos raros como hepatotoxicidade, citopenias e hipersensibilidade pulmonar (FOURNIER et al., 2010).

Além dos medicamentos convencionais utilizados no tratamento das DII, os agentes biológicos têm sido amplamente utilizados na prática clínica e incluem anticorpos bloqueadores de citocinas e outras moléculas envolvidas na inflamação intestinal. Dentre eles, destacam-se: anticorpos bloqueadores de TNF (Adalimumabe e Infliximabe), inibidores de moléculas de adesão que impedem a migração leucocitária (Natalizumabe e Vedolizumabe) e antagonistas de IL-12 e IL-23 (Ustekinumabe), com ação anti-inflamatória no intestino (AHLUWALIA et al., 2018; DE MATTOS et al., 2015).

Dentre várias citocinas, o TNF é um importante mediador envolvido na patogênese das DII. Medicamentos, como o Infliximabe, agem bloqueando o TNF e atuam neutralizando este mediador derivado de macrófagos inflamatórios (Figura 2). O Infliximabe também atua na recuperação da barreira epitelial (SUENAERT et al., 2002), na indução da motilidade dos fibroblastos intestinais, na cicatrização de lesões (DI SABATINO et al., 2007), promovem apoptose das células T e podem induzir a polarização de macrófagos regulatórios (NA et al., 2019; ZAEEM CADER; KASER, 2013). Entretanto, aproximadamente 30% dos pacientes descontinuem a terapia anti-TNF por não apresentarem resposta primária e outros 30 a 40% por apresentarem perda da resposta dentro de cinco anos de tratamento (PAPAMICHAEL et al., 2015).



Fonte: (NA et al., 2019)

Figura 2: Terapia atual de controle das doenças inflamatórias intestinais (DII) direcionada aos macrófagos.

O Infliximabe é um anticorpo IgG1 quimérico humano-murino que bloqueia a ação da citocina TNF e impede a ativação inflamatória mediada pelo receptor de TNF (TNFR) em macrófagos intestinais.

Outra proposta para o tratamento das DII é o uso de probióticos. A literatura tem evidenciado que o uso de probióticos é superior ao placebo e tão eficaz quanto ao uso da mesalazina na manutenção da remissão (DO; BAIRD; KOCKLER, 2010; SANG et al., 2010). Resultados promissores com uma mistura probiótica denominada VSL#3 têm sido relatados por diferentes autores. O VSL#3 tem apresentado bons resultados no tratamento profilático, além de auxiliar na manutenção da remissão em pacientes com RCU (BIBILONI et al., 2005; GIONCHETTI et al., 2000; MARDINI; GRIGORIAN, 2014; SOOD et al., 2009). Por outro lado, diferentes estudos têm evidenciado que o uso da terapia convencional, associada ao uso de probiótico, não melhora as taxas de remissão em pacientes com RCU leve e moderada. Além do fato de que estudos que avaliaram o uso de probióticos no tratamento da RCU são limitados no que tange ao desenho de ensaio clínico e ao uso de probióticos com diferentes microrganismos (DERIKX; DIELEMAN; HOENTJEN, 2016; NAIDOO et al., 2011; ROLFE et al., 2006).

As DII são um conjunto de doenças crônicas do trato gastrointestinal, de etiologia multifatorial, associadas a uma complexa interação entre a microbiota e o sistema imune, que resulta em uma resposta inflamatória anormal em indivíduos geneticamente suscetíveis. A disbiose é um quadro caracterizado pela alteração da composição das bactérias comensais do hospedeiro e está intimamente relacionada à patogênese das DII (BELKAID; HAND, 2014). Estudos recentes têm apontado o transplante de microbiota fecal (TMF) como uma nova alternativa terapêutica de correção dessa disbiose, atuando no aumento da probabilidade de remissão clínica na retocolite ulcerativa (COSTELLO et al., 2017; PARAMSOTHY et al., 2017). Entretanto a literatura a respeito do TMF ainda é escassa de estudos que abordem os efeitos adversos relacionados à utilização dessa terapia, de protocolos que estabeleçam parâmetros ideais em termos de via de administração, frequência, volume, preparação, tipo de doador e em quais fases das DII o TMF deve ser utilizado. A manutenção da indução da remissão da DC e da RCU a longo prazo e em pacientes pediátricos ainda também não foram elucidadas (IMDAD et al., 2018).

Apesar do grande número de terapias disponíveis no mercado para o tratamento das DII, ainda há relatos de pacientes refratários, graves efeitos colaterais associados aos medicamentos utilizados e elevado custo dos tratamentos disponíveis atualmente (PITHADIA; JAIN, 2011).

#### 1.4 Modelos experimentais das doenças inflamatórias intestinais

Nas últimas décadas, diferentes modelos de DII experimental têm sido desenvolvidos para se entender melhor a patogênese dessas doenças e para a busca de novos alvos de tratamento. Embora nenhum modelo reproduza perfeitamente o complexo quadro das DII, alguns modelos nos permitem mimetizar a patogênese deste espectro de doenças. Desta forma, estes modelos visam identificar genes envolvidos na suscetibilidade à DC e RCU e caracterizar células e moléculas do sistema imunológico que estejam envolvidas na patogênese das DII e que venham a ser consideradas essenciais para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (YAN et al., 2009).

Modelos experimentais das DII podem ser divididos em 5 grandes grupos: a) Modelos animais por depleção de genes (*knockout* - KO), como exemplo podemos citar camundongos IL-10<sup>-/-</sup>; b) modelo de ratos ou camundongos transgênicos, como camundongos transgênicos para IL-7 que expressam constitutivamente IL-7 em vários tecidos (WATANABE et al., 1999); c) modelo de colite espontânea, como camundongos C3H/HeJBir, que desenvolvem uma forma hereditária espontânea de DII idiopática (SUNDBERG et al., 1994); d) modelo de colite induzida por agente químico, dentre eles destacam-se o modelo de administração retal do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e a colite induzida pelo DSS, por via oral; e) modelo de transferência adotiva, exemplificado pela transferência de células TCD4<sup>+</sup>/CD45RB<sup>high</sup> (JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004; TAGHIPOUR et al., 2016).

Um bom modelo animal deve apresentar algumas características, tais como: intestino com alterações morfológicas, inflamação, sinais e sintomas, fisiopatologia e curso semelhante as DII apresentadas em humano (JURJUS; KHOURY; REIMUND, 2004). Dentre os modelos experimentais, os modelos de colite induzida por agentes químicos são os mais bem descritos e utilizados, principalmente por sua praticidade e rapidez de execução. Dentre os agentes químicos utilizados o DSS apresenta algumas vantagens em relação aos demais. Uma importante vantagem deste modelo é a possibilidade de se reproduzir uma colite aguda, crônica ou recidivante, simplesmente alterando a concentração e o tempo de administração do DSS. O modelo de colite induzida por DSS pode se desenvolver na ausência de resposta imune adaptativa mediada por células T, tendo em vista que tal modelo pode ser reproduzido em camundongos *Knockout* Rag1. Sendo assim, o modelo DSS é

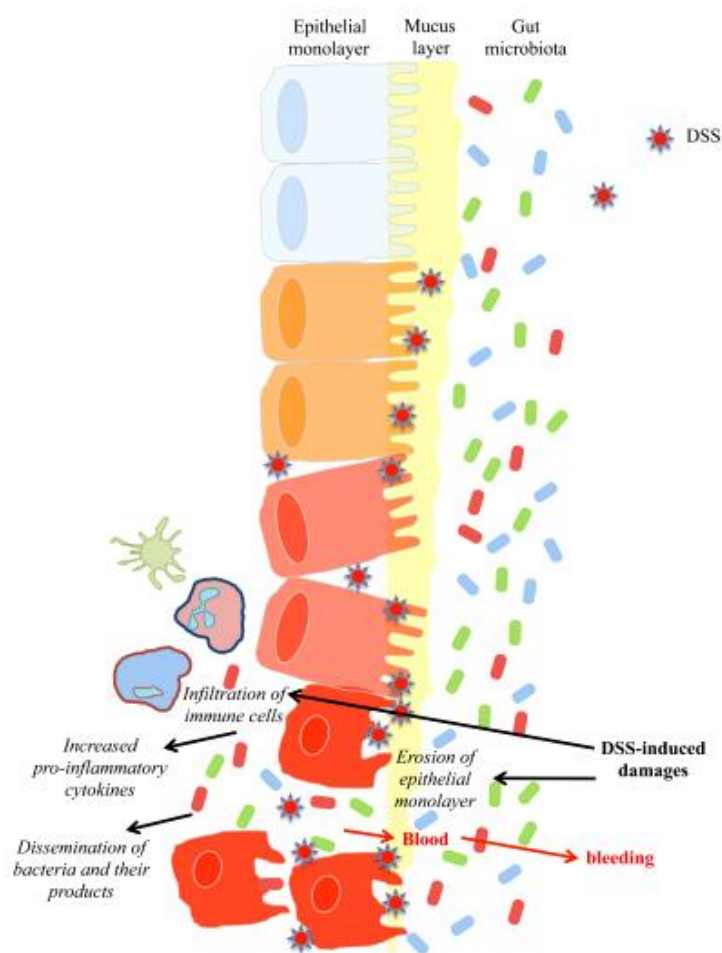
amplamente utilizado para estudos de mecanismos da imunidade inata na colite (WIRTZ et al., 2007).

O modelo de colite induzida por DSS apresenta elevada uniformidade e reprodutibilidade das lesões presentes no cólon (KIESLER; FUSS; STROBER, 2015), além de não existirem deleções ou manipulações genéticas artificiais que comumente não são observadas na DII humana (WIRTZ et al., 2007).

O modelo de colite induzida por DSS se reproduz bem em ratos e em diferentes linhagens de camundongos (PERŠE; CERAR, 2012). As diferenças na progressão e na resolução da colite experimental induzida em camundongos C57BL/6 e BALB/c estão relacionadas com a capacidade de cada linhagem orquestrar respostas inflamatórias e mecanismos de reparo tecidual, de acordo com os diferentes perfis de citocinas secretados pelas linhagens (MELGAR; KARLSSON; MICHAËLSSON, 2005). Sendo assim, camundongos C57BL/6 são mais susceptíveis à indução de colite por DSS que camundongos BALB/c (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002).

O DSS reproduz em modelo murino características clínicas e histológicas que mimetizam a RCU em humanos (YAN et al., 2009), além de apresentarem perfil de citocinas semelhantes (MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2008). Sendo assim, esse modelo de colite pode ser usado como um modelo relevante para a projeção dos dados encontrados em camundongos para a doença humana (MELGAR et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais o DSS induz a colite ainda não são bem elucidados. Porém, acredita-se que o DSS age primeiramente interferindo com a função da barreira intestinal e num segundo momento está associado à inflamação local. A Figura 3 representa um possível mecanismo de ação do DSS.



Fonte: (CHASSAING et al., 2014).

Figura 3: Representação esquemática do modelo de colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS).

O DSS possui carga negativa, o que o torna tóxico para o epitélio do cólon induzindo erosões que comprometem a integridade da barreira epitelial, resultando em uma maior permeabilidade intestinal. O DSS também possui propriedade anticoagulante que agrava o sangramento intestinal.

O modelo experimental de colite induzido por DSS caracteriza-se histologicamente por: alterações degenerativas da camada muscular, atipia celular e desorganização de células epiteliais colunares que dão origem a extensas lesões segmentares no epitélio, ausência de células caliciformes, presença de edema e recrutamento de células inflamatórias (SOUZA et al., 2016).

## 1.5 Macrófagos

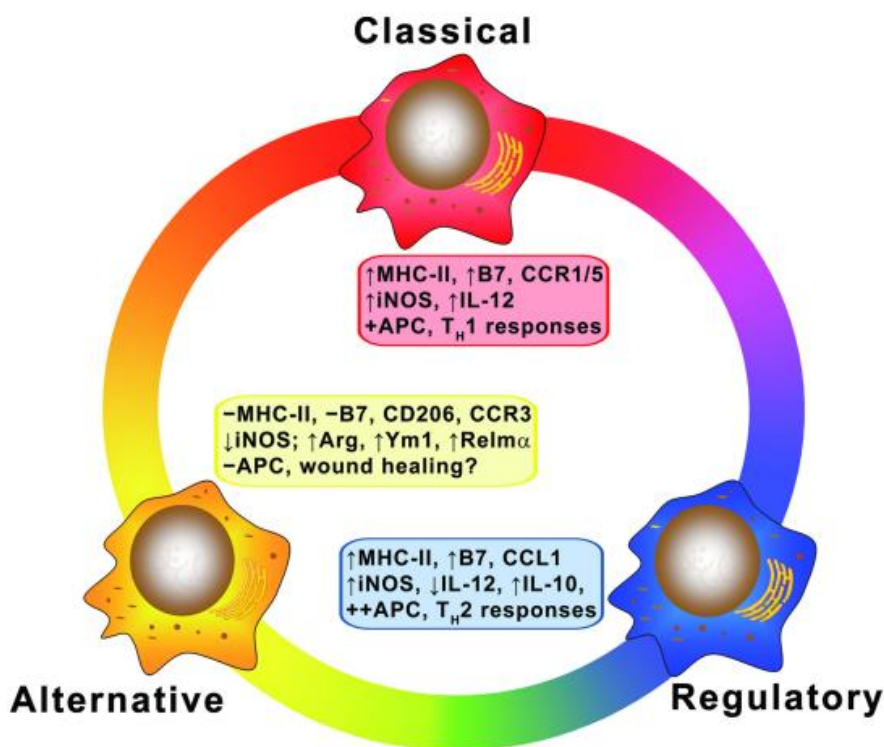
Macrófagos são células multifuncionais encontradas nos diferentes tecidos. São importantes fagócitos mononucleares reconhecidos por participarem das repostas imunes inata e adaptativa. Entretanto suas funções vão muito além da

imunidade (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Diferentes estudos têm apontado diversas funções dessas células, como por exemplo, a destruição de milhões de hemácias senescentes diariamente (KAWANE et al., 2001), funções no metabolismo sistêmico (HOTAMISLIGIL, 2006), desenvolvimento de tecidos e órgãos (GORDON; PLUDDMANN; MARTINEZ ESTRADA, 2014), produção de fatores de crescimento e matriz extracelular (OKABE; MEDZHITOV, 2016), reparo tecidual (POLLARD, 2009) e até mesmo, nos mecanismos de adaptação ao frio (NGUYEN et al., 2011). Mas todos estes papéis representam, talvez, um mesmo objetivo: manter a homeostase dos tecidos.

No contexto da resposta imunológica, macrófagos podem se comportar como células pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Os diferentes fenótipos que essas células adquirem são resultantes do perfil de citocinas e de outros sinais derivados dos tecidos, após agressões (GORDON; TAYLOR, 2005; MARTINEZ et al., 2008).

A simples definição proposta por Mills *et al.* (2000) de polarização de macrófagos clássicos (M1) e alternativos (M2) tornou-se obsoleta. De uma forma geral, a ativação de macrófagos pode resultar em populações heterogêneas com diferentes funções (GORDON; TAYLOR, 2005; HOPKINS et al., 2014; MOSSER, 2003). De fato, existe um amplo espectro de ativação de macrófagos (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Atualmente temos relatos da existência de pelo menos três populações diferentes de macrófagos: macrófagos ativados por via clássica, voltados basicamente para a função de defesa do organismo; macrófagos alternativamente ativados, com função de reparo de danos teciduais; e macrófagos ditos regulatórios que agem principalmente por mecanismos imunomoduladores controlando a inflamação (MOSSER; GONÇALVES, 2015; MURRAY, 2017). As três subpopulações de macrófagos já descritas estão representadas na Figura 4.



Fonte: (FLEMING; MOSSER, 2011).

Figura 4: Três subpopulações de macrófagos, com respectivas propriedades bioquímicas e fisiológicas.

Macrófagos classicamente ativados estão associados à defesa do hospedeiro, alta atividade microbicida e produção de citocinas pró-inflamatórias. Macrófagos alternativamente ativados promovem a eliminação de detritos, reparo tecidual e cicatrização de feridas. Macrófagos regulatórios possuem potente atividade anti-inflamatória, produzindo altos níveis de IL-10 e regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Os macrófagos classicamente ativados (CAM $\phi$ s) são vitais componentes da defesa do hospedeiro, apresentando alta atividade microbicida e produção de citocinas pró-inflamatórias (MURRAY; SPITALNY; NATHAN, 1985). Porém sua ativação requer um controle minucioso, pois as citocinas e os mediadores pró-inflamatórios gerados podem levar a danos teciduais, como observado nas DII (ZHANG; MOSSER, 2008).

Os macrófagos alternativamente ativados (AA-M $\phi$ ) são ativados na presença das citocinas IL-4 ou IL-13. Essas células promovem o reparo tecidual e a cicatrização de feridas (GORDON, 2003; STEIN et al., 1992).

Sutterwala e colaboradores (1998) foram os pioneiros em identificar uma população de macrófagos regulatórios após ativação *in vitro* com um agonista do receptor do tipo Toll (TLR) na presença de complexos imunes, formados por

hemácias de carneiro opsonizadas por IgG de coelho, o que resultou no desenvolvimento de uma população de macrófagos produtora de elevados níveis de IL-10 e baixas concentrações de IL-12 (SUTTERWALA et al., 1998). Uma característica das subpopulações de células com perfil regulatório é a necessidade de dois estímulos para induzir a sua atividade anti-inflamatória (EDWARDS et al., 2006; GERBER; MOSSER, 2001).

A ativação de macrófagos com um único estímulo, como um agonista de TLR, resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, mas essa estimulação não é suficiente para produzir altos níveis de IL-10. A adição de um segundo estímulo, representado por imunocomplexo, que se liga aos macrófagos através do *Fc-gamma receptor 1* (Fc $\gamma$ R), tem a função de "reprogramação" de sinalização suficiente para induzir a produção de IL-10. Grande parte dos estímulos de reprogramação estudados até o momento levam à ativação de uma proteína quinase regulada por sinalização extracelular (ERK), e uma proteína quinase ativada por mitógenos (p38) (LUCAS et al., 2005). A ativação de ERK resulta na fosforilação de histonas associadas ao promotor IL-10, tornando esse promotor mais acessível aos fatores de transcrição que induzem a expressão gênica de IL-10 (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007).

Fleming *et al.* (2015) avaliaram três estímulos distintos de reprogramação de macrófagos para o perfil regulatório: imunocomplexo de alta densidade (OVA – IgG anti OVA), prostaglandina E2 (PGE2) (200 nM) ou Adenosina (200  $\mu$ M). O outro sinal foi realizado utilizando lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10ng/ml. Todas as três populações celulares geradas expressaram altos níveis de transcritos de IL-10, fatores angiogênicos e de crescimento. As populações também secretaram baixas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12. Quando avaliados *in vivo*, todos os três fenótipos de macrófagos foram eficazes em aumentar a sobrevivência de camundongos com endotoxemia letal, induzida por 10 mg/kg dose de LPS.

A maior população de macrófagos residentes em camundongos está presente no intestino (LEE; STARKEY; GORDON, 1985). A caracterização de macrófagos intestinais requer uma abordagem baseada em diferentes marcadores. Atualmente estas células são identificadas e quantificadas, através de marcadores como: CD64 (Fc $\gamma$ RI), F4/80 e complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII), utilizados em combinação com Ly6C e associados a marcadores de exclusão de



linhagem (por exemplo, para linfócitos e granulócitos) (GRAINGER et al., 2017). Macrófagos residentes no intestino também apresentam alta expressão de CX3CR1 (BAIN; MOWAT, 2014).

A maioria dos macrófagos residentes no intestino são repovoados por monócitos sanguíneos provenientes da medula óssea, tanto em humanos, quanto em camundongos (BAIN et al., 2014; GRAINGER et al., 2017) e possuem uma meia vida de aproximadamente 3 a 5 semanas. Entretanto, estudos recentes em camundongos têm mostrado que existe uma heterogeneidade de ontogenia dos macrófagos intestinais, após ser identificada a existência de uma população de macrófagos auto renováveis que se originam de precursores embrionários, além da população de macrófagos provenientes de monócitos adultos derivados de medula óssea (DE SCHEPPER et al., 2018; SHAW et al., 2018).

A diferenciação de monócitos em macrófagos intestinais resulta em uma célula com capacidade fagocitária aumentada, com produção constitutiva de IL-10, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e de óxido nítrico sintase (iNOS) e que se apresentam anérgicas à estimulação de TLR (BAIN; MOWAT, 2014).

No intestino, os macrófagos possuem funções paradoxais, pois precisam manter a tolerância à microbiota comensal e aos diversos antígenos alimentares, mantendo a capacidade de resposta a possíveis microrganismos patogênicos (GRAINGER et al., 2017). Tais células controlam a inflamação excessiva em resposta a microrganismos comensais, favorecendo a expansão de células T reg, principalmente via produção de IL-10 (MOWAT, 2018). Os macrófagos intestinais também possuem as funções de limpeza, como remodelação de tecidos e remoção de células mortas ou senescentes (NAGASHIMA et al., 1996). São células capazes de produzir fatores solúveis que auxiliam na manutenção da integridade da barreira epitelial, como a PGE2 (GRAINGER et al., 2013). Macrófagos presentes nas camadas muscular e serosa são importantes na manutenção do peristaltismo (MULLER et al., 2014).

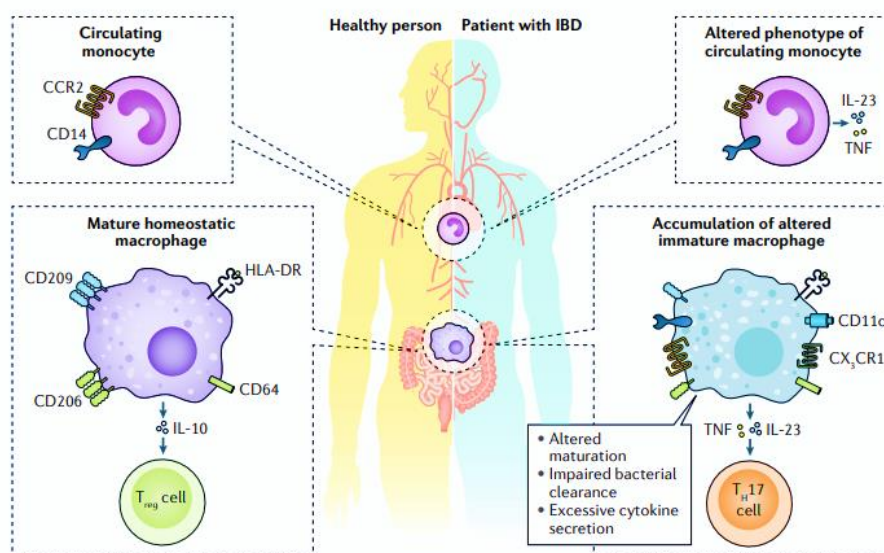
Estas células apresentam importante papel na homeostase do intestino (BELKAID; HAND, 2014) porém, quando ativados, macrófagos inflamatórios intestinais produzem grandes quantidades de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico, que podem levar à potencialização das lesões neste órgão (BAIN et al., 2013). A ativação do sistema imunológico para uma resposta inflamatória exacerbada é o que

caracteriza as doenças inflamatórias intestinais, e neste contexto, os macrófagos possuem um papel crucial na patogênese dessas doenças (LISSNER et al., 2015).

### 1.6 Participação dos macrófagos e da IL-10 na colite

Macrófagos são células de extrema importância durante todo o processo inflamatório, estando presentes durante o início e progressão da inflamação, bem como no reparo (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

A migração e a ativação exacerbadas de macrófagos têm sido considerados fatores cruciais para a patogênese das DII em indivíduos geneticamente suscetíveis (WEBER; SAURER; MUELLER, 2009). O perfil de monócitos e macrófagos em um indivíduo saudável, em homeostase, é diferente do perfil de monócitos/macrófagos de pacientes com DII ativa (NA et al., 2019), como mostrado na Figura 5.



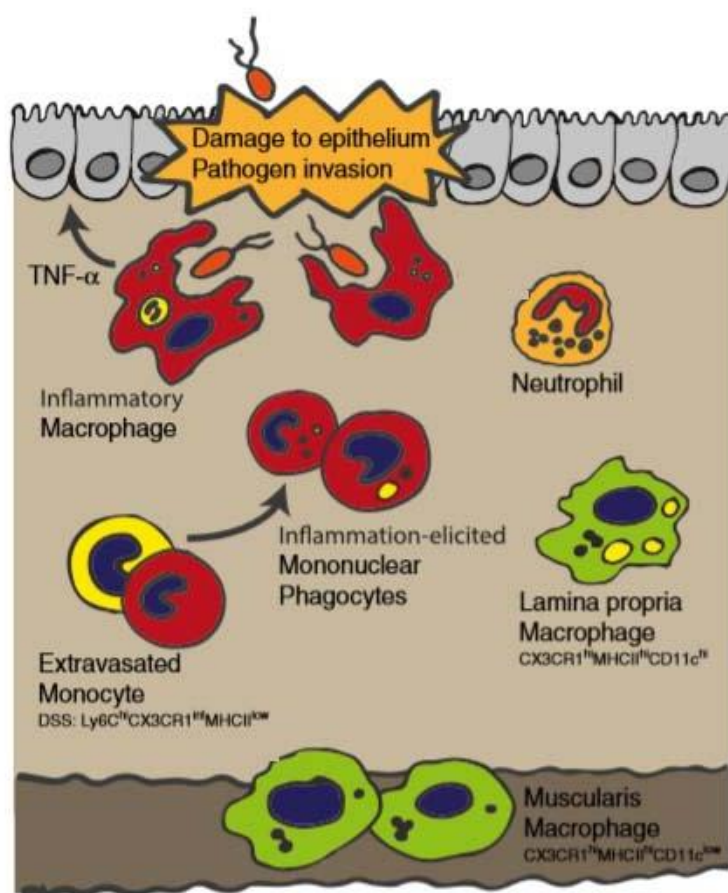
Fonte: (NA et al., 2019)

Figura 5: Alteração dos monócitos e macrófagos em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. Durante a homeostase, os monócitos presentes no sangue (CCR2<sup>+</sup>: Receptor de quimiocina tipo 2) migram para a lâmina própria e se tornam tolerantes, produzindo IL-10 constitutivamente. Esses macrófagos maduros favorecem a expansão de células T regulatórias (T<sub>reg</sub>). Entretanto, esse processo é desregulado em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII), o que resulta em um acúmulo de células pró-inflamatórias, dentre elas macrófagos no cólon inflamado. Essas células possuem a capacidade de induzir células T patogênicas auxiliares tipo 17 (Th17), que respondem secretando citocinas pró-inflamatórias, como IL-23, IL-17 e TNF. Monócitos circulantes de pacientes com DII ativa também são caracterizados por secreção aumentada de IL-23 e TNF.

A colite experimental murina, induzida por DSS, envolve principalmente células da imunidade inata, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, uma

vez que a doença ocorre em camundongos deficientes em células T e B (ARRANZ et al., 2012; BERNDT et al., 2007; FAROOQ et al., 2009).

O DSS promove a ruptura direta da barreira epitelial, favorecendo a entrada de bactérias intestinais na mucosa lesada, culminando na perpetuação da inflamação da mucosa, com aumento do infiltrado inflamatório e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, mimetizando a doença que ocorre em humanos (OKAYASU et al., 1990). A Figura 6 retrata a migração de monócitos  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{CX3CR1}^{\text{int}}\text{MHCII}^{\text{low}}$  para o trato gastrointestinal e a diferenciação em macrófagos inflamatórios, após a administração de DSS.



Fonte: Adaptado de (GRAINGER et al., 2017).

Figura 6: Macrófagos na inflamação intestinal em quadro de colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS).

Em homeostase, os macrófagos residentes no intestino apresentam alta expressão de CX3CR1 ( $\text{CX3CR1}^{\text{hi}}$ ). Entretanto no modelo experimental de inflamação intestinal induzida pelo DSS há a migração rápida de monócitos  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  (inflamatórios), que se diferenciam em macrófagos  $\text{CX3CR1}^{\text{int}}$  no tecido. Essas células possuem um perfil pró-inflamatório, caracterizado pela produção de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Macrófagos apresentam papel fundamental na patogênese e de forma paradoxal, no controle das DII, visto que a depleção de fagócitos mononucleares intestinais, via a utilização de lipossomas contendo clodronato em camundongos C57BL/6 e BALB/c, está relacionada à gravidade da colite induzida por DSS, com aumento dos escores histopatológicos, maior perda de massa corporal, fezes mal formadas e diarreicas, sangramento retal e encurtamento do cólon (QUALLS et al., 2006).

A IL-10 tem papel fundamental na manutenção da função dos macrófagos na mucosa gastrointestinal e na homeostase intestinal (HAYASHI et al., 2013; MALOY; POWRIE, 2011; MANTOVANI; MARCHESI, 2014; MAYNARD et al., 2007; SHOUVAL et al., 2014; ZIGMOND et al., 2014). Macrófagos provenientes de camundongos com deficiência do receptor de IL-10 apresentam aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios que resultam em colite espontânea, como iNOS, IL-23 e IL-12 (ZIGMOND et al., 2014). Similarmente, pacientes que apresentam polimorfismo no promotor de IL-10, apresentam níveis séricos reduzidos de IL-10, associados às DII (EDDIE IP et al., 2017; FRANKE et al., 2008).

Diversos são os exemplos de modelos experimentais que utilizam a IL-10 como controle das DII. Hayashi *et al.* (2013) demonstraram que a administração de *Clostridium butyricum* em camundongos, induzia a produção de IL-10 pelos macrófagos, evitando o desenvolvimento de colite experimental. O trabalho de Steidler *et al.* (2000) mostrou que a liberação da IL-10, diretamente no intestino, por bactérias transgênicas da espécie *Lactococcus lactis* apresentou excelente resultado no controle da doença experimental. Na tentativa de realizar uma pesquisa translacional, a continuação deste trabalho foi publicada em 2006 com resultados promissores para a terapêutica das DII, ao tratar 10 pacientes com DC com *L. lactis* geneticamente modificado e observar que os pacientes apresentavam menor índice de atividade de doença, maior produção de IL-10 local e raros efeitos adversos (BRAAT et al., 2006).

O importante papel desempenhado pelos macrófagos intestinais na manutenção da homeostase, na evolução de doenças inflamatórias e sua intensa relação com a IL-10, nos direciona para a necessidade de estudos mais aprofundados nesta área, para um melhor entendimento das funções desta célula nos quadros de DII, assim como o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para esse espectro de doenças até então incuráveis (GRAINGER et al., 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

As DII constituem um importante problema mundial de saúde pública com o significativo aumento de sua incidência e prevalência (MOLODECKY et al., 2012).

O aumento gradual da prevalência dessas doenças resultará dentro de um curto período de tempo em elevados custos de saúde, maiores até que os valores despendidos para cuidados de pacientes portadores de asma, hipertensão e doença pulmonar obstrutiva crônica (GUNNARSSON et al., 2012).

Dados de mortalidade revelam um aumento no número de mortes a médio e longo prazo entre os pacientes com DII, sendo mais pronunciadas em crianças e adolescentes (JESS; FRISCH; SIMONSEN, 2013).

O diagnóstico das DII está associado a um impacto substancial na baixa qualidade de vida do paciente (bem-estar físico, social e emocional), no comprometimento da produtividade deste indivíduo no trabalho e no aumento do número de cirurgias e hospitalizações no Brasil (PARRA et al., 2019).

Somado a todos estes fatos, ainda temos as limitações inerentes ao tratamento dos pacientes, como efeitos adversos relacionados à utilização dos medicamentos convencionais e existência de pacientes refratários (PITHADIA; JAIN, 2011).

Os estudos descritos na literatura, principalmente com modelo experimental em animais, têm descrito a importância dos macrófagos na patogênese da colite e nos processos de reparo (ANDERSON et al., 2013; ARRANZ et al., 2012; HAYASHI et al., 2013; HEINSBROEK; GORDON, 2009; HUNTER et al., 2010; LEUNG et al., 2013; LIN et al., 2014), além de apontarem a IL-10 como promissora terapia para as DII (BARBARA et al., 2000; BRAAT et al., 2006; DUCHMANN et al., 1996; GROOL et al., 1998; SASAKI et al., 2005). Entretanto, a prática clínica tem apresentado muitas variações, sem resultados conclusivos de que a IL-10 seria realmente uma boa escolha (BICKSTON; COMINELLI, 2000; MANTOVANI; MARCHESI, 2014).

A proposta de induzir um fenótipo pré-resolutivo em macrófagos tem se apresentado como uma nova abordagem terapêutica para controlar a inflamação intestinal e restaurar a homeostase e a função tecidual (NA et al., 2019). Tal ideia é corroborada por evidências que mostram que a maioria das terapias clássicas das DII interferem com as funções dos macrófagos, como exemplo a mesalazina que atua inibindo vias de sinalização inflamatórias nos macrófagos (BANTEL et al., 2000).

Tendo em vista a plasticidade de ativação dos macrófagos e a possibilidade de se manipular populações individuais estimulando a indução de um perfil regulatório de produção de IL-10, a proposta do estudo em questão é a de elucidar melhor a função dos macrófagos na colite e avaliar o efeito do tratamento da DII experimental, através do uso de terapia celular autóloga, com macrófagos regulatórios, por nós denominada REMAC (*Regulatory Macrophage Cell Therapy*). Nossa hipótese é de que estas células serão atraídas ao local da lesão (intestino inflamado) e lá produzirão IL-10 localmente, aumentando desta forma a eficácia da terapia.

### 3. OBJETIVO

Estudar o papel dos macrófagos e avaliar o efeito da imunoterapia celular realizada com a administração destas células estimuladas para um perfil regulatório de produção de IL-10 na resposta inflamatória associada à colite em camundongos.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o papel de macrófagos sem estímulos, macrófagos classicamente ativados e da terapia imune celular com macrófagos regulatórios – REMAC (*Regulatory Macrophage Cell Therapy*) sobre os parâmetros descritos abaixo para avaliação de colite experimental.
  - Padronizar os estímulos para diferentes perfis de ativação de macrófagos;
  - Avaliar a eficácia do tratamento utilizando uma dose de macrófagos e duas doses da terapia celular;
  - Calcular o Índice de atividade da doença (perda de massa corporal, diarreia e sangramento nas fezes);
  - Realizar análises macroscópicas e histológicas do cólon;
  - Analisar os níveis de citocinas no soro dos camundongos;
  - Avaliar a migração de macrófagos do local da administração (peritônio) para o cólon.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Camundongos SPF (*Specific Pathogen Free*), C57BL/6, selvagens, machos, entre 6-8 semanas de idade, e massa corporal entre 18 - 23g foram obtidos do Biotério Central da UFMG.

Camundongos fluorescentes B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)<sup>Luo/J</sup> (The Jackson Laboratory, código 007676), mantidos no *background* C57BL/6, que expressam fluorescência vermelha (*TdTomato*), foram gentilmente cedidos pelo Prof. Alexander Birbrair do departamento de Patologia Geral.

Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Patologia Geral, sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/ escuro de 12h) com acesso à ração e água controlados durante todo experimento.

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), com os números de protocolo: 212/2017 (Anexo 1) e 34/2020 (Anexo 2).

### 4.2. ETAPA 1 – Isolamento e estímulos de macrófagos (Experimentos *in vitro*)

A primeira etapa desse trabalho foi elaborada com o objetivo de determinar o melhor perfil de ativação dos macrófagos para o perfil regulatório. Para o desenvolvimento desta primeira etapa foram utilizados 4 camundongos da linhagem C57BL/6.

#### 4.2.1. Cultivo de macrófagos derivados de medula óssea

O cultivo de macrófagos de medula óssea foi realizado de acordo com Gonçalves e Mosser (2015). Brevemente, progenitores de medula óssea do fêmur e da tíbia foram extraídos de camundongos C57BL/6 saudáveis. A extração foi realizada em capela de fluxo laminar e após a retirada das epífises ósseas, as células foram lavadas de dentro dos ossos com salina tamponada (PBS - *phosphate buffered saline*), suplementada com 50 UI/ml de penicilina (United States Biological, USA) e 50µg/ml de estreptomicina (United States Biological, USA). As células foram então centrifugadas a 350g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM, Sigma Aldrich, USA), suplementado



com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Brasil), 50 UI/ml de penicilina e 50µg/ml de estreptomicina e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 contendo fator estimulador de colônia (M-CSF – *Macrophage Colony Stimulating Factor*), necessário para diferenciação das células precursoras da medula em macrófagos. As células foram mantidas em placas de petri (Corning, USA) e então acondicionadas em incubadora a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5% e umidade a 75%, por 7 – 10 dias (GONÇALVES; MOSSER, 2015).

Após a diferenciação, os macrófagos foram retirados das placas de petri com *cellstripper*® (Corning, USA), centrifugados a 300g por 10 minutos a 4°C e ressuspendidos em meio DMEM completo (sem sobrenadante de L929). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi avaliada pela coloração com azul de Tripán.

#### **4.2.2. Estímulo de macrófagos derivados de medula óssea**

Após contagem em câmara de Neubauer os macrófagos foram plaqueados em placas de 24 poços (Biofil, Brasil) para realização dos diferentes estímulos propostos para ativação dessas células.

Para concluirmos este objetivo utilizamos o protocolo descrito por Mosser e Gonçalves (2015), com pequenas alterações. Resumidamente,  $5 \times 10^5$  macrófagos foram distribuídos por poço num volume final de 0,5 ml de DMEM completo (MOSSER; GONÇALVES, 2015).

Aos macrófagos do grupo controle (M $\phi$ ), compostos por macrófagos sem estímulo, foi adicionado somente DMEM completo.

O segundo grupo de macrófagos foi ativado na presença de LPS 10ng/ml (*Ultrapure LPS, E. coli 0111:B4*; Invivogen, USA) (FLEMING et al., 2015), obtendo assim os macrófagos classicamente ativados (CAM $\phi$ s).

Para a polarização dos macrófagos para um perfil regulatório, três diferentes imunocomplexos em combinação com LPS foram testados. Para isso, testou-se qual seria melhor estímulo para produção de IL-10. Os seguintes imunocomplexos foram produzidos e testados: Beads de poliestireno adsorvidas a IgG de coelho (DELBY et al., 2020, no prelo), OVA/ IgG anti-OVA (MOSSER; GONÇALVES, 2015) e Prostaglandina E2 (PGE2) (FLEMING et al., 2015).

Até o presente momento, não há descrito na literatura marcadores específicos para macrófagos regulatórios, portanto o ensaio imunoenzimático (ELISA) tem sido a

melhor alternativa para identificar tais células, tendo em vista que macrófagos regulatórios produzem grandes quantidades de IL-10 e reduzem a produção de IL-12/23(p40) (GERBER; MOSSER, 2001; MOSSER; ZHANG, 2008; PULL et al., 2005). Portanto foi realizado o ELISA para quantificação de IL-10 e IL-12, para então comprovar e comparar a eficiência dos diferentes estímulos realizados.

#### **4.2.3. Produção de macrófagos regulatórios utilizando OVA/ IgG anti-OVA**

A ligação entre ovoalbumina (OVA) e anticorpos IgG anti-OVA formam imunocomplexos solúveis que na presença do LPS polarizam os macrófagos para um perfil regulatório. Resumidamente, em um eppendorf de 1,5ml foram adicionados 250µl de DMEM completo (sem sobrenadante de L929), 14µl (14µg) de OVA (Worthington Biochemical, USA) e por fim foi adicionado vagorosamente 50µl do anticorpo IgG anti-OVA (Novus Biologicals, USA), perfazendo o volume final de 0,314ml. A mistura resultante foi colocada em homogeneizador por 30 minutos em temperatura ambiente.

Para ativar os macrófagos foi utilizada a concentração de 10ng/ml de LPS e 50µl do imunocomplexo OVA/anti OVA por poço ( $5 \times 10^5$  macrófagos em um volume final de 0,5 ml de DMEM completo).

#### **4.2.4. Produção de macrófagos regulatórios utilizando Beads/IgG de coelho**

A ligação entre as Beads de poliestireno e o anticorpo IgG de coelho (10 mg/ml) foram utilizadas para a polarização de macrófagos regulatórios, de acordo com Delby *et al.* (2020, no prelo). Brevemente, as Beads de poliestireno, de 1,1µm, (Sigma Aldrich, USA) foram lavadas com PBS estéril três vezes e centrifugadas utilizando o programa de centrifugação: 680g, 5 minutos a 4°C. Após preparo das Beads essas foram adicionadas ao IgG de coelho (Innovative Research, USA) e ao PBS estéril, na proporção de 10% (p/v), sendo 50µl das Beads de IgG, 66,7µl de Beads e 383,3µl de PBS. A mistura preparada foi mantida em rotor a 4°C, *overnight*. No dia seguinte antes de sua utilização o imunocomplexo preparado foi centrifugado a 2.700g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em 0,5ml de DMEM completo. Para ativar os macrófagos *in vitro*, 50µl do imunocomplexo em combinação com 10ng/ml de LPS foram utilizados por poço. Já para os experimentos *in vivo*, o protocolo terapêutico de imunoterapia dos animais

com colite, consistiu na administração de  $1 \times 10^6$  macrófagos regulatórios ativados com 100 $\mu$ l de IC Beads + IgG em combinação com 10ng/ml de LPS, por animal.

#### **4.2.5. Produção de macrófagos regulatórios utilizando Prostaglandina (PGE2)**

Para o terceiro estímulo de ativação dos macrófagos regulatórios foi utilizado 200 nM PGE2 (Cayman Chemical, USA) em combinação 10ng/ml de LPS por poço. Brevemente, uma alíquota de PGE2 congelada e armazenada em álcool etílico absoluto, na concentração de 10mM, foi diluída em meio de cultura DMEM, para ser utilizada na concentração final de 200nM por poço. Primeiramente a PGE2 foi adicionada ao poço com  $5 \times 10^5$  macrófagos, seguida pelo LPS (10ng/ml).

#### **4.2.6. Determinação dos níveis de IL-10 e IL-12 em sobrenadante de cultura (ELISA)**

Níveis de IL-10 e IL-12 foram dosados no sobrenadante resultante da cultura de macrófagos estimulados com imunocomplexo OVA/anti-OVA + LPS; imunocomplexo Beads/IgG de coelho + LPS; Prostaglandina E2 + LPS; somente LPS; somente Beads/IgG e como controle macrófagos com DMEM completo.

A técnica foi realizada utilizando-se os kits de anticorpos adquiridos dos fabricantes *R&D Systems* e *BD Biosciences*, para dosagem de IL-10 e IL-12, respectivamente. Seguiram-se os protocolos recomendados pelos fabricantes para as dosagens e o protocolo descrito por Hornbeck (2015).

O sobrenadante foi coletado aproximadamente 16 horas após os estímulos terem sido realizados, e as amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização no ELISA.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços (R&D Systems, USA). As placas foram sensibilizadas com 100 $\mu$ l/poço de solução do anticorpo monoclonal anti-camundongo para a citocina em questão e incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  *overnight*. No dia seguinte foram realizadas três lavagens das placas com Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,4. Posteriormente adicionou-se às placas o tampão de bloqueio – Reagente diluente (1% BSA em PBS, pH 7,4) e estas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação uma nova etapa de lavagem foi realizada. Adicionou-se 100 $\mu$ l/poço dos padrões (39-5000pg/ml) ou 100 $\mu$ l das amostras e incubou-se as placas por 2 horas em temperatura ambiente. Após mais uma lavagem das placas, adicionou-se 100 $\mu$ l/poço de solução de anticorpo

biotinilado anti-IL10 de camundongo diluído em reagente diluente e incubou-se as placas por mais 2 horas. Após nova lavagem foi pipetado 100µl/poço da solução de Streptoavidina - HRP também diluída em reagente diluente (1:40), seguida de 1 hora de incubação em temperatura ambiente. Foi realizada a última lavagem das placas e adicionado 100µL/poço do revelador TMB – tetrametilbenzidina (BD Biosciences, USA), e então incubado em temperatura ambiente por 20 minutos, ao abrigo da luz. Após o desenvolvimento da cor foi adicionado 50µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para parar a reação e por fim a leitura das placas foi realizada no leitor de ELISA (Epoch - Biotek) no comprimento de onda de 450nm.

### **4.3. ETAPA 2 – Modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo DSS**

Para estabelecermos o melhor modelo de colite a ser utilizado em nosso estudo, nosso objetivo nessa etapa foi o de padronizar a concentração do DSS administrada por via oral para os animais.

A indução da colite foi realizada por meio da administração de dextrana sulfato de sódio em duas concentrações diferentes, ofertado na mamadeira, como única fonte líquida durante sete dias, segundo adaptação do protocolo proposto por Chassaing e colaboradores (2014). A solução de DSS era renovada e mensurada diariamente durante o período de 7 dias. Aos animais do grupo controle foi ofertada água autoclavada, também devidamente renovada e mensurada durante todo o experimento.

O DSS usado para a indução de colite foi do fabricante *MP Biobedicals*, com peso molecular de 36 – 50 kDa.

#### **4.3.1. Modelo de colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6**

O DSS foi administrado por 7 dias consecutivos, nas concentrações de 2,5% (KRIEGLSTEIN et al., 2001) e 3% (QUALLS et al., 2006).

Os camundongos, com idade entre 6-8 semanas e massa corporal de aproximadamente 20 gramas foram pesados e posteriormente separados de maneira homogênea em três grupos: Grupo controle (somente ingestão de água autoclavada); Grupo DSS 2,5% e Grupo DSS 3%.

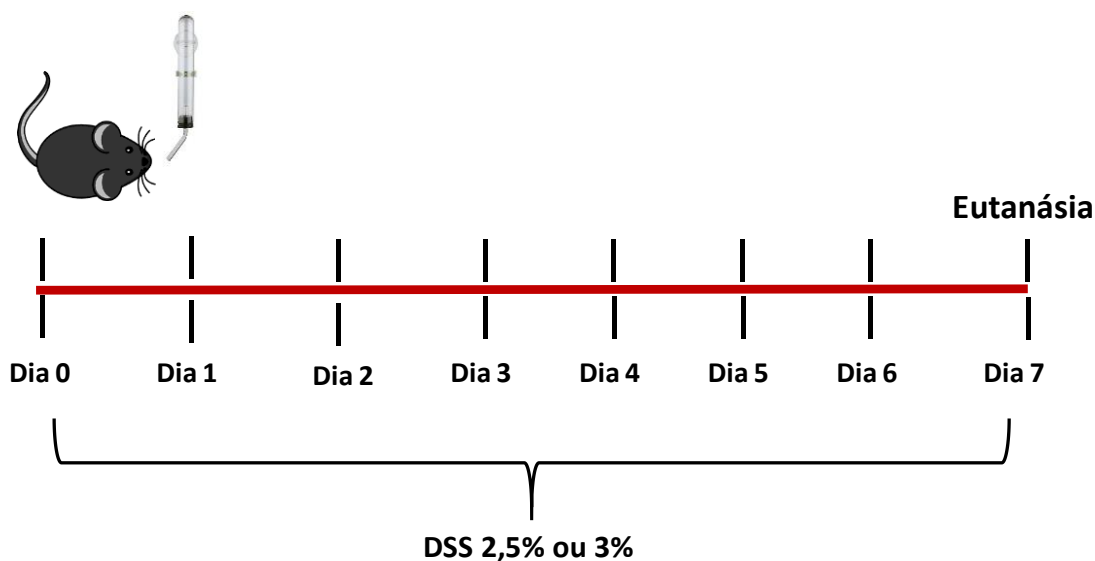
Os animais foram monitorados todos os dias durante o protocolo de indução de colite. A solução de DSS ou a água e a ração foram mensuradas e completadas

diariamente. Ao final do sétimo dia de experimento, os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical.

#### 4.3.2. Delineamento experimental

Para o desenvolvimento desta etapa foram utilizados 15 camundongos machos da linhagem C57BL/6.

Os animais foram divididos em três grupos: Grupo controle (somente ingestão de água autoclavada), (n=5); Grupo 2,5% DSS, (n=5); Grupo 3% DSS, (n=5).



#### 4.4. Avaliação dos sinais clínicos e determinação do índice de atividade da doença (IAD)

Os animais foram pesados e monitorados clinicamente, durante o período experimental, sempre na parte da manhã, a fim de evitar variações durante o dia. Para análise do desenvolvimento ponderal, a massa obtida no início da indução da colite (dia 0) foi considerada 100%, sendo as alterações diárias (perda ou ganho) computadas individualmente em relação à massa inicial e expressas em porcentagem. Após a pesagem dos animais, esses eram colocados individualmente em caixas de acrílico por cerca de 10 minutos para avaliação da consistência e da presença de sangue nas fezes. Para a análise da presença de sangue oculto, utilizou-se o kit de teste de sangue oculto *Hexagon obscreen* adquirido da distribuidora *In Vitro*, catálogo: 28220.

O IAD é um índice que tem por objetivo a avaliação clínica da progressão da colite. Este índice tem se mostrado de grande relevância na análise dos parâmetros

clínicos característicos da colite. Os parâmetros avaliados por este índice são análogos aos sintomas observados em humanos. Tal índice consiste na pontuação combinada entre a perda de massa corporal durante a colite em relação à massa inicial, a consistência das fezes e a presença de sangramento.

A porcentagem de massa corporal foi calculada através da diferença entre a massa inicial (primeiro dia do experimento) e a massa do dia da medição subsequente, seguindo-se desta forma, com medições todos os dias, até o último dia de experimentação. A diarreia foi observada pela presença de muco e/ou material fecal aderido à pele do ânus do animal. A presença da diarreia pôde ser confirmada pela ausência da formação de fezes bem formadas e/ou pela presença de material fecal fluido, contínuo no cólon após eutanásia e excisão do cólon. As pontuações do IAD foram atribuídas segundo parâmetros propostos por Kang e colaboradores (2006), como mostrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Pontuações dos sinais clínicos para cálculo do índice de atividade de doença (IAD).

Pontuação	Perda de massa (%)	Diarreia	Sangramento
0	Ausente	Ausente	Ausente
1	01-05%		
2	05-10%	Moderado	Oculto
3	11-15%		
4	> 15%	Severa	Aparente

Fonte: (KANG et al., 2006)

#### 4.5. Comprimento do cólon

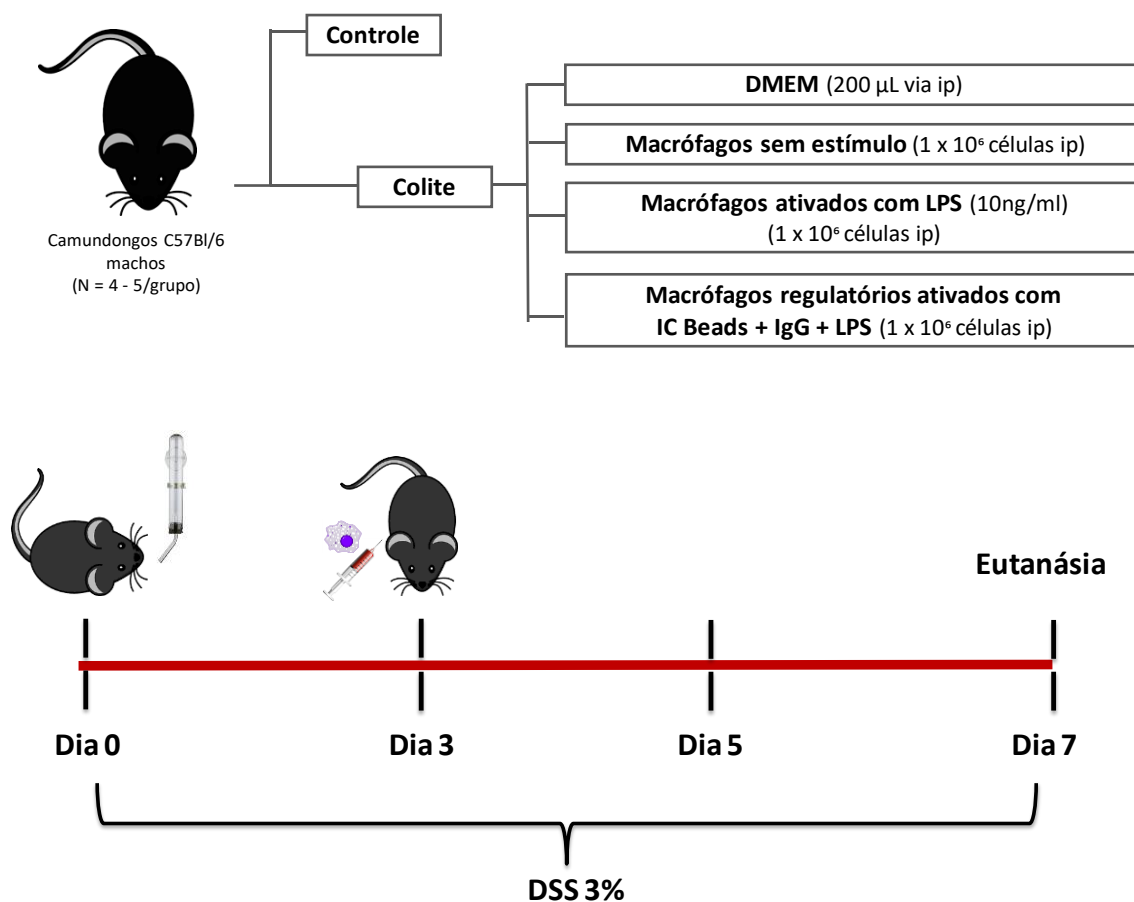
A mensuração do comprimento do cólon foi realizada com o auxílio de uma régua comum de 30 cm e os resultados obtidos foram utilizados para calcular a média de cada grupo.

#### 4.6. ETAPA 3 – Colite com Imunoterapia – Uma dose de macrófagos.

##### Delineamento experimental

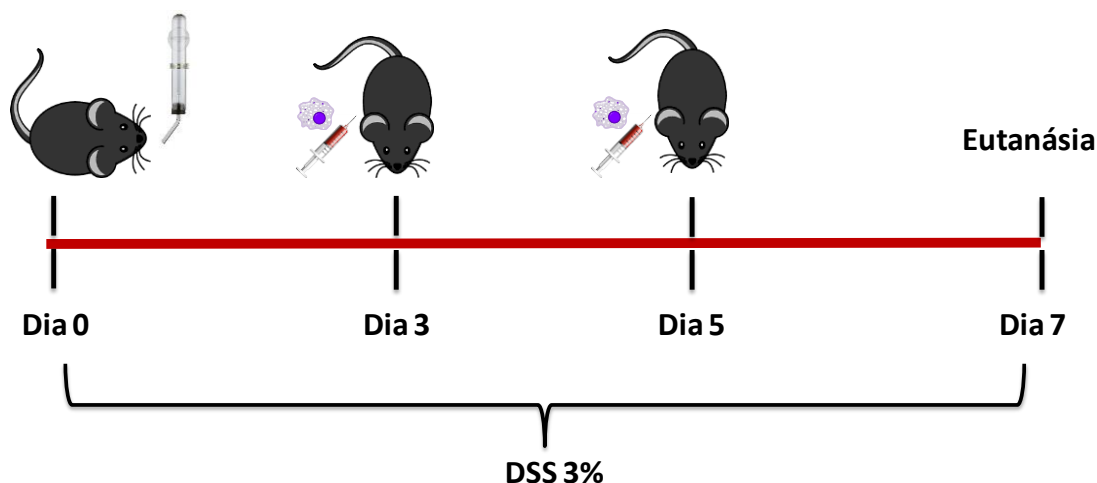
Num segundo momento, após a padronização do melhor modelo, iniciamos o primeiro protocolo de tratamento dos animais com colite. Nesse protocolo, propusemos a administração de uma dose de macrófagos com diferentes perfis de ativação no terceiro dia de colite. Os macrófagos foram ativados *in vitro* por 2 horas,

com os diferentes estímulos previamente padronizados, e então administrados por via intraperitoneal (IP) em cada animal. Os delineamentos desta etapa estão apresentados abaixo.



#### 4.7. ETAPA 4 – Colite com Imunoterapia – Duas doses de macrófagos. Delineamento experimental

No segundo protocolo de terapia celular, propusemos a administração das células em duas doses, no terceiro e no quinto dia de indução da colite. Novamente os macrófagos foram ativados *in vitro* por 2 horas, com os diferentes estímulos previamente padronizados, e então administrados por via intraperitoneal em cada animal. Para acompanhamento da evolução da colite e a eficácia dos tratamentos propostos, foram avaliados a massa corporal dos animais e o consumo alimentar durante os 7 dias de consumo do DSS. O delineamento desta etapa está apresentado abaixo.



#### 4.8. Avaliação do consumo de ração

O consumo de dieta foi mensurado por meio da verificação do peso da sobra da ração na gaiola e do peso de ração ofertado no dia anterior. Assim sendo, foi realizada a avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e/ou tratados com diferentes perfis de ativação de macrófagos, e os valores computados foram expressos em consumo (g)/ grupo/ dia.

#### 4.9. Coleta de sangue e soro

Os animais foram sedados com isoflurano e o sangue foi retirado do seio orbital, através da exérese do globo ocular com auxílio de uma pinça, e acondicionado em tubos eppendorfs de 1,5ml na ausência de anticoagulante, para posterior centrifugação (HOFF, 2000). Imediatamente após a coleta do sangue terminal, o animal foi eutanasiado por deslocamento cervical. Para a separação do soro, o sangue foi centrifugado a 3.000g por 10 minutos. Após a centrifugação, o soro foi coletado com o auxílio de uma pipeta e congelado a -80°C para posteriores análises de citocinas.

#### 4.10. Avaliação macroscópica do cólon

No sétimo dia de indução da colite, os animais foram pesados, sedados e posteriormente eutanasiados. O cólon foi removido, pesado, medido, fotografado e aberto longitudinalmente sobre um papel filtro (em toda a extensão) e cuidadosamente limpo com PBS. As amostras de cólon dos diferentes grupos experimentais foram avaliadas macroscopicamente segundo metodologia adaptada



de Morris e colaboradores (1989) que leva em consideração a intensidade das principais lesões presentes na mucosa. Cada amostra recebeu uma pontuação de 0 a 4, de acordo com o dano macroscópico visível (Tabela 2).

Tabela 2: Critérios para pontuação de lesões macroscópicas.

Pontuação	Critérios macroscópicos avaliados
0	Ausência de lesões macroscópicas
1	Apenas eritema da mucosa
2	Edema de mucosa e sangramento discretos ou pequenas erosões
3	Edema moderado, úlceras ou hemorragia
4	Ulceração/erosões graves, edema e necrose tecidual

Fonte: Adaptado de (MORRIS et al., 1989).

#### 4.11. Análises histológicas

Após criteriosa avaliação macroscópica, o cólon foi direcionado para o preparo histológico. Este foi estendido com a serosa em contato com o papel filtro e todo o seu conteúdo lavado delicadamente com PBS (pH 7,4), evitando-se danos à mucosa. Posteriormente os segmentos teciduais foram transferidos para a solução de Bouin contendo 2% de ácido acético glacial, na qual foram mantidos por aproximadamente 5 minutos. O cólon pré-fixado foi enrolado em espiral com a mucosa virada para o interior de modo a formar rolos da porção distal (ânus) para a extremidade proximal (ceco) (ARANTES; NOGUEIRA, 1997). Este procedimento permite mostrar a totalidade do comprimento do cólon, evidenciando as lesões presentes em toda extensão do órgão, o que nos permite um maior detalhamento das lesões histológicas presentes, quando comparado com análises realizadas em cortes transversais ou longitudinais do cólon. Os rolos foram mantidos em formol 4% por aproximadamente 5 dias, sendo que a solução foi trocada após as primeiras 24 horas. O material foi então processado rotineiramente para inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 3 – 5 micrômetros que foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) (Figura 7), Tricrômico de Masson e coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) e *Alcian Blue* para análises histopatológicas. Todas as lâminas foram analisadas pela profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes (Departamento de Patologia Geral/UFMG) que não teve acesso aos códigos das

mesmas. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.



Figura 7: Rolo do intestino grosso (cólon).

Imagem digitalizada de um corte histológico do rolo de cólon corado com hematoxilina e eosina (H&E).

A atribuição de escore às análises histológicas foi realizada através da soma de cinco parâmetros: destruição da camada mucosa, inflamação, espessamento da camada muscular, presença/ausência de abscessos de criptas e células caliciformes. Sendo a pontuação máxima 11 (MCCAFFERTY et al., 2000). Os cinco parâmetros avaliados foram analisados da seguinte forma: Extensão da destruição da arquitetura da camada mucosa, 0–3 [0, ausente; 1, discreta; 2, moderada; 3, dano intenso]; Presença e grau de infiltração celular, 0–3 [0, ausente; 1, discreta; 2, moderada; 3, infiltrado transmural]; Extensão do espessamento da camada muscular, 0–3 [0, ausente; 1, discreta; 2, moderada; 3, espessamento intenso]; Presença ou ausência de abscessos das criptas [0, ausente; 1, presente]; Presença ou ausência de depleção das células caliciformes [0, ausente; 1, presente] (Tabela 3).

Tabela 3: Critérios para pontuação de lesões microscópicas.

Parâmetro	Pontuação
<b>Extensão da destruição da camada mucosa</b>	0 - Ausente
	1 - Discreta
	2 - Moderada
	3 - Destruição das criptas e lesão do epitélio
<b>Presença e grau de infiltração celular</b>	0 - Ausente
	1 - Discreta
	2 - Moderada
	3 - Inflamação transmural
<b>Espessamento da camada muscular</b>	0 - Ausente
	1 - Discreta
	2 - Moderada
	3 - Espessamento intenso
<b>Presença ou ausência de abscessos das criptas</b>	0 - Ausente
	1 - Presente
<b>Presença ou ausência de depleção de células caliciformes</b>	0 - Ausente
	1 - Presente

Fonte: Adaptado de (MCCAFFERTY et al., 2000).

As lâminas com os cortes histológicos de cólon foram fotografadas em microscópio óptico Olympus Bx51 (Japão) equipado com câmera SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, USA) através do software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, USA).

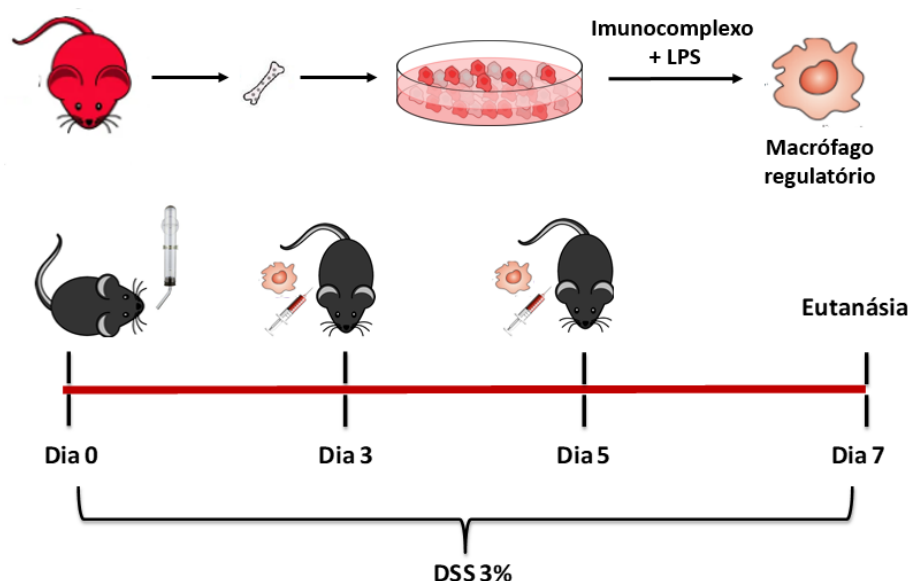
#### 4.12. Detecção de citocinas no soro por citometria de fluxo

O soro coletado foi utilizado para a determinação quantitativa de citocinas. O procedimento foi realizado através de citometria de fluxo em ensaios multiplex *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O kit inflamatório CBA contempla as

citocinas IL-12p70, TNF, IFN- $\gamma$ , *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) (CCL-2), IL-10 e IL-6. As análises foram conduzidas no citômetro de fluxo FACS Verse system (BD Bioscience, USA) e os dados analisados através do software FCAP Array V3.0. Brevemente, para a avaliação das citocinas, as amostras devidamente identificadas e acondicionadas em eppendorfs de 1,5ml foram primeiramente descongeladas em banho maria por 5 minutos e logo em seguida centrifugadas a 14.000g por 7 minutos. Os procedimentos adotados incluíram as etapas de preparação das curvas padrão para cada citocina utilizada, a mistura das microesferas com as amostras de soro dos animais e por fim a incubação com os reagentes de detecção. A detecção das citocinas é realizada através da adição de anticorpos específicos conjugados com fluorescência. A quantificação em pg/mg de cada citocina é baseada em uma curva padrão, realizada com nove concentrações conhecidas. As análises foram realizadas em colaboração com o laboratório Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) sob os cuidados da Dr<sup>a</sup>. Elaine Speziali de Faria e da Plataforma de citometria de Fluxo da FIOCRUZ – Minas Gerais, com o auxílio das pesquisadoras Dr<sup>a</sup>. Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz e Dr<sup>a</sup>. Dayane Andriotti Otta.

#### **4.13. ETAPA 5 – Avaliação da migração de macrófagos regulatórios para o intestino**

Para avaliação da migração dos macrófagos regulatórios do peritônio para o intestino inflamado foi realizado um novo experimento onde macrófagos foram isolados da medula óssea de camundongos transgênicos, *TdTomato*, como descrito por Gonçalves e Mosser (2015). Os camundongos *TdTomato*, apresentam expressão “*membrane-targeted tandem dimer Tomato*” (uma proteína fluorescente vermelha). Após 7 dias em cultura os macrófagos foram estimulados com imunocomplexo (Beads/IgG de coelho) em combinação com o LPS 10ng/ml, com o intuito de ativar esses macrófagos para o perfil regulatório. Camundongos C57BL/6 selvagens foram submetidos ao modelo de colite induzida por DSS na concentração de 3% por 7 dias e ao protocolo de imunoterapia com duas doses de macrófagos regulatórios fluorescentes, nos dias 3 e 5 da colite, exatamente como realizado no experimento da ETAPA 4, como mostrado no desenho experimental abaixo.



A análise de fluorescência foi realizada em cortes de cólon congelados. Resumidamente, após a eutanásia dos animais o cólon foi coletado e cuidadosamente enrolado, mantendo sua integridade, e fixado em paraformaldeído (PFA) 4% *overnight*. O cólon foi lavado em PBS e então transferido para a solução de sacarose 30% *overnight* a 4°C. Posteriormente as amostras de cólon foram submetidas ao congelamento rápido por isopentano (Merck, EUA), e montadas em suporte com tissue-teck, (O.C.T. Compound, Sakura, EUA). Cortes de 20µm foram realizados em micrótomos de congelamento (Leica, EUA). Após a lavagem com PBS as lâminas foram marcadas com marcador fluorescente, para núcleo, DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Sigma Aldrich, USA) - 1µg/ml por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss AxioVision 2.0) e as imagens analisadas usando ImageJ (v. 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### 4.14. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à distribuição das variáveis utilizando os algoritmos disponíveis no software *GraphPad Prism* v5.0. Os dados que passaram no teste de normalidade foram analisados pelo One Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados que não passaram no teste de normalidade foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn e expressos pela mediana, valor máximo e valor mínimo. Já para a avaliação da perda de massa corporal e consumo de ração, foi realizado o teste

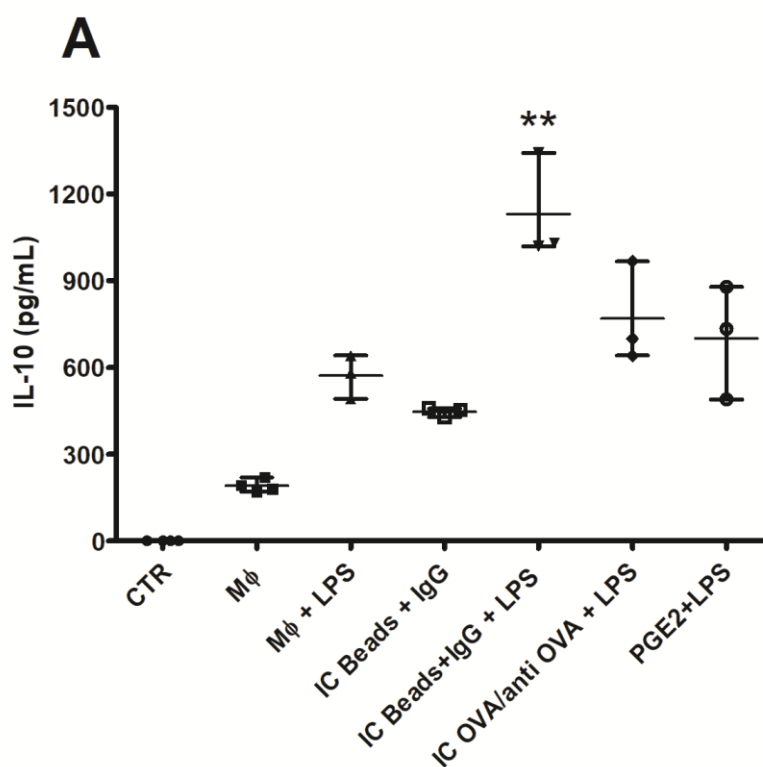
Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ETAPA 1 – Determinação dos níveis de IL-10 e IL-12 em sobrenadante de cultura de macrófagos

Na avaliação do perfil de ativação dos macrófagos com diferentes estímulos *in vitro*, foi realizada a cultura dessas células com seus devidos estímulos, em placas de 24 poços, *overnight*. Essa análise tinha como intuito a validação do protocolo de ativação dos macrófagos, para posterior utilização dessas células nas terapias propostas. As concentrações de IL-10 e IL-12 foram dosadas no sobrenadante resultante da cultura de macrófagos estimulados com: imunocomplexo OVA/anti-OVA + LPS; imunocomplexo Beads/IgG de coelho + LPS; Prostaglandina E2+ LPS; somente LPS; somente imunocomplexo Beads/IgG de coelho; e como controle macrófagos somente com DMEM completo (sem estímulo - M $\phi$ ). Os macrófagos estimulados com imunocomplexo Beads/IgG de coelho + LPS 10ng/ml, foram os que apresentaram melhor perfil regulatório, produzindo maiores quantidades de IL-10 e pouca IL-12 (Figura 8 A e B).

Diante deste resultado de confirmação do protocolo de estímulo *in vitro* na polarização dos macrófagos para um perfil regulatório ou classicamente ativado, padronizou-se a utilização destes estímulos para posteriores passos do trabalho.



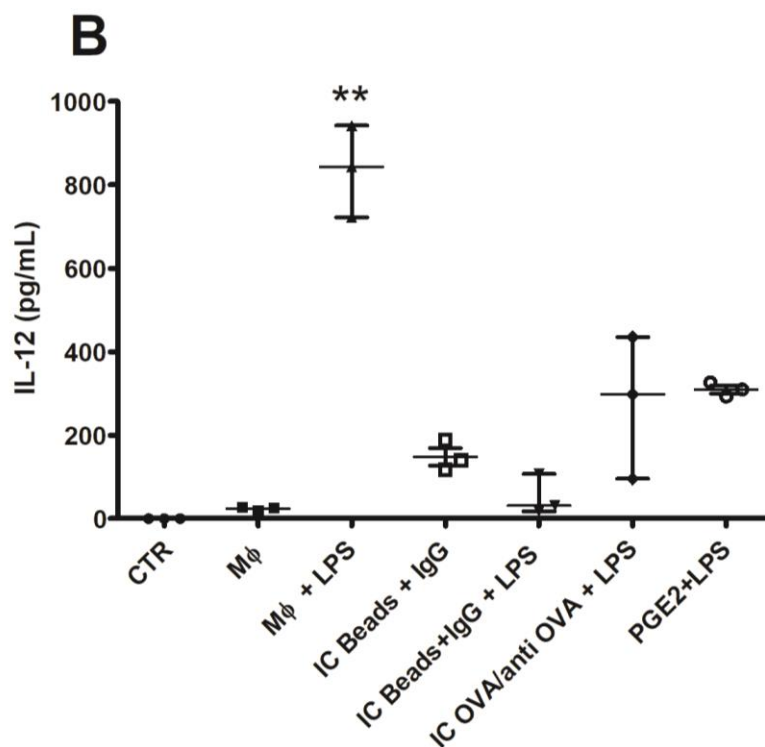


Figura 8: Dosagens de IL-10 (A) e IL-12 (B) no sobrenadante de cultura de macrófagos submetidos a diferentes estímulos.

As citocinas foram quantificadas através do ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$ . ( $n = 3 - 4$ ). CTR: Controle; Mφ: Macrófagos sem estímulo; Mφ + LPS: Macrófagos estimulados com LPS (10ng/ml); IC Beads + IgG: Macrófagos estimulados apenas com imunocomplexo Beads de poliestireno adsorvidas com IgG de coelho; IC Beads + IgG + LPS: Macrófagos estimulados com imunocomplexo Beads de poliestireno adsorvidas com IgG de coelho em combinação com o LPS (10ng/ml); IC OVA/anti OVA + LPS: Macrófagos estimulados com imunocomplexo OVA/ IgG anti-OVA em combinação com o LPS (10ng/ml); PGE2 + LPS: Macrófagos estimulados com prostaglandina E2 em combinação com o LPS (10ng/ml).

## 5.2. ETAPA 2 – Padronização do modelo de colite

Duas concentrações distintas de DSS foram utilizadas para padronização do melhor modelo de colite para o trabalho em questão. A padronização foi idealizada ao notarmos que na literatura concentrações entre 1% e 5% de DSS, administradas por via oral, no período compreendido entre 4 e 9 dias, são eficazes em induzir colite aguda em camundongos C57BL/6 (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000; OKAYASU et al., 1990; TAGHIPOUR et al., 2016). O resultado de tal padronização e escolha do modelo estão representados nos sub-itens abaixo.



### 5.2.1. Avaliação da perda de massa corporal

Os animais pertencentes aos dois grupos colite avaliados, 2,5% DSS e 3% DSS, apresentaram perda de massa corporal em relação ao controle. O que corrobora com os resultados observados por Krieglstein *et al.* (2001) e Qualls *et al.* (2006). Porém também observamos uma redução da massa corporal dos animais do grupo colite 3% DSS em relação ao grupo 2,5% DSS, nos dias 5, 6 e 7. A Figura 9 representa a medição diária da massa corporal dos três grupos avaliados.

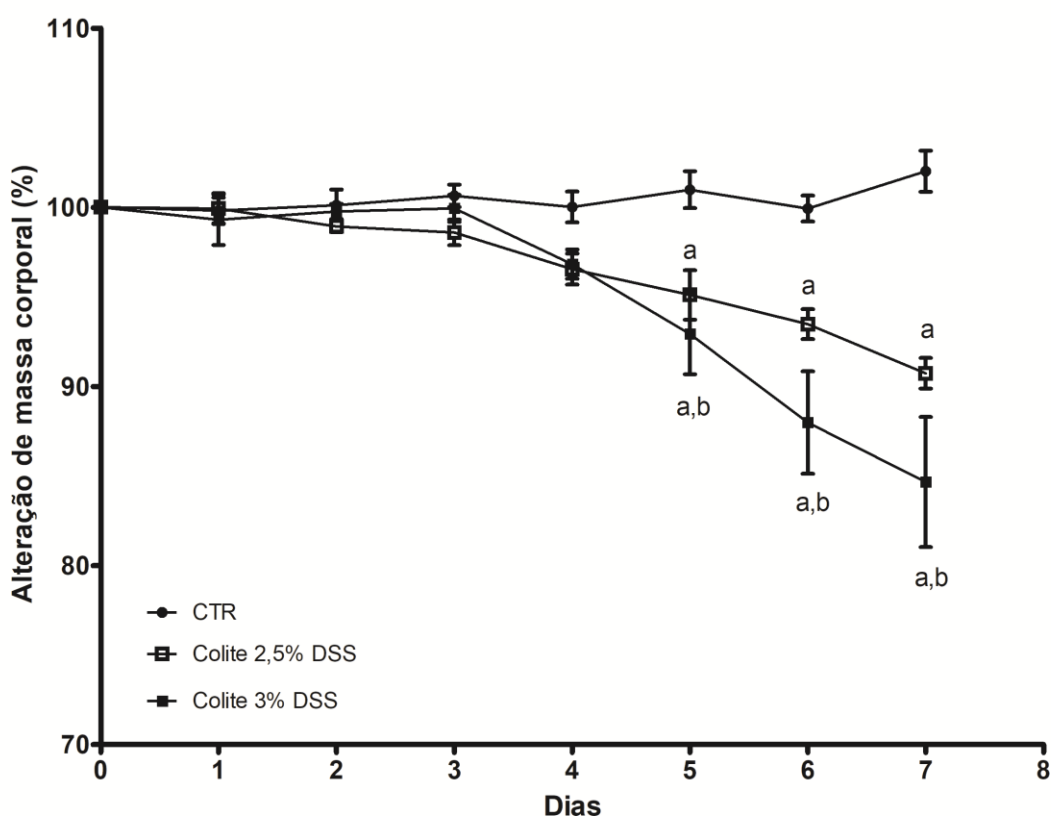


Figura 9: Avaliação da massa corporal.

Os camundongos foram submetidos a dois protocolos distintos de indução de colite (2,5% e 3% de DSS) por 7 dias. Os dados foram avaliados pelo teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas pela letra "a" (a) e diferenças em relação ao grupo 2,5% DSS são representadas pela letra "b" (b). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . (n=5). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio. Colite 2,5% DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 2,5%. Colite 3% DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3%.

### 5.2.2. Comprimento do cólon

Após eutanásia, o intestino foi isolado e o cólon separado do restante do órgão para avaliação de lesões macroscópicas e microscópicas, aspecto das fezes e

para medição do seu comprimento. A redução do tamanho do cólon dos animais colite está relacionada com a intensa inflamação aguda do órgão (CHASSAING et al., 2014). Como representado na Figura 10, a administração de DSS na concentração de 3% levou ao encurtamento do cólon quando comparado ao grupo controle, enquanto os animais que receberam a concentração de 2,5% não apresentaram diferenças significativas.

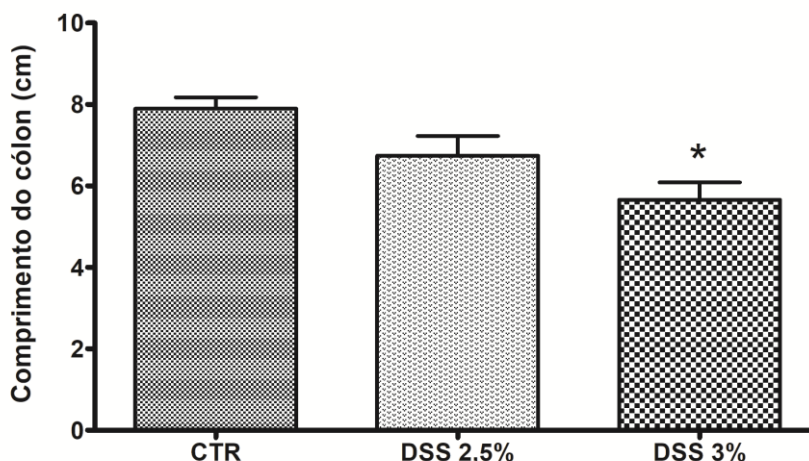


Figura 10: Comprimento do cólon.

O tamanho do cólon foi mensurado com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto. As medidas foram expressas em centímetros (cm). Os dados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey e expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$ . (n=5). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio. DSS 2,5%: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 2,5%. DSS 3%: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3%.

### 5.2.3. Índice de atividade da doença (IAD)

O IAD foi calculado a partir das pontuações atribuídas aos sinais clínicos, utilizando a fórmula:  $IAD = (\text{pontuação da perda de massa corporal}) + (\text{pontuação da consistência das fezes}) + (\text{pontuação da presença de sangue nas fezes})$ . Quanto maior o IAD, maior a gravidade da colite (KANG et al., 2006). Tanto o grupo colite 2,5% DSS quanto o grupo colite 3% DSS apresentaram IAD significativamente maior que o IAD do grupo controle, como mostrado na Figura 11.

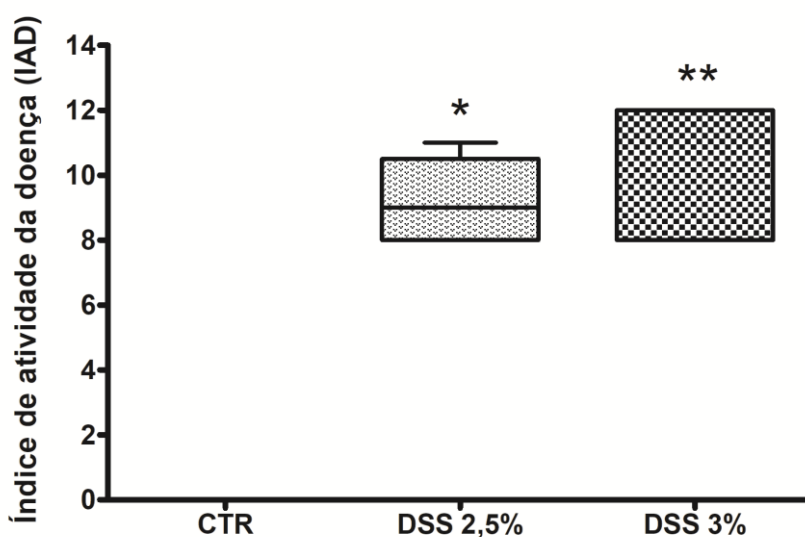


Figura 11: Índice de atividade de doença (IAD).

Índice calculado através de pontuações atribuídas aos três parâmetros clínicos avaliados: pontuação da perda de massa corporal + pontuação da consistência das fezes + pontuação da presença de sangue nas fezes. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$  e por dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$ . ( $n = 5$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio. DSS 2,5%: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 2,5%. DSS 3%: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3%.

#### 5.2.4. Avaliações histopatológicas

Para avaliação histopatológica do cólon, foram analisadas 5 lâminas de cada grupo experimental. As lâminas foram avaliadas por microscopia ótica em cortes corados por hematoxilina e eosina. Nos animais do grupo controle observamos que as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa apresentavam arquitetura normal, com as criptas e células caliciformes preservadas e sem infiltrado inflamatório.

A administração do DSS alterou a morfologia do cólon, originando acometimento predominantemente das camadas mucosa e submucosa. No grupo colite 2,5% DSS, os animais apresentaram lesões focais nas regiões da mucosa e submucosa, mantendo as camadas muscular e serosa relativamente preservadas. Foram observadas áreas de infiltrado inflamatório na camada mucosa, infiltrado este composto predominantemente por polimorfonucleares, com infiltração leucocitária interepitelial e alterações do epitélio de revestimento. Também foram observadas áreas com erosão e/ou fusão de criptas. Na camada submucosa foram observadas

áreas de edema e infiltrado inflamatório. As mesmas alterações foram observadas no grupo colite 3% DSS, porém com padrões de intensidade e extensão de lesões de maior grau, além do acometimento intenso das camadas mucosa e submucosa e em menor grau, da camada muscular. As fotos representativas das lâminas de camundongos pertencentes aos três grupos experimentais estão representadas na Figura 12.

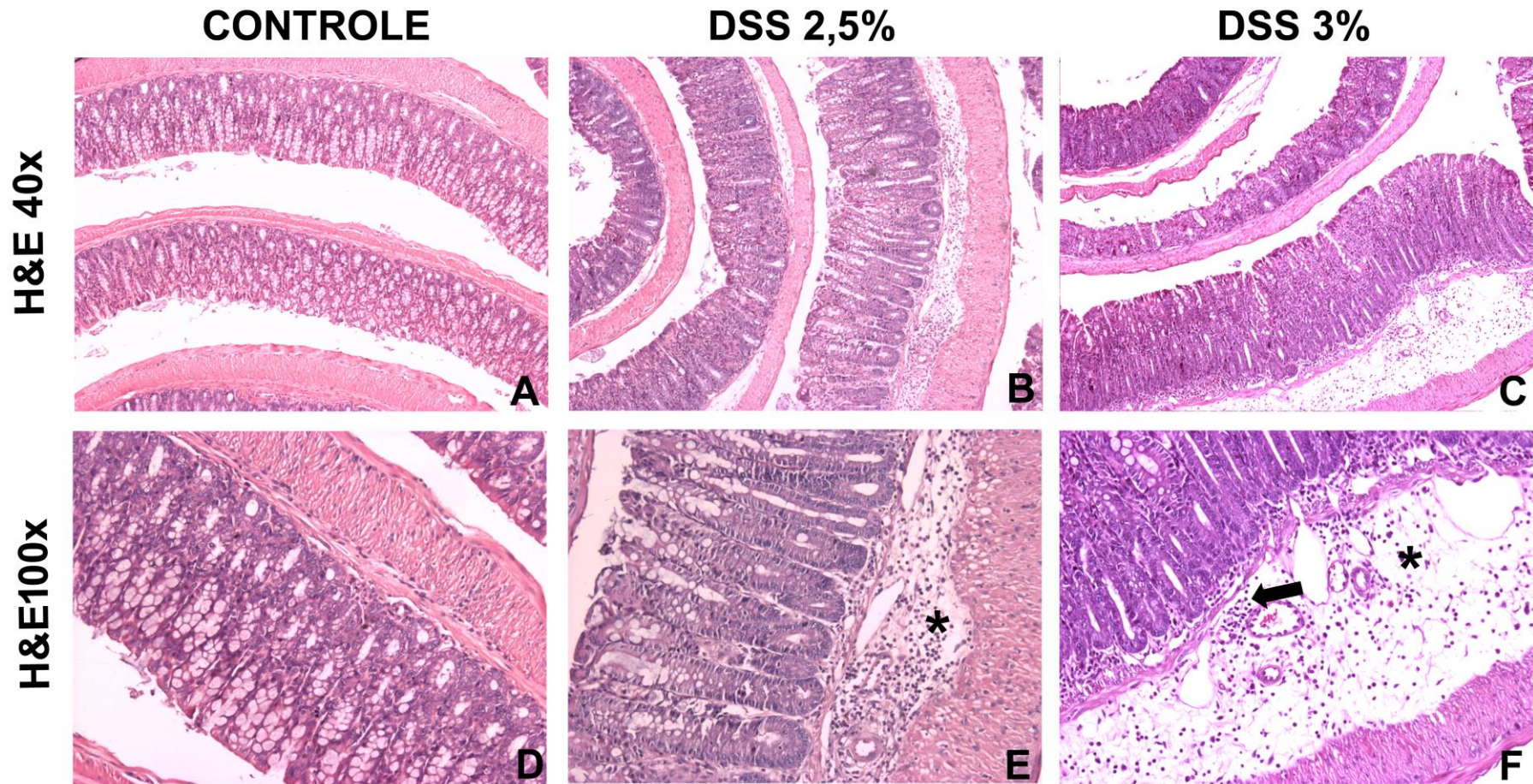


Figura 12: Histologia do cólon.

Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos a dois diferentes protocolos de indução de colite por dextrana sulfato de sódio (DSS). (A & D) Grupo controle; (B & E) Grupo colite 2,5% DSS; (C & F) Grupo colite 3% DSS. Infiltrado inflamatório (seta preta). Edema na submucosa (asterisco). Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

### 5.3. ETAPA 3 – Avaliação do protocolo de terapia celular – Uma dose de macrófagos

Após a padronização do melhor modelo de colite para nossos estudos, foi proposto o primeiro protocolo terapêutico. Nesse primeiro protocolo administramos uma única dose de macrófagos: Macrófagos sem estímulo ( $M\phi$ ), macrófagos classicamente ativados ( $CAM\phi$ s) ou macrófagos regulatórios ( $RM\phi$ ), no terceiro dia de indução da colite, nos diferentes grupos de estudo propostos.

Apresentamos os resultados dos experimentos separadamente nos sub-itens abaixo:

#### 5.3.1. Avaliação da perda de massa corporal

A massa corporal dos animais foi medida diariamente. Todos os animais pertencentes aos grupos tratados com macrófagos, independente do perfil de ativação, tiveram perda de massa corporal significativa em relação ao controle. A Figura 13 representa a perda de massa corporal dos cinco grupos avaliados, durante 7 dias.

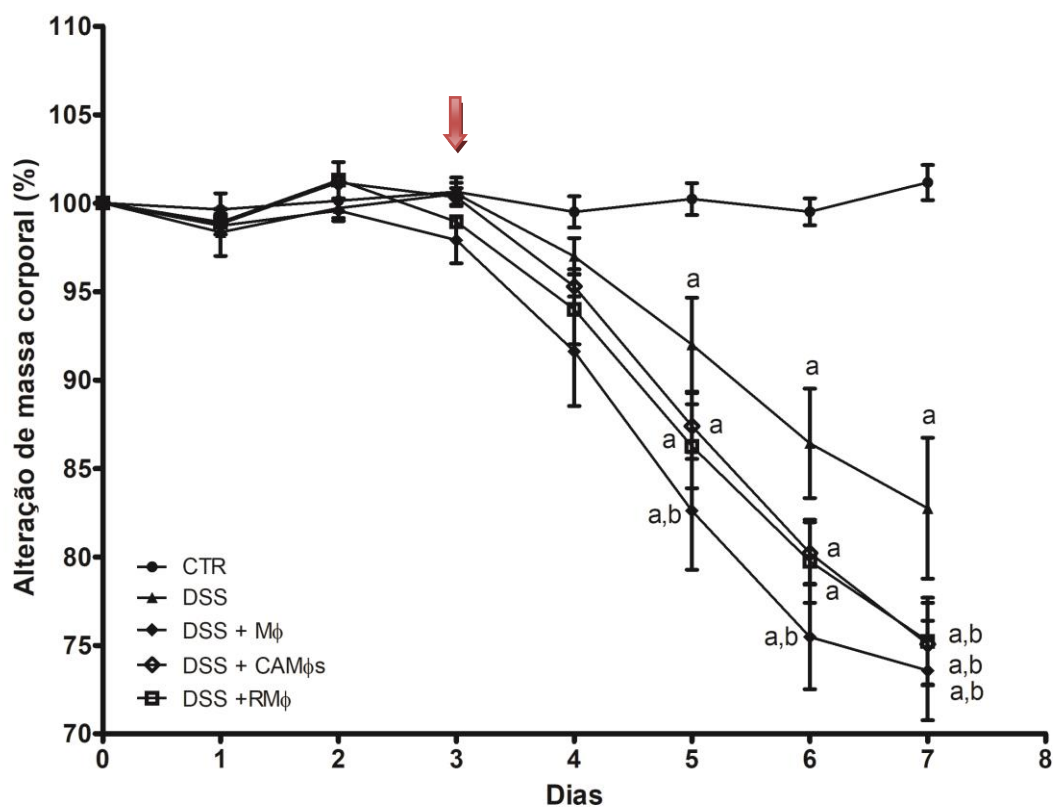


Figura 13: Avaliação da massa corporal.

Os dados foram avaliados pelo teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (CTR) são representadas pela letra “a” (a) e diferenças em relação ao grupo colite (DSS) são representadas pela letra “b” (b). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . A seta vermelha indica o dia em que a administração dos macrófagos foi realizada. CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos regulatórios.

### 5.3.2. Comprimento do cólon

Como representado na Figura 14, nenhum dos grupos avaliados apresentou encurtamento do cólon em relação ao grupo controle.

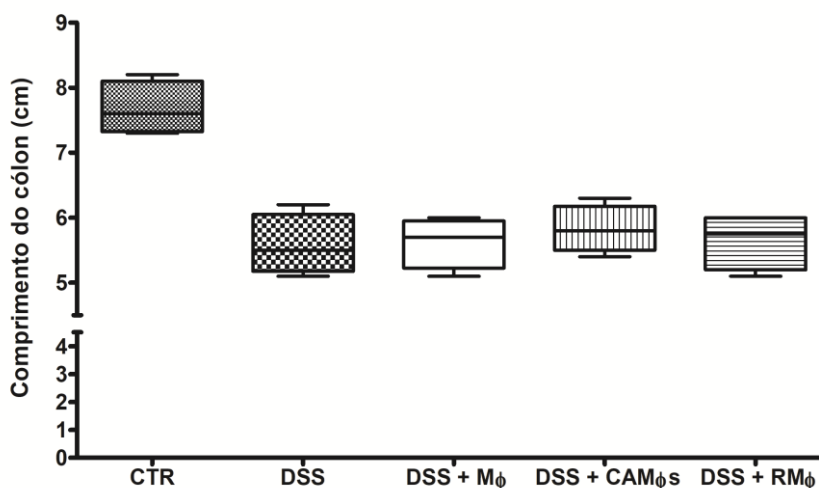


Figura 14: Comprimento do cólon.

O tamanho do cólon foi mensurado com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto. Medida expressa em centímetros (cm). Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. (n =4). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos regulatórios.

### 5.3.3. Índice de atividade da doença (IAD)

Os camundongos foram avaliados quanto aos parâmetros que determinam o IAD, após a terapia com uma única dose de macrófagos. Os animais pertencentes aos grupos tratados com macrófagos sem estímulo e macrófagos classicamente ativados apresentaram IAD significativamente maior que o IAD do grupo controle, como mostrado na Figura 15.

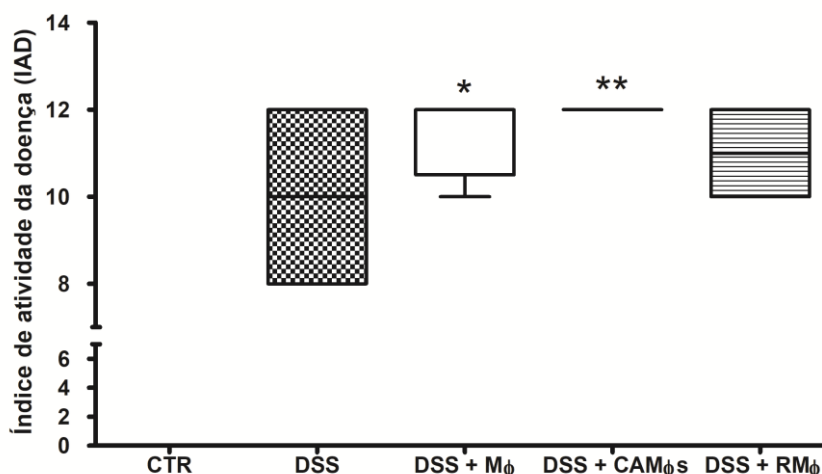


Figura 15: Índice de atividade de doença (IAD).

Índice calculado através de pontuações atribuídas aos três parâmetros clínicos avaliados: pontuação da perda de massa corporal + pontuação da consistência das fezes + pontuação da presença de sangue nas fezes. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$  e dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$ . (n =4). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com macrófagos regulatórios.

### 5.3.4. Avaliações histopatológicas

Todos os animais de cada grupo tiveram o cólon coletado e preparado para avaliação histológica. Observamos que os animais pertencentes aos grupos colite 3% DSS e colite tratados com macrófagos com diferentes perfis de ativação apresentaram diferenças histológicas em relação ao grupo controle, porém não observamos alterações histológicas significativas entre os grupos colite e colite



tratados com diferentes perfis de ativação de macrófagos, como evidenciado na Figura 16. Foram observadas extensas áreas de acometimento do cólon. As principais lesões histológicas foram o intenso edema inflamatório presente na submucosa, áreas de erosão e fusão de criptas, infiltrado inflamatório transmural, infiltração leucocitária interepitelial, presença de abscessos e depleção de células caliciformes, resultando em perda da arquitetura do órgão.

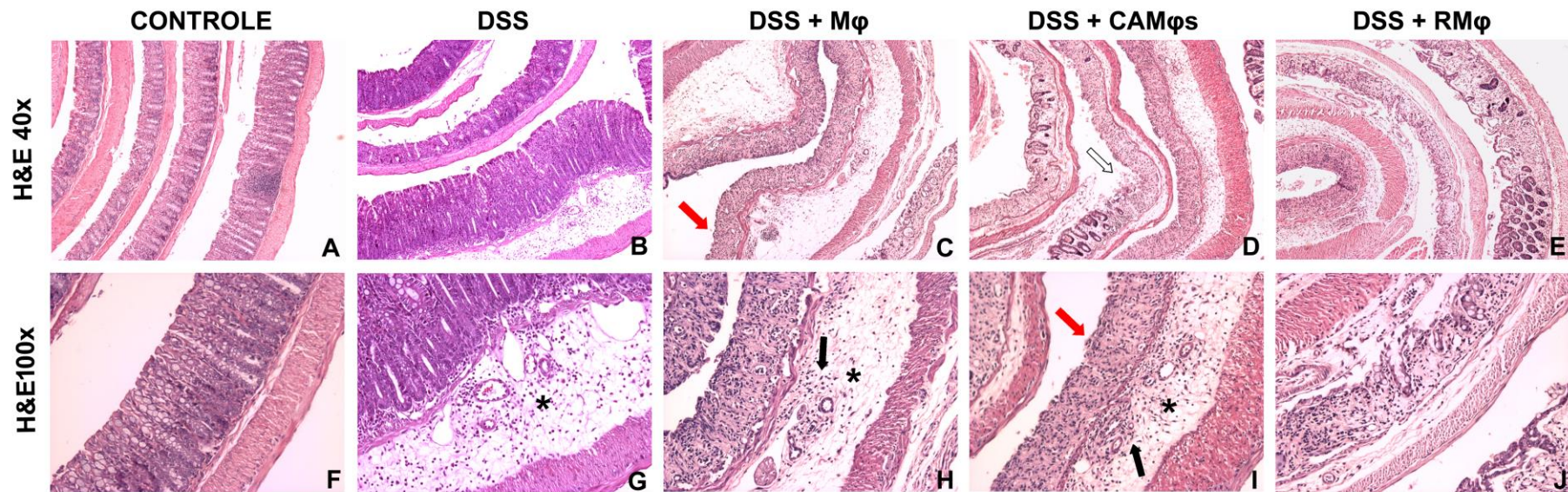


Figura 16: Histologia do cólon.

Cortes histológicos de cólon corados em hematoxilina e eosina após tratamento da colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) com uma dose de macrófagos em comparação com o grupo controle. (A & F) Grupo controle; (B & G) Grupo colite - DSS; (C & H) Grupo colite tratado com macrófagos sem estímulo – DSS+ M $\phi$ ; (D & I) Grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados – DSS+ CAM $\phi$ s; (E & J) Grupo colite tratado com macrófagos regulatórios – DSS+ RM $\phi$ . Infiltrado inflamatório (seta preta), edema (asterisco), destruição das criptas (seta branca), fusão de criptas (seta vermelha). Micrografias (A, B, C, D & E) com aumento de 40x e Micrografias (F, G, H, I & J) com aumento de 100X. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

#### **5.4. ETAPA 4 – Avaliação do protocolo de terapia celular – Duas doses de macrófagos**

O insucesso da terapia com somente uma dose de macrófagos, nos levou a investigar um novo protocolo mais eficaz no controle da doença. O segundo protocolo terapêutico proposto foi constituído pela administração de duas doses de macrófagos: Macrófagos sem estímulo ( $M\phi$ ), macrófagos classicamente ativados ( $CAM\phi$ s) ou macrófagos regulatórios ( $RM\phi$ ) no terceiro e no quinto dia de indução da colite.

Apresentamos os resultados dos experimentos separadamente nos sub-itens abaixo:

##### **5.4.1. Avaliação da perda de massa corporal**

A massa dos animais foi medida diariamente por 7 dias. Os animais pertencentes ao grupo colite (DSS) apresentaram perda de massa corporal significativa em relação ao grupo controle, nos dias 5, 6 e 7. Os animais do grupo colite tratados com macrófagos sem estímulo (DSS +  $M\phi$ ) também apresentaram perda de massa corporal significativa em relação ao controle, nos dias 5, 6 e 7 e no dia 7 apresentaram diferença em relação ao grupo colite, apresentando um pior quadro clínico quando comparado aos animais do grupo colite sem tratamento. Já os animais do grupo colite tratados com macrófagos classicamente ativados (DSS +  $CAM\phi$ s) apresentaram uma acentuada redução da massa corporal em relação ao grupo controle já a partir do quarto dia, seguindo-se pelos dias 5, 6 e 7 e ao grupo colite no dia 7, também demonstrando um efeito de piora no quadro clínico. Os animais tratados com macrófagos regulatórios (DSS +  $RM\phi$ ), no entanto, apresentaram diferença em relação ao grupo controle apenas nos dias 6 e 7. Esses animais do grupo colite tratados com  $RM\phi$  apresentaram recuperação da massa corporal, com diferença significativa em relação aos grupos colite e colite tratados com macrófagos sem estímulo, nos dias 5, 6 e 7 e com relação ao grupo tratado com  $CAM\phi$ s nos dias 4, 5, 6 e 7 (Figura 17).

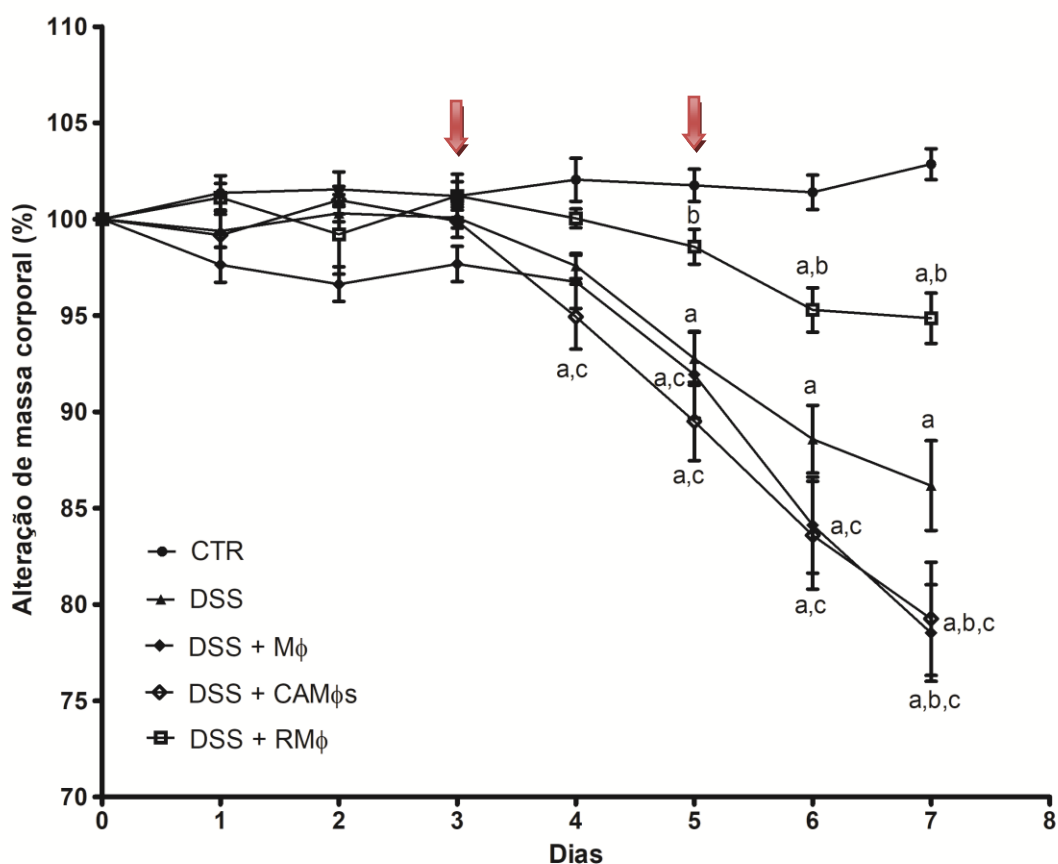


Figura 17: Avaliação da massa corporal.

Dados avaliados pelo teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (CTR) são representadas pela letra "a" (a), diferenças em relação ao grupo colite (DSS) são representadas pela letra "b" (b) e diferenças em relação ao grupo colite tratados com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ) são representadas pela letra "c" (c). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . ( $n = 6 - 8$ ). As setas vermelhas indicam os dias em que as administrações dos macrófagos foram realizadas. CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

Com o intuito de melhor representarmos a perda da massa corporal dos animais nos diferentes grupos analisados, evidenciamos a variação da massa dos camundongos no dia da eutanásia (dia 7). Como mostrado na Figura 18, podemos observar que os animais dos grupos colite (DSS), grupo colite tratado com

macrófagos sem estímulo (DSS + M $\phi$ ) e macrófagos classicamente ativados (DSS + CAM $\phi$ s) apresentaram redução da massa corporal significativa em relação ao grupo controle e em relação ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ). Importante relatar que não houve diferença significativa na perda de massa corporal dos camundongos do grupo controle e do grupo colite tratado com RM $\phi$ , quando avaliados somente no sétimo dia.

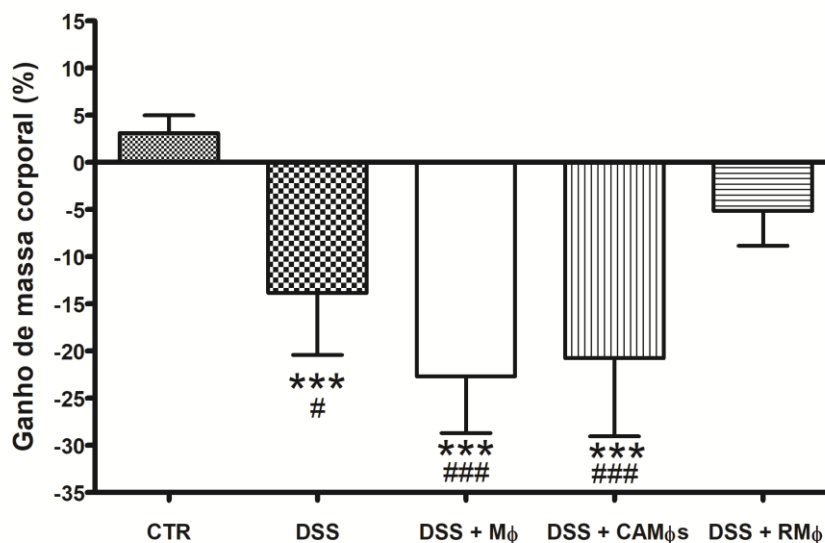


Figura 18: Variação da massa corporal. Comparação entre o dia 7 e o dia 0.

Dados avaliados pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey e expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (CTR) são representadas por três asteriscos (\*\*\*) quando o  $p < 0,001$ . Diferenças significativas em relação ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ) são representadas por um hashtag (#) quando o  $p < 0,05$  e por três hashtags (###) quando o  $p < 0,001$ . ( $n = 6 - 8$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

#### 5.4.2. Avaliação do consumo alimentar

O consumo de ração foi avaliado diariamente em todos os grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas no consumo de ração no grupo colite (DSS), grupo colite tratado com macrófagos sem estímulo (DSS + M $\phi$ ) e colite tratado com macrófagos classicamente ativados (DSS + CAM $\phi$ s) com relação ao

grupo controle (CTR). Interessante observar que não houve diferença significativa do consumo de ração do grupo controle com o consumo dos animais tratados com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ) (Figura 19).

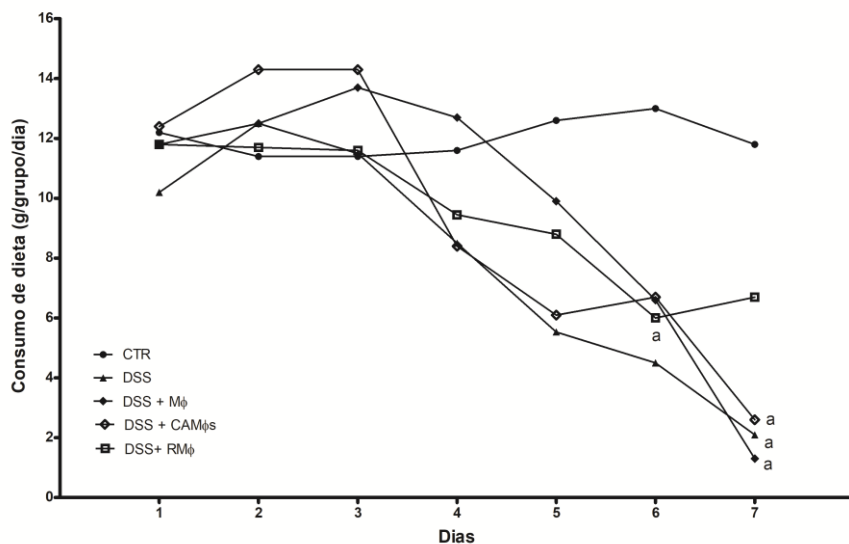


Figura 19: Medida do consumo de ração.

O consumo de dieta foi obtido por meio da diferença entre a quantidade ofertada e a sobra na gaiola, diariamente. Os dados foram avaliados pelo teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (CTR) são representadas pela letra “a” (a). O nível de significância mínimo aceito foi  $p < 0,05$ . (n=5 animais por caixa). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

### 5.4.3. Avaliação macroscópica do cólon

O intestino dos camundongos foi retirado após a eutanásia e o colón foi isolado para avaliação de lesões macroscópicas, bem como do aspecto das fezes e para a medida do seu comprimento.

Como representado nas Figuras 20 e 21, todos os grupos analisados, exceto o grupo tratado com macrófagos regulatórios, apresentaram encurtamento do cólon quando comparados ao grupo controle. Além disso, podemos observar na Figura 21, o aspecto hemorrágico do ceco e do cólon, bem como as fezes malformadas ou ausência de fezes, no cólon representativo dos animais do grupo colite (DSS), grupo

colite tratado com macrófagos sem estímulo (DSS + M $\phi$ ) e grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados (DSS + CAM $\phi$ s). Pode-se observar que os animais do grupo colite tratados com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ), já apresentam aspectos mais normais na formação de fezes no final do intestino além de um ceco de aspecto muito semelhante ao normal (CTR).

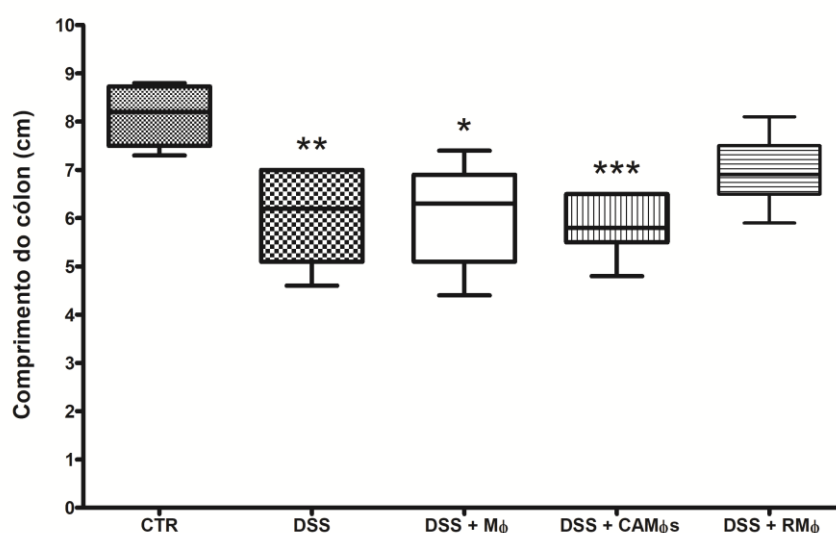


Figura 20: Comprimento do cólon.

O tamanho do cólon foi medido com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto. As medidas em centímetros foram compiladas e avaliadas pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$ , por dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$  e por três asteriscos (\*\*\*) quando o  $p < 0,001$ . ( $n = 6 - 8$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.



Figura 21: Aspectos macroscópicos do cólon.

CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

Na avaliação quantitativa das lesões, levou-se em consideração a presença de eritema, edema, hemorragia, erosões na mucosa como parâmetros na determinação de um escore macroscópico. Desta forma os dados analisados foram compilados e mostrados na Figura 22. Os animais dos grupos colite, colite tratado com macrófagos sem estímulo e colite tratado com macrófagos classicamente ativados apresentaram índice de lesões macroscópicas significativamente maior que o grupo controle. As lesões observadas eram muito semelhantes em todos estes grupos, variando muito pouco quanto à intensidade. Em geral o cólon se apresentava hiperêmico e hemorrágico, contraído em seu comprimento, mas também em largura (circunferência). Por vezes o cólon apresentava-se edemaciado



e de aspecto brilhante. Ausência de fezes ou de resquícios de fezes, chamou a atenção nestes grupos. O ceco apresentava-se também alterado, de aspecto mais escuro, o que pode estar relacionado com o processo hemorrágico. O grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados também apresentou escore macroscópico maior que o grupo colite tratado com macrófagos regulatórios. Por outro lado, o cólon e o ceco dos animais pertencentes ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios, apresentaram um aspecto mais conservado, com menos lesões e mais parecido com o cólon e o ceco do grupo controle. Não houve diferença entre o escore de lesões macroscópicas do grupo controle e do grupo colite tratado com RM $\phi$ .

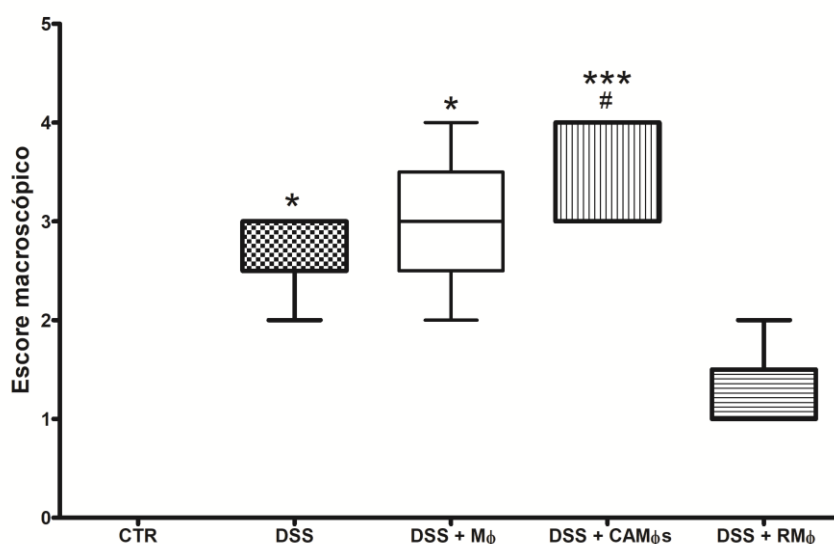


Figura 22: Avaliação macroscópica do cólon.

Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$ . Diferença significativa em relação ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios é representada por um hashtag (#) quando o  $p < 0,05$ . ( $n = 5$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

#### 5.4.4. Índice de atividade da doença (IAD)

Todos os grupos estudados após o tratamento com duas doses de macrófagos, foram avaliados quanto ao IAD. Todos os grupos com colite apresentaram IAD significativamente maior que o IAD do grupo controle, exceto o grupo colite tratado com macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ). Observou-se ainda que o grupo colite tratado com macrófagos ativados classicamente (DSS + CAM $\phi$ s) apresentou IAD maior que o grupo colite tratado com RM $\phi$  (Figura 23). Não houve diferença entre o IAD do grupo controle e do grupo colite tratado com RM $\phi$ .

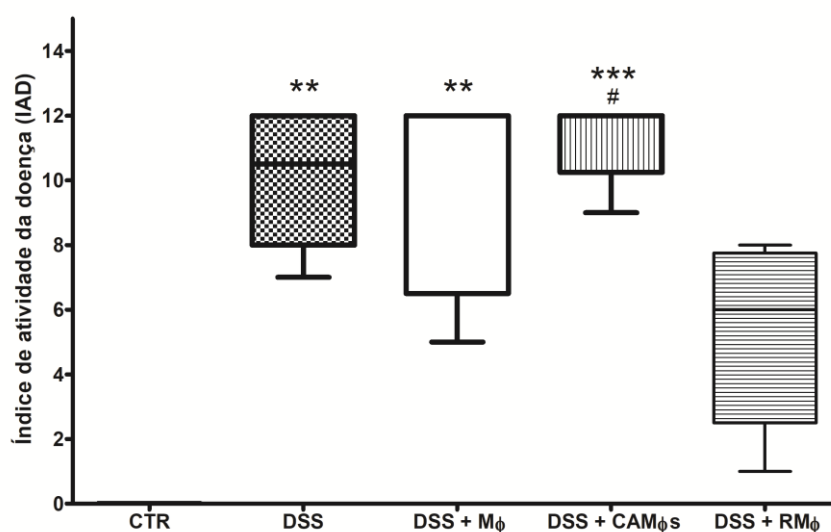


Figura 23: Índice de atividade de doença (IAD).

Índice calculado através de pontuações atribuídas aos três parâmetros clínicos avaliados: pontuação da perda de massa corporal + pontuação da consistência das fezes + pontuação da presença de sangue nas fezes. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas em relação ao grupo controle são representadas por dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$  e por três asteriscos (\*\*\*) quando o  $p < 0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios é representada por um hashtag (#) quando o  $p < 0,05$ . (n = 6 - 8). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

#### 5.4.5. Avaliações histopatológicas

Como demonstrado até aqui, o tratamento da colite experimental induzida por DSS com macrófagos em diferentes perfis de ativação, resultou em diferenças clínicas significativas entre os grupos, onde os animais do grupo tratado com RM $\phi$  apresentaram importante melhora clínica, enquanto os animais dos grupos tratado com M $\phi$  ou com CAM $\phi$ s apresentaram piora significativa. Os dados de avaliação ponderal, IAD, consumo de ração e macroscopia do cólon, confirmam estas diferenças e nos levam a pensar no importante e paradoxal papel dos macrófagos nas DII. Sendo assim, decidimos avaliar se estas diferenças clínicas refletiram em diferenças nas lesões intestinais. Para isso, o cólon dos animais foi coletado e analisado microscopicamente.

Em geral, as lesões observadas em todos os grupos tratados com DSS, eram as mesmas, variando quanto à intensidade, exceto o grupo tratado com macrófagos regulatórios, que apresentou um quadro diferente, com poucas lesões discretas e perfil histológico em geral, muito semelhante ao normal (controle).

Os grupos DSS, DSS+M $\phi$  e DSS+CAM $\phi$ s apresentaram lesões semelhantes, variando em intensidade. Em geral, observou-se intenso infiltrado inflamatório transmural, presença de abscessos de criptas, erosão e fusão das criptas, depleção de células caliciformes, resultando em perda da arquitetura da camada mucosa. Além de extensas áreas de edema inflamatório na submucosa (Figura 24 B, C, D, G, H e I). No grupo colite tratado com duas doses de macrófagos regulatórios, observamos arquitetura do cólon preservada, com poucas áreas de lesões discretas da mucosa e submucosa. Quando as lesões estavam presentes, se encontravam restritas ao terço inferior da camada mucosa, com presença discreta de edema na submucosa. Boa diferenciação epitelial, com raras lesões intraepiteliais, bem como extensas e preservadas áreas de criptas (Figura 24 E e J), condizentes com a estrutura histológica normal do cólon.

Na camada mucosa do cólon dos animais pertencentes aos grupos colite tratados com macrófagos sem estímulo e tratados com macrófagos classicamente ativados podemos observar áreas com maiores deposições de tecido conjuntivo, sugerindo o remodelamento tecidual da mucosa, associado à fibrose, evidenciado pela coloração de Tricrômico de Masson (Figura 25 C, D, H e I). No grupo colite tratado com CAM $\phi$ s observamos todas essas alterações com maior intensidade, e

ainda, a presença de células caliciformes hipertrofiadas, evidenciadas pela coloração de PAS/*Alcian Blue* (Figura 26 D e I). Este achado não foi encontrado em nenhum outro grupo.

Não foram observadas alterações significativas do colágeno nem das células caliciformes nos animais do grupo colite tratados com RM $\phi$ . As lâminas coradas em Tricrômico de Masson e PAS/*Alcian Blue* mostraram áreas normais de deposição de tecido conjuntivo (Figura 25 E e J) e manutenção do padrão de células caliciformes (Figura 26 E e J), semelhantes ao grupo controle (Figuras 25A/F e 26A/F, respectivamente).

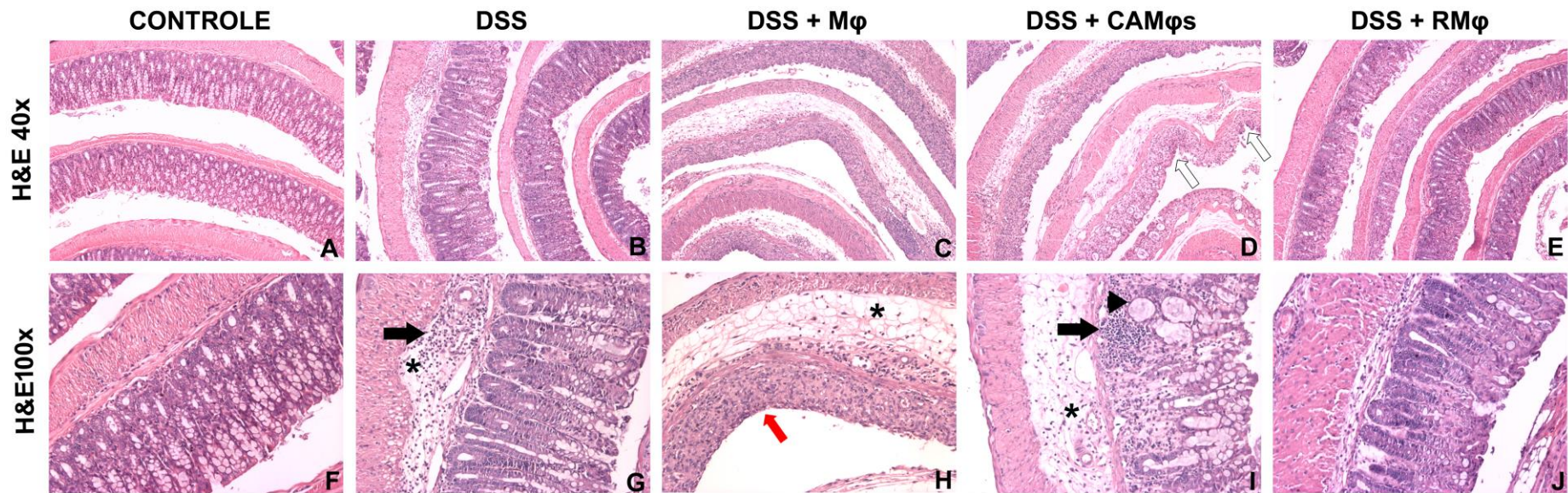


Figura 24: Histologia do cólon.

Cortes histológicos de cólon corados em hematoxilina e eosina, após tratamento da colite induzida por DSS com duas doses de macrófagos com diferentes perfis de ativação. (A & F) Grupo controle; (B & G) Grupo colite - DSS; (C & H) Grupo colite tratado com macrófagos sem estímulo – DSS+ M $\phi$ ; (D & I) Grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados – DSS+ CAM $\phi$ s; (E & J) Grupo colite tratado com macrófagos regulatórios – DSS+ RM $\phi$ . Infiltrado inflamatório (seta preta), edema (asterisco), destruição das criptas (seta branca), fusão de criptas (seta vermelha) e célula caliciforme hipertrófica (cabeça de seta preta). Micrografias (A, B, C, D & E) com aumento de 40x e Micrografias (F, G, H, I & J) com aumento de 100X. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

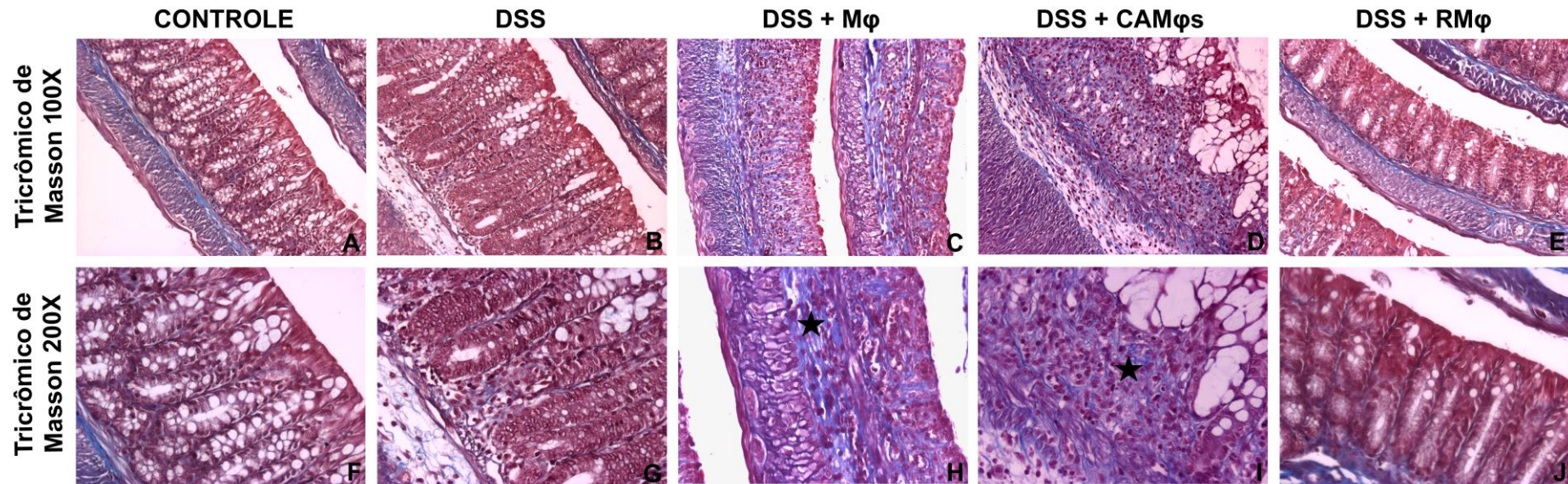


Figura 25: Histologia do cólon.

Cortes histológicos de cólon corados em Tricrômico de Masson, após tratamento da colite induzida por DSS com duas doses de macrófagos com diferentes perfis de ativação. (A & F) Grupo controle; (B & G) Grupo colite - DSS; (C & H) Grupo colite tratado com macrófagos sem estímulo – DSS+ Mφ; (D & I) Grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados – DSS+ CAMφs; (E & J) Grupo colite tratado com macrófagos regulatórios – DSS+ RMφ. Deposição de colágeno na camada mucosa (estrela). Micrografias (A, B, C, D & E) com aumento de 100x e Micrografias (F, G, H, I & J) com aumento de 200X. Coloração: Tricrômico de Masson.

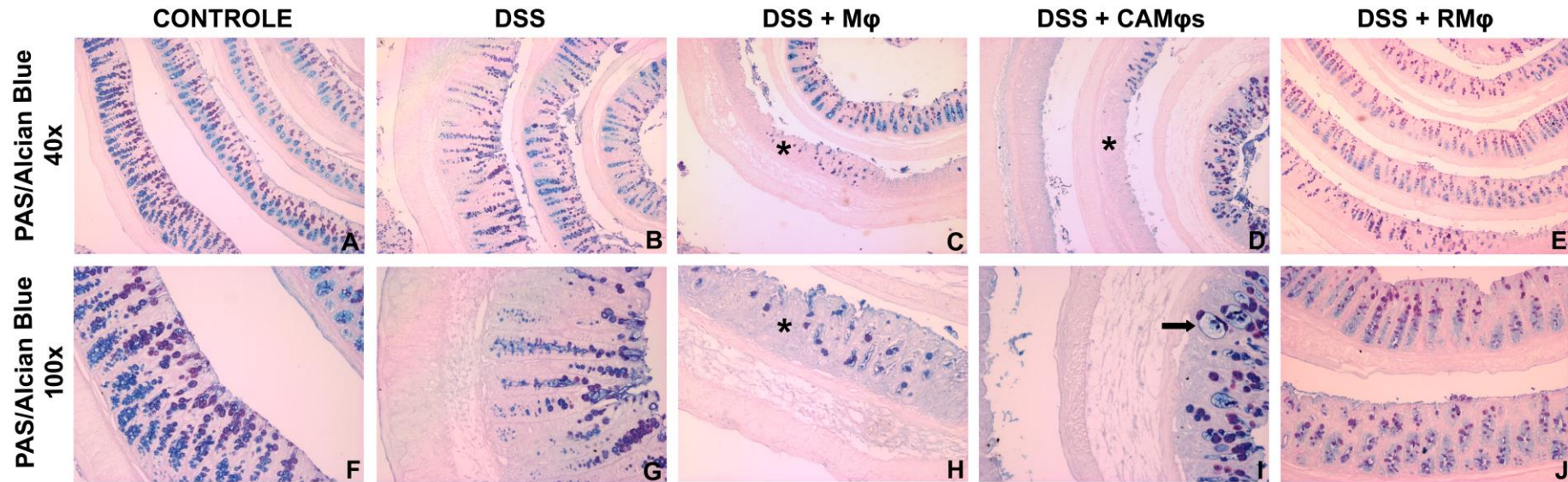


Figura 26: Histologia do cólon.

Cortes histológicos de cólon corados em ácido periódico de Schiff (PAS) / *Alcian Blue*, após tratamento da colite induzida por DSS com duas doses de macrófagos com diferentes perfis de ativação. (A & F) Grupo controle; (B & G) Grupo colite - DSS; (C & H) Grupo colite tratado com macrófagos sem estímulo – DSS + M $\phi$ ; (D & I) Grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados – DSS + CAM $\phi$ s; (E & J) Grupo colite tratado com macrófagos regulatórios – DSS + RM $\phi$ . Depleção de células caliciformes (asterisco). Célula caliciforme hipertrófica (seta preta). Micrografias (A, B, C, D & E) com aumento de 40x e Micrografias (F, G, H, I & J) com aumento de 100X. Coloração: Ácido periódico de Schiff (PAS) / *Alcian Blue*.

Em relação ao índice histológico, observamos um maior índice dos grupos colite, colite tratado com macrófagos sem estímulo e tratado com macrófagos classicamente ativados em relação ao grupo controle. Também foi observado um menor escore histológico do grupo colite tratado com macrófagos regulatórios em relação ao grupo colite tratado com macrófagos classicamente ativados. Não houve diferença significativa entre o índice histológico do grupo controle e grupo colite tratado com RM $\phi$  (Figura 27).

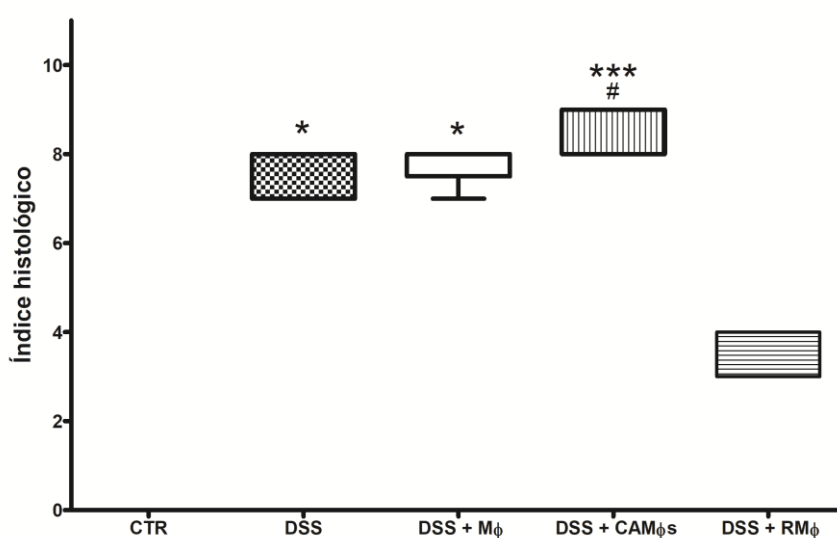


Figura 27: Índice histológico.

Índice calculado através de pontuações atribuídas às alterações histológicas do cólon. Os parâmetros avaliados foram: destruição da camada mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento da camada muscular, presença de abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas foram representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$  e por três asteriscos (\*\*\*) quando o  $p < 0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo colite tratado com macrófagos regulatórios é representada por um hashtag (#) quando o  $p < 0,05$ . ( $n = 5$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + M $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos sem estímulo. DSS + CAM $\phi$ s: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos classicamente ativados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.



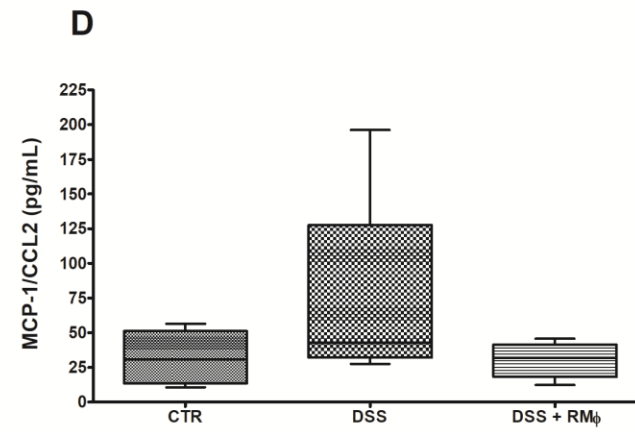
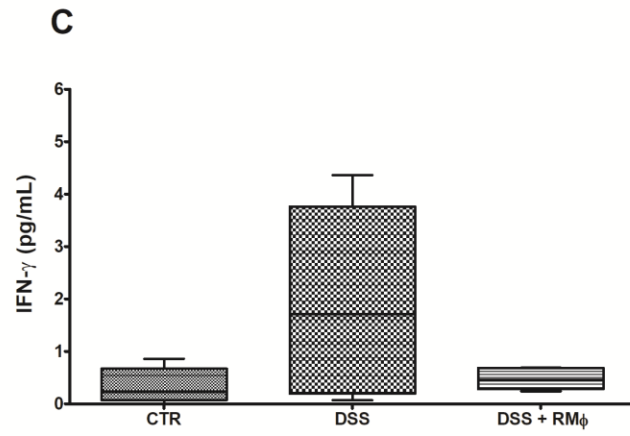
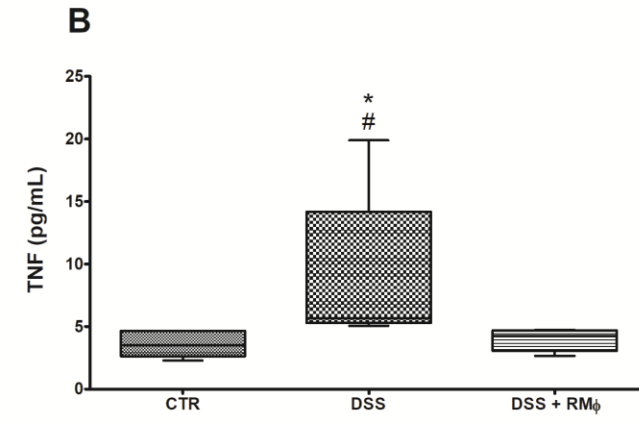
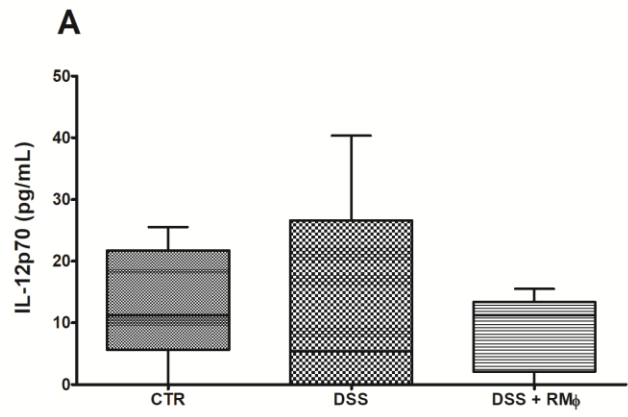
#### 5.4.6. Avaliação do perfil de citocinas no soro

No intuito de se caracterizar melhor o efeito do tratamento da colite com macrófagos regulatórios, avaliamos o perfil de algumas citocinas e uma quimiocina no soro dos animais do grupo controle (CTR), grupo colite sem tratamento (DSS) e grupo colite tratado com duas doses de macrófagos regulatórios (DSS + RM $\phi$ ).

No decurso das DII sabe-se que os pacientes apresentam forte resposta pró-inflamatória, descontrolada e mediada por muitas citocinas produzidas por macrófagos ativados no intestino (GREN; GRIP, 2016; HEINSBROEK; GORDON, 2009; WALLACE et al., 2014). Modelos experimentais de indução de colite, como exemplo, a administração de DSS, também apresentam um perfil de citocinas pró-inflamatórias detectáveis no soro (JEENGAR et al., 2017; XIAO et al., 2016). Desta forma, pesquisamos alterações neste perfil de citocinas, após o tratamento da colite com os macrófagos regulatórios. Foram avaliados: IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , MCP-1 (CCL2), IL-10 e IL-6 no soro.

Os animais do grupo colite apresentaram níveis elevados de TNF em relação ao grupo controle e ao grupo colite tratado com RM $\phi$  (Figura 28 B), além de apresentarem maiores concentrações de IL-6 em relação ao grupo controle (Figura 28 F). Os animais do grupo colite tratados com duas doses de RM $\phi$  apresentaram aumento na concentração de IL-10, quando comparados aos níveis encontrados nos animais do grupo controle (Figura 28 E).

Não foram observadas diferenças significativas na dosagem sérica das demais citocinas analisadas.



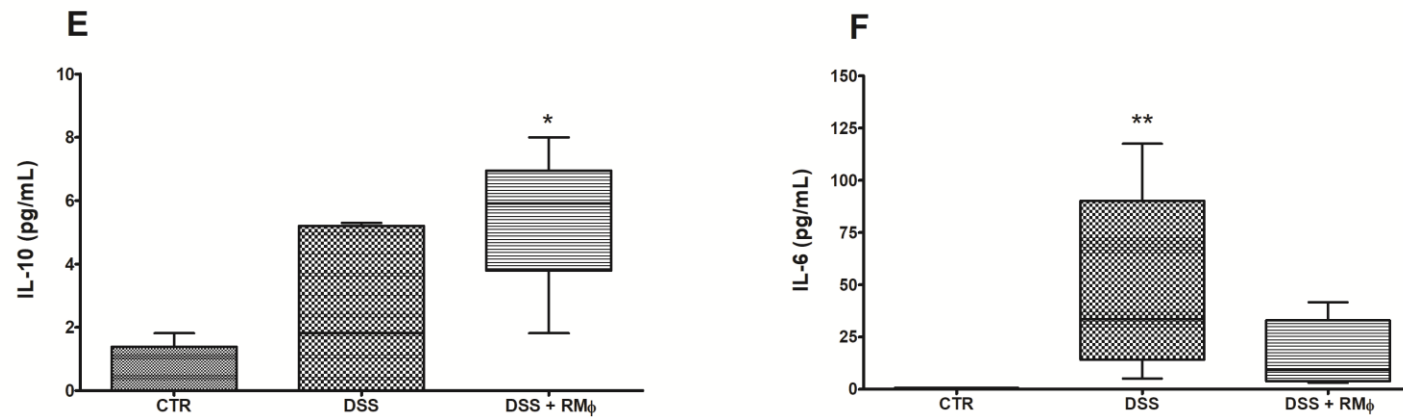


Figura 28: Concentração de citocinas no soro de camundongos.

A concentração das citocinas foram avaliadas após sete dias de indução da colite por dextrana sulfato de sódio (DSS) com a administração de duas doses de imunoterapia composta por macrófagos regulatórios. As citocinas foram mensuradas no soro dos camundongos através de citometria de fluxo em ensaios multiplex *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit*. (A) Concentração de IL-12p70; (B) Concentração de TNF; (C) Concentração de INF- $\gamma$ ; (D) Concentração de MCP-1/CCL-2; (E) Concentração de IL-10; (F) Concentração de IL-6. Os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn. Os resultados representam a mediana, valor máximo e valor mínimo. Diferenças significativas foram representadas por um asterisco (\*) quando o  $p < 0,05$  e dois asteriscos (\*\*) quando o  $p < 0,01$ . ( $n = 5$ ). CTR: Animais não desafiados com dextrana sulfato de sódio e não tratados. DSS: Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e não tratados. DSS + RM $\phi$ : Animais que foram desafiados com dextrana sulfato de sódio na concentração de 3% e tratados com duas doses de macrófagos regulatórios.

## 5.5. ETAPA 5 – Avaliação da migração de macrófagos regulatórios para o intestino inflamado

Nosso trabalho teve como objetivo observar os efeitos gerados pela terapia com macrófagos em diferentes estados de ativação, na colite experimental por DSS em camundongos. Observamos assim, que houve um efeito paradoxal no resultado da doença experimental onde os macrófagos classicamente ativados induziram uma doença mais severa, representada por alterações clínicas e patológicas, enquanto que os macrófagos regulatórios apresentaram um papel de controle da doença, com discretas lesões macro e microscópicas importantes no cólon e redução significativa nos parâmetros clínicos avaliados, como o IAD.

Neste sentido, sobressai-se a ideia do uso de macrófagos regulatórios como uma possível terapia no controle das DII.

No caso do trabalho aqui apresentado, optamos pelo uso de macrófagos reprogramados *in vitro* e injetados via IP nos camundongos com colite. Os resultados foram promissores, porém fica a pergunta: como essas células agiram no controle da doença?

Havia duas hipóteses prováveis: os macrófagos ficariam na cavidade peritoneal produzindo IL-10 que agiria no intestino ali adjacente; ou, os macrófagos transferidos, migrariam para o tecido, provavelmente atraídos por quimiocinas liberadas pelo intestino inflamado.

Visando responder a essas perguntas, decidimos submeter os animais a um novo experimento de indução de colite com DSS, porém agora realizando o tratamento com macrófagos fluorescentes provenientes de camundongos transgênicos *TdTomato*. Os macrófagos foram isolados, como já descrito, da medula óssea e cultivados *in vitro* por 7 dias. A sua diferenciação e fluorescência foram confirmadas através de análise das placas de cultura observadas em microscópio de fluorescência (Evos XL-Core, ThermoFisher). Os macrófagos se apresentavam fortemente aderidos às placas, espalhados, com morfologia condizente com macrófagos de camundongos selvagens e apresentavam forte fluorescência vermelha.

Essas células diferenciadas, foram então estimuladas *in vitro* com imunocomplexo (Beads/IgG de coelho) + LPS (10ng/ml) e injetadas na cavidade peritoneal dos camundongos com colite induzida por DSS, repetindo-se assim exatamente o mesmo protocolo utilizado em todos os experimentos anteriores, ao

terceiro e quinto dias de experimentação. No sétimo dia, os camundongos foram eutanasiados e o colón coletado.

Após o devido processamento do material, os rolinhos foram cortados e as lâminas preparadas foram coradas com DAPI, para evidenciação dos núcleos das células.

A Figura 29 mostra o resultado da análise de microscopia após o uso de macrófagos regulatórios fluorescentes, provenientes de camundongos transgênicos *TdTomato*, no cólon de camundongos selvagens submetidos à colite.

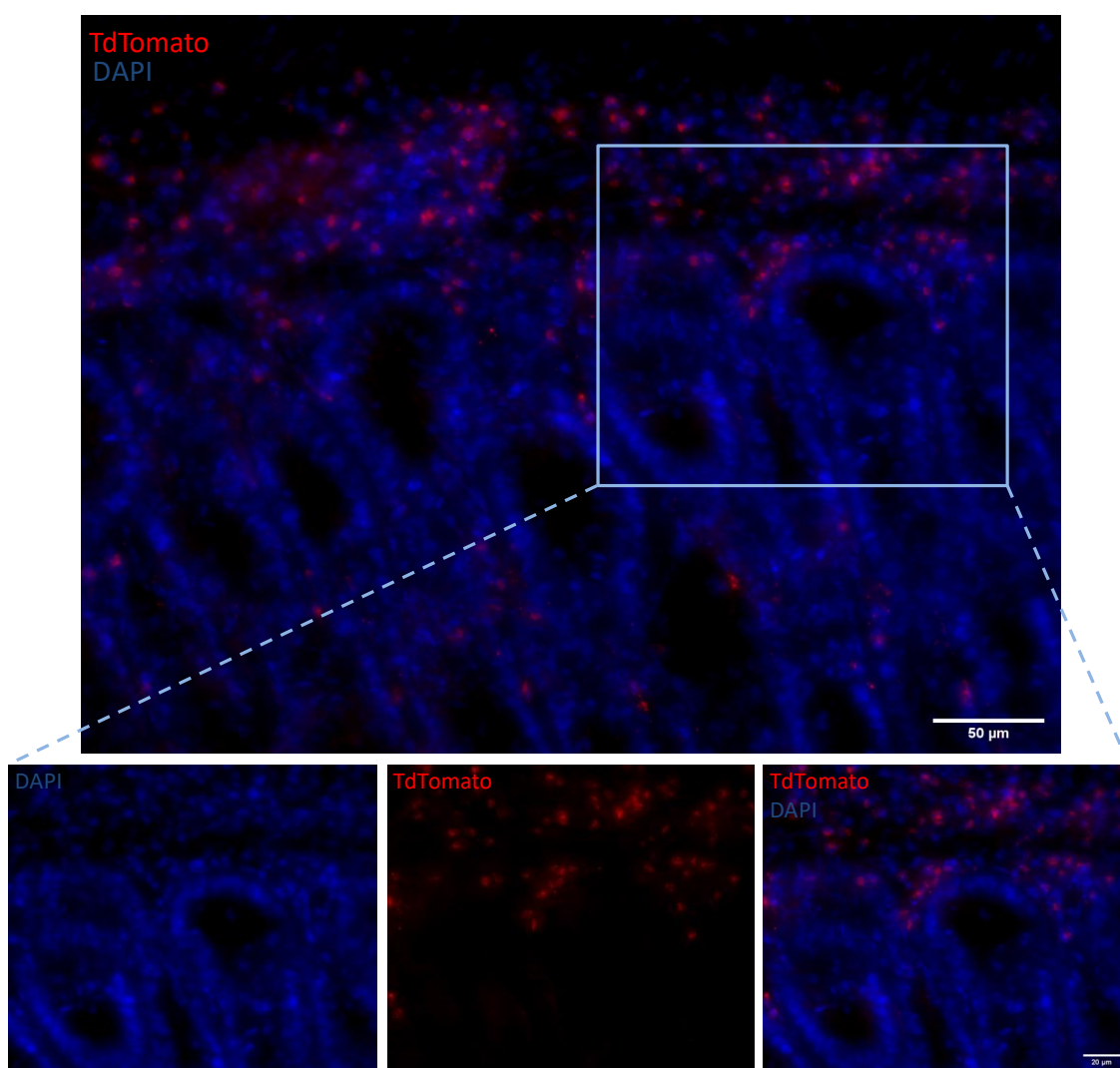


Figura 29: Macrófagos regulatórios presentes no intestino inflamado.

Camundongos selvagens com colite induzida por DSS, tratados com duas doses de macrófagos provenientes de camundongos *TdTomato*, ativados para o perfil regulatório, por via intraperitoneal. O cólon foi removido no sétimo dia de indução da colite. Imagem representativa do cólon de camundongos com os macrófagos marcados com fluorescência *TdTomato* (vermelho) e os núcleos

corados por DAPI (azul). A imagem ampliada destaca a presença dessas células na submucosa e na mucosa do cólon. Barra de 50 $\mu$ m na foto com aumento de 200x e 20  $\mu$ m na ampliação.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou avaliar o papel de diferentes perfis de ativação de macrófagos na patogênese e no controle da colite experimental induzida por DSS. Primeiramente diferentes estímulos de ativação de macrófagos para o perfil regulatório foram testados *in vitro* para a padronização do melhor estímulo de produção de IL-10, importante citocina anti-inflamatória, e redução de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12. Posteriormente tais macrófagos foram administrados como terapia celular em dois protocolos de tratamento distintos e sua eficácia no controle da colite experimental foi avaliada.

Macrófagos provenientes da medula óssea têm sido comumente utilizados em pesquisas devido à sua homogeneidade, capacidade de serem transfectados, facilidade de proliferação e vida útil prolongada (WANG et al., 2013). O isolamento de macrófagos de medula óssea foi realizado seguindo o protocolo previamente descrito por Mosser e Gonçalves (2015).

Para a ativação de macrófagos classicamente ativados foi utilizado somente LPS na concentração de 10ng/ml. Resultando na detecção de altas concentrações de IL-12 e baixas concentrações de IL-10 após 16 horas de estímulo. O LPS utilizado sozinho ou em associação com o IFN- $\gamma$  promove a ativação de monócitos e macrófagos resultando na síntese de citocinas pró-inflamatórias e no remodelamento da matriz extracelular (MANTOVANI et al., 2004). Nosso trabalho corrobora com os resultados encontrados por Fleming *et al.* (2015) que observaram que macrófagos estimulados com apenas 10ng/ml de LPS apresentaram um perfil inflamatório de ativação, secretando altas concentrações de IL-12 e baixas concentrações de IL-10.

Macrófagos ativados na presença de imunocomplexos + LPS polarizam para um perfil fenotípico caracterizado pelo aumento dos níveis de IL-10 e redução das concentrações de IL-12 (SUTTERWALA et al., 1998). Em nosso trabalho decidimos utilizar a ativação de macrófagos regulatórios por Beads + IgG de coelho em combinação com LPS, pois foi o que apresentou os melhores resultados de produção de IL-10. Este protocolo mimetiza a formação de imunocomplexos (*immunocomplex-like*), ao colocar as porções Fc da IgG próximas o bastante umas das outras, para gerar nos macrófagos o chamado *cross-linking* com os receptores Fc da IgG (Fc $\gamma$ R). O *cross-linking* é necessário para atuar como segundo sinal na ativação dessas células (GERBER; MOSSER, 2001). Isso se dá pela propriedade

dos plásticos de adsorver proteínas em sua superfície (FAIR; JAMIESON, 1980), fazendo desta forma, com que as beads de poliestireno fiquem repletas de anticorpos adsorvidos ao seu redor, e até mesmo se agreguem, mimetizando o que acontece em uma reação antígeno/anticorpo.

A segunda etapa do trabalho foi realizada com o intuito de padronizar e comprovar a eficácia do DSS como agente químico indutor de colite. O modelo agudo de colite é comumente induzido pela administração contínua do DSS em concentrações que variam entre 1 a 5%, por um período de 4 a 9 dias (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000; PERŠE; CERAR, 2012; SOLOMON et al., 2010; TAGHIPOUR et al., 2016). Sendo assim, duas concentrações diferentes de DSS foram avaliadas no tempo fixo de 7 dias. Os melhores resultados de perda de massa corporal, encurtamento do cólon, IAD e aspectos histopatológicos foram observados no modelo contínuo de indução de colite por 7 dias com a concentração de 3% de DSS. Esse protocolo de indução de colite foi adequado para o desenvolvimento de lesões representativas da RCU humana, sem provocar letalidade aos animais.

O modelo de indução de colite em camundongos utilizando DSS foi desenvolvido por Okayasu *et al.* (1990) e desde então tem sido utilizado em inúmeras publicações (CHASSAING et al., 2014; EGGER et al., 2000; KAYAMA et al., 2018; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000; MELGAR et al., 2008; MELGAR; KARLSSON; MICHAËLSSON, 2005; QUALLS et al., 2006; SASAKI et al., 2003; SOLOMON et al., 2010; TAGHIPOUR et al., 2016; YAN et al., 2009), tendo em vista que tal modelo é o que melhor mimetiza a RCU observada em humanos, além de ser um modelo muito bem estabelecido no teste de eficácia de diferentes protocolos terapêuticos (OKAYASU et al., 1990).

A colite induzida por DSS apresenta manifestações clínicas como: diarreia, sangue oculto ou até visível nas fezes, perda de massa corporal, diminuição do apetite e piloereção (pêlos arrepiados) (SOLOMON et al., 2010).

Os bons resultados do protocolo de indução de colite por DSS estão relacionados a fatores como: o peso molecular do DSS, a concentração utilizada, o tempo de administração desse agente químico, a linhagem do camundongo, a idade, o gênero, a massa corporal inicial do animal, além das condições higiênicas de criação e da microbiota (NELL; SUERBAUM; JOSENHANS, 2010; PERŠE; CERAR, 2012).



A faixa etária dos animais escolhida para indução da colite variou entre 6 e 8 semanas, já que estudos anteriores mostraram que nessa idade a indução do modelo é bem-sucedida e de grande reprodutibilidade (CHASSAING et al., 2014; SAMBASIVARAO, 2013). O gênero também possui relevância na padronização do modelo, e por isso, optamos por trabalhar com camundongos machos, pois de acordo com a literatura camundongos machos desenvolvem a colite mais rapidamente e de forma mais intensa quando comparado às fêmeas (CHASSAING et al., 2014).

O encurtamento do cólon é uma característica comum encontrada no modelo experimental de indução de colite por DSS, bem como na RCU humana. A redução do tamanho do cólon está diretamente associada à inflamação e à severidade da doença (CHASSAING et al., 2014). O encurtamento do cólon tem sido listado como uma das causas de diarreia em pacientes com RCU, devido à redução do tempo de trânsito intestinal (CIANCIO; CHANG, 1992). Ao correlacionarmos os demais achados macroscópicos e microscópicos com os dados de comprimento do cólon, acreditamos que a presença de inflamação e edema no cólon dos camundongos com colite (DSS) está diretamente relacionada à redução do comprimento do cólon.

As análises histopatológicas do cólon dos camundongos após 7 dias de administração de DSS, nas concentrações de 2,5% e 3%, confirmaram que o modelo foi efetivo ao apresentar lesões em toda extensão do cólon dos animais, sendo essas lesões mais evidentes e intensas na porção distal, corroborando com os achados de Yan *et al.* (2009) e Azuma *et al.* (2008) que evidenciaram que o cólon distal é a região mais afetada pelo tratamento com DSS (AZUMA et al., 2008; YAN et al., 2009).

Após estabelecimento do melhor modelo de indução de colite, administração de DSS na concentração de 3% por 7 dias aos camundongos C57BL/6, a terceira etapa do trabalho foi elaborada para avaliação de uma proposta de terapia celular pautada na administração de uma dose de macrófagos com diferentes perfis de ativação, injetada intraperitonealmente, no dia 3 da indução da colite.

Os resultados deste protocolo de terapia celular não foram promissores, tendo em vista que todos os animais com colite, tratados ou não com macrófagos sem estímulo, macrófagos classicamente ativados e macrófagos regulatórios apresentaram redução da massa corporal de forma semelhante. Os animais pertencentes a esses grupos também não apresentaram diferença significativa no

comprimento do cólon. Os animais dos grupos colite tratados com M $\phi$  e colite tratados com CAM $\phi$ s apresentaram aumento significativo no IAD quando comparados ao grupo controle. Com relação aos aspectos histopatológicos, os animais pertencentes ao grupo colite e colite tratados com diferentes perfis de ativação de macrófagos apresentaram morfologia do cólon alterada, com acometimento de toda extensão do órgão. Foram observadas áreas de erosão e fusão de criptas, presença de intenso infiltrado inflamatório e infiltração leucocitária interepitelial. Além de intenso edema presente na submucosa. O acometimento do cólon nos animais de todos esses grupos foi caracterizado pela perda da arquitetura do órgão.

Na quarta etapa do trabalho realizamos uma nova proposta de terapia celular baseada na administração de diferentes perfis de ativação de macrófagos, nos dias 3 e 5 de indução da colite.

Os resultados obtidos confirmam os efeitos paradoxais dos macrófagos, quando ativados de formas diferentes. Enquanto os macrófagos classicamente ativados pioram as lesões, os macrófagos regulatórios controlam a inflamação e têm a capacidade de restaurar a homeostase no intestino lesado.

Diversos são os trabalhos que mostram a importância dos macrófagos na patogênese das DII (HAYASHI et al., 2013; HEINSBROEK; GORDON, 2009; NA et al., 2019; WEBER; SAURER; MUELLER, 2009; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Paradoxalmente, essas células também são consideradas as responsáveis por manter a homeostase intestinal, bem como por coordenar a cura (BAIN; MOWAT, 2014; GRAINGER et al., 2017).

Os macrófagos possuem papel central na patogênese das DII. Ao serem ativados por PAMPS ou DAMPS, essas células apresentam um perfil pró-inflamatório com a produção de citocinas inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e quimiocinas que atraem mais células inflamatórias para o local e potencializam a lesão (MAHIDA, 2000).

Diferentemente da ação dos macrófagos classicamente ativados, os macrófagos regulatórios foram capazes de controlar a doença, com menos sinais clínicos e evitando lesões. Isto se deve em função do seu perfil produtor de IL-10. Macrófagos regulatórios produzem elevadas concentrações de IL-10, o que tem como efeito, a supressão da inflamação e a restauração da homeostase. Somado à função de alta produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória), essas células também

desligam sua produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Figura 8) e com isso não atraem mais células inflamatórias para o local, evitando assim o maior problema das DII que é a intensa inflamação que destrói os tecidos (CHANDRASEKARAN et al., 2019; CIRACI et al., 2016; JANCZY et al., 2014). Além disso existe uma importante evidência de que estas células induzam a cura de processos inflamatórios pela produção de fatores de crescimento que levam a formação de novos vasos sanguíneos, ativação de fibroblastos, gerando cicatrização e regeneração dos tecidos lesados (FLEMING et al., 2015).

Os macrófagos apresentam múltiplas possibilidades de ativação, caracterizando sua plasticidade, de acordo com o estímulo gerado no microambiente tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014; SICA; MANTOVANI, 2012). Muitos leucócitos apresentam esta característica de plasticidade, porém, em nenhum isso é tão evidente quanto nos macrófagos. Essa característica marcante de plasticidade pode explicar os papéis completamente antagônicos dos macrófagos observados no curso das DII.

Acreditamos que cada estado de ativação determina um importante papel desta célula em cada momento de um processo inflamatório. No início da agressão, não importa o agente agressor, é importante que essas células reajam inflamando, protegendo os tecidos de infecções, fagocitando restos celulares e atraindo outras células para o local. Papel esse desempenhado pelos macrófagos classicamente ativados. Logo em seguida, assim que o agente agressor foi controlado e não há mais risco para o organismo, essas células são reprogramadas para um perfil de “desinflamação”, no intuito de interromper o processo inflamatório, para que o tecido possa ser reconstruído. Função essa desempenhada pelos macrófagos regulatórios.

Alguns perfis de ativação de macrófagos têm sido estudados em modelos de colite experimental em camundongos. Hunter *et al.* (2010) evidenciaram a importância de diferentes perfis de ativação de macrófagos no tratamento da colite induzida pelo modelo de administração retal de ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS). Assim, foram os pioneiros a mostrar que a administração intraperitoneal de AA-M $\phi$ , provenientes do peritônio de camundongos, 6 horas após a indução da colite, foi eficaz em reduzir o IAD e o escore histológico quando comparado ao grupo colite, entretanto esses mesmos animais tratados com AA-M $\phi$  apresentaram significativo aumento do IAD e do escore histológico em relação ao grupo controle.

Leung *et al.* (2013) testaram dois protocolos terapêuticos para camundongos BALB/c com colite induzida por DNBS. O primeiro deles foi realizado pela administração de uma única dose de macrófagos derivados de medula óssea, ativados por via alternativa (IL-4 e IL-13, concentração de 20ng/ml), 48 horas antes da indução da colite por DNBS. No segundo protocolo terapêutico o DNBS foi administrado três vezes, por via retal, com intervalo de 2 semanas entre cada administração e foram realizadas 3 doses do tratamento, 6 horas após cada administração do DNBS. No primeiro protocolo foi observada a redução significativa do IAD e a preservação do comprimento do cólon do grupo tratado com macrófagos alternativamente ativados em relação ao grupo colite, porém não foi observada diferença no índice histológico. Entretanto vale ressaltar que o grupo tratado com os AA-M $\phi$  apresentou maior IAD e redução do comprimento do cólon em relação ao grupo controle. No segundo protocolo terapêutico foi também observada a redução significativa do IAD do grupo tratado com AA-M $\phi$ , quando comparado ao IAD do grupo colite. Entretanto, neste mesmo protocolo de tratamentos múltiplos, os animais tratados não apresentaram diferenças no índice histológico em relação ao grupo colite.

A administração de macrófagos alternativamente ativados melhora parcialmente alguns parâmetros da doença, mas foi incapaz de controlar as alterações histológicas, por exemplo. Além de apresentarem piora dos parâmetros clínicos e histológicos com relação ao grupo controle. Isto talvez se deva em função da diferença funcional apresentada pelos AA-M $\phi$ , quando comparados aos macrófagos regulatórios, que foram o cerne dos nossos experimentos.

A principal função dos macrófagos regulatórios é modular as respostas imunes inflamatórias e, assim, limitar os danos teciduais, contribuindo para a homeostase. Recentemente foi descrita uma nova função atribuída aos RM $\phi$ , a de inibir a ativação alternativa dos macrófagos e assim controlar a resposta pró fibrótica dessas células (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2019).

Smith *et al.* (2007) mostraram que camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* são resistentes à colite induzida por DSS. Os autores estudaram os mecanismos envolvidos nessa resistência e observaram que esses não estavam associados com a modulação da resposta Th2 ou com a ativação de linfócitos Treg, e sim com a migração de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11<sup>-</sup>) para a lâmina própria

dos camundongos. Entretanto também evidenciaram que a resistência à colite não se dava pela ação de macrófagos alternativamente ativados, mas na ocasião os autores não chegaram a levantar a hipótese de algum outro perfil de ativação de macrófagos responsável por tal modulação.

Anderson *et al.* (2013) mostraram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos, cultivados com células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASCs), isoladas de gordura epididimal e inguinal de camundongos e de lipoaspiração de humanos, possuem características fenotípicas diferentes dos macrófagos classicamente ativados e dos macrófagos alternativamente ativados, compartilhando características comuns aos macrófagos regulatórios, como a produção de elevadas concentrações de IL-10. Os autores também avaliaram a eficácia terapêutica dessas células no tratamento da colite experimental. Foi observado menor perda de massa corporal e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no cólon e no soro. Entretanto não foi observado aumento na concentração de IL-10 no cólon, importante citocina imunomodulatória produzida pelos RM $\phi$ . Os autores também mostraram que camundongos submetidos à colite e tratados com macrófagos sem estímulo apresentaram aumento no IAD e maior perda de massa corporal, porém não houve diferença no comprimento do cólon com relação ao grupo controle ou grupo colite (ANDERSON *et al.*, 2013).

O consumo de alimentos é um fator importante no decurso das doenças inflamatórias intestinais. Pacientes com DII ativa, apresentam problemas de desnutrição relacionados principalmente a redução da ingestão de alimentos (DIELEMAN; HEIZER, 1998), o que pode agravar ainda mais a situação clínica dos mesmos. A perda de massa corporal observada nessas doenças tem sido associada a fatores como aumento do catabolismo gerado pelo quadro inflamatório, má-absorção de macro e micronutrientes, sinais e sintomas que prejudicam a ingestão de alimentos e diarreia (ELSHERIF; ALEXAKIS; MENDALL, 2014).

Os sintomas gastrintestinais característicos das DII podem levar a desnutrição com perda de massa corporal, deficiência de proteínas, vitaminas, minerais e elementos traço, comuns na fase aguda da DC. Entretanto, pacientes com DC em fase de remissão, apresentam estado nutricional aparentemente normal. Pacientes com RCU ativa apresentam desnutrição com deficiências específicas, como anemia por ferro ou folato (BISCHOFF *et al.*, 2020). No geral, pacientes com DII podem

apresentar deficiências nutricionais graves, associadas à deficiência de digestão ou absorção de nutrientes, em virtude das lesões na mucosa, bem como pela inapetência gerada pela forte inflamação local e pelo sangramento (CAMPOS et al., 2002).

A redução do consumo alimentar e provavelmente a diarreia, refletiram na perda de massa corporal dos animais. Os animais pertencentes aos grupos colite e colite tratados com macrófagos sem estímulo ou macrófagos classicamente ativados, apresentaram alteração no consumo alimentar e diarreia com sangue. Entretanto os animais do grupo colite tratados com macrófagos regulatórios não apresentaram diferença no consumo alimentar durante os 7 dias de experimentação, além de apresentarem fezes relativamente bem formadas. Isso significa que a ação dos macrófagos regulatórios de reduzir e controlar a inflamação local e as lesões no cólon, propiciou menor desconforto nos animais, que desta forma continuam a apresentar apetite, colaborando, conseqüentemente, na sua recuperação.

No cólon as camadas de muco possuem importantes funções de auxiliar a progressão do conteúdo fecal, promover proteção química contra agressões ocasionadas por antígenos luminiais, toxinas e enzimas digestivas e impedir a translocação bacteriana para dentro do intestino (CORFIELD et al., 2000; GAUDIER et al., 2009; HOEBLER et al., 2006).

Modificações na composição, secreção e padrão de distribuição das mucinas nas criptas intestinais têm sido observadas em diferentes doenças inflamatórias que acometem o intestino, dentre elas a DC e a RCU (FILIPE, 1969; MOEHLE et al., 2006; YAMAMOTO-FURUSHO; MENDIVIL-RANGEL; FONSECA-CAMARILLO, 2012).

Mello *et al.* (2012) desenvolveram um modelo de análise de cólons de ratos Wistar, com e sem trânsito fecal, com o objetivo de quantificar o número de células caliciformes e correlacionar com a espessura das criptas, na presença ou ausência de trânsito intestinal. O estudo em questão reforçou que a manutenção do trânsito fecal está diretamente relacionada com o adequado desenvolvimento das criptas colônicas. A exclusão do trânsito intestinal reduz o tamanho das criptas e diminui a população de células caliciformes no intestino. Os autores por fim concluem que a conservação da massa corporal dos animais pode estar relacionada ao aumento da espessura das criptas e, conseqüentemente, do número de células caliciformes (MELLO et al., 2012). Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com os

nossos resultados, tendo em vista que os animais submetidos à colite e tratados com macrófagos regulatórios tiveram a preservação das criptas, bem como das células caliciformes ao longo do cólon, além de apresentaram ganho ponderal e melhores aspectos macroscópicos do cólon, com formação do bolo fecal, quando comparados aos animais com colite induzida.

O perfil de citocinas presente nas DII desempenha um importante papel na regulação das respostas imunes inata e adaptativa da mucosa intestinal. A resposta imunológica desregulada a antígenos comensais é caracterizada por um desequilíbrio no perfil de produção de citocinas em diferentes estágios do processo da doença (PIZARRO; COMINELLI, 2007).

O DSS é um agente químico que possui uma capacidade intrínseca de romper a barreira celular epitelial, levando a ativação de macrófagos da mucosa intestinal perante a presença de antígenos luminais, resultando na produção de citocinas (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999).

Pacientes com RCU e DC ativas e modelos experimentais de colite, apresentam aumento no número de macrófagos inflamatórios na mucosa intestinal (GRIMM et al., 1995; TOKUYAMA et al., 2005). Esses macrófagos recrutados são fenotipicamente diferentes da população de macrófagos residentes e desempenham um papel importante na mediação da inflamação crônica da mucosa (BAIN et al., 2013). Essas células ativadas secretam importantes citocinas pró-inflamatórias, como a 1L- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-23, IL-18 e TNF (MAHIDA, 2000). Em nosso trabalho observamos o aumento na concentração sérica das citocinas TNF e IL-6, corroborando com a ideia de que o modelo de DSS é um importante modelo experimental de colite.

As citocinas pró-inflamatórias não estão apenas relacionadas com a inflamação intestinal e com sinais clínicos das DII, como a diarreia (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002), essas também estão associadas a manifestações de doenças extra intestinais, como a artralgia (PEYRIN-BIROULET et al., 2011; RUFFOLO et al., 2010) e a efeitos sistêmicos, como a caquexia, relacionada principalmente à ação de TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (KLEIN et al., 2013). Neste contexto a liberação de IL-10, bem como a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, parece ser um importante efeito gerado pela terapia com macrófagos regulatórios.

Xiao *et al.* (2016) também observaram maiores concentrações de IL-6 e TNF no soro de camundongos C57BL/6 que receberam DSS na concentração de 3%, durante 7 dias. Tal estudo também demonstrou que o aumento na concentração dessas citocinas está diretamente ligado a alterações histopatológicas presentes no cólon e aumento da permeabilidade intestinal.

Alex *et al.* (2009) estudaram o perfil de citocinas no soro de camundongos C57BL/6 desafiados com o protocolo de colite de administração de DSS na concentração de 3% durante 7 dias. O estudo evidenciou o aumento das concentrações séricas das citocinas IL-6, TNF, IL-17 e da quimiocina derivada de queratinócitos (KC) dos animais colite com relação ao grupo controle e não apresentou diferença significativa na dosagem das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e da quimiocina MCP-1, corroborando com os resultados por nós encontrados.

Chami *et al.* (2014) também utilizaram a metodologia do kit CBA para avaliar a concentração de citocinas e quimiocinas no cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução de colite por DSS, na concentração de 2,5% durante 9 dias e não observaram diferença significativa na concentração de IL-10 entre os grupos controle e colite. XU, HUNT e BAO (2008) avaliaram a concentração de IL-10 no cólon de camundongos submetidos à colite por DSS 2,5% por 7 dias, pela técnica de ELISA e também não observaram diferença na concentração dessa citocina entre os grupos colite e controle. Sugerindo que a IL-10 pode não estar envolvida na colite induzida por DSS. Em nosso estudo o grupo colite com administração de DSS 3% por 7 dias também não apresentou diferença estatística na concentração de IL-10 com relação ao grupo controle, corroborando com os autores anteriormente citados. Entretanto foi observado maior concentração de IL-10 no soro de camundongos colite tratados com macrófagos regulatórios em relação ao grupo controle, o que corrobora com os estudos que mostram que macrófagos regulatórios são células com potencial função anti-inflamatória, que regulam positivamente a produção de IL-10 (ANDERSON *et al.*, 2013; FLEMING; MOSSER, 2011; GALLO; GONÇALVES; MOSSER, 2010; MURRAY *et al.*, 2014), e que sua produção de IL-10 é tão relevante, que foi detectada após 48 horas da última terapia com os macrófagos regulatórios. Acreditamos que a IL-10 controle as respostas imunes exarcebadas e proteja contra os danos epiteliais causados pela inflamação gerada pelo DSS, auxiliando na manutenção da integridade das células epiteliais.



A IL-10 também inibe diretamente a produção de IL-12 pelos macrófagos inflamatórios (OUYANG et al., 2011). Entretanto em nossos resultados não houve diferença significativa na dosagem de IL-12 no soro dos camundongos avaliados. Esse resultado pode ser explicado em função do tempo escolhido para a coleta do soro, somente no final do experimento, após 7 dias de indução de colite com DSS. Esse achado é corroborado pelo trabalho de Bauer *et al.* (2007) que não observaram diferença na expressão gênica de IL-12 no homogenato de cólon de camundongos que receberam DSS por 8 dias.

A utilização da IL-10 como terapia na colite experimental é embasada por diferentes estudos precedentes que mostraram o papel fundamental desta citocina no controle da homeostase intestinal e no quanto ela é fundamental para o controle da inflamação (ANDERSON et al., 2013; CHANG et al., 2013; GOMES-SANTOS et al., 2012; HAYASHI et al., 2013; OPPONG et al., 2015; SASAKI et al., 2005; SHOUVAL et al., 2014; ZIGMOND et al., 2014).

Devido à importante função regulatória da IL-10 no contexto da inflamação intestinal, opções terapêuticas têm sido propostas para o tratamento das DII. Entretanto os resultados da administração de IL-10 recombinante ainda são inconclusivos e de eficácia questionável (BRAAT; PEPPELENBOSCH; HOMMES, 2003; FEDORAK et al., 2000; HERFARTH; SCHÖLMERICH, 2002; MANTOVANI; MARCHESI, 2014; TILG et al., 2002). Uma revisão sistemática realizada por Buruiana e Alonso-Coello (2008) evidenciou que a administração de IL-10 recombinante não aumenta o número de remissões (completas ou clínicas) em relação a administração do placebo em pacientes com DC.

Alguns motivos para o insucesso da terapia com IL-10 recombinante têm sido apontados, como o fato da administração sistêmica de IL-10 não ser suficiente para exercer sua função de citocina anti-inflamatória nos locais de inflamação da mucosa, acrescido do fato de que o tratamento sistêmico com essa citocina possui tempo de meia-vida curto (SCHREIBER et al., 1995). A administração de elevadas concentrações de IL-10 recombinante (20 µg/kg durante 28 dias) em pacientes com DC, também apresentou limitações, uma vez que a utilização de elevadas doses dessa citocina foi relacionada a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , pelas células T auxiliares (TILG et al., 2002).

Acreditamos que o uso da IL-10, sempre considerada de extrema importância no controle das DII, não tenha se constituído na prática terapêutica, em função

provavelmente da necessidade de altas concentrações necessárias no soro, para a manutenção de um mínimo funcional no intestino lesado. Tal evento se torna difícil, visto que a IL-10 parece ser rapidamente consumida por um grande número de células que expressam seus receptores em todo o corpo (HAYASHI et al., 2013; MANTOVANI; MARCHESI, 2014; SHOUVAL et al., 2014).

Propostas terapêuticas pautadas na administração oral de IL-10 recombinante também não apresentaram resultados promissores devido a sensibilidade dessa citocina ao ambiente do sistema digestório, sendo essa proteína degradada rapidamente após sua administração, não conseguindo alcançar o intestino inflamado (STEIDLER; VANDENBROUCKE, 2006).

Para contornar os problemas relacionados ao uso da IL-10 no tratamento das DII, estudos que desenvolvam novas estratégias baseadas na entrega da IL-10 diretamente no intestino inflamado, fazem-se necessários. A entrega da IL-10 diretamente no sítio da inflamação resolverá a necessidade de dosagens altas de IL-10, além de reduzir o desenvolvimento de efeitos secundários pró-inflamatórios não desejados (NELL; SUERBAUM; JOSENHANS, 2010).

No caso do nosso modelo proposto, com o uso dos macrófagos produtores de IL-10, estas células ao migrarem para o tecido lesado, se espalham e produzem grandes quantidades de IL-10 de forma constante, exatamente onde é necessário, por toda a extensão da lesão, não havendo dispersão e por este motivo, amplificando a possibilidade de sucesso.

Observamos que esta constância da presença de IL-10, para a recuperação da homeostase nas DII, é tão sensível, que a terapia testada nesse trabalho composta por apenas uma dose de macrófagos no terceiro dia, não obteve sucesso, sendo necessário duas doses com intervalo de 48 horas, o que permitiu a permanência de um maior número de macrófagos no local da lesão e a liberação de IL-10 por mais tempo de forma constante.

Nossos resultados, apresentaram importantes interpretações: em primeiro lugar, a afirmação de que os macrófagos são muito importantes na patogênese das DII, em virtude de que o uso de macrófagos classicamente ativados, estimulados com LPS, potencializou a doença, aumentando os sinais clínicos e patológicos, mostrando que o perfil pró-inflamatório destas células são muito piores para a doença; em segundo lugar, esta mesma célula, quando ativada por imunocomplexo + LPS (perfil regulatório) e transferida aos camundongos com colite, mostrou-se

capaz de controlar a doença clínica além de melhorar significativamente o índice histológico, determinando um importante papel dos macrófagos, também na homeostase intestinal, garantindo o “equilíbrio da resposta inflamatória” local, mesmo após severa agressão. Esses RMφ podem estar promovendo a “desativação” de macrófagos residentes presentes na mucosa inflamada, bem como de macrófagos inflamatórios que migraram para o cólon. Sendo assim, dependendo do estímulo, o papel destas células pode ser totalmente paradoxal, atuando diretamente na progressão da doença ou na sua cura.

Outro resultado interessante do nosso estudo foi que a aplicação de macrófagos sem estímulo também favorece a progressão e a piora do quadro de colite, contribuindo para a hipótese de que a administração de mais macrófagos num ambiente pró-inflamatório intensifica a inflamação, devido ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias, polarizando estes macrófagos para o perfil de ativação clássico, potencializando a doença. Esse resultado é corroborado pelo trabalho de Rivollier *et al.* (2012) que mostraram que no modelo de colite induzida pela transferência de células T, os monócitos Ly6C<sup>hi</sup> migram para o cólon inflamado e se diferenciaram em células pró-inflamatórias, que agem secretando altos níveis de IL-12, IL-23, iNOS e TNF. Esses achados demonstram a capacidade dos monócitos presentes no sangue de se diferenciarem em células inflamatórias de acordo com as condições do microambiente.

Por fim nossos resultados corroboram com os achados de que os macrófagos são as células centrais na indução e na regulação da inflamação intestinal induzida por DSS (HAYASHI *et al.*, 2013; QUALLS *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2007). Assim sendo, tais resultados demonstram a potencialidade em se controlar doenças inflamatórias graves, como as DII, por meio da manipulação do estado de ativação de macrófagos, e reafirmam as ideias iniciais de Metchnikoff acerca do importante papel destas células na manutenção da homeostase tecidual (TAUBER, 2003).

## **7. CONCLUSÃO**

Baseado nos resultados encontrados, ratificamos a ideia de que os macrófagos representam uma estratégia atraente na reeducação do microambiente imune intestinal e na restauração da homeostase tecidual após a inflamação. Que a proposta de imunoterapia celular, com administração de duas doses de macrófagos regulatórios controla a inflamação no modelo experimental de DII.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, Sarah Leão Fiorini et al. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, n. JAN, p. 1–12, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01969.

AHLUWALIA, Bani; MORAES, Luiza; MAGNUSSON, Maria K.; ÖHMAN, Lena. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 379–389, 2018. DOI: 10.1080/00365521.2018.1447597. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>.

ALEX, Philip; ZACHOS, Nicholas C.; NGUYEN, Thuan; GONZALES, Liberty; CHEN, Tian E.; CONKLIN, Laurie S.; CENTOLA, Michael; LI, Xuhang. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 341–352, 2009. DOI: 10.1002/ibd.20753.

ANDERSON, Per; SOUZA-MOREIRA, Luciana; MORELL, Maria; CARO, Marta; O'VALLE, Francisco; GONZALEZ-REY, Elena; DELGADO, Mario. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. **Gut**, [S. l.], v. 62, n. 8, p. 1131–1141, 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302152.

ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 290, n. 1, p. 61–9, 1997. DOI: 10.1007/s004410050908.

ARRANZ, A. et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 109, n. 24, p. 9517–9522, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1119038109.

AZUMA, Yasu Taka; HAGI, Kiyomi; SHINTANI, Norihito; KUWAMURA, Mitsuru; NAKAJIMA, Hidemitsu; HASHIMOTO, Hitoshi; BABA, Akemichi; TAKEUCHI, Tadayoshi. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 216, n. 1, p. 111–119, 2008. DOI: 10.1002/jcp.21381.

BAIN, C. C. et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C hi monocyte

precursors. **Mucosal Immunology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 498–510, 2013. DOI: 10.1038/mi.2012.89.

BAIN, C. C.; MOWAT, A. Mc I. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 260, p. 102–117, 2014. DOI: 10.1007/s00424-017-1958-2.

BAIN, Calum C. et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 15, p. 929–937, 2014. DOI: 10.1038/ni.2967.

BANTEL, Heike; BERG, Christoph; VIETH, Michael; STOLTE, Manfred; KRUIS, Wolfgang; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 95, p. 3452–3457, 2000. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.03360.x.

BARBARA, G.; XING, Z.; HOGABOAM, C. M.; GAULDIE, J.; COLLINS, S. M. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. **Gut**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 344–349, 2000. DOI: 10.1136/gut.46.3.344.

BAUER, Christian; LOHER, Florian; DAUER, Marc; MAYER, Christine; LEHR, Hans Anton; SCHÖNHARTING, Martin; HALLWACHS, Roland; ENDRES, Stefan; EIGLER, Andreas. The ICE inhibitor pralnacasan prevents DSS-induced colitis in C57BL/6 mice and suppresses IP-10 mRNA but not TNF- $\alpha$  mRNA expression. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], v. 52, n. 7, p. 1642–1652, 2007. DOI: 10.1007/s10620-007-9802-8.

BELKAID, Yasmine; HAND, Timothy W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 121–141, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>.

Disponível em:

BERNDT, B. E.; ZHANG, M.; CHEN, G. H.; HUFFNAGLE, G. B.; KAO, J. Y. The Role of Dendritic Cells in the Development of Acute Dextran Sulfate Sodium Colitis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.179.9.6255.

BERNSTEIN, Charles N. et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 112–124, 2010. DOI: 10.1002/ibd.21048.

BIBILONI, Rodrigo; FEDORAK, Richard N.; TANNOCK, Gerald W.; MADSEN, Karen L.; GIONCHETTI, Paolo; CAMPIERI, Massimo; DE SIMONE, Claudio; SARTOR, R.

- Balfour. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 100, p. 1539–1546, 2005. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41794.x.
- BICKSTON, S. J.; COMINELLI, F. Recombinant interleukin 10 for the treatment of active Crohn's disease: Lessons in biologic therapy. **Gastroenterology**, [S. l.], 2000. DOI: 10.1053/gast.2000.20822.
- BILLIQUOD, Vincent; FORD, Alexander C.; TEDESCO, Emilie Del; COLOMBEL, Jean Frédéric; ROBLIN, Xavier; PEYRIN-BIROULET, Laurent. Preoperative use of anti-TNF therapy and postoperative complications in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis. **Journal of Crohn's and Colitis**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 853–867, 2013. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.01.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.014>.
- BISCHOFF, Stephan C. et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 39, p. 632–653, 2020. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.11.002.
- BRAAT, Henri et al. A Phase I Trial With Transgenic Bacteria Expressing Interleukin-10 in Crohn's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 754–9, 2006. DOI: 10.1016/j.cgh.2006.03.028.
- BRAAT, Henri; PEPPELENBOSCH, Maikel. P.; HOMMES, Daan. W. Interleukin-10-based therapy for inflammatory bowel disease. **Expert Opinion**, [S. l.], v. 3, p. 725–31, 2003. DOI: 10.1080/00855910310001467.
- BURUIANA, F.; ALONSO-COELLO, Pablo. Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], n. 1, 2008. DOI: 10.1002/14651858.CD005109.pub2.
- CAMPOS, Fábio Guilherme; WAITZBERG, Dan L.; TEIXEIRA, Magaly Gemio; MUCERINO, Donato Roberto; HABR-GAMA, Angelita; KISS, Desidério R. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. **Revista do Hospital das Clínicas**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 187–198, 2002. DOI: 10.1590/S0041-87812002000400009.
- CHAMI, Belal; YEUNG, Amanda W. S.; VAN VREDEN, Caryn; KING, Nicholas J. C.; BAO, Shisan. The role of CXCR3 in DSS-induced colitis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 7, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0101622.
- CHANDRASEKARAN, Prabha; IZADJOO, Salman; STIMELY, Jessica; PALANIYANDI, Senthilkumar; ZHU, Xiaoping; TAFURI, Wagner; MOSSER, David M.

Regulatory Macrophages Inhibit Alternative Macrophage Activation and Attenuate Pathology Associated with Fibrosis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 203, n. 8, p. 2130–2140, 2019. DOI: 10.4049/jimmunol.1900270.

CHANG, H. H.; MIAW, S. C.; TSENG, W.; SUN, Y. W.; LIU, C. C.; TSAO, H. W.; HO, I. C. PTPN22 Modulates Macrophage Polarization and Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 191, n. 5, p. 2134–2143, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1203363. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203363>.

CHASSAING, Benoit; AITKEN, Jesse D.; MALLESHAPPA, Madhu; VIJAY-KUMAR, Matam. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, [S. l.], v. 104, p. Unit 15.25, 2014. DOI: 10.1002/0471142735.im1525s104.

CIANCIO, MAE J.; CHANG, EUGENE B. Epithelial Secretory Response to Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 664, n. 1, p. 210–221, 1992. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb39762.x.

CIRACI, Ceren et al. Immune complexes indirectly suppress the generation of Th17 Responses In Vivo. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151252.

COLOMBEL, Jean Frederic; NARULA, Neeraj; PEYRIN-BIROULET, Laurent. Management Strategies to Improve Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 152, n. 2, p. 351–361.e5, 2017. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.046>.

CORFIELD, A. P.; MYERSCOUGH, N.; LONGMAN, R.; SYLVESTER, P.; ARUL, S.; PIGNATELLI, M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: New prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, [S. l.], p. 589–94, 2000. DOI: 10.1136/gut.47.4.589.

COSTELLO, Samuel P. et al. Short Duration, Low Intensity, Pooled Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients with Mild-Moderately Active Ulcerative Colitis: A Randomised Controlled Trial. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 11, p. 23, 2017. DOI: 10.1016/s0016-5085(17)30969-1.

DARR, Umar; KHAN, Nabeel. Treat to Target in Inflammatory Bowel Disease: An Updated Review of Literature. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 116–25, 2017. DOI: 10.1007/s11938-017-0130-6.



DC, Pearson; GR, May; GH, Fick; LR, Sutherland. Azathioprine and 6-mercaptopurine in crohn disease: A meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 123, n. 2, p. 132–42, 1995.

DE CRUZ, Peter; KAMM, Michael A.; PRIDEAUX, Lani; ALLEN, Patrick B.; DESMOND, Paul V. Postoperative recurrent luminal Crohn's disease: A systematic review. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 758–777, 2012. DOI: 10.1002/ibd.21825.

DE MATTOS, Bruno Rafael Ramos; GARCIA, Maellin Pereira Gracindo; NOGUEIRA, Julia Bier; PAIATTO, Lisiery Negrini; ALBUQUERQUE, Cassia Galdino; SOUZA, Caique Lopes; FERNANDES, Luís Gustavo Romani; TAMASHIRO, Wirla Maria Da Silva Cunha; SIMIONI, Patricia Ucelli. Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/493012.

DE SCHEPPER, Sebastiaan et al. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. **Cell**, [S. l.], v. 175, n. 2, p. 400–415.e13, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.048.

DERIKX, Lauranne A. A. P.; DIELEMAN, Levinus A.; HOENTJEN, Frank. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 55–71, 2016. DOI: 10.1016/j.bpg.2016.02.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.005>.

DI SABATINO, Antonio et al. Functional Modulation of Crohn's Disease Myofibroblasts by Anti-Tumor Necrosis Factor Antibodies. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. 137–149, 2007. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.069.

DI SABATINO, Antonio; BIANCHERI, Paolo; ROVEDATTI, Laura; MACDONALD, Thomas T.; CORAZZA, Gino R. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 368–371, 2012. DOI: 10.1002/ibd.21735.

DIELEMAN, L. A.; HEIZER, W. D. Nutritional issues in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, [S. l.], v. 27, p. 435–51, 1998. DOI: 10.1016/S0889-8553(05)70012-1.

DO, Vi T.; BAIRD, Brian G.; KOCKLER, Denise R. Probiotics for maintaining remission of ulcerative colitis in adults. **Annals of Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 565–571, 2010. DOI: 10.1345/aph.1M498.

DUCHMANN, Rainer; SCHMITT, Edgar; KNOLLE, Percy; ZUM BÜSCHENFELDE, Karl Hermann Meyer; NEURATH, Markus. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 934–938, 1996. DOI: 10.1002/eji.1830260432.

EDDIE IP, W. K. ..; HOSHI, N. ..; SHOUVAL, D. D. ..; SNAPPER, S. ..; MEDZHITOV, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, [S. l.], v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017. DOI: 10.1126/science.1249098.Sleep.

EDWARDS, Justin P.; ZHANG, Xia; FRAUWIRTH, Kenneth A.; MOSSER, David M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 80, n. 6, p. 1298–307, 2006. DOI: 10.1189/jlb.0406249. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905575> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2642590>.

EGGER, Bernhard; BAJAJ-ELLIOTT, Mona; MACDONALD, Thomas T.; INGLIN, Roman; EYSSELEIN, Viktor E.; BÜCHLER, Markus W. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: Cytokine profile and dose dependency. **Digestion**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 240–248, 2000. DOI: 10.1159/000007822.

ELSHERIF, Yasser; ALEXAKIS, Christopher; MENDALL, Michael. Determinants of weight loss prior to diagnosis in inflammatory bowel disease: A retrospective observational study. **Gastroenterology Research and Practice**, [S. l.], p. 1–7, 2014. DOI: 10.1155/2014/762191.

FAIR, B. D.; JAMIESON, A. M. Studies of protein adsorption on polystyrene latex surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 77, n. 2, p. 525–534, 1980. DOI: 10.1016/0021-9797(80)90325-2.

FAROOQ, Shukkur Muhammed; STILLIE, RoseMarie; SVENSSON, Majlis; SVANBORG, Catharina; STRIETER, Robert M.; STADNYK, Andrew W. Therapeutic effect of blocking CXCR2 on neutrophil recruitment and dextran sodium sulfate-induced colitis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1124/jpet.108.145862.

FEDORAK, Richard N. et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 119, n. 6, p. 1473–1482, 2000. DOI: 10.1053/gast.2000.20229.

- FILIPPE, M. I. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. **Gut**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 577–586, 1969. DOI: 10.1136/gut.10.7.577.
- FLEMING, Bryan D.; CHANDRASEKARAN, Prabha; DILLON, Laura A. L.; DALBY, Elizabeth; SURESH, Rahul; SARKAR, Arup; EL-SAYED, Najib M.; MOSSER, David M. The generation of macrophages with anti-inflammatory activity in the absence of STAT6 signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 395–407, 2015. DOI: 10.1189/jlb.2a1114-560r.
- FLEMING, Bryan D.; MOSSER, David M. Regulatory macrophages: Setting the threshold for therapy. **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 9, p. 2498–2502, 2011. DOI: 10.1002/eji.201141717.
- FORKEL, Marianne; MJÖSBERG, Jenny. Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, [S. l.], v. 16, 2016. DOI: 10.1007/s11882-016-0652-3.
- FOURNIER, Marc R.; KLEIN, Julianne; MINUK, Gerald Y.; BERNSTEIN, Charles N. Changes in liver biochemistry during methotrexate use for inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 105, p. 1620–1626, 2010. DOI: 10.1038/ajg.2010.21.
- FRANKE, Andre et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 40, p. 1319–1323, 2008. DOI: 10.1038/ng.221.
- FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 65–70, 2003. DOI: 10.1136/gut.52.1.65.
- GALLO, Paul; GONÇALVES, Ricardo; MOSSER, David M. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. **Immunology Letters**, [S. l.], v. 133, p. 70–77, 2010. DOI: 10.1016/j.imlet.2010.07.004.
- GAUDIER, E.; RIVAL, M.; BUISINE, M. P.; ROBINEAU, I.; HOEBLER, C. Butyrate enemas Upregulate MRCU genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiological Research**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 111–9, 2009.
- GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc Receptors. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 166, p. 6861–6868, 2001. a. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6861.

GERBER, Jeffrey S.; MOSSER, David M. Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fcγ Receptors. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 166, n. 11, p. 6861–6868, 2001. b. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6861.

GEREMIA, Alessandra; BIANCHERI, Paolo; ALLAN, Philip; CORAZZA, Gino R.; DI SABATINO, Antonio. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 3–10, 2014. DOI: 10.1016/j.autrev.2013.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>.

GERLACH, Katharina et al. T H 9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 676–686, 2014. DOI: 10.1038/ni.2920.

GIONCHETTI, Paolo; RIZZELLO, Fernando; VENTURI, Alessandro; BRIGIDI, Patrizia; MATTEUZZI, Diego; BAZZOCCHI, Gabriele; POGGIOLI, Gilberto; MIGLIOLI, Mario; CAMPIERI, Massimo. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 119, p. 305–309, 2000. DOI: 10.1053/gast.2000.9370.

GJULADIN-HELLON, Teuta; GORDON, Morris; IHEOZOR-EJIOFOR, Zipporah; AKOBENG, Anthony K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of surgically induced remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], v. 2019, n. 6, 2019. DOI: 10.1002/14651858.CD008414.pub3.

GLOCKER, Erik-Oliver et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **The New England journal of medicine**, [S. l.], 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0907206.

GOMES-SANTOS, Ana Cristina et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical and Developmental Immunology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/560817.

GONÇALVES, Ricardo; MOSSER, David M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**, [S. l.], v. 111, p. Unit 14.1, 2015. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s111. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1401s111>.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], p. 23–35, 2003. DOI: 10.1038/nri978.

GORDON, Siamon; PLUDEMANN, Annette; MARTINEZ ESTRADA, Fernando.

- Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews**, [S. l.], v. 262, p. 36–55, 2014. DOI: 10.1111/imr.12223.
- GORDON, Siamon; TAYLOR, Philip R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], p. 953–964, 2005. DOI: 10.1038/nri1733.
- GRAFF, Lesley A.; WALKER, John R.; BERNSTEIN, Charles N. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: A review of comorbidity and management. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 1105–1118, 2009. DOI: 10.1002/ibd.20873.
- GRAINGER, John R. et al. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. **Nature Medicine**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1038/nm.3189.
- GRAINGER, John R.; KONKEL, Joanne E.; ZANGERLE-MURRAY, Tamsin; SHAW, Tovah N. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 469, n. 3–4, p. 527–539, 2017. DOI: 10.1007/s00424-017-1958-2.
- GREN, Susanne T.; GRIP, Olof. Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 1992–1998, 2016. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000824.
- GRIMM, MC; PULLMAN, WE; BENNETT, GM; SULLIVAN, PJ; PAVLI, P.; DOE, WF. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 10, p. 387–395, 1995. DOI: 10.1111/j.1440-1746.1995.tb01589.x.
- GROOL, T. A.; VAN DULLEMEN, H.; MEENAN, J.; KOSTER, F.; TEN KATE, F. J. W.; LEBEAUT, A.; TYTGAT, G. N. J.; VAN DEVENTER, S. J. H. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 in rabbit immune complex-induced colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 754–758, 1998. DOI: 10.1080/00365529850171710.
- GUNNARSSON, Candace; CHEN, Jie; RIZZO, John A.; LADAPO, Joseph A.; LOFLAND, Jennifer H. Direct health care insurer and out-of-pocket expenditures of inflammatory bowel disease: Evidence from a US national survey. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. l.], v. 57, n. 12, p. 3080–3091, 2012. DOI: 10.1007/s10620-012-2289-y.
- HAMILTON, Matthew J. et al. Prospective Evaluation of Terminal Ileitis in a Surveillance Population of Patients with Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel**

**Diseases**, [S. I.], v. 22, n. 10, p. 2448–2455, 2016. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000911.

HAYASHI, Atsushi et al. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. **Cell Host and Microbe**, [S. I.], v. 13, n. 6, p. 711–722, 2013. DOI: 10.1016/j.chom.2013.05.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.013>.

HEINSBROEK, Sigrid E. M.; GORDON, Siamon. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. **Expert reviews in molecular medicine**, [S. I.], v. 11, p. 1–19, 2009. DOI: 10.1017/S1462399409001069.

HELLER, Frank et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, [S. I.], v. 129, p. 550–564, 2005. DOI: 10.1016/j.gastro.2005.05.002.

HERFARTH, H.; SCHÖLMERICH, J. IL-10 therapy in Crohn's disease: At the crossroads. **Gut**, [S. I.], v. 50, n. 2, p. 146–147, 2002. DOI: 10.1136/gut.50.2.146.

HISAMATSU, Tadakazu; KANAI, Takanori; MIKAMI, Yohei; YONENO, Kazuaki; MATSUOKA, Katsuyoshi; HIBI, Toshifumi. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacology and Therapeutics**, [S. I.], v. 137, n. 3, p. 283–297, 2013. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.10.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.008>.

HOEBLER, C.; GAUDIER, E.; DE COPPET, P.; RIVAL, M.; CHERBUT, C. MRCU genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. **Digestive Diseases and Sciences**, [S. I.], v. 51, n. 2, p. 381–9, 2006. DOI: 10.1007/s10620-006-3142-y.

HOFF, Janet. Methods of Blood Collection in the Mouse. **Lab Animal**, [S. I.], v. 29, n. 10, p. 47–53, 2000.

HOPKINS, Jessica; HWANG, Grace; JACOB, Justin; SAPP, Nicklas; BEDIGIAN, Rick; OKA, Kazuhiro; OVERBEEK, Paul; MURRAY, Steve; JORDAN, Philip W. Meiosis-Specific Cohesin Component, Stag3 Is Essential for Maintaining Centromere Chromatid Cohesion, and Required for DNA Repair and Synapsis between Homologous Chromosomes. **PLoS Genetics**, [S. I.], v. 10, n. 7, 2014. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004413.

HORNBECK, Peter V. Enzyme-linked immunosorbent assays. **Current Protocols in**

**Immunology**, [S. I.], v. 2015, n. August, p. 2.1.1-2.1.23, 2015. DOI: 10.1002/0471142735.im0201s110.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, [S. I.], p. 860–867, 2006. DOI: 10.1038/nature05485.

HUNTER, Meaghan M.; WANG, Arthur; PARHAR, Kuljit S.; JOHNSTON, Michael J. G.; VAN ROOIJEN, Nico; BECK, Paul L.; MCKAY, Derek M. In Vitro-Derived Alternatively Activated Macrophages Reduce Colonic Inflammation in Mice.

**Gastroenterology**, [S. I.], v. 138, n. 4, p. 1395–1405, 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.041. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.041>.

IMDAD, Amer; NICHOLSON, Maribeth R.; TANNER-SMITH, Emily E.; ZACKULAR, Joseph P.; GOMEZ-DUARTE, Oscar G.; BEAULIEU, Dawn B.; ACRA, Sari. Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. I.], 2018. DOI: 10.1002/14651858.CD012774.pub2.

ITAGAKI, Munenori; SARUTA, Masayuki; IINUMA, Toshio; ARIHIRO, Seiji; KATO, Tomohiro; TAJIRI, Hisao. Infliximab- and immunosuppressant-resistant Crohn's disease successfully treated with adsorptive granulocyte apheresis combined with prednisolone. **Case Reports in Gastroenterology**, [S. I.], v. 6, p. 118–123, 2012. DOI: 10.1159/000334428.

JANCZY, John R.; CIRACI, Ceren; HAASKEN, Stefanie; IWAKURA, Yoichiro; OLIVIER, Alicia K.; CASSEL, Suzanne L.; SUTTERWALA, Fayyaz S. Immune Complexes Inhibit IL-1 Secretion and Inflammasome Activation. **The Journal of Immunology**, [S. I.], v. 193, n. 10, p. 5190–5198, 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1400628.

JEENGAR, Manish Kumar; THUMMURI, Dinesh; MAGNUSSON, Mattias; NAIDU, V. G. M.; UPPUGUNDURI, Srinivas. Uridine Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04041-9.

JESS, Tine; FRISCH, Morten; SIMONSEN, Jacob. Trends in Overall and Cause-Specific Mortality Among Patients With Inflammatory Bowel Disease From 1982 to 2010. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [S. I.], v. 11, n. 1, p. 43–48, 2013. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.09.026.

JOHANSSON, Malin E. V.; HANSSON, Gunnar C. Mucus and the goblet cell. **Digestive Diseases**, [S. I.], v. 31, n. 3–4, p. 305–309, 2013. DOI:

10.1159/000354683.

JURJUS, Abdo R.; KHOURY, Naim N.; REIMUND, Jean-Marie. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 81–92, 2004. DOI: 10.1016/j.vascn.2003.12.002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871903000959>.

KANAI, T.; MIKAMI, Y.; SUJINO, T.; HISAMATSU, T.; HIBI, T. ROR $\gamma$ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation. **Mucosal Immunology**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1038/mi.2012.6.

KANG, Ok Hwa et al. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 893–899, 2006.

KAPLAN, Gilaad G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], p. 720–727, 2015. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.150.

KASER, Arthur; ZEISSIG, Sebastian; BLUMBERG, Richard S. Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? **Dig Dis**, [S. l.], v. 28, p. 395–405, 2010. DOI: 10.1159/000320393.

KAWANE, K.; FUKUYAMA, H.; KONDOH, G.; TAKEDA, J.; OHSAWA, Y.; UCHIYAMA, Y.; NAGATA, S. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. **Science**, [S. l.], v. 292, n. 5521, p. 1546–1549, 2001. DOI: 10.1126/science.292.5521.1546.

KAYAMA, Hisako et al. Heme ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis through providing intestinal macrophages with noninflammatory profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 115, n. 33, p. 8418–8423, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1808426115.

KIESLER, Patricia; FUSS, Ivan J.; STROBER, Warren. Experimental models of inflammatory bowel diseases. **Cellular and Molecular Gastroenterology and hepatology**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 154–170, 2015. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.

KIM, Young S.; HO, Samuel B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010. DOI: 10.1007/s11894-010-0131-2.

KITAJIMA, Shuji; TAKUMA, Shigenobu; MORIMOTO, Masatoshi. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental Animals**, [S. l.], v. 48, p. 137–143, 1999. DOI:



10.1538/expanim.48.137.

KITAJIMA, Shuji; TAKUMA, Shigenobu; MORIMOTO, Masatoshi. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. **Experimental Animals**, [S. l.], v. 49, p. 9–15, 2000. DOI: 10.1538/expanim.49.9.

KLEIN, Gerald L.; PETSCHOW, Bryon W.; SHAW, Audrey L.; WEAVER, Eric. Gut barrier dysfunction and microbial translocation in cancer cachexia: A new therapeutic target. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 361–367, 2013. DOI: 10.1097/SPC.0000000000000017.

KOBOZIEV, Iurii; REINOSO WEBB, Cynthia; FURR, Kathryn L.; GRISHAM, Matthew B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 68, p. 122–133, 2014. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.008>.

KRIEGLSTEIN, Christian F.; CERWINKA, Wolfgang H.; LAROUX, F. Stephen; GRISHAM, Matthew B.; SCHÜRMAN, Guido; BRÜWER, Matthias; GRANGER, D. Neil. Role of appendix and spleen in experimental colitis. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], 2001. DOI: 10.1006/jsre.2001.6223.

KUENZIG, M. Ellen; REZAI, Ali; SEOW, Cynthia H.; OTLEY, Anthony R.; STEINHART, A. Hillary; GRIFFITHS, Anne Marie; KAPLAN, Gilaad G.; BENCHIMOL, Eric I. Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], v. 2014, n. 8, 2014. DOI: 10.1002/14651858.CD002913.pub3.

LEE, S. H.; STARKEY, Phyllis M.; GORDON, Siamon. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 161, p. 475–489, 1985. DOI: 10.1084/jem.161.3.475.

LEUNG, Gabriella; WANG, Arthur; FERNANDO, Maria; PHAN, Van C.; MCKAY, Derek M. Bone marrow-derived alternatively activated macrophages reduce colitis without promoting fibrosis: participation of IL-10. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, [S. l.], v. 304, n. 9, p. G781-92, 2013. DOI: 10.1152/ajpgi.00055.2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494123>.

LICHTENSTEIN, Gary R.; HANAUER, Stephen B.; SANDBORN, William J.

Management of Crohn's Disease in Adults. **The American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 104, n. 2, p. 465–483, 2009. DOI: 10.1038/ajg.2008.168. Disponível em:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/ajg.2008.168>.

LIN, Yuli; YANG, Xuguang; YUE, Wenjie; XU, Xiaofei; LI, Bingji; ZOU, Linlin; HE, Rui. Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 355–366, 2014. DOI: 10.1038/cmi.2014.15. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.15>.

LISSNER, Donata; SCHUMANN, Michael; BATRA, Arvind; KREDEL, Lea-Isabel; KÜHL, Anja A.; ERBEN, Ulrike; MAY, Claudia; SCHULZKE, Jörg-Dieter; SIEGMUND, Britta. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 1297–1305, 2015. DOI: 10.1097/mib.0000000000000384.

LUCAS, Mark; ZHANG, Xia; PRASANNA, Vikram; MOSSER, David M. ERK Activation Following Macrophage FcγR Ligation Leads to Chromatin Modifications at the IL-10 Locus. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 469–77, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.1.469.

MAHIDA, Yashwant R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 6, p. 21–33, 2000. DOI: 10.1097/00054725-200002000-00004.

MALOY, K. J.; KULLBERG, M. C. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. **Mucosal Immunology**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 339–349, 2008. DOI: 10.1038/mi.2008.28.

MALOY, Kevin J.; POWRIE, Fiona. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, [S. l.], v. 474, p. 298–306, 2011. DOI: 10.1038/nature10208.

MANTOVANI, Alberto; MARCHESI, Federica. IL-10 and macrophages orchestrate gut homeostasis. **Immunity**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 637–639, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.04.015. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.015>.

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio; SOZZANI, Silvano; ALLAVENA, Paola; VECCHI, Annunciata; LOCATI, Massimo. The chemokine system in diverse forms of

macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.

MARDINI, Houssam E.; GRIGORIAN, Alla Y. Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: A meta-analysis. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1562–1567, 2014. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000084.

MARTINEZ, Fernando Oneissi; SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto; LOCATI, Massimo. Macrophage activation and polarization. [Front Biosci. 2008] - PubMed result. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, [S. l.], 2008.

MAUL, Jochen; LODDENKEMPER, Christoph; MUNDT, Pamela; BERG, Erika; GIESE, Thomas; STALLMACH, Andreas; ZEITZ, Martin; DUCHMANN, Rainer. Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25high T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 128, n. 7, p. 1868–1878, 2005. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.043.

MAYNARD, Craig L.; HARRINGTON, Laurie E.; JANOWSKI, Karen M.; OLIVER, James R.; ZINDL, Carlene L.; RUDENSKY, Alexander Y.; WEAVER, Casey T. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3-precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 8, p. 931–941, 2007. DOI: 10.1038/ni1504.

MCCAFFERTY, D. M.; SIHOTA, E.; MUSCARA, M.; WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. a; KUBES, P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. **American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology**, [S. l.], v. 279, p. 90–99, 2000.

MCCORMICK, D. A.; HORTON, L. W. L.; MEE, A. S. Mucin depletion in inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 143–146, 1990. DOI: 10.1136/jcp.43.2.143.

MELGAR, Silvia; KARLSSON, Agneta; MICHAËLSSON, Erik. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: Correlation between symptoms and inflammation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. l.], v. 288, p. 328–38, 2005. DOI: 10.1152/ajpgi.00467.2004.

MELGAR, Silvia; KARLSSON, Lisa; REHNSTRÖM, Erika; KARLSSON, Agneta; UTKOVIC, Helena; JANSSON, Liselotte; MICHAËLSSON, Erik. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human

inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 836–844, 2008. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.01.036.

MELLO, Rodrigo de Oliveira; DA SILVA, Camila Morais Gonçalves; FONTE, Fábio Piovezan; SILVA, Daniele Luchinitz Ferraz; PEREIRA, José Aires; MARGARIDO, Nelson Fontana; MARTINEZ, Carlos Augusto Real. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 139–145, 2012. DOI: 10.1590/S0100-69912012000200010.

MILLS, Charles D.; KINCAID, Kristi; ALT, Jennifer M.; HEILMAN, Michelle J.; HILL, Annette M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 164, p. 6166–6173, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

MIZOGUCHI, Atsushi; MIZOGUCHI, Emiko. Inflammatory bowel disease, past, present and future: Lessons from animal models. **Journal of Gastroenterology**, [S. l.], p. 1–17, 2008. DOI: 10.1007/s00535-007-2111-3.

MOEHLE, Christoph et al. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. **Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 84, p. 1055–1066, 2006. DOI: 10.1007/s00109-006-0100-2.

MOLODECKY, Natalie A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 142, n. 1, 2012. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.

MORRIS, Gerald P.; BECK, Paul L.; HERRIDGE, Margaret S.; DEPEW, William T.; SZEWCZUK, Myron R.; WALLACE, John L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 795–803, 1989. DOI: 10.1016/0016-5085(89)90904-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90904-9](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(89)90904-9).

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 73, p. 209–212, 2003. DOI: 10.1189/jlb.0602325.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of murine macrophages. **Curr Protoc Immunol**, [S. l.], v. Chapter 14, p. Unit 14 2, 2008. DOI: 10.1002/0471142735.im1402s83. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016446>.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 958–

969, 2008. DOI: 10.1038/nri2448.

MOSSER, David M.; GONÇALVES, Ricardo. Activation of Murine Macrophages. *In: Current Protocols in Immunology*. [s.l.: s.n.]. p. Unit 14.2. DOI: 10.1002/0471142735.im1402s111. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1402s111>.

MOWAT, Allan Mc I. To respond or not to respond - A personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews Immunology*, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 405–415, 2018. DOI: 10.1038/s41577-018-0002-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0002-x>.

MULLER, Paul Andrew et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*, [S. l.], 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.050.

MURRAY, H. W.; SPITALNY, G. L.; NATHAN, C. F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *Journal of immunology*, [S. l.], v. 134, n. 3, p. 1619–1622, 1985.

MURRAY, Peter J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.

MURRAY, Peter J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 541–566, 2017. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

NA, Yi Rang; STAKENBORG, Michelle; SEOK, Seung Hyeok; MATTEOLI, Gianluca. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 531–543, 2019. DOI: 10.1038/s41575-019-0172-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0172-4>.

NAGASHIMA, R.; MAEDA, K.; IMAI, Y.; TAKAHASHI, T. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, [S. l.], 1996. DOI: 10.1177/44.7.8675993.

NAIDOO, Khimara; GORDON, Morris; FAGBEMI, Andrew O.; THOMAS, Adrian G.; AKOBENG, Anthony K. Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, [S. l.], 2011. DOI:

10.1002/14651858.cd007443.pub2.

NALLEWEG, Nancy et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. **Gut**, [S. l.], v. 64, p. 743–755, 2014. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305947.

NELL, Sandra; SUERBAUM, Sebastian; JOSENHANS, Christine. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: Lessons from mouse infection models. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 564–577, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2403.

NEURATH, Markus F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 329–342, 2014. DOI: 10.1038/nri3661.

NG, Siew C. et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 145, n. 1, p. 158–165, 2013. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.007>.

NG, Siew C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, [S. l.], v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0).

NGUYEN, Khoa D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, [S. l.], v. 480, p. 104–108, 2011. DOI: 10.1038/nature10653.

OKABE, Yasutaka; MEDZHITOV, Ruslan. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 9–17, 2016. DOI: 10.1038/ni.3320. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3320>.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 98, p. 694–702, 1990. DOI: S0016508590000725 [pii].

OPPONG, Gertrude O. et al. Biofilm-associated bacterial amyloids dampen inflammation in the gut: oral treatment with curli fibres reduces the severity of haptan-induced colitis in mice. **npj Biofilms and Microbiomes**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 15019, 2015. DOI: 10.1038/npjbiofilms.2015.19. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npjbiofilms201519>.

- OUYANG, Wenjun; RUTZ, Sascha; CRELLIN, Natasha K.; VALDEZ, Patricia A.; HYMOWITZ, Sarah G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 71–109, 2011. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
- PAPAMICHAEL, Konstantinos; GILS, Ann; RUTGEERTS, Paul; LEVESQUE, Barrett G.; VERMEIRE, Séverine; SANDBORN, William J.; VANDE CASTEELE, Niels. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: Evolution in the definition and management of primary nonresponse. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], p. 182–197, 2015. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000202.
- PARAMSOTHY, Sudarshan et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, [S. l.], v. 389, p. 1218–28, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30182-4.
- PARRA, Rogerio S. et al. Quality of life, work productivity impairment and healthcare resources in inflammatory bowel diseases in Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 25, n. 38, p. 5862–5882, 2019. DOI: 10.3748/wjg.v25.i38.5862.
- PENNA, Francisco Guilherme Cancela; ROSA, Rodrigo Macedo; DA CUNHA, Pedro Ferrari Sales; DE SOUZA, Stella Cristina Silva; DE ABREU FERRARI, Maria de Lourdes. Faecal calprotectin is the biomarker that best distinguishes remission from different degrees of endoscopic activity in Crohn's disease. **BMC gastroenterology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 35, 2020. DOI: 10.1186/s12876-020-1183-x.
- PERŠE, Martina; CERAR, Anton. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/718617.
- PEYRIN-BIROULET, Laurent; LOFTUS, Edward V.; COLOMBEL, Jean Frederic; SANDBORN, William J. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], p. 471–478, 2011. DOI: 10.1002/ibd.21417.
- PITHADIA, Anand B.; JAIN, Sunita. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 629–642, 2011. DOI: 10.1016/S1734-1140(11)70575-8. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70575-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70575-8).
- PIZARRO, Theresa T.; COMINELLI, Fabio. Cytokine Therapy for Crohn's Disease: Advances in Translational Research. **Annual Review of Medicine**, [S. l.], v. 58, p.

433–444, 2007. DOI: 10.1146/annurev.med.58.121205.100607.

PLATT, Andrew M.; MOWAT, Allan Mc I. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. **Immunology Letters**, [S. l.], p. 22–31, 2008. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.05.009.

POLLARD, Jeffrey W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 9, p. 259–270, 2009. DOI: 10.1038/nri2528.

PONDER, Alexis; LONG, Millie D. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. **Clinical Epidemiology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 237–247, 2013. DOI: 10.2147/CLEP.S33961.

POWRIE, Fiona. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. **Immunity**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 171–174, 1995. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90086-1.

PULL, Sarah L.; DOHERTY, Jason M.; MILLS, Jason C.; GORDON, Jeffrey I.; STAPPENBECK, Thaddeus S. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 99–104, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0405979102.

QUALLS, Joseph E.; KAPLAN, Alan M.; VAN ROOIJEN, Nico; COHEN, Donald a. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 80, p. 802–815, 2006. DOI: 10.1189/jlb.1205734.

QUARESMA, Abel B.; KAPLAN, Gilaad G.; KOTZE, Paulo G. The globalization of inflammatory bowel disease: The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Current Opinion in Gastroenterology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 259–264, 2019. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000534.

RANSFORD, R. A. J.; LANGMAN, M. J. S. Sulphasalazine and mesalazine: Serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, [S. l.], v. 51, p. 536–539, 2002. DOI: 10.1136/gut.51.4.536.

RIVOLLIER, Aymeric; HE, Jianping; KOLE, Abhisake; VALATAS, Vassilis; KELSALL, Brian L. Inflammation switches the differentiation program of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 209, n. 1, p. 139–155, 2012. DOI: 10.1084/jem.20101387.

Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20101387>.



- RIZZO, Angelamaria et al. Inhibition of colitis by IL-25 associates with induction of alternatively activated macrophages. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 449–459, 2012. DOI: 10.1002/ibd.21799.
- ROLFE, Vivien E.; FORTUN, P. J.; HAWKEY, C. J.; BATH-HEXTALL, F. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], 2006. DOI: 10.1002/14651858.CD004826.pub2.
- ROMAGNANI, Sergio. Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 12, p. 227–57, 1994. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001303.
- RUFFOLO, Cesare; SCARPA, Marco; FAGGIAN, Diego; BASSO, Daniela; D'INCA, Renata; PLEBANI, Mario; STURNIOLO, Giacomo C.; BASSI, N.; ANGRIMAN, Imerio. Subclinical intestinal inflammation in patients with crohn's disease following bowel resection: A smoldering fire. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, [S. l.], v. 14, p. 24–31, 2010. DOI: 10.1007/s11605-009-1070-9.
- SALIM, S. Y.; SÖDERHOLM, Johan D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], p. 362–381, 2011. DOI: 10.1002/ibd.21403.
- SAMBASIVARAO, Somisetti V. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **NIH Public Access**, [S. l.], v. 18, p. 1199–1216, 2013. DOI: 10.1002/0471142735.im1525s104.Dextran.
- SANCHEZ-MUÑOZ, Fausto; DOMINGUEZ-LOPEZ, Aaron; YAMAMOTO-FURUSHO, Jesus K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], p. 4280–4288, 2008. DOI: 10.3748/wjg.14.4280.
- SANG, Li Xuan; CHANG, Bing; ZHANG, Wen Liang; WU, Xiao Mei; LI, Xiao Hang; JIANG, Min. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: A meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 16, n. 15, p. 1908–1915, 2010. DOI: 10.3748/wjg.v16.i15.1908.
- SASAKI, M.; BHARWANI, S.; JORDAN, P.; ELROD, J. W.; GRISHAM, M. B.; JACKSON, T. H.; LEFER, D. J.; ALEXANDER, J. Steven. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 35, n. 12, p. 1679–1687, 2003. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.016.
- SASAKI, Makoto; MATHIS, J. Michael; JENNINGS, Marilyn H.; JORDAN, Paul; WANG, Yuping; ANDO, Tomoaki; JOH, Takashi; ALEXANDER, J. Steven. Reversal

of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. **Journal of inflammation**, [S. l.], v. 2, p. 13, 2005. DOI: 10.1186/1476-9255-2-13.

SCHOEPFER, A. M. et al. The gap between scientific evidence and clinical practice: 5-aminosalicylates are frequently used for the treatment of Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], v. 40, p. 930–937, 2014. DOI: 10.1111/apt.12929.

SCHREIBER, Stefan; HEINIG, Thomas; THIELE, Heinz Günther; RAEDLER, Andreas. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 1434–1444, 1995. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90692-4.

SHAW, Tovah N. et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 215, n. 1, p. 1507–18, 2018. DOI: 10.1084/jem.20180019.

SHIRAZI, T.; LONGMAN, R. J.; CORFIELD, A. P.; PROBERT, C. S. J. Mucins and inflammatory bowel disease. **Postgraduate Medical Journal**, [S. l.], v. 76, n. 898, p. 473–478, 2000. DOI: 10.1136/pmj.76.898.473.

SHOUVAL, Dror S. et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. **Immunity**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 706–719, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.03.011.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 122, p. 787–795, 2012. DOI: 10.1172/JCI59643.

SMITH, Philip; MANGAN, Niamh E.; WALSH, Caitriona M.; FALLON, Rosie E.; MCKENZIE, Andrew N. J.; VAN ROOIJEN, Nico; FALLON, Padraic G. Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. **Journal of Immunology**, [S. l.], v. 178, n. 7, p. 4557–4566, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4557.

SOLOMON, Livingstone; MANSOR, Sorsiah; MALLON, Peter; DONNELLY, Eilish; HOPER, Margaret; LOUGHREY, Morris; KIRK, Stephen; GARDINER, Keith. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. **Comparative Clinical Pathology**, [S. l.], v. 19, p. 235–239, 2010. DOI: 10.1007/s00580-010-0979-4.

SOOD, Ajit; MIDHA, Vandana; MAKHARIA, Govind K.; AHUJA, Vineet; SINGAL, Dinesh; GOSWAMI, Pooja; TANDON, Rakesh K. The Probiotic Preparation, VSL#3

Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1202–1209.e1, 2009. DOI: 10.1016/j.cgh.2009.07.016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2009.07.016>.

SOUZA, Éricka L.; ELIAN, Samir D.; PAULA, Laís M.; GARCIA, Cristiana C.; VIEIRA, Angélica T.; TEIXEIRA, Mauro M.; ARANTES, Rosa M.; NICOLI, Jacques R.; MARTINS, Flaviano S. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 201–210, 2016. DOI: 10.1099/jmm.0.000222.

SPITS, Hergen et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1038/nri3365.

STEIDLER, L.; HANS, W.; SCHOTTE, L.; NEIRYNCK, S.; OBERMEIER, F.; FALK, W.; FIERS, W.; REMAUT, E. Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. **Science**, [S. l.], v. 289, n. 5483, p. 1352–1355, 2000. DOI: 10.1126/science.289.5483.1352.

STEIDLER, Lothar; VANDENBROUCKE, Klaas. Genetically modified Lactococcus lactis: Novel tools for drug delivery. In: INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY 2006, **Anais** [...]. [s.l.: s.n.] p. 140–146. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2006.00255.x.

STEIN, M.; S., Keshav.; HARRIS, N.; GORDON, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 287–292, 1992. DOI: 10.1084/jem.176.1.287.

STROBER, Warren; FUSS, Ivan J.; BLUMBERG, Richard S. THE IMMUNOLOGY OF MUCOSAL MODELS OF INFLAMMATION. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 20, p. 495–549, 2002. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816.

SUENAERT, Peter; BULTEEL, Veerle; LEMMENS, Liesbeth; NOMAN, Maja; GEYPENS, Benny; ASSCHE, Gert Van; GEBOES, Karel; CEUPPENS, Jan L.; RUTGEERTS, Paul. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. **American Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 97, n. 8, p. 2000–4, 2002. DOI: 10.1016/S0002-9270(02)04271-5.

SUNDBERG, John P.; ELSON, Charles O.; BEDIGIAN, Hendrick; BIRKENMEIER, Edward H. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice.

**Gastroenterology**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. 1726–1735, 1994. DOI: 10.1016/0016-5085(94)90813-3.

SUTTERWALA, By Fayyaz S.; NOEL, Gary J.; SALGAME, Padmini; MOSSER, David M. Macrophage Fcγ Receptor Type I. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 188, n. 1, p. 217–222, 1998.

TAGHIPOUR, Niloofar; MOLAEI, Mahsa; MOSAFFA, Nariman; ROSTAMI-NEJAD, Mohammad; AGHDAEI, Hamid Asadzadeh; ANISSIAN, Ali; AZIMZADEH, Pedram; ZALI, Mohammad Reza. An experimental model of colitis induced by dextran sulfate sodium from acute progresses to chronicity in C57BL/6: Correlation between conditions of mice and the environment. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 45–52, 2016. DOI: 10.22037/ghfbb.v1i9.868.

TAUBER, Alfred I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 897–901, 2003. DOI: 10.1038/nrm1244.

THIA, Kelvin T.; MAHADEVAN, Uma; FEAGAN, Brian G.; WONG, Cindy; COCKERAM, Alan; BITTON, Alain; BERSNTEIN, Charles N.; SANDBORN, William J. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 17–24, 2009. DOI: 10.1002/ibd.20608.

TILG, H. et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. **Gut**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 191–195, 2002. DOI: 10.1136/gut.50.2.191. Disponível em: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.50.2.191>.

TOKUYAMA, Hirotake; UEHA, Satoshi; KURACHI, Makoto; MATSUSHIMA, Kouji; MORIYASU, Fuminori; BLUMBERG, Richard S.; KAKIMI, Kazuhiro. The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. **International Immunology**, [S. l.], v. 17, p. 1023e34, 2005. DOI: 10.1093/intimm/dxh284.

TORRES, Júlio Augusto do Prado; SANTANA, Raquel Matos De; TORRES, Felipe Augusto do Prado; MOURA, Alex Rodrigues; TORRES NETO, Juvenal da Rocha. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**,

[S. I.], v. 31, n. 2, p. 115–119, 2011. DOI: 10.1590/S0101-98802011000200001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-98802011000200001&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-98802011000200001&lng=pt&tlng=pt).

TROMM, Andreas; GRIGA, T.; MAY, B. Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: Clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties. **Hepato-Gastroenterology**, [S. I.], p. 3124–3135, 1999.

VALENCIA, Xavier; STEPHENS, Geoffrey; GOLDBACH-MANSKY, Raphaela; WILSON, Mildred; SHEVACH, Ethan M.; LIPSKY, Peter E. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. **Blood**, [S. I.], v. 108, p. 253–61, 2006. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4567.

VAN ASSCHE, Gert et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's & colitis**, [S. I.], 2010. DOI: 10.1016/j.crohns.2009.12.003.

VILELA, Eduardo Garcia; DA GAMA TORRES, Henrique Osvaldo; MARTIN, Fabiana Paiva; DE LOURDES DE ABREU FERRARI, Maria; ANDRADE, Marcella Menezes; DA CUNHA, Aloísio Sales. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, [S. I.], v. 18, n. 9, p. 872–881, 2012. DOI: 10.3748/wjg.v18.i9.872.

WALLACE, Kori L.; ZHENG, Li Bo; KANAZAWA, Yoshitake; SHIH, David Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, [S. I.], v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.6.

WANG, Changqi et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. **BMC Immunology**, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1186/1471-2172-14-6.

WATANABE, Mamoru; UENO, Yoshitaka; YAMAZAKI, Motomi; HIBI, Toshifumi. Mucosal IL-7-mediated immune responses in chronic colitis-IL-7 transgenic mouse model. **Immunologic Research**, [S. I.], v. 20, n. 3, p. 251–259, 1999. DOI: 10.1007/bf02790408.

WEBER, Benjamin; SAURER, Leslie; MUELLER, Christoph. Intestinal macrophages: Differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. **Seminars in Immunopathology**, [S. I.], v. 31, n. 2, p. 171–184, 2009. DOI: 10.1007/s00281-009-0156-5.

WEHKAMP, Jan; SCHMID, Michael; STANGE, Eduard F. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. **Current Opinion in**

**Gastroenterology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 370–378, 2007. DOI: 10.1097/MOG.0b013e328136c580.

WEYLANDT, Karsten H.; KANG, Jing X.; WIEDENMANN, Bertram; BAUMGART, Daniel C. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 13, p. 797–799, 2007. DOI: 10.1002/ibd.20109.

WIRTZ, Stefan; NEUFERT, Clemens; WEIGMANN, Benno; NEURATH, Markus F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, p. 541–46, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.41.

WRIGHT, Emily K.; KAMM, Michael A. Impact of drug therapy and surgery on quality of life in crohn's disease: A systematic review. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1187–1194, 2015. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000271.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [S. l.], v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013. DOI: 10.1038/nature12034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12034>.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, [S. l.], p. 427–434, 2007. DOI: 10.1038/nature06005.

XIAO, Yong Tao; YAN, Wei Hui; CAO, Yi; YAN, Jun Kai; CAI, Wei. Neutralization of IL-6 and TNF- $\alpha$  ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. **Cytokine**, [S. l.], v. 83, p. 189–192, 2016. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.04.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.04.012>.

XU, Yinghua; HUNT, Nicholas H.; BAO, Shisan. The effect of restraint stress on experimental colitis is IFN- $\gamma$  independent. **Journal of Neuroimmunology**, [S. l.], v. 200, n. 1–2, p. 53–61, 2008. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.06.008.

YAMAMOTO-FURUSHO, Jesús K.; MENDIVIL-RANGEL, Edgar J.; FONSECA-CAMARILLO, Gabriela. Reduced expression of mucin 9 (MUC9) in patients with ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, [S. l.], p. 601, 2012. DOI: 10.1002/ibd.21920.

YAN, Yutao; KOLACHALA, Vasantha; DALMASSO, Guillaume; NGUYEN, Hang; LAROUI, Hamed; SITARAMAN, Shanthy V.; MERLIN, Didier. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 6, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0006073.

YANG, Ziyang; MOSSER, David M.; ZHANG, Xia. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages. **The Journal of**

**Immunology**, [S. l.], v. 178, n. 2, p. 1077–1085, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.2.1077.

YEN, David et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 116, n. 5, p. 1310–1316, 2006. DOI: 10.1172/JCI21404.


ZAEEM CADER, M.; KASER, Arthur. Recent advances in inflammatory bowel disease: Mucosal immune cells in intestinal inflammation. **Gut**, [S. l.], v. 62, n. 11, p. 1653–1664, 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303955.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **The Journal of Pathology**, [S. l.], v. 214, p. 161 – 178, 2008. DOI: 10.1002/path.2284.

ZIGMOND, Ehud et al. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 720–733, 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.03.012.

## 9. ANEXOS

- **ANEXO A**



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 212/2017  
**Título do projeto:** Estudo da atividade imunomoduladora da interleucina-10 no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por DSS em camundongos.  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Ricardo Goncalves  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Patologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

- **ANEXO B**



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 34/2020  
**Título do projeto:** MACRÓFAGOS REGULATÓRIOS CONTROLAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E PROMOVEM A RECUPERAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Ricardo Goncalves  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Patologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)