

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Renata Lacerda de Lima

PAPEL DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
INDUZIDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
COLITE ULCERATIVA

Belo Horizonte
Maio de 2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Renata Lacerda de Lima

**PAPEL DO RECEPTOR DO FATOR DE AGREGAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
INDUZIDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
COLITE ULCERATIVA**

Tese apresentada à Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Danielle da Glória de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Belo Horizonte
Maio de 2016

Dedico esse trabalho à minha família, meu porto seguro!

Por me incentivar e se orgulharem das minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Manifesto a minha gratidão a Deus, pois sem minha fé não chegaria até aqui!

Agradeço infinitamente à minha família, vocês são os responsáveis por eu me tornar uma mulher forte e persistente. Desistir? Nem em sonho! À minha mãe, Ana Maria, por todo amor e dedicação integral.. A cada dia, desde lá no passado, que eu não queria levantar para a aula no jardim de infância e ela me ensinava que apesar de estar frio, era preciso encarar e executar minhas obrigações! Ao meu pai, Gilmar, exemplo de força e resiliência. Você sempre acreditou em mim mais do que eu mesma... Sabe que a “Gilmazinha” aqui é capaz! Aos meus irmãos, Cláudio e Jonathan, meus companheiros que tornam meus dias mais felizes! Ao meu sobrinho Bernardo e à minha cunhada Juliete! Família, vocês são meu porto seguro! Obrigada por me incentivar e se orgulharem das minhas escolhas. Amo vocês!

A toda grande família, Teixeirada do meu coração... Tanto aos Teixeira de Lacerda quanto aos Teixeira de Lima, está aqui o resultado de cada encontro de domingo que eu estive ausente! Obrigada pela torcida e orações.

À minha orientadora, Danielle de Souza, pelos ensinamentos, pelo conhecimento, por me guiar no mundo científico, por todo carinho e amizade! Por cada gargalhada gostosa de escutar! Muito orgulho de ser sua “filha”!

Ao meu co-orientador, Caio Fagundes, por olhar com brilho nos olhos para cada resultado e, assim, me entusiasmar! Obrigada por compartilhar seu conhecimento e pela paciência!

Às amigas e colaboradoras desse trabalho, Zélia, Raquel, Camila e Júlia pelo trabalho braçal de bancada, pela amizade sincera que ultrapassa o mundo científico e todas as discussões e verdades ditas! Isso fortalece nossa amizade!

Às amigas conselheiras científicas e de vida Luana, Ludmila e Mila por todos os conselhos e experiências compartilhados.

Ao Celso Queiroz e ao Daniel Cisalpino pela disponibilidade e compartilhamento de seus conhecimentos.

Aos meus lindos, Alice e Ian sempre dispostos a me ajudar.

Aos outros, e de forma alguma menos importantes, amigos do LIMHO: Gil, Ana Carol, Paty Campi, Lucas Secchim, Vívian, Adriana, Fernando, Rebeca, Pedro, Tereza e Júlia Araújo pela convivência agradável e disponibilidade sempre que necessário.

Às professoras Sueli Diniz e Patrícia Cisalpino pela ótima convivência no laboratório.

A todos os amigos do Departamento de Microbiologia, em especial ao Rafa Bastos e ao Leo Acúrcio, pelos conselhos e novas ideias trocadas no corredor que facilitaram a vida na bancada.

A todos os amigos do grupo IMUNOFAR em especial ao professor Mauro Teixeira pelos ensinamentos e à Ilma e à Frank pela assistência constante!

Aos meus grandes amigos Felipe, Silvinhas, Kamilinha, Regiane, Cris, Heloísa, Drika, Mary, Fê, Lívio, Elisa e Thiago Falcone, às nutris lindas da minha vida, e a todos os amigos antigos e novos que apesar de reivindicarem, compreenderam as minhas ausências! Vocês são muito importantes para mim!

Ao Vinícius que trouxe muito carinho e paz e tornou mais leve uma etapa tão tensa que é a reta final da tese!

Aos professores Thiago Ávila, Albená Nunes, Vanessa Pinho, Adaliene Ferreira, Mila Madeira e Raquel Gouvêa por aceitarem participar da banca examinadora e possibilitarem o enriquecimento científico e aprimoramento do desse estudo.

Ao professor Flaviano Martins pela contribuição com os probióticos.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico ao longo desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) são distúrbios inflamatórios do trato gastrointestinal que vêm aumentando em incidência mundialmente. As duas principais formas de IBD, colite ulcerativa e doença de Crohn, são doenças crônicas, recidivantes e resultam de uma resposta imune a alterações na microbiota intestinal em indivíduos com predisposição genética a IBDs. A colite ulcerativa afeta o cólon e os indivíduos acometidos por essa doença apresentam manifestações clínicas como perda de peso, diarreia acompanhada por sangue, febre e encurtamento do cólon. O PAF é um mediador fosfolipídico com importante atividade pró-inflamatória, que exerce suas ações a partir da ligação e ativação do seu receptor, PAFR. E, apesar de ser indicado como envolvido na indução e na gravidade de doenças inflamatórias intestinais, os mecanismos de indução da resposta inflamatória via PAF, na colite ulcerativa não estão bem esclarecidos. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi investigar o papel do PAFR na resposta inflamatória durante colite experimental induzida por DSS. Nossos resultados demonstraram que os animais com deleção genética do receptor PAFR apresentaram exacerbação da resposta ao desenvolvimento da colite, quando esses foram comparados aos animais selvagens. Nos protocolos de colite aguda, crônica ou na recuperação da doença, os animais PAFR^{-/-} se destacaram quanto ao agravamento dos sinais clínicos da colite, com maior perda de peso, alteração da consistência das fezes e acentuada perda de sangue nas mesmas, além de maior lesão tecidual. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram uma resposta inflamatória exacerbada à indução da colite ulcerativa por DSS, caracterizada principalmente por aumento da atividade de MPO e produção de IL-1 β . Esses animais apresentam, ainda, um déficit na recuperação da doença após a retirada do estímulo do DSS. O tratamento com um antagonista do PAFR não surtiu no mesmo efeito da deleção genética do receptor. Assim, sugere-se que a deleção genética do PAFR interfira de forma a atrasar a fase de resolução da inflamação e conseqüentemente a renovação do epitélio intestinal durante a colite ulcerativa.

Palavras chaves: PAFR, IBD, colite ulcerativa, inflamação, IL-1 β

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are inflammatory diseases that affect the gastrointestinal tract and have increased in prevalence all around the world. Ulcerative colitis and Crohn's disease are the major chronic IBD and patients show flares of remission and relapses, resulting from an immune response to changes in intestinal microbiota in individuals with genetic predisposition to IBD. Ulcerative colitis affects the colon leading to clinical symptoms such as weight loss, bloody diarrhea, fever and shortening of the colon. PAF is a phospholipid mediator with important pro-inflammatory activity that acts through binding and activation of its receptor, PAFR. PAF have been involved in the induction and severity of IBD, however, the mechanisms of induction of the inflammatory response via PAF in these diseases are not well understood. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of PAFR in the inflammatory response during experimental DSS-induced colitis. Our results have demonstrated that animals with genetic deletion of the PAFR have shown exacerbated development of colitis when these were compared to wild type animals. In experimental protocols of acute or chronic disease and colitis recovery, PAFR^{-/-} animals have presented exacerbated clinical signs of colitis, greater weight loss, changes in stool consistency and severe bleeding and greater tissue injury. The PAFR^{-/-} animals have shown an exaggerated inflammatory response to induction of ulcerative colitis DSS, mainly characterized by increased MPO activity and IL-1 β production. These animals also exhibited a deficit in the disease recovery after DSS removal. Treatment with a PAFR antagonist, haven't shown the same effects over disease as the ones found in gene-deficient mice. Therefore, we suggest that genetic deletion of PAFR interfere in order to delay the inflammation resolution phase and, consequently, the epithelial intestinal regeneration during ulcerative colitis.

Key words: PAFR , IBD , ulcerative colitis, inflammation, IL-1 β

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ANXA1- Anexina A1

CCL – Quimiocina CC ligante

COX2 – cicloxigenase 2

DAMPS – *damage-associated molecular pattern* - Padrões moleculares associados ao dano tecidual

DSS – sulfato de sódio dextrana

ELISA - ensaio imunoenzimático

EPO - peroxidase eosinofílica

GILZ – “*Glucocorticoid-induced leucine zipper*”

IBD – doença inflamatória intestinal

IFN γ - Interferon gamma

IL- Interleucina

I/R – Isquemia e reperfusão

MAMPS – *microorganism-associated molecular pattern* – Padrão molecular associado a micro-organismos

MPO - mieloperoxidase

MyD88 – Gene de resposta primária de diferenciação miéide 88

NF κ B - Fator nuclear Kappa B

NLR - Receptor do tipo NOD

NOD – Domínios de ligação a nucleotídeos

PAF – fator de ativação plaquetária

PAFR - Receptor do fator de ativação plaquetária

PGE2 - Prostaglandina E2

PRR – Receptores do reconhecimento de padrão

TNF- α – Fator de Necrose tumoral TGF β – Fator de transformação de crescimento Beta

TLR – Receptores do tipo Toll (Toll Like receptors)

UFC - Unidades formadoras de colônias

WT- *wild type* – selvagem

-/- - Indica deleção genética

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens e com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de indução de colite por DSS.	47
Figura 2: Hemoconcentração e atividade da enzima mieloperoxidase em camundongos com deleção genética do PAFR submetidos ao protocolo de indução de colite por DSS.	49
Figura 3: Representação histológica e graduação histopatológica de secções do cólon de camundongos selvagens ou PAFR ^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite por DSS.	51
Figura 4: Concentração de mediadores inflamatórios no cólon de camundongos selvagens ou PAFR ^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite por DSS.	52
Figura 5: Concentração de mediadores inflamatórios no cólon de camundongos selvagens ou PAFR ^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite por DSS.	53
Figura 6: Avaliação do fenótipo de camundongos com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de colite crônica induzida por DSS.	56
Figura 7: Comprimento do cólon e influxo de neutrófilos para o cólon em camundongos com colite crônica.	58
Figura 8: Representação histológica e graduação histopatológica de secções do cólon de camundongos selvagens ou PAFR ^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite crônica por DSS.	59
Figura 9: Perfil dos mediadores inflamatórios IL1- β e CXCL1 na colite ulcerativa crônica.	60
Figura 10: Perfil de produção de mediadores inflamatórios na colite ulcerativa crônica.	61

Figura 11: Avaliação do fenótipo de camundongos com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de recuperação da colite aguda por DSS.	64
Figura 12: Atividade de MPO e produção de mediadores inflamatórios IL1- β e CXCL1 na recuperação da colite ulcerativa aguda.	65
Figura 13: Mediadores inflamatórios ANXA1, IL10 e GILZ na recuperação da colite ulcerativa aguda.	66
Figura 14: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens submetidos ao protocolo de indução de colite aguda por DSS associado ao tratamento com um antagonista do PAFR.	69
Figura 15: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens submetidos ao protocolo de recuperação da colite aguda induzida por DSS associado ao tratamento com um antagonista do PAFR.	70

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1. Doenças inflamatórias intestinais (IBDs)	14
1.2. Resposta inflamatória e homeostase intestinal	16
1.3. Microbiota intestinal residente e inflamação	21
1.4. Fator de Ativação Plaquetária (PAF)	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVO GERAL.....	29
3.1. Objetivos específicos	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. <i>Animais e seu tratamento</i>	30
4.1.1. <i>Colite Ulcerativa Aguda</i>	30
4.1.2. <i>Colite Ulcerativa Crônica</i>	32
4.1.3. <i>Recuperação após Colite Ulcerativa</i>	34
4.1.4. <i>Tratamento com antagonista do PAFR</i>	36
4.2. <i>Determinação do escore clínico</i>	36
4.3. <i>Comprimento do cólon</i>	37
4.4. <i>Histologia</i>	37
4.5. <i>Análise histopatológica</i>	37
4.6. <i>Extração de citocinas de tecidos</i>	38
4.7. <i>Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas por ELISA</i>	38
4.8. <i>Análise do índice de hematócrito</i>	39
4.9. <i>Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	40
4.10. <i>Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)</i>	41
4.11. <i>Avaliação da expressão do mRNA de ANXA1, IL-10 e GILZ</i>	42
4.12. <i>Análise Estatística</i>	45
5. RESULTADOS	46
5.1. AUSÊNCIA DE PAFR INDUZ MAIOR GRAVIDADE DA COLITE ULCERATIVA	46
5.2. AUSÊNCIA DE PAFR ESTÁ ASSOCIADA A MAIOR GRAVIDADE DA COLITE CRÔNICA	54

5.3. AUSÊNCIA DE PAFR ESTÁ ASSOCIADA AO DÉFICIT NA RECUPERAÇÃO DA COLITE	62
5.4. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR (PCA4248) NÃO INTERFERE NA INDUÇÃO E NA RECUPERAÇÃO APÓS DESAFIO COM O DSS.	67
6. DISCUSSÃO	72
7. PERSPECTIVAS E PRÓXIMOS PASSOS.....	82
8. ADENDO – <i>EFEITO DOS PROBIÓTICOS NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS</i>	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Doenças inflamatórias intestinais (IBDs)

As doenças inflamatórias intestinais (IBDs) são distúrbios inflamatórios do trato gastrointestinal que vêm aumentando em incidência no Brasil, apesar de não se saber a taxa real das mesmas (SOUZA et al, 2002; VICTORIA et al, 2009; NG et al, 2013). As IBDs são comuns em países desenvolvidos, afetam a qualidade de vida de aproximadamente 1,4 milhões de indivíduos na América do Norte e 2,2 milhões de pessoas na Europa (LOFTUS, 2004). As duas principais formas de IBD são a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Essas são doenças crônicas, recidivantes e remetem a condições inflamatórias de origem desconhecida. O início da IBD ocorre comumente na segunda ou terceira década de vida (XAVIER e PODOLSKY, 2007). A origem e a localização da patologia da inflamação diferem nas duas principais formas de manifestação da IBD, sendo os dois distúrbios resultados de uma resposta imune a alterações na microbiota intestinal em indivíduos com predisposição genética a IBDs (SALEH e ELSON, 2011).

A etiologia das IBDs permanece ainda não esclarecida, mas presume-se que envolva imunomodulação e ativação da produção de mediadores pró-inflamatórios (XAVIER e PODOLSKY, 2007). A doença de Crohn apresenta inflamação transmural, pode ser granulomatosa e ocorre em qualquer parte do trato gastrointestinal, sendo o íleo o mais afetado (PODOLSKY, 2002). Já a colite ulcerativa é a condição que afeta primeiramente a camada superficial da mucosa do cólon e as manifestações clínicas apresentadas por essa doença incluem perda de peso, diarreia acompanhada por sangue e/ou muco nas fezes, febre e encurtamento do cólon. O cólon de indivíduos que apresentam a colite ulcerativa é caracterizado pelo aumento do infiltrado inflamatório, composto predominantemente por

neutrófilos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (XAVIER e PODOLSKY, 2007). Desde 1940, a incidência de IBDs vem aumentando drasticamente em países com influências ocidentais, o que sugere a participação de fatores ambientais na etiologia dessas doenças, como estilo de vida, higiene, hábitos alimentares e o uso de antibióticos (SHANABAN e BERNSTEIN, 2009; NG et al, 2013). Esses fatores podem alterar a quantidade e o perfil da microbiota favorecendo o aparecimento ou a progressão de IBD (SHANABAN e BERNSTEIN, 2009; NG et al, 2013).

Além do papel dos fatores ambientais na ocorrência de IBDs, estudos com famílias e etnias diferentes sugerem forte influência de fatores genéticos na etiologia das IBDs, mais precisamente na ocorrência de determinantes genéticos recessivos (CHO, 2008). Pesquisas para a identificação de genes que contribuem para a susceptibilidade de IBD têm crescido nos últimos anos e revelam que mais de 100 loci genéticos apresentam associação significativa com o surgimento dessas doenças (FRANKE et al, 2010; MCGOVERN et al, 2010). Apesar desses loci serem indicados como responsáveis por apenas 20% do risco genético estimado para IBD, eles pontuam vias específicas que possuem implicações na homeostase intestinal (MCGOVERN et al, 2010). Como por exemplo, vias relacionadas à imunidade inata, autofagia e outras vias que têm sido indicadas como fatores essenciais à homeostase intestinal, e fundamentais para a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal, o controle do crescimento de bactérias e a tolerância imunológica (SALEH e ELSON, 2011).

A terapia medicamentosa de IBD ocorre classicamente por meio de drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras que diferem quanto à capacidade de induzir e manter o controle dos sintomas bem como na tolerabilidade e toxicidade (STROBER, FUSS e MANNON, 2007). Medicamentos biológicos como o anticorpo anti-TNF- α , têm sido investigados no controle de IBD, mas essas terapias são limitadas pela ausência ou pela

pouca eficácia, dependendo do indivíduo, além da associação com toxicidade (TARGAN, 2006). Dessa forma, o surgimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento dessas doenças e também na melhora dos sintomas pode aumentar eficácia das ações e consequentemente a qualidade de vida dos pacientes.

1.2. Resposta inflamatória e homeostase intestinal

A inflamação é uma resposta adaptativa disparada por estímulos ou condições nocivas, como por exemplo, infecção ou lesão tecidual e desencadeia uma variedade de processos fisiológicos e patológicos na tentativa de restaurar a homeostase local. De forma resumida a inflamação, desencadeada por infecção ou lesão tecidual, envolve o reconhecimento da lesão e a liberação coordenada de componentes do sangue (plasma e leucócitos) para o local de infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV, 2010). Essa resposta inflamatória tem sido melhor caracterizada em infecções microbianas, nas quais esta é disparada por reconhecimento de componentes estruturais dos micro-organismos por receptores dos sistemas imune inato como os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo NOD (NLRs). Esse reconhecimento é mediado inicialmente por células residentes no tecido, como os macrófagos e mastócitos, levando a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, mediadores lipídicos e produtos de cascatas proteolíticas. O efeito principal e imediato desses mediadores é a formação de um exsudato tecidual composto principalmente por neutrófilos, que são normalmente contidos aos vasos sanguíneos, e passam a ter acesso ao meio extravascular, via vênulas pós-capilares no sítio de infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008). Os neutrófilos, ao chegarem ao tecido lesado, são ativados por contato direto com os indutores da lesão, ou por ação de mediadores inflamatórios secretados pelas células residentes. Na tentativa de

eliminar os agentes causadores da inflamação, patógenos ou células lesadas, os neutrófilos liberam conteúdos tóxicos dos seus grânulos, como espécies de radicais reativos e proteases (NATHAN, 2006). Esses produtos são altamente potentes e não discriminam entre alvos microbianos e células lesadas ou outras células do hospedeiro. Dessa forma, o dano ao tecido do hospedeiro é muitas vezes inevitável (MEDZHITOV, 2008). Assim, de forma geral, uma resposta inflamatória típica consiste de quatro componentes: os indutores da inflamação (DAMPS, de origem endógena ou MAMPS, de origem microbiana); os sensores que os detectam (PRRs), que são expressos em células sentinelas especializadas como os macrófagos residentes; os mediadores induzidos pelos sensores, mediadores inflamatórios que agem nos tecidos alvo, desencadeando mudanças no estado funcional destes, favorecendo a migração de leucócitos do sangue e produção do quarto componente; e moléculas efetoras, que promovem a adaptação à condição nociva (MEDZHITOV, 2010).

Uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida implica na eliminação do agente lesivo e é seguida de uma fase de resolução e reparo (SERHAN et al, 2008; DAS, 2016). A mudança nos mediadores lipídicos de prostaglandinas e leucotrienos, mediadores pró-inflamatórios, para lipoxinas, resolvinas e protectinas, que são mediadores anti-inflamatórios, é essencial para a transição da inflamação para a resolução (DAS, 2016). As lipoxinas possuem papel na inibição da migração de neutrófilos e na quimiotaxia de monócitos para o sítio inflamatório (SERHAN e CHIANG, 2008), promovendo a fagocitose de células mortas e promovendo a resolução do processo inflamatório local. Outros mediadores promotores da resolução do processo inflamatório são proteínas como Anexina-A1 (ANXA1), IL-10, GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*) e também fatores de crescimento (PERRETTI e FLOWER, 2004). A ANXA1 é um membro da superfamília das anexinas, proteínas capazes de ligar-se a fosfolípidos na presença de Ca^{++} (GERKE et al, 2005). Em condições basais, neutrófilos, monócitos e macrófagos, de humanos e camundongos, possuem grande

quantidade de ANXA1 no citoplasma (MORAND et al, 1995; MULLA et al, 2005). Após ativação celular os estoques de ANXA1 são mobilizados para a superfície celular e secretados acarretando inibição do influxo de neutrófilos, a apoptose desses leucócitos e a promoção da fagocitose e remoção das células que sofreram apoptose do sítio inflamatório (PERRETTI e FLOWER, 2009). Já a IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, age diretamente em macrófagos e monócitos inibindo a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e de moléculas co-estimuladoras, e também modula a expressão de mediadores pró-inflamatórios, regulando de forma negativa o processo inflamatório (SERHAN e CHIANG, 2008). GILZ é um importante mediador anti-inflamatório induzido por glicocorticoides em vários tipos celulares incluindo células linfoides, e regula a ativação e apoptose desses (RONCHETTI et al, 2015). Essa proteína tem sido mostrada como um importante mediador dos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides em linhagens celulares e em modelos experimentais de inflamação, pela inibição da expressão de genes pró-inflamatórios (AYROLDI et al, 2014; CHENG et al, 2014). De forma geral, a ação de mediadores pró-resolutivos e anti-inflamatórios na resolução do processo inflamatório se baseia na redução do influxo de neutrófilos no exsudato, aumento do recrutamento de monócitos para o exsudato, estimulação da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos e promoção da saída do exsudato pelos vasos linfáticos. Esses processos ocorrem no intuito de resolver o processo inflamatório e retornar a homeostase no sítio atingido (MEDZHITOV, 2010).

As IBDs têm sido muito estudadas nas últimas décadas, porém apesar de muitos avanços no entendimento da patologia das IBDs, ainda não está esclarecido o que engatilha o processo inflamatório e ocorrência dessas doenças e quais fatores são necessários para induzir a resolução da inflamação intestinal (DAS, 2016). A resposta inflamatória descompensada e a continuidade da inflamação vistas nas IBDs podem ocorrer devido a

falência no processo de resolução da inflamação. Assim, o balanço entre a inflamação e a resolução é perturbado em favor de vias pro-inflamatórias e/ou em favor de uma falência na produção de moléculas que promovem a resolução da inflamação (DAS, 2016). Ou seja, pode ocorrer uma produção inadequada de moléculas inflamatórias resolutivas, como as lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas e nitrolípidios que suprimem a inflamação, modulam a produção de ROS, promovem a cicatrização da ferida, além de terem propriedades citoprotetoras. Essa carência na produção de mediadores pró-resolutivos resulta em inflamação inapropriada, atraso na cura/ou no processo de reparo e levam ao dano tecidual em IBDs (DAS, 2016).

Para ficar mais claro como a inflamação ocorre nas IBDs precisamos aprofundar no entendimento do processo inflamatório no contexto do intestino. O intestino é um órgão complexo, com grande importância na manutenção da homeostase orgânica. Esse órgão possui sistema linfóide próprio e representa uma das principais e mais efetivas barreiras contra a proliferação de patógenos em potencial, que frequentemente estão em trânsito na luz intestinal junto aos alimentos. Além disso, o intestino possui superfícies apropriadas, nas quais coexistem os micro-organismos formadores da microbiota residente, estes se encontram alojados em criptas intestinais, associados às células que constituem o epitélio mucoso intestinal, ricamente vascularizado (FASANO e NATARO, 2004; TANNOCK, 2007). O epitélio intestinal é composto por uma camada única de células epiteliais intestinais, incluindo enterócitos absorptivos, células caliciformes, células de Paneth e células entero-endócrinas que coletivamente cobrem uma área superficial de 400 m², justapostas em numerosos vilos e criptas. A integridade dessa barreira é fundamental para isolar o hospedeiro de micro-organismos e gêneros alimentícios presentes no lúmen intestinal e auxiliar na prevenção da resposta imune antígeno-específica patológica, como ocorre nas IBDs e doença celíaca (SALEH e ELSON, 2011). Fato importante que auxilia na integridade

da barreira epitelial é a preservação da camada de muco que envolve a mucosa. No estado de homeostase a microbiota intestinal não está diretamente em contato com a mucosa, devido à presença de uma camada de muco que os separa (JOHANSSON et al, 2008). Entretanto, após indução de lesão na mucosa, essa barreira é danificada, e a mucosa encontra-se em contato direto com os micro-organismos presentes no lúmen. Esse processo ocorre principalmente devido a modificação de três pontos chaves: enterócitos, células glomerulares e camada de muco que se tornam totalmente diferenciados após início do processo inflamatório (ALAM et al, 2016).

No epitélio intestinal encontram-se receptores de superfície, como os receptores do tipo Toll (TLRs), e intracelulares, como os receptores do tipo NOD (NLRs), para a identificação de micro-organismos ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que tenham violado a barreira epitelial, por meio do reconhecimento de elementos microbianos como flagelina, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS) e peptídeos formilados. Após o reconhecimento microbiano específico, esses receptores recrutam proteínas adaptadoras, como o MyD88, TRIF, TIRAP, TRAM e Rip2, que ativam as cascatas de sinalização responsáveis pela regulação da ativação do fator nuclear Kappa-B (NF- κ B), da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), ou de vias de sinalização dependentes de caspases. A ativação dessas vias culmina na indução da expressão de mediadores pró-inflamatórios e antimicrobianos, incluindo interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (KAWAI e AKIRA, 2006). Uma vez que o processo inflamatório é disparado, ocorre a produção de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias e possivelmente, redução da produção de moléculas anti-inflamatórias. Essa perturbação do balanço entre moléculas pró e anti-inflamatórias pode levar a lesão tecidual comumente visto nessa situação.

1.3. Microbiota intestinal residente e inflamação

O corpo humano é colonizado, a partir do nascimento, por um amplo espectro de micro-organismos que numericamente excedem a quantidade de células do hospedeiro em aproximadamente 10 vezes. O trato gastrointestinal é naturalmente colonizado por aproximadamente 500 espécies diferentes de bactérias, além de espécies de protozoários, fungos e vírus. Estima-se que 10^{14} bactérias coexistam sobre o epitélio intestinal, o que equivale a aproximadamente 1,5 Kg do peso corporal humano (KARRASH et al, 2007). Inicialmente, após o nascimento, proliferam-se grupos tais como *Lactobacillus*, micoplasmas, bacilos anaeróbicos facultativos dos gêneros *Enterobacterium*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Posteriormente, com o consumo gradual e progressivo do oxigênio pelos anaeróbios facultativos, se estabelecem os representantes *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Clostridium* (ADLEBERTH, 2008), sendo que a maioria das bactérias isoladas nas fezes de adultos é anaeróbia estrita (GIBSON e RODENFROID, 1995; QUINTANILHA et al, 2007).

Coletivamente, esses micro-organismos contém aproximadamente 100 vezes mais genes que o genoma humano (GIL et al, 2006) e este microbioma é fortemente determinado pelo estado de saúde do hospedeiro (SALEH e ELSON, 2011). A composição da microbiota é diferente entre os indivíduos, dependendo da herança genética, idade, dieta, mudanças no estilo de vida e estresse. Existem, também, variações na composição da microbiota nas diferentes localizações anatômicas, com aumento progressivo de micro-organismos nas porções distais do trato gastrointestinal, o ceco e o cólon (SALEH e TRINCHIERI, 2011, FAGUNDES et al, 2011). A coexistência do homem com a microbiota é um processo de beneficiamento dinâmico e mútuo. E, além da influência no metabolismo do hospedeiro e

desenvolvimento intestinal, a microbiota residente modula o sistema imune na superfície da mucosa intestinal e, também, sistemicamente (SALEH e ELSON, 2011).

As relações simbióticas estabelecidas entre a microbiota residente e os hospedeiros são diversas. A proteção contra a proliferação de patógenos oportunistas é uma delas (MACPHERSON et al, 2001; MACPHERSON et al, 2005; MAGALHAES et al, 2007; ARTIS, 2008). Outra função benéfica da microbiota no epitélio intestinal é a regulação da maturação de linfócitos T auxiliares e linfócitos B2, bem como a síntese de IgA por células B1, situadas em contato íntimo com a lâmina própria de apoio dos enterócitos (MACPHERSON et al, 2001; MACPHERSON et al, 2005). Dessa forma há o controle da proliferação microbiana, inclusive de alguns vírus, como os rotavírus (MACPHERSON et al, 2001; MACPHERSON et al, 2005). As bactérias residentes no cólon contribuem com a produção de energia para o epitélio do hospedeiro. As células da mucosa colonizada obtêm 60 a 70% do total de sua energia gerada no lúmen a partir dos produtos de fermentação bacteriana (GIBSON e RODENFROID, 1995; TANNOCK et al, 2007). Além disso, muitas das espécies residentes auxiliam na degradação de carboidratos complexos não digeríveis (GIBSON e RODENFROID, 1995; TANNOCK et al, 2007).

A microbiota beneficia o hospedeiro também pela produção de vitaminas fundamentais à saúde do hospedeiro (GILL et al, 2006, FAGUNDES et al, 2011). Dentre estas, existe a síntese de vitamina K por muitos componentes da microbiota como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Enterobacter* e *Streptococcus* (HILL, 1997). Estes são capazes de converter moléculas análogas às naftaquinonas, em vitamina K2 (menadiona) prontamente assimilável pelos transportadores situados nos enterócitos (GOLDING et al, 1994; GIBSON e RODENFROID, 1995; MACPHERSON et al, 2001). As vitaminas do complexo B também podem ser sintetizadas por componentes da microbiota

residente. Gêneros como *Pseudomonas* e *Bifidobacterium* são capazes de produzir vitamina B12 (cianocobalamina) em quantidades significativas. Outros subtipos como *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* sintetizam os subtipos B1(tiamina), B6 (piridoxina) e B9 (ácido fólico), além de vitamina B12 e ácido nicotínico (GIBSON e RODENFROID, 1995). A microbiota residente produz ácidos graxos de cadeia curta, acetato, propionato, butirato, etanol, piruvato entre outros, como produtos finais do metabolismo bacteriano, e esses podem influenciar o metabolismo do hospedeiro (MAHOWALD et al, 2007).

A presença da microbiota residente é fundamental para a atividade do sistema imune inato e para a homeostase intestinal e reparo tecidual após lesão (SALEH e TRINCHIERI, 2011). A depleção da microbiota intestinal por meio de tratamento com antibióticos, ou deficiência em efetores da imunidade inata como o inflamassoma NLRP3 e sua principal enzima caspase-1, bem como a deficiência de TLRs, ou dos receptores de IL-1 (IL-1R) e de IL-18 (IL-18R), interfere na regeneração da mucosa intestinal após lesão induzida pela administração oral de DSS (SALEH e TRINCHIERI, 2011). A partir da interação com o sistema imune inato, a microbiota residente regula a homeostase intestinal pela promoção de sinais instrutivos que induzem a renovação e maturação das células epiteliais intestinais, desenvolvimento de linfócitos e o condicionamento do sistema imune local (mucosa intestinal) e sistêmico (SALEH e TRINCHIERI, 2011). Mudanças na composição da microbiota intestinal ou colonização por patógenos específicos podem alterar a homeostase intestinal e a natureza da resposta imune e podem resultar na ocorrência espontânea de colite e/ou tumorigênese (LUPP et al, 2007; SALEH e TRINCHIERI, 2011).

A colite ulcerativa pode ser induzida quimicamente pela administração oral de sulfato de sódio dextrana (DSS) diluído em água, sendo este um dos modelos mais comumente utilizados em protocolos experimentais de indução de colite ulcerativa (WIRTZ, 2007,

PERSE e CERAR, 2012). O DSS induz lesões nas células epiteliais colônicas, expondo a lâmina própria a microrganismos luminiais e, conseqüentemente, acarretando uma resposta inflamatória aguda. A administração de DSS é associada com mudanças na diversidade da microbiota de camundongos. As mudanças na microbiota e as mudanças imunológicas parecem ocorrer antes do desenvolvimento da inflamação grave no cólon. Assim as mudanças na microbiota intestinal podem possuir papel na inflamação em resposta ao tratamento com o DSS (NABEETHA et al, 2011). De forma inversa, a inflamação também é capaz de alterar a microbiota. Para investigar o papel da inflamação na alteração da microbiota, Lupp e colaboradores utilizaram a *Citrobacter rodentium*, uma bactéria relacionada à diarreia enterohemorrágica em humanos causada pela bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica, como modelo de inflamação intestinal induzida por patógeno. Eles utilizaram também a *Campylobacter jejuni* que coloniza o trato gastrointestinal de camundongos, mas não induz resposta inflamatória. Essa última, para avaliar se apenas a infecção é necessária ou se é preciso que haja uma resposta inflamatória para a alteração da microbiota. E para verificar o papel da inflamação não infecciosa nas alterações da microbiota, eles avaliaram o efeito da inflamação induzida por DSS e em animais IL-10^{-/-} geneticamente predispostos à inflamação intestinal (LUPP et al, 2007). Esses autores observaram que a inflamação não infecciosa é suficiente para alterar a composição da microbiota intestinal. Segundo esse estudo, isso ocorre por meio da eliminação de um subconjunto de bactérias, em detrimento do crescimento de outros subconjuntos, em particular, *Enterobacteriaceae*. Esses autores afirmam, ainda, que a inflamação é necessária para reduzir de forma significativa a microbiota, uma vez que as bactérias patogênicas alteraram a microbiota, enquanto a infecção pelo micro-organismo não patogênico aos camundongos não interferiu na microbiota intestinal (LUPP et al, 2007).

Não podemos deixar de enfatizar que alterações genéticas de mediadores e/ou vias inflamatórias podem influenciar na composição da microbiota e acarretar inflamação intestinal. Estudos com animais RAG2^{-/-} e T-bet^{-/-} demonstraram desenvolvimento de colite espontânea, conhecida como TRUC referente à colite ulcerativa (UC) e a imunodeficiência (TR). A origem da colite TRUC pode ser um reflexo do fato de T-bet ser um fator transcricional repressor de TNF- α em células dendríticas (GARRETT et al, 2007). Conseqüentemente essa deleção acarreta em produção excessiva de TNF- α por essas células e produção de IL-17 por células do sistema imune inato induzida por TNF- α em sinergia com IL-23 (GARRETT et al, 2007). Além disso, a deficiência de RAG2 leva a ausência de células T reguladoras que são fundamentais a homeostase intestinal (GARRETT et al, 2007; POWELL et al, 2012). Estudos com o modelo de colite TRUC mostram, ainda, que animais com colite possuem uma microbiota colitogênica que transmite colite verticalmente para animais selvagens filhotes amamentados por fêmeas TRUC e horizontalmente em experimentos de co-habitação mesmo após separados dos animais TRUC (STROBER, 2013). Esses estudos demonstram, mais uma vez, o papel da alteração da microbiota na indução da inflamação intestinal e destacando a importância das alterações genéticas de fatores críticos à resposta inflamatória como indutores de alterações da microbiota intestinal.

A deleção de componentes do complexo inflamassoma também altera o perfil da microbiota em favor do desenvolvimento de colite (STROBER, 2013). Estudos com NLRP6 demonstram que animais deficientes para essa molécula apresentam maior gravidade de colite induzida por DSS ou mesmo colite espontânea (CHEN et al, 2011; NORMAND et al, 2011). Essas considerações são baseadas no fato de que animais selvagens em co-habitação com animais NLRP6^{-/-} desenvolverem colite com intensidade igual aos deficientes dessa molécula. O mesmo acontece em animais selvagens em co-habitação com animais ASC^{-/-}, componente necessário para a clivagem de caspase 1, ou em animais selvagens em co-

habitação com IL-18^{-/-} (ELINAV et al, 2011). Animais com deficiência de NLRP3 ou com deficiência de NOD2 também apresentam maior suscetibilidade a colite devido a alterações na composição da microbiota (HIROTA et al, 2011; ELINAV et al, 2011; COUTURIER-MALLARD, 2013). Esses estudos enfatizam que moléculas envolvidas em eventos inflamatórios modulam a composição da microbiota intestinal, acarretam disbiose e indução do desenvolvimento e suscetibilidade a colite, bem como maior gravidade da inflamação intestinal.

1.4.Fator de Ativação Plaquetária (PAF)

O Fator de ativação plaquetária (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) é um mediador fosfolipídico, gerado pela acetilação do ácido lisofosfatídico (ALF), produzido por diversas células incluindo plaquetas, células endoteliais, macrófagos e neutrófilos (ISHII e SHIMIZU, 2000; PRESCOTT et al, 2000). Mediadores lipídicos são derivados de fosfolipídeos de membrana que se encontram na parte interna da membrana plasmática celular. Após a ativação por íons Ca⁺⁺, a enzima fosfolipase A2 dá origem, a partir da fosfatidilcolina, ao ácido araquidônico (AA) e ao ácido lisofosfatídico, precursores dos eicosanoides e do PAF (ISHII e SHIMIZU, 2000). O PAF pode circular e agir de forma endócrina. Sua ação endócrina é controlada pela enzima plasmática PAF acetil-hidrolase, que limita a meia vida do PAF a poucos minutos no sangue de humanos e animais experimentais (PRESCOTT et al, 2000). E de forma interessante, modelos experimentais de inflamação aguda tem mostrado que o PAF pode sinalizar também, entre células justapostas tendo ação parácrina (PRESCOTT et al, 2000).

A ação do PAF ocorre pela ligação ao seu receptor acoplado à proteína G (PAFR) (MERENDINO et al, 1999). A ativação do PAFR dispara diversas cascatas de transdução de

sinal intracelular, incluindo fosfolipases PLA₂, PLC β e PLD, proteína cinase C, fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), proteína tirosina cinase e MAP cinases (ISHII e SHIMUZI, 2000) modulando, dessa forma, vários aspectos da função celular. Dentre estas, destacam-se diversas atividades biológicas associadas à inflamação aguda, como o recrutamento e ativação de leucócitos, alterações na permeabilidade vascular, ativação de plaquetas (MONTRUCCHIO, 2000) e síntese de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (YOST et al, 2010). O PAF ativa leucócitos polimorfonucleares (PMN) agindo de forma cooperada com uma proteína de adesão, a P-selectina (PRESCOTT et al, 2000). Os PMNs, ativados via PAF, são fundamentais na resposta inflamatória aguda e apresentam ações críticas na inflamação, incluindo a polarização celular, aumento da motilidade, aumento da liberação de enzimas e redistribuição de ligantes de superfície (PRESCOTT et al, 2000). A ativação de outros leucócitos, como os monócitos, via PAF, induz a translocação de NF- κ B para o núcleo e alterações na expressão de vários genes, entre outras respostas funcionais (PRESCOTT et al, 2000).

No epitélio intestinal, onde o PAF pode ser produzido e também degradado, esse mediador modula processos pró-inflamatórios e exerce vários efeitos biológicos (BORMAN et al, 1998; BORTHAKUR et al, 2010), incluindo modulação do transporte de íons, síntese de prostaglandinas e eicosanoides, indução de apoptose, e ativação de NF- κ B (KO et al, 2006). Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que a ativação de PAFR está envolvida na inflamação local e sistêmica induzidas por isquemia e reperfusão (I/R) intestinal, interferindo na intensidade da lesão tecidual e na letalidade do modelo (SOUZA et al, 2000 e 2003). Em humanos, a concentração de PAF é aumentada no tecido e soro sanguíneo em resposta a infecção por patógenos e em pacientes com doença de Crohn, colite ulcerativa, e com enterocolite necrotizante neonatal, e esse aumento da concentração é indicado nos estudos como correlacionado com a gravidade das doenças (MERENDINO et

al, 1999; CAPLAN et al, 2005). Assim, esse mediador inflamatório tem sido envolvido na indução de doenças inflamatórias intestinais como as IBDs (CAMUESCO et al, 2011). E apesar da maior concentração de PAF estar relacionada à ocorrência e gravidade de IBDs (MERENDINO et al, 1999; CAPLAN et al, 2005; CAMUESCO et al, 2011), os mecanismos de indução da resposta inflamatória via PAF nessas doenças ainda não estão bem esclarecidos.

2. JUSTIFICATIVA

A incidência das doenças inflamatórias intestinais tem aumentando nas últimas décadas nos países em desenvolvimento, e afetam cerca de 0,1% da população dos países desenvolvidos. Atribui-se isto a fatores múltiplos e complexos, tais como mudanças dos hábitos alimentares e perda da homeostase entre antígenos do lúmen intestinal e a imunidade da mucosa. A colite ulcerativa tem sido caracterizada como uma intensa resposta inflamatória na superfície da mucosa do cólon, estendendo-se desde o cólon ascendente até o descendente, com um grande infiltrado celular, destacando-se os linfócitos T CD4⁺, neutrófilos e eosinófilos. Esse infiltrado celular no intestino acarreta a liberação de enzimas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, promovendo dano tecidual com ocorrência de úlceras na mucosa e destruição das criptas. Assim, o entendimento dos eventos inflamatórios envolvidos no desenvolvimento das IBDs se mostra crucial para o eventual desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para estas patologias.

Além disso, estudos sugerem que, somado aos fatores genéticos, o desequilíbrio na microbiota indígena do hospedeiro é, pelo menos em parte, responsável pela ocorrência das doenças intestinais inflamatórias. Já é bem definido que a disbiose é

essencial para o desenvolvimento da colite ulcerativa, a modificação da composição da microbiota interfere na ocorrência e na intensidade da inflamação. De forma importante, os mediadores inflamatórios podem modular a composição da microbiota intestinal e promover as IBDs. Nesse sentido, sabendo que a via inflamatória PAF/PAFR participa de diversos processos inflamatórios no intestino e está associada a maior gravidade de doenças inflamatórias intestinais, buscamos investigar o papel desse potente mediador inflamatório, o PAF, no desenvolvimento, na intensidade e na recuperação da colite experimental induzida por DSS.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do PAFR na resposta inflamatória em modelo experimental de colite induzida por sulfato de sódio dextrana (DSS).

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar o papel do PAFR no perfil inflamatório, bem como a gravidade da doença (*score* clínico e histopatológico) induzidos em modelo experimental de colite por DSS.
2. Avaliar o papel do PAFR na indução e manutenção da colite crônica;
3. Verificar se a ausência do PAFR interfere na taxa de sobrevivência dos animais após indução da colite ulcerativa crônica experimental;
4. Avaliar o papel de PAFR na recuperação dos animais submetidos à indução da colite ulcerativa.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e seu tratamento

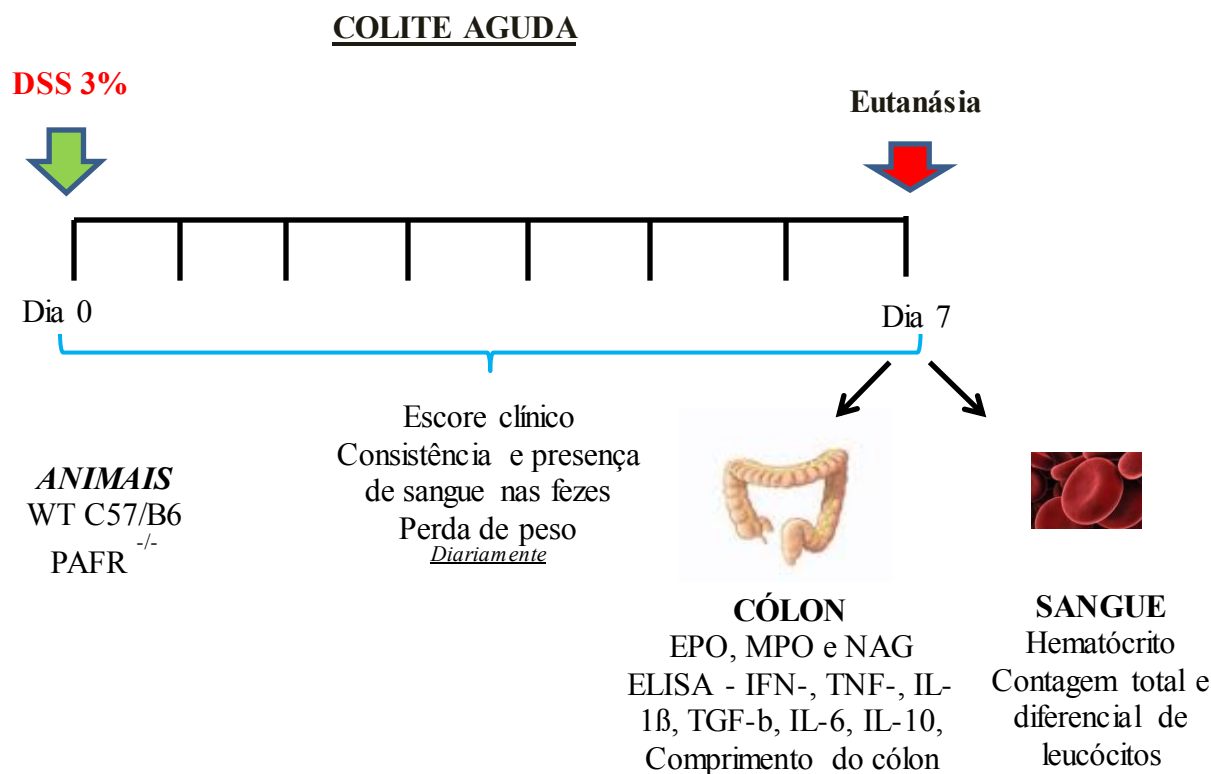
A utilização dos animais nesse estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA 138/2012 e CEUA 176/2015). Foram utilizados camundongos C57BL6 selvagens, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG) e com deleção genética do receptor do PAF (PAFR^{-/-}), provenientes de laboratório próprio (Grupo Imunofar/ICB-UFMG) fêmeas e machos entre seis e oito semanas de idade. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada, ciclo claro e escuro de 12 horas controlado por temporizador eletrônico e acesso livre à água e comida.

4.1.1. Colite Ulcerativa Aguda

A colite ulcerativa aguda foi induzida por sulfato de sódio dextrana (DSS) em camundongos selvagens e PAFR^{-/-}. Para isso, o DSS foi administrado oralmente misturado à água em concentração de 3% p/v (ROSE et al, 2012). Após sete dias de administração de DSS ocorreu a eutanásia e foram avaliados os parâmetros descritos abaixo: os animais foram pesados e o escore clínico avaliado diariamente (ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1).

- i. Taxa de sobrevivência dos animais no decurso da inflamação;
- ii. A graduação clínica dos animais, analisados de acordo com a consistência das fezes e a presença de sangue nas mesmas, e perda de peso corporal, avaliados

- diariamente a partir da administração de DSS (ver item “Determinação da graduação clínica”);
- iii. Análise do índice de hematócrito para a verificação da ocorrência de hemoconcentração;
 - iv. O influxo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o cólon, em homogenato de tecidos inflamados, por meio da determinação da atividade de enzimas específicas para cada uma das populações referidas, mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG);
 - v. A contagem total e diferencial de leucócitos circulantes;
 - vi. As concentrações de citocinas (TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, IL-23) e a quimiocina CXCL1 no cólon;
 - vii. Análise histopatológica de cortes histológicos do cólon;
 - viii. Verificação do comprimento do cólon, para avaliação de lesão induzida pela colite;



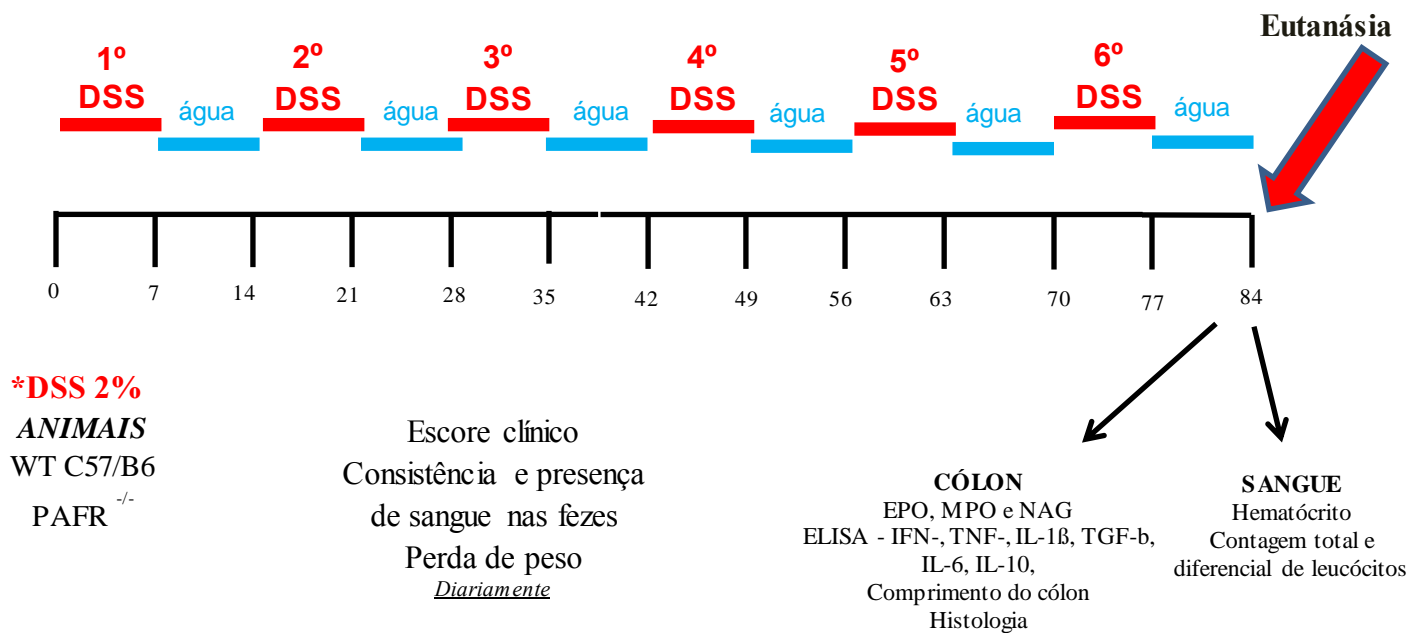
ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – COLITE AGUDA. A colite ulcerativa aguda foi induzida por sulfato de sódio dextrana (DSS) 3% diluído em água e administrado via oral em camundongos selvagens e PAFR^{-/-} por sete dias. No sétimo dia ocorreu a eutanásia e foram retirados o cólon - para análise de influxo de leucócitos, concentração de citocinas (ELISA) e averiguado o comprimento do cólon - e o sangue – para índice e hematócrito e contagem de leucócitos. Os animais foram pesados e o escore clínico avaliado diariamente.

4.1.2. Colite Ulcerativa Crônica

No sentido de se aproximar da colite encontrada na clínica, a qual se apresenta de forma crônica e os indivíduos sofrem constantes períodos de recidiva, realizamos o protocolo de colite ulcerativa crônica (ROSE et al, 2012). Nesse protocolo, a colite ulcerativa

crônica foi induzida em camundongos selvagens e PAFR^{-/-} com DSS, que foi administrado oralmente, misturado à água na concentração de 2%, durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. Os camundongos foram avaliados diariamente quanto à variação ponderal e o escore clínico. Ao final do sexto ciclo de descanso com água ocorreu a eutanásia e foram avaliados os parâmetros descritos na sessão acima (ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2).

COLITE CRÔNICA



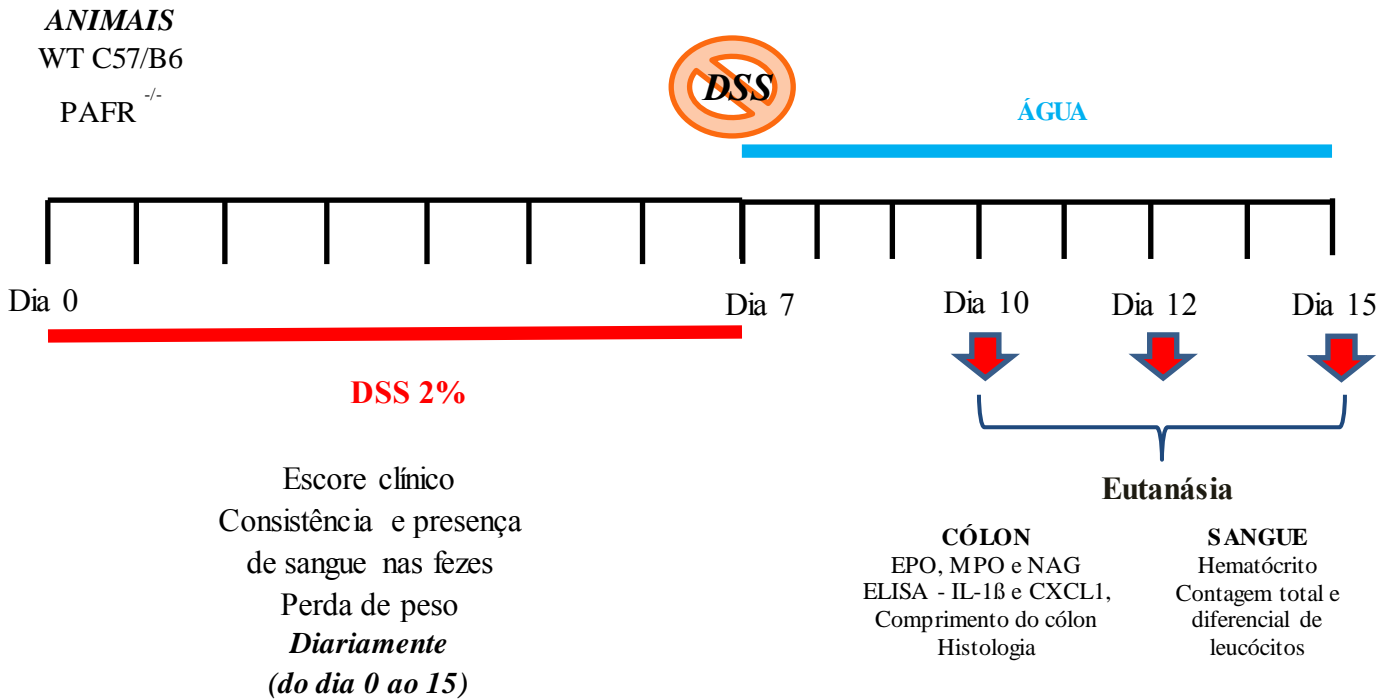
ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – COLITE CRÔNICA. A colite ulcerativa crônica foi induzida em camundongos selvagens e PAFR^{-/-} com DSS 2% em água e administrado via oral durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. Ao final do sexto ciclo de descanso com água ocorreu a eutanásia e foram retirados o cólon - para análise de influxo de leucócitos, concentração de citocinas (ELISA) e averiguado o

comprimento do cólon - e o sangue – para índice e hematócrito e contagem de leucócitos. Os animais foram pesados e o escore clínico avaliado diariamente.

4.1.3. Recuperação após Colite Ulcerativa

Para se entender melhor o atraso da recuperação da colite observado nos períodos de retirada do DSS no protocolo de colite crônica, buscamos avaliar a recuperação dos camundongos selvagens e PAFR^{-/-} após a indução da colite por DSS. Os camundongos receberam DSS na concentração de 2% diluído em água por sete dias. No sétimo dia o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água por mais sete dias. A fase de recuperação foi avaliada no terceiro, no quinto e no sétimo dia após a retirada do DSS, ou seja, no dia 10, 12 e 15 após o início do experimento. Os camundongos foram avaliados diariamente quanto à variação ponderal e escore clínico. Ao final do terceiro, quinto ou sétimo dia de descanso com água ocorreu a eutanásia e foram avaliados os parâmetros descritos na sessão 4.1.1 descrita acima (ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3).

COLITE + RECUPERAÇÃO



ESQUEMA PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3 – RECUPERAÇÃO APÓS COLITE ULCERATIVA. A colite foi induzida em camundongos selvagens e PAFR^{-/-} com DSS 2% em água e administrado via oral durante sete dias. por sete dias. No sétimo dia o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água por mais sete dias. A fase de recuperação foi avaliada no dia 10, 12 e 15 após o início do experimento, nos quais ocorreu a eutanásia e foram retirados o cólon - para análise de influxo de leucócitos, concentração de citocinas (ELISA) e averiguado o comprimento do cólon - e o sangue – para índice e hematócrito e contagem de leucócitos. Os animais foram pesados e o escore clínico avaliado diariamente.

4.1.4. Tratamento com antagonista do PAFR

O antagonista do PAFR, PCA 4248 (Tocris Bioscience), foi administrado na concentração de 5mg/kg diluído em 5% de etanol em PBS e injetado via subcutânea duas vezes ao dia. O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução veículo utilizada para diluir o PCA 4248. O PCA foi administrado durante os 7 dias de indução da colite no modelo de colite ulcerativa aguda (ver item 4.1.2) ou do dia 6 ao dia 12 (5º dia após a retirada do DSS), no modelo de recuperação após colite ulcerativa (ver item 4.1.3).

4.2. Determinação do escore clínico

Os camundongos foram clinicamente monitorados diariamente. Os animais foram colocados isoladamente em uma gaiola por 10 minutos para a determinação da consistência das fezes. A presença de sangue nas fezes foi avaliada por meio do teste de papel guáiaco Feca/cult (INLAB, São Paulo, Brasil). A graduação encontra-se a seguir: 0 = fezes normais e sem sangue; 1 = fezes normais e traço de sangue no teste de sangue fecal; 2 = fezes com consistência macia (*smooth*) e teste de sangue fecal negativo; 3 = fezes com consistência pastosa e teste de sangue fecal positivo; 4 = fezes líquidas e teste de sangue fecal positivo; 5 = fezes líquidas e sangramento retal moderado; 6 = fezes líquidas e sangramento retal grave; 7 = diarreia e hemorragia; e 8 = diarreia, hemorragia e sinais clínicos de morbidade, incluindo postura arqueada e ausência de exploração (VIEIRA et al, 2009).

4.3. Comprimento do cólon

O cólon foi retirado, após eutanásia, colocado sobre superfície lisa e averiguado o comprimento do tecido a partir do cécum até o reto, por meio de régua.

4.4. Histologia

Amostras do cólon foram removidos e fixadas em solução de formol a 10% em tampão fosfato pH=7,4 durante 24h. Posteriormente, foram processados segundo protocolo de desidratação com soluções de etanol de diferentes concentrações (70%, 85%, 95%, absoluto I, II, III), durante 30 minutos cada. Posteriormente, foram embebidas em xilol, por dois ciclos de 20 min; parafina líquida (3 banhos de 30 minutos) e, posteriormente, incluídos em blocos de parafina (Paraplast Sigma). Os tecidos incluídos em parafina foram cortados posteriormente em micrótomo, com espessura de 5 μ m e distendidos sobre lâminas de microscopia previamente identificadas. Após desparafinização (xilol, álcool absoluto, álcool 90, 80, 70%, água) as lâminas foram então coradas em corante hematoxilina (90 segundos) - eosina (90 segundos), segundo protocolo de coloração H&E. Após serem novamente desidratadas, as lâminas foram diafanizadas e montadas com Entelan para análise em microscópio óptico.

4.5. Análise histopatológica

A análise histopatológica de cortes histológicos do cólon corados com H&E foi determinada segundo quatro diferentes parâmetros: Inflamação (0 a 3: ausente, leve,

moderada ou intensa); lesão tecidual (0 a 2: ausente, erosão ou ulceração); arquitetura da cripta (0 a 2: normal, perda parcial da arquitetura ou perda total da arquitetura); e presença de células caliciformes nas criptas e no epitélio (0 a 2: normal, diminuição de células caliciformes ou perda total das células caliciformes). O escore máximo é 9.

4.6.Extração de citocinas de tecidos

Fragments do cólon foram macerados em um homogeneizador próprio na presença de 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89g diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10min a 10000 r.p.m. a 4⁰C e o sobrenadante recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

4.7. Determinação da concentração de citocinas e quimiocinas por ELISA

As concentrações utilizadas para os anticorpos e reagentes foram baseadas nos protocolos do fabricante (R&D Systems). Placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram recobertas com anticorpo purificado, específico para as citocinas TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, IL-23 e CXCL1 (100 μ L/poço em PBS, pH 7,4) e incubadas por 18 horas a 4⁰C. Numa segunda etapa, as placas foram lavadas em PBS acrescido de Tween 20 e bloqueadas em BSA 1% p/v em PBS (200 μ L/poço), por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Amostras de

sobrenadante de extrato de cólon diluídas 1:3 em BSA 1% em PBS foram adicionas em duplicata (100µL/poço), seguindo de incubação por 18 horas a 4°C. Posteriormente, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após 2 horas (a temperatura ambiente), foi utilizada uma solução de Estreptoavidina acoplada a enzima peroxidase numa concentração de 5µL/mL, seguido de incubação por 20 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição de 100µL/poço do cromógeno OPD 0,4mg/mL, contendo H₂O₂ (0,2µL/mL) em tampão citrato pH 5,0 e a absorbância lida em espectrofotômetro com filtro para comprimento de onda de 492nm, após parada da reação pela adição de 50 µL de H₂SO₄ a 1M. A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir de curva padrão correspondente.

4.8. Análise do índice de hematócrito

Uma amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro para determinação de micro-hematócrito (Perfecta), o qual foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e translúcida (concentração de plasma), por meio de uma regra de três simples.

4.9. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no tecido foi obtida pelos ensaios da atividade da mieloperoxidase (MPO) como descrito anteriormente (MATOS et al., 1999; SOUZA et al, 2003).

Os fragmentos teciduais foram removidos e congelados a -20° C. Após descongelamento, o tecido (100g de tecido em 2 mL de solução tampão) foram homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na_3PO_4 , 0,015 M de Na_2EDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125- Fischer Scientific Pennsylvania, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1 mL de solução NaCl 0,2% p/v seguido da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% p/v e glicose 5% p/v, 30 segundo após .

Após nova centrifugação o precipitado foi ressuscitado em tampão Na_3PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de “hexadecyltrimethylammonium (HTAB)” 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL de suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se de nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10000 rpm e recolhidos os sobrenadantes. As amostras de tecido foram diluídas previamente a análise em tampão Na_3PO_4 0,05 M em razão 1:5.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuscitado foi calculada pela medida das alterações em densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando-se de TMB (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido comparados com

neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade abdominal foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína 5% p/v em PBS. Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida previamente pelo processamento de neutrófilos purificados como descritos acima.

Determinação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

O sobrenadante resultante do protocolo de extração de citocinas de tecidos, citados acima, foi utilizado para o ensaio de NAG. Foram adicionados 100µL das amostras diluídas em tampão citrato/fosfato a uma placa de 96 possos, em duplicata. Posteriormente foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida) e a placa foi incubada a 37°C por 10 min. Após esse período foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M e realizada a leitura em espectrofotmetro a 405 nm.

4.10. Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

O ensaio do EPO foi realizado conforme descrito por STRATH, 1985 (VIEIRA et al, 2009). Resumidamente, para cada 100 mg de cólon foi utilizado 1,9 ml de PBS para homogeneizar o tecido. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lisadas. As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 1,9 ml de 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio em PBS. Posteriormente, esse homogenato final foi congelado três vezes em nitrogênio líquido, e centrifugado a 4 ° C , 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante

foi utilizado no ensaio enzimático com a adição de um montante igual de cromógeno (1,5 mmol / L o-fenilenodiamina e 6,6 mmol / L de H₂O₂ em 0.075 mmol / L Tris-HCl (pH=8). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e lida na absorbância de 492 nm em espectrofotometro.

4.11. Avaliação da expressão do mRNA de ANXA1, IL-10 e GILZ

Para a quantificação relativa da expressão do RNAm de ANXA1, IL-10 e GILZ, foram utilizados os cólons de animais selvagens ou com deleção genética do PAFR submetidos a indução de colite por DSS. As amostras de cólon (50 a 100 mg de tecido) foram homogeneizadas em 1 mL de TRIZOL (GIBCO/BLR Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA) utilizando-se um homogeneizador elétrico. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 min a uma temperatura de 15° a 30° C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de Clorofórmio de alta qualidade para cada 1 mL de TRIZOL. É realizada agitação em *vortex* e depois incubação por 3 min de 15° a 30° C. O homogenato é centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 2 a 8° C. Após a centrifugação, a mistura fica separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa que é, então, transferida para um microtubo novo. O RNA é precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (500µl de isopropanol para cada 1 ml de TRIZOL) e acetato de sódio na concentração de 3M na proporção de 1:20 (50 µl para cada 1 ml de solução). As amostras foram incubadas por 10 min a 15 a 30°C e então centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 2 a 8°C, quando se forma um pellet branco. Após descarte do sobrenadante, é adicionado 1 ml de etanol

75% (diluído em água tratada com DEPC) para 1 ml de TRIZOL. O tubo é agitado no vortex para que o pellet se solte do fundo. Então, é feita nova centrifugação a 7.500 x g por 5 min a 2 a 8° C. Após descarte do sobrenadante, o tubo é deixado aberto por 5 minutos para secagem do *pellet* que é, em seguida, diluído em água de alta qualidade tratada com DEPC, em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA é estocado a -70° C até o uso.

A quantificação das amostras de RNA é feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O RNA é quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2 µl da amostra pura. O aparelho fornece a concentração em ng/µL e a correlação 260nm/280nm (RNA/proteínas).

Preparo do cDNA por Transcrição Reversa:

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais é realizada utilizando-se 2,0 µg de RNA aos quais foram adicionados 50µM do primer Oligo dT (15) (Promega Cor, Madison WI, EUA). É feita uma incubação por 5 minutos a 70°C e em seguida por 5 minutos no gelo para permitir a separação das fitas de RNA e o anelamento do *primer* e para impedir a formação de artefatos inespecíficos, respectivamente. Em seguida, é adicionada uma mistura de reagentes em um volume de 14,5µl contendo 1,5µl de dNTPs a 100 mM (Promega Cor, Madison, WI, EUA), 4 µl tampão M-MLV 5X (Promega Cor, Madison WI, EUA) e 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor, Madison WI, EUA) e 8,5µl de água Milli-Q autoclavada. A mistura é incubada por 2 horas a 42°C quando ocorre a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA serão conservadas a -20°C até a reação de polimerase em cadeia (PCR).

PCR específica:

Para as reações subseqüentes de amplificação, 5µl da amostra de cDNA foram utilizados. A PCR é realizada em um volume final de 20µl contendo 10µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5µl de primer senso a 5µM, 1,5µl de primer anti-senso a 5µM e 2µl de água Milli-Q. A reação é realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, é feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois é feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se as seguintes fórmulas: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do grupo controle. Em que $\Delta Ct = Ct$ do gene alvo $- Ct$ do gene referência murino (18S). As seqüências dos iniciadores utilizados foram as seguintes: 18S primer senso- 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G- 3' e 18S primer anti-senso- 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C- 3'; IL-10 primer senso- 5'- GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG - 3' e IL-10 primer anti-senso- 5'- CGC AGC TCT ACG AGC ATG TG - 3'; ANXA1 primer senso- 5'- ACT CTG CGA AGA TGA GGA AAG - 3' e ANXA1 primer anti-senso- 5'- AGA TGC CAG GGC TTT GTA TG - 3'; GILZ primer senso- 5'- CAG CAG CCA CTC AAA CGA GC - 3' e GILZ primer anti-senso- 5'- ACC ACA TCC CCT CCA AGC AG - 3'

4.12. Análise Estatística

As comparações estatísticas entre os vários grupos foram realizadas por ANOVA “one way” seguidas de pós teste de Newman-Keuls. Nos experimentos de graduação histopatológica as análises foram realizadas por teste não paramétrico. E nas análises de variação ponderal e graduação clínica utilizamos ANOVA “two way”. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste “t de student”. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad PRISM 5.0, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. AUSÊNCIA DE PAFR INDUZ MAIOR GRAVIDADE DA COLITE ULCERATIVA

Inicialmente, avaliamos se animais PAFR^{-/-} apresentariam alguma alteração durante a colite ulcerativa aguda. Os nossos dados demonstram que, após sete dias de exposição ao DSS (3%), os animais selvagens apresentaram aumento do escore clínico da doença e perda de peso de aproximadamente 10% do peso inicial (Figura 1A e 1B, respectivamente) quando comparados aos animais controle, que receberam somente água. Esses animais apresentaram também encurtamento do comprimento do cólon (Figura 1C) quando comparados ao grupo controle. Quando avaliamos os animais com deleção genética do PAFR, nossos resultados demonstraram que estes apresentaram maior gravidade da colite ulcerativa quando comparados ao grupo selvagem. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram escore clínico máximo, acentuada perda de peso, com aproximadamente 40% de redução do peso corporal, (Figura 1A e 1B, respectivamente) e maior encurtamento do comprimento do cólon (Figura 1C), quando comparados aos animais selvagens. Estes dados indicam que a colite aguda se manifesta de forma mais grave na ausência de PAFR.

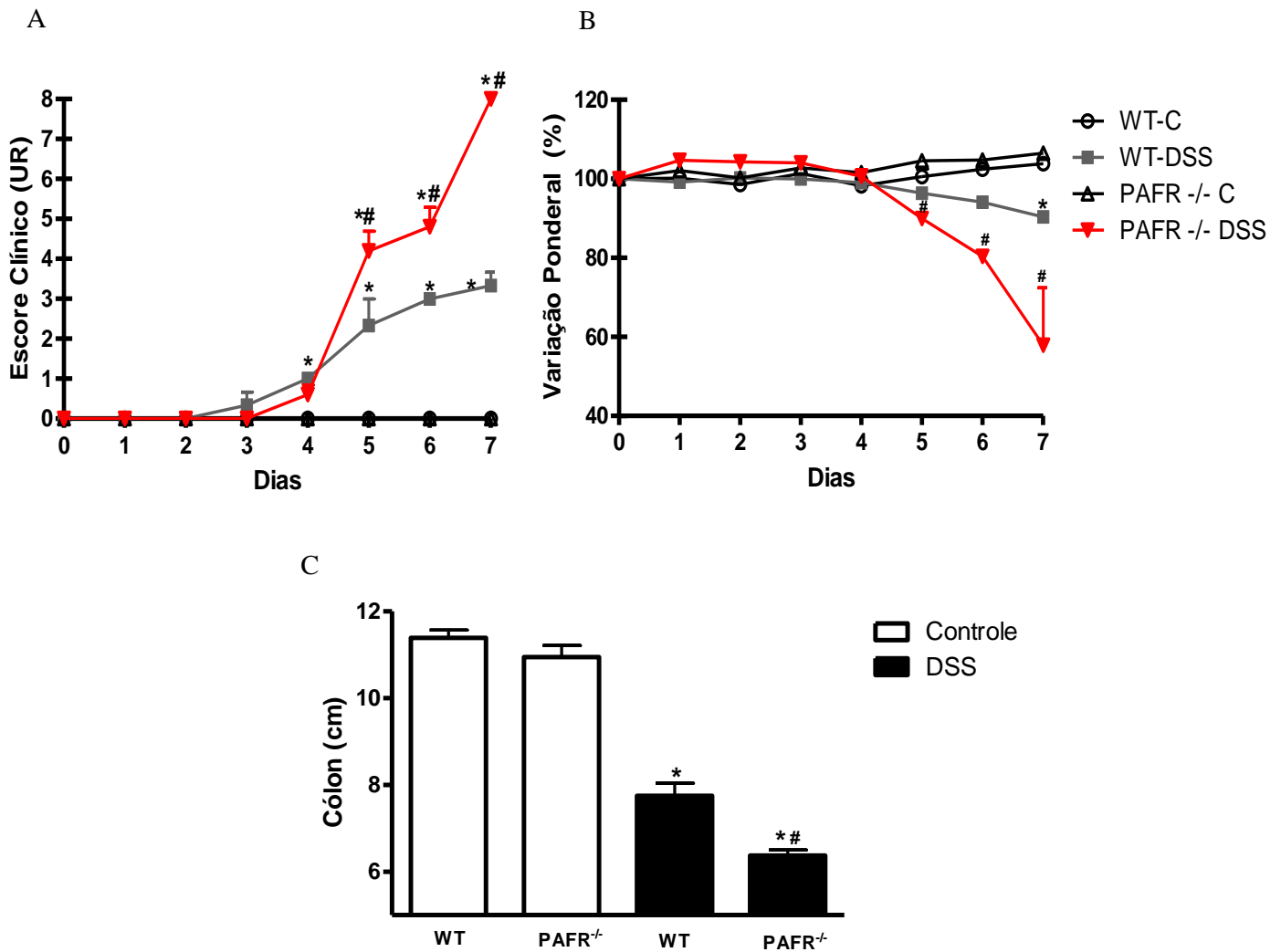


Figura 1: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens e com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de indução de colite por DSS.

A colite foi induzida por administração de DSS, na concentração de 3% em água, para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR, durante 7 dias. Foram avaliados diariamente a variação ponderal (A) e os sinais clínicos da doença (B) e no sétimo dia, após eutanásia, o comprimento do cólon foi averiguado (C). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

Os animais selvagens com DSS apresentaram hemoconcentração, identificado pelo menor índice de hematócrito, quando comparados ao grupo controle (Figura 2A). Já os animais PAFR^{-/-} apresentaram menor hemoconcentração (Figura 2A) quando comparados aos animais selvagens. Corroborando a piora do índice de hematócrito e com os resultados clínicos da doença, os animais selvagens que receberam o DSS

apresentaram também influxo de neutrófilos para o cólon, avaliado por meio do ensaio de atividade de MPO (Figura 2B), quando comparados ao grupo controle. Já os animais PAFR^{-/-} com DSS apresentaram aproximadamente três vezes mais atividade de MPO quando comparados ao grupo selvagem desafiado com o DSS (Figura 2B).

Ao avaliarmos histologicamente o cólon dos animais selvagens observamos que esses animais apresentaram influxo de células inflamatórias, erosão tecidual focal, ulcerações teciduais focais, perda parcial da arquitetura da cripta e diminuição do número de células caliciformes, o que refletiu no maior escore histopatológico quando comparados ao grupo controle (Figura 3A). Nas lamínas histológicas do cólon dos animais PAFR^{-/-}, observamos maior intensidade do comprometimento do intestino (Figura 3A) quando comparados ao grupo selvagem. Esses animais apresentaram infiltrado inflamatório expressivo, erosão tecidual generalizada, ulcerações teciduais focais, perda total da arquitetura criptal e ausência de células caliciformes, o que ocasionou escore histológico alto (Figura 3B). Estes dados demonstram que há maior dano tecidual no intestino de animais deficientes para PAFR^{-/-} durante a colite ulcerativa aguda.

O nosso próximo passo foi avaliar o influxo de leucócitos e a produção de mediadores inflamatórios no cólon de animais submetidos à indução da colite aguda. Corroborando o maior infiltrado inflamatório documentado na avaliação histopatológica, os animais selvagens que receberam o DSS apresentaram também influxo de neutrófilos para o cólon, avaliado por meio do ensaio de atividade de MPO (Figura 2B), quando comparados ao grupo controle. Já os animais PAFR^{-/-} apresentaram aproximadamente três vezes mais atividade de MPO quando comparados ao grupo selvagem desafiado com o DSS (Figura 2B).

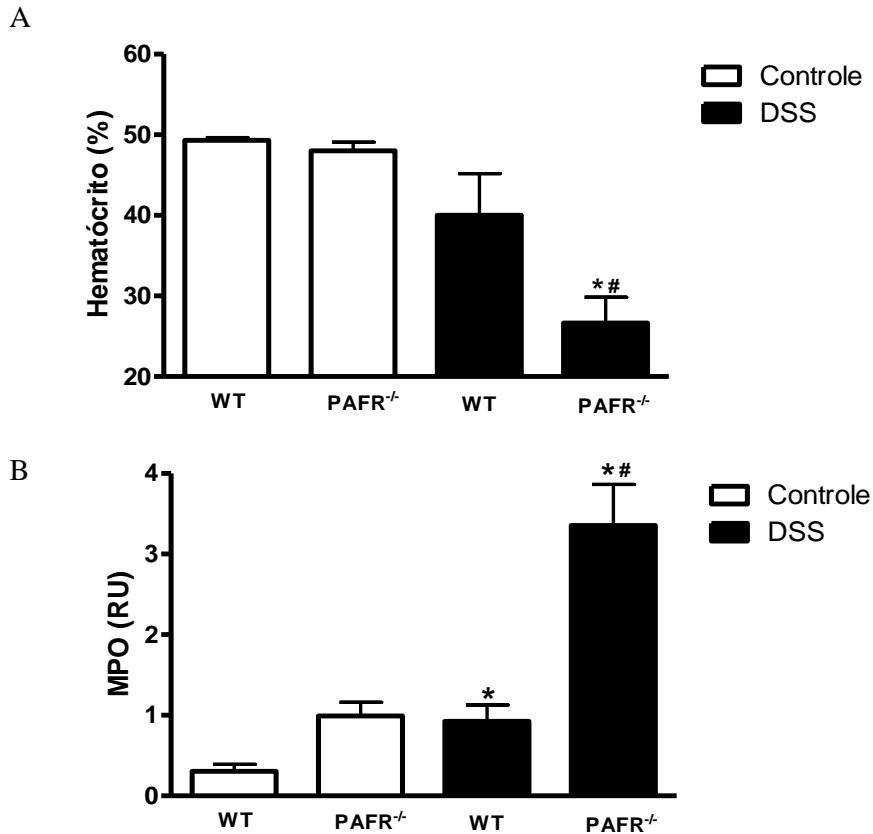


Figura 2: Hemoconcentração e atividade da enzima mieloperoxidase em camundongos com deleção genética do PAFR submetidos ao protocolo de indução de colite por DSS.

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 3% em água para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR durante 7 dias. Após eutanásia, sangue e cólon foram coletados para a análise do índice de hematócrito (A) e a da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (B). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

Os animais selvagens não apresentaram maior concentração das citocinas IL1-β, IL-6, TNF-α e CXCL-1 no cólon (Figura 4 A, B, C e D, respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Já os animais PAFR^{-/-} desafiados com o DSS apresentaram concentrações dessas citocinas significativamente maiores quando comparadas a concentração desses mediadores inflamatórios no grupo selvagem que também apresentava colite ulcerativa. Não houve alterações significativas das concentrações de IL-10 e IL-17 entre os diferentes grupos experimentais (Figura 5 A e

B, respectivamente). A colite induzida por DSS acarretou diminuição da concentração de TGF- β no cólon nos animais selvagens quando comparada ao seu controle, e não apresentou diferença quando comparada ao grupo PAFR^{-/-} que recebeu o DSS (Figura 5 C). Este grupo de resultados demonstra que em animais PAFR^{-/-} há maior influxo de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios durante a colite ulcerativa.

A

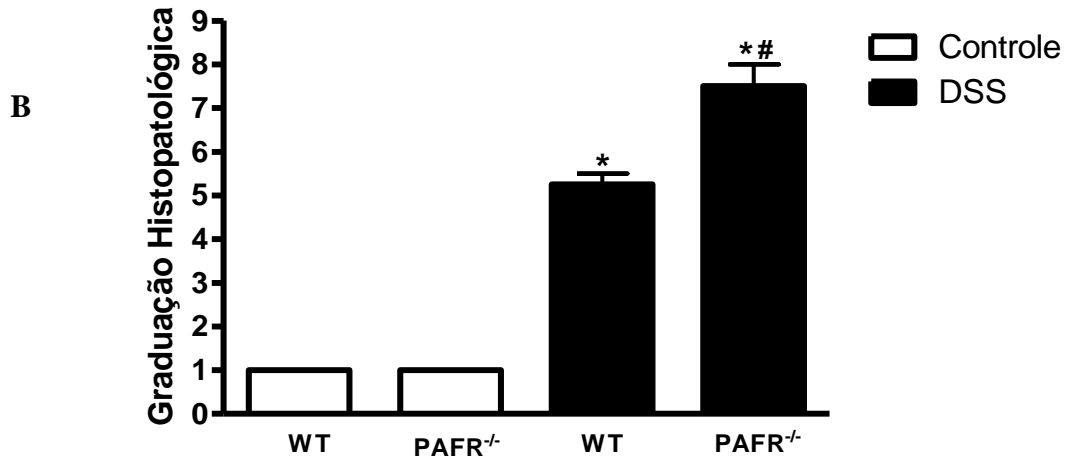
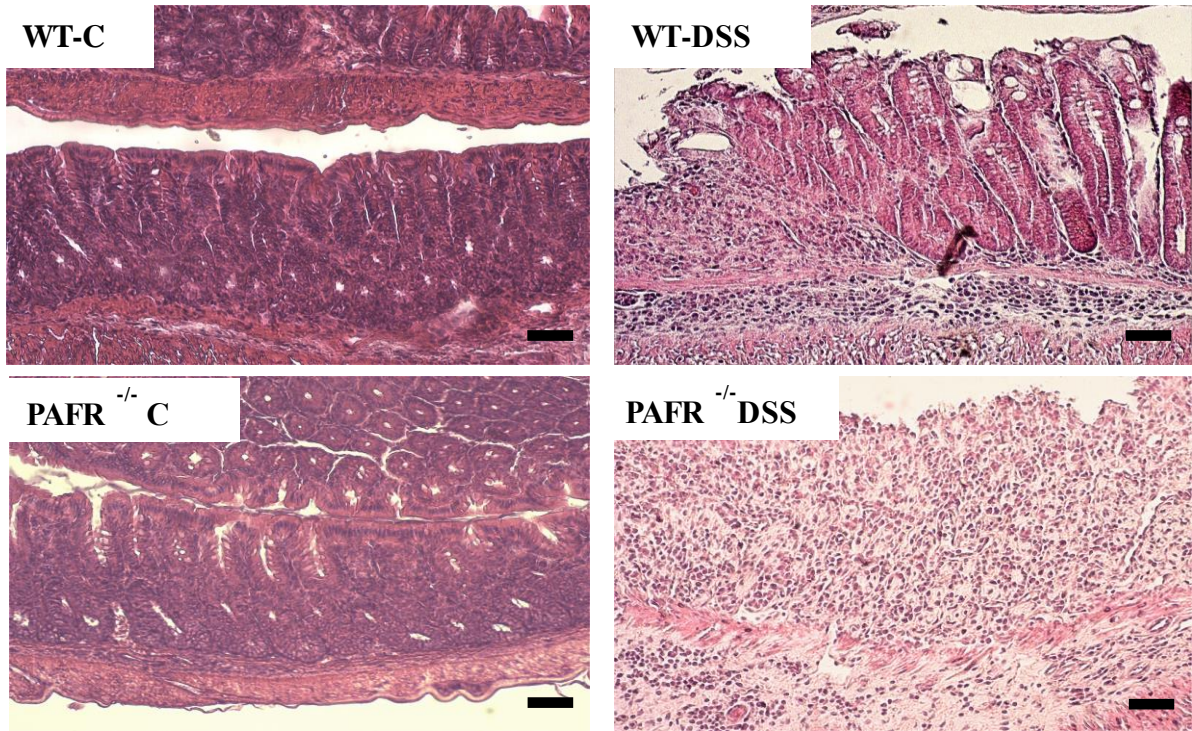


Figura 3: Representação histológica e graduação histopatológica de secções do cólon de camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite.

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 3% em água para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR durante 7 dias. No sétimo dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente realizado a fixação em formol 10%, processados, incluídos em parafina e corados por H&E. Imagens representativas da histologia do cólon, com barras de escala representam 50µm (A). Graduação histopatológica segundo o grau de inflamação, lesão tecidual, estrutura criptal e presença de células caliciformes (B). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

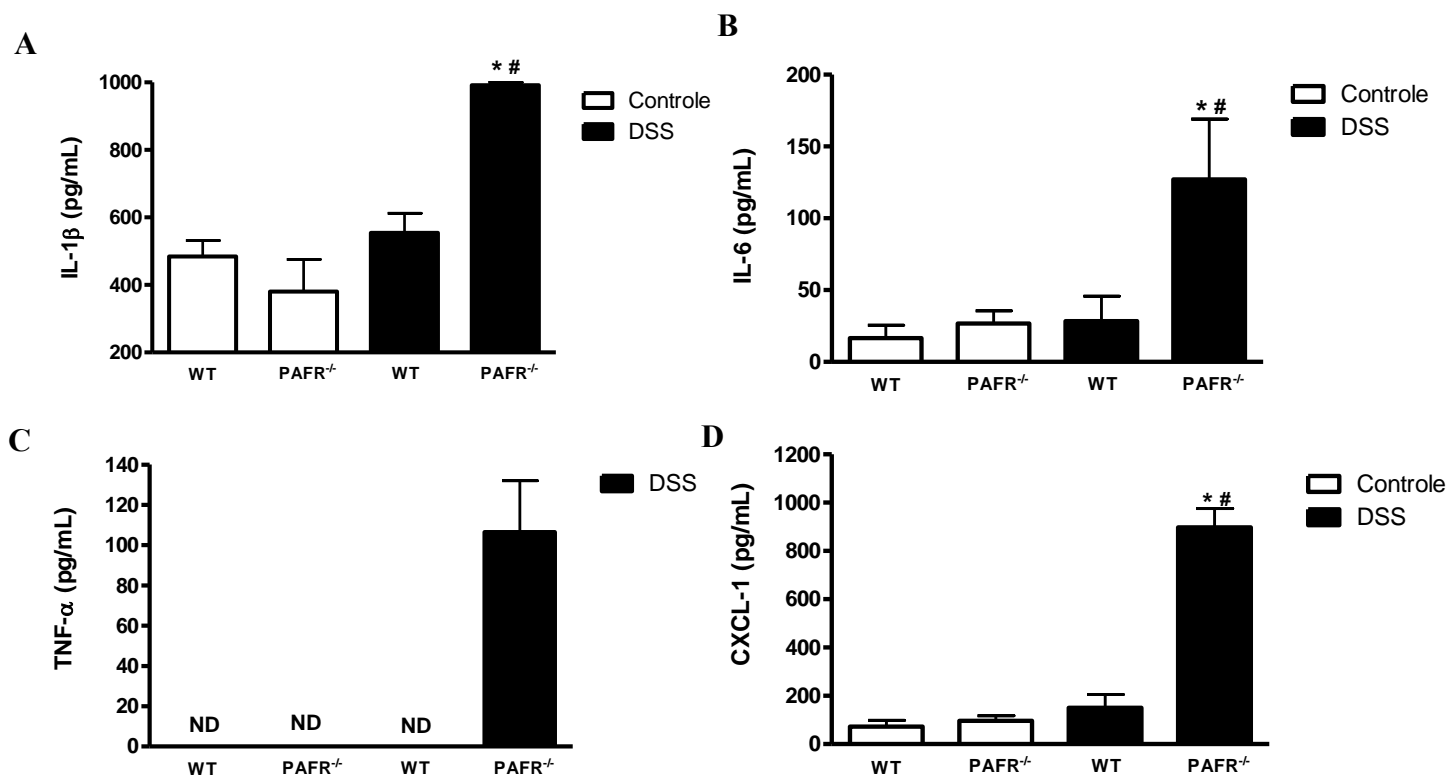


Figura 4: Concentração de mediadores inflamatórios no cólon de camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite por DSS.

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 3% em água para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR durante 7 dias. No sétimo dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente avaliado por ELISA as concentrações dos mediadores inflamatórios IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e CXCL-1 (D) em 100 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

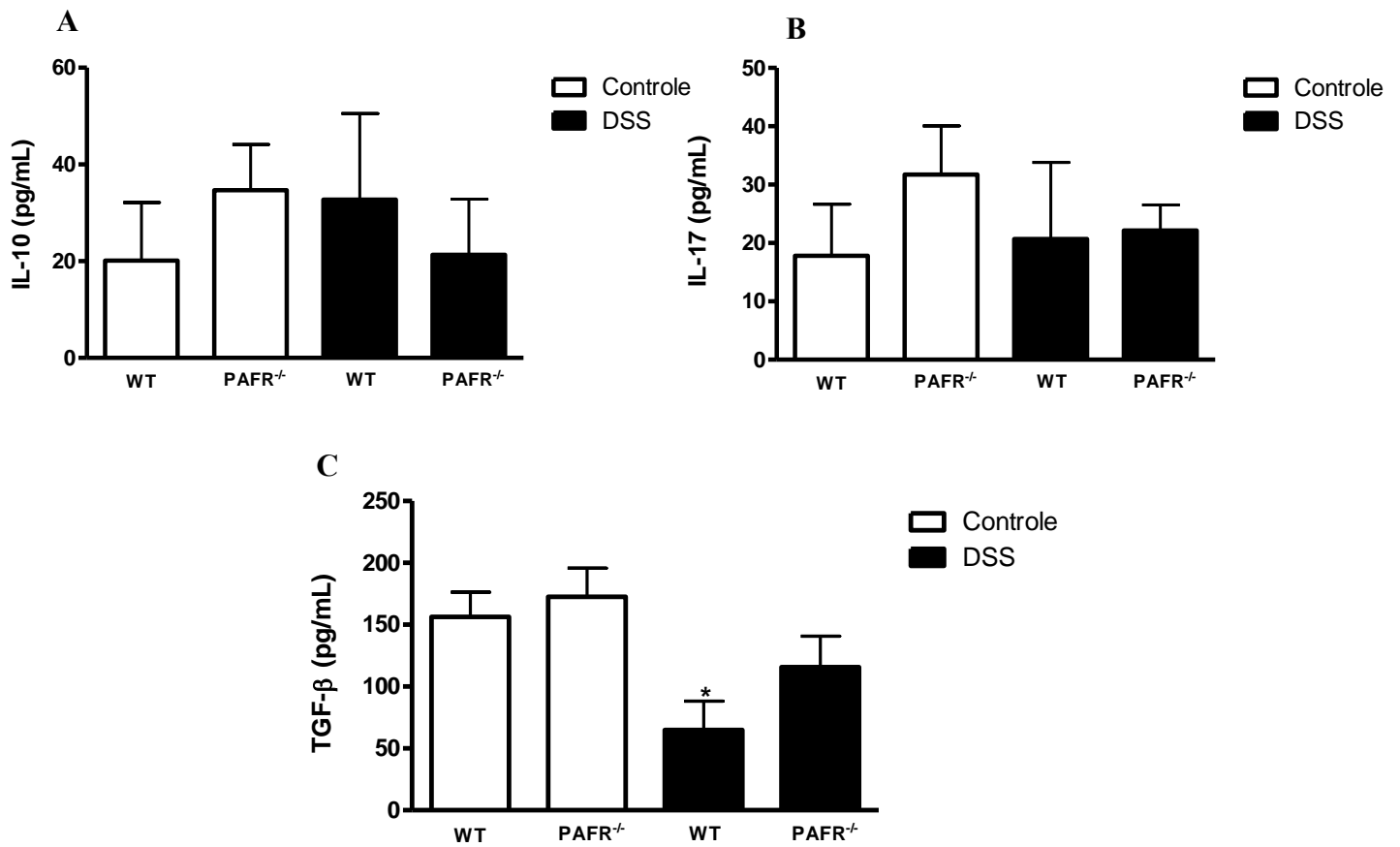


Figura 5: Concentração de mediadores inflamatórios no cólon de camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite por DSS.

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 3% em água para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR durante 7 dias. No sétimo dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente foi avaliado, por ELISA, as concentrações dos mediadores inflamatórios IL-10 (A), IL-17 (B) e TGF-β (C) em 100 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

5.2. AUSÊNCIA DE PAFR ESTÁ ASSOCIADA A MAIOR GRAVIDADE DA COLITE CRÔNICA

Nosso próximo passo foi no sentido de se aproximar da colite encontrada na clínica, a qual se apresenta de forma crônica e os indivíduos sofrem constantes períodos de recidiva. Para mimetizar o que encontramos na colite ulcerativa em humanos, nós realizamos o protocolo de colite ulcerativa crônica. Nesse protocolo, induzimos a colite ulcerativa crônica por administração de DSS a 2%, buscando uma doença mais moderada nos animais PAFR^{-/-}. O DSS foi oferecido aos animais durante seis ciclos de sete dias, intercalados por sete dias de descanso com água pura e somente ao final do sexto ciclo de descanso com água ocorreu a eutanásia.

Nós observamos que a cada ciclo de descanso, no qual o animal com indução da doença recebia água pura, sem o DSS, os animais selvagens apresentaram redução no escore clínico, chegando ao final do sexto e último ciclo de descanso apresentando escore clínico mínimo. Ou seja, esses animais mesmo sem o desafio do DSS mantinham a doença por alguns dias e no sétimo dia já se apresentavam significativamente recuperados quanto aos parâmetros avaliados no escore clínico (Figura 6A). Esses animais apresentavam ainda, de forma geral, manutenção do peso corporal (Figura 6B). Já os animais PAFR^{-/-} não apresentaram essa recuperação significativa quando comparados aos animais selvagens. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram maior escore clínico, quando comparados aos selvagens, durante todo o protocolo de indução da doença crônica e, nos intervalos dos ciclos com DSS (descanso com água), esses animais não se recuperaram na mesma proporção que os animais selvagens (Figura 6A).

Outro fator importante a ser destacado é a variação ponderal. Os animais selvagens não apresentaram diferença significativa em relação à perda de peso quando

comparados aos animais sem a indução da doença, grupo controle (Figura 6B). Já os animais PAFR^{-/-} apresentaram, durante todos os ciclos de indução da doença e de descanso com água maior, perda de peso (chegando a 30% em alguns pontos) quando comparados aos animais selvagens submetidos ao protocolo de colite crônica (Figura 6B). O modelo de colite induzida por DSS utilizado nesse estudo não está associado à letalidade, porém como os animais com a deleção genética do PAFR apresentavam maior gravidade da doença e ainda um déficit na recuperação durante o período de descanso com água, observamos que aproximadamente 50% dos animais PAFR^{-/-} não resistiram até o final do experimento (Figura 6C).

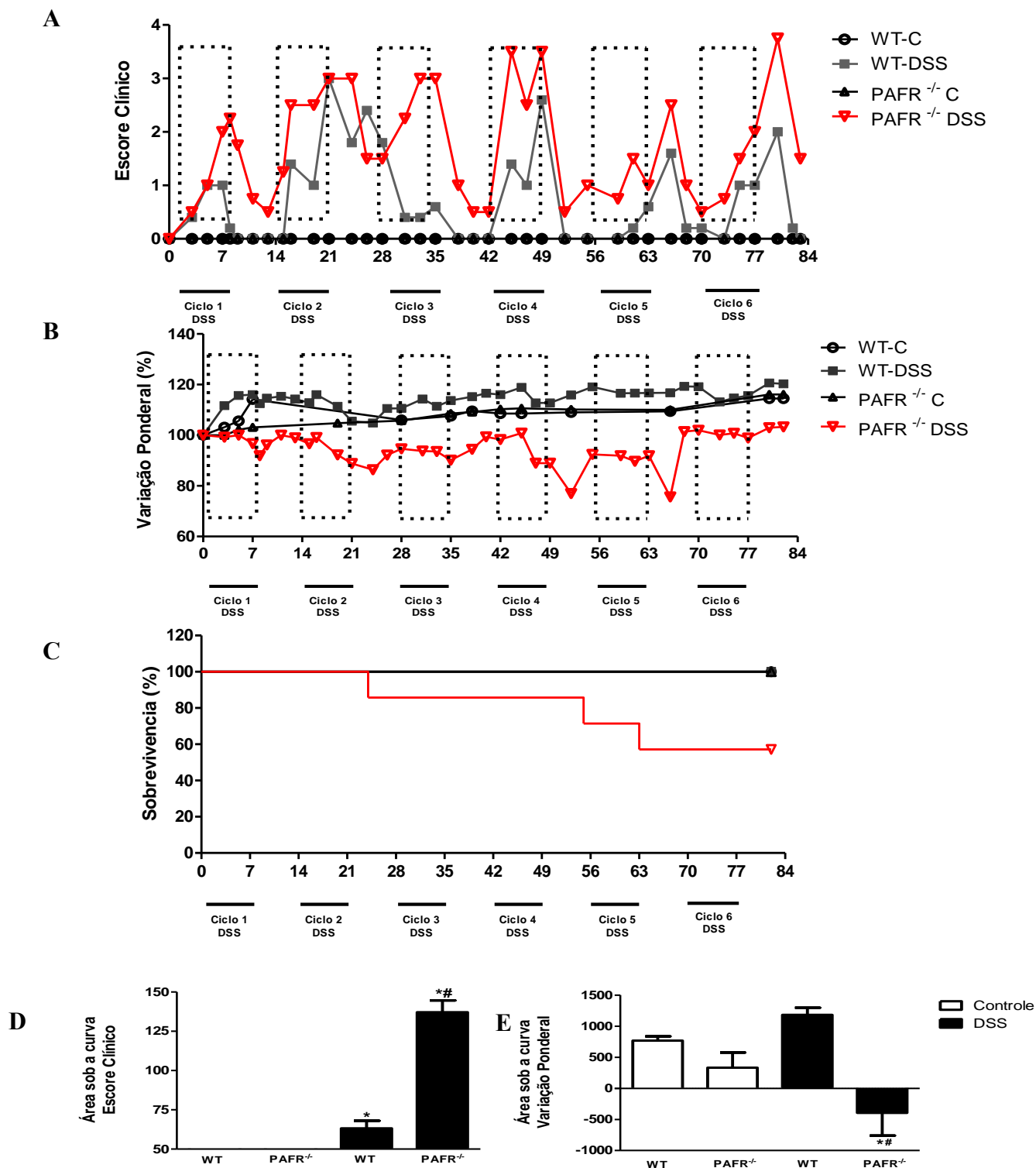


Figura 6: Avaliação do fenótipo de camundongos com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de colite crônica induzida por DSS.

A colite ulcerativa crônica foi induzida por DSS em camundongos selvagens ou PAFR^{-/-}, com DSS administrado oralmente misturado à água na concentração de 2% durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. Durante todo o período, foram avaliados diariamente os sinais clínicos da doença (A), a variação ponderal (B) e a letalidade do modelo (C). Em (D) e (E) demonstramos graficamente a área sob a curva do escore clínico e da variação ponderal, respectivamente. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

Após o sexto ciclo de descanso com água, os animais foram eutanasiados e pudemos observar que os animais selvagens apresentaram encurtamento do comprimento do cólon quando comparados ao grupo controle (Figura 7A). Os animais PAFR^{-/-} apresentaram encurtamento mais expressivo do comprimento do cólon quando comparados aos animais selvagens com indução da doença (Figura 7A). Corroborando esses resultados, ao avaliarmos a resposta inflamatória, observamos que os animais selvagens apresentaram maior influxo de neutrófilos para o cólon (Figura 7B) quando comparados ao grupo controle. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram ainda maior influxo de neutrófilos para o tecido, indicado pela exacerbação da atividade de MPO no cólon (Figura 7B) quando comparados aos animais selvagens.

Na análise histológica dos animais selvagens observamos que esses animais apresentaram influxo de células inflamatórias, erosão tecidual focal, perda parcial da arquitetura da cripta e diminuição do número de células caliciformes, o que refletiu no maior escore histopatológico quando comparados ao grupo controle (Figura 8A). Os animais PAFR^{-/-} apresentaram aumento expressivo do infiltrado inflamatório, erosão tecidual, perda parcial da arquitetura da cripta e diminuição do número de células caliciformes (Figura 8A), o que levou ao maior valor na graduação histopatológica quando comparados aos animais selvagens (Figura 8B). Os mediadores inflamatórios IL1- β e CXCL-1 também apresentaram-se em maior concentração no cólon dos animais selvagens quando comparados ao grupo controle (Figura 9). Os animais PAFR^{-/-} apresentaram maior concentração dessas citocinas quando comparados aos animais controle, sem indução da doença (Figura 9). Outras citocinas como IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, IL23, TNF- α e TGF- β apresentaram concentrações semelhantes entre os grupos controle e com indução da doença (Figura 10). Em conjunto, estes dados demonstram que animais PAFR^{-/-} são mais susceptíveis à colite ulcerativa crônica.

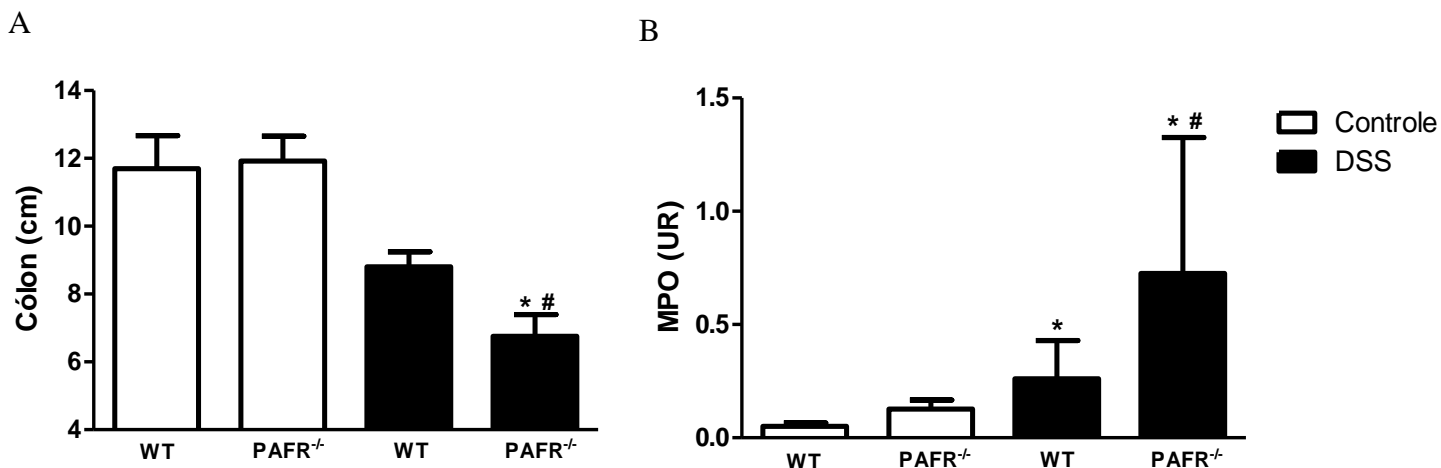


Figura 7: Comprimento do cólon e influxo de neutrófilos para o cólon em camundongos com colite crônica.

A colite ulcerativa crônica foi induzida por DSS em camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} com DSS administrado oralmente misturado à água na concentração de 2%, durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. No final do sexto ciclo de descanso, após eutanásia, o cólon foi retirado e medido por régua (A) e realizamos o ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase - MPO - no homogenato do cólon (B). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

A

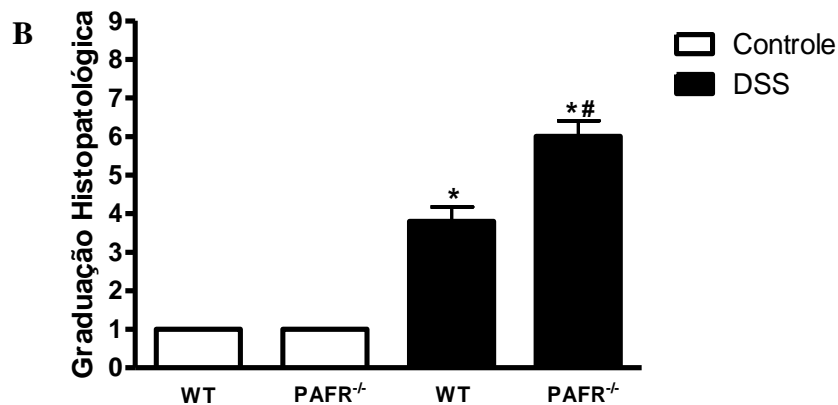
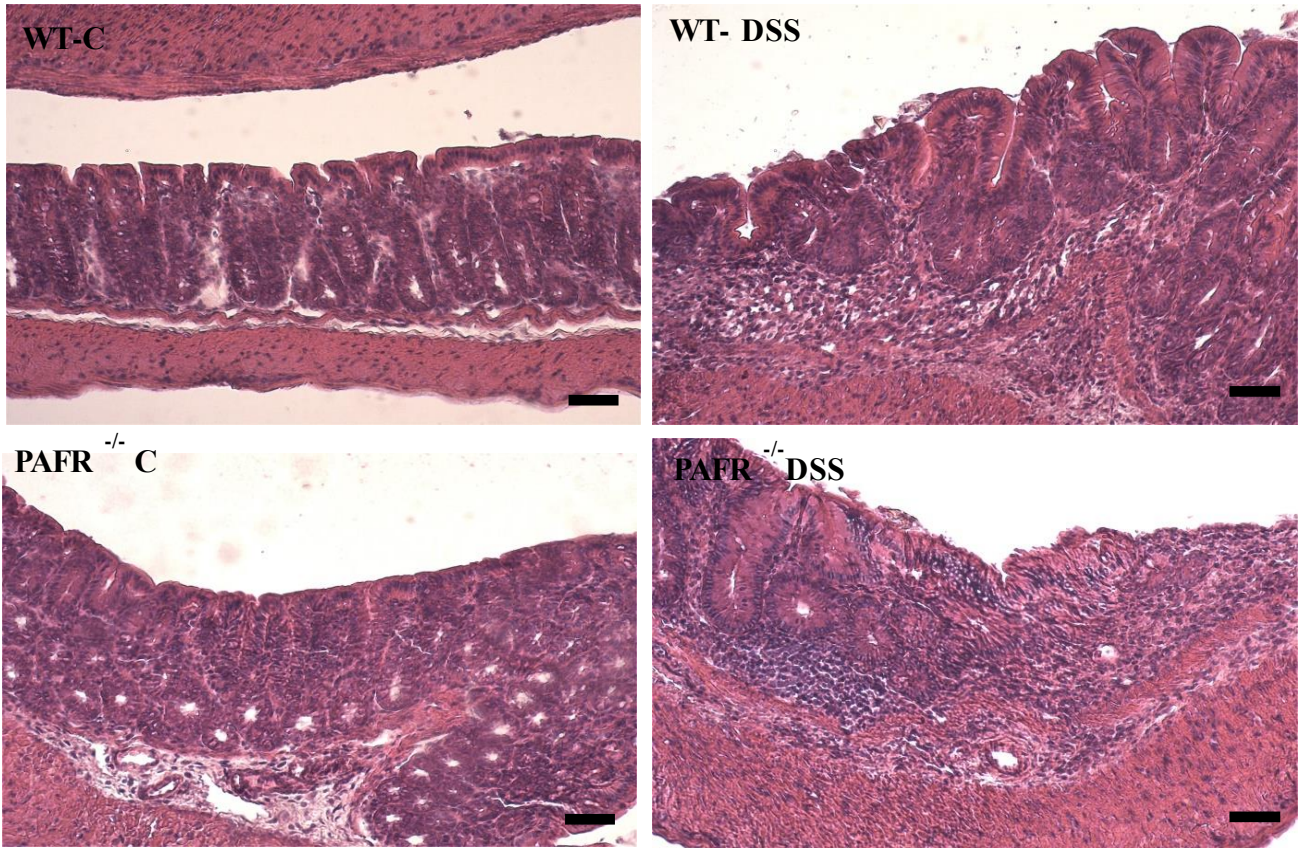


Figura 8: Representação histológica e graduação histopatológica de secções do cólon de camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} submetidos ou não ao protocolo de indução de colite crônica por DSS.

A colite ulcerativa crônica foi induzida por DSS em camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} com DSS administrado oralmente misturado à água na concentração de 2%, durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. No final do sexto ciclo de descanso, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente foi realizado a fixação em formol 10%, processados, incluídos em parafina e corados por H&E. Imagens representativas da histologia do cólon, com barras de escala representam 50µm (A). Graduação histopatológica segundo o grau de inflamação, lesão tecidual, estrutura criptal e presença de células calciformes (B). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

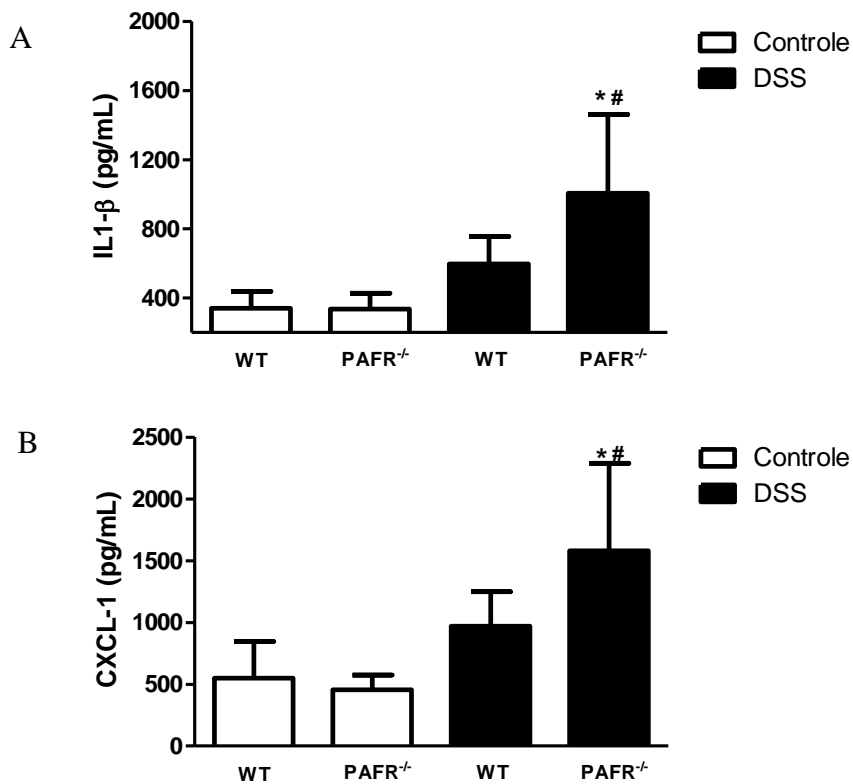


Figura 9: Perfil dos mediadores inflamatórios IL1-β e CXCL1 na colite ulcerativa crônica.

A colite ulcerativa crônica foi induzida por DSS em camundongos selvagens ou PAFR^{-/-} com DSS administrado oralmente misturado à água na concentração de 2%, durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. No final do sexto ciclo de descanso, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente foi avaliada, por ELISA, as concentrações dos mediadores inflamatórios IL1-β (A) e CXCL1 (B) em 100 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

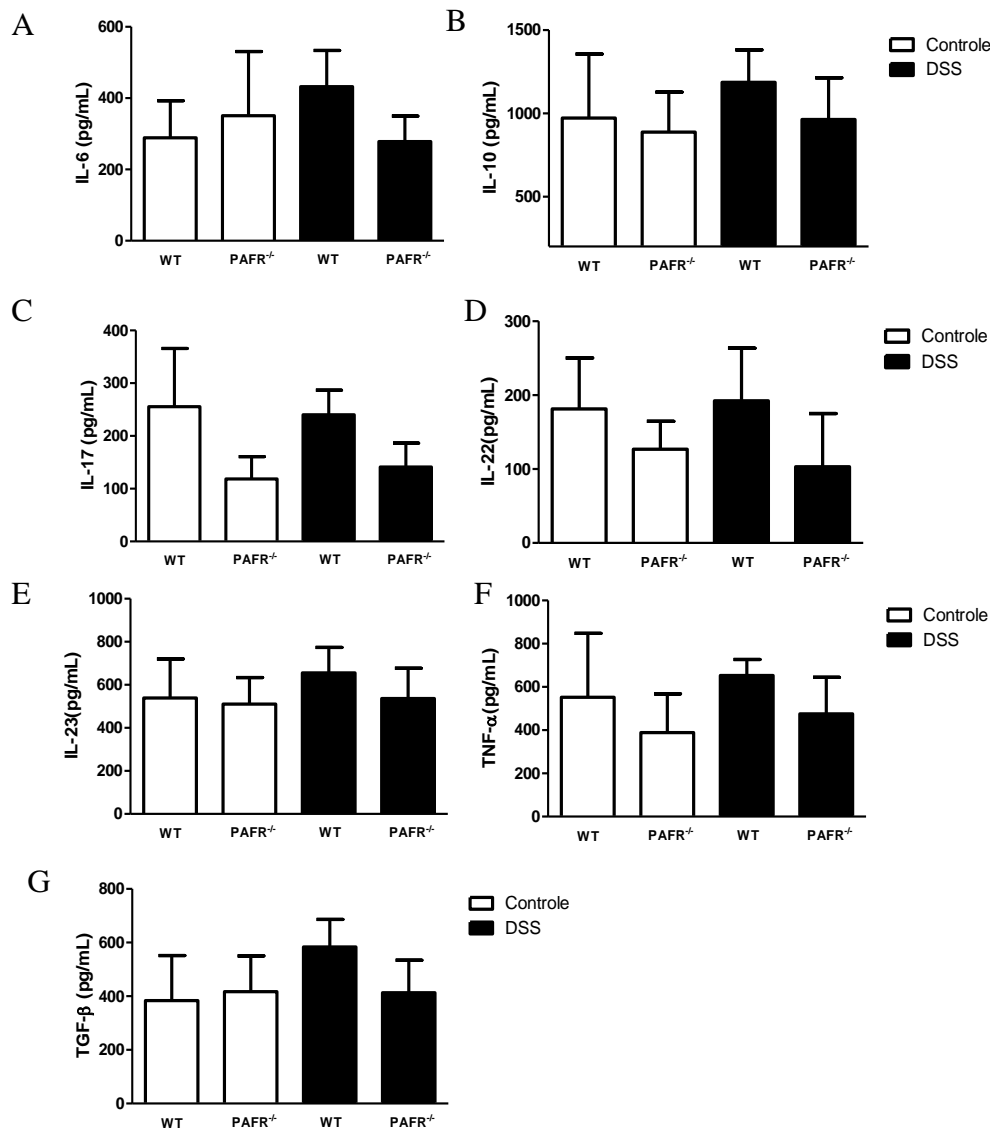


Figura 10: Perfil de produção de mediadores inflamatórios na colite ulcerativa crônica.

A colite ulcerativa crônica foi induzida por DSS em camundongos selvagens ou PAFR^{-/-}, com DSS administrado oralmente misturado à água na concentração de 2%, durante seis ciclos de sete dias intercalados por sete dias de descanso com água pura. No final do sexto ciclo de descanso, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente foi avaliada, por ELISA, as concentrações dos mediadores inflamatórios IL-6 (A), IL-10 (B), IL-17 (C), IL-22 (D), IL-23 (E), TNF-α (F) e TGF-β (G) em 100 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

5.3. AUSÊNCIA DE PAFR ESTÁ ASSOCIADA AO DÉFICIT NA RECUPERAÇÃO DA COLITE

Nosso próximo passo foi entender melhor o atraso da recuperação da colite observado nos períodos de retirada do DSS no protocolo de colite crônica. Assim, buscamos avaliar se os animais PAFR^{-/-} apresentam atraso da recuperação dos sinais clínicos da doença e da resposta inflamatória desses, após indução da colite aguda. Para isso nós induzimos a colite aguda a 2% de DSS por sete dias e avaliamos a recuperação dos animais selvagens ou PAFR^{-/-} após 3, 5 ou 7 dias de retirada do DSS, ou seja, no dia 10, 12 ou 15 após o início do experimento.

Nós observamos que os animais selvagens rapidamente apresentaram redução no escore clínico e, no dia 10 (3º dia após retirada do DSS), apresentaram escore clínico mínimo. Entretanto, os animais PAFR^{-/-} não apresentaram recuperação significativa quando comparados aos animais selvagens até o dia 14 (7º dia após a retirada do DSS). Os animais PAFR^{-/-} apresentaram maior escore clínico durante todo o período de recuperação da doença (no qual receberam apenas água) quando comparados aos animais selvagens (Figura 11 A). Não houve diferença significativa na variação ponderal entre os grupos avaliados (Figura 11 B). Os animais selvagens apresentam recuperação do comprimento do cólon e menor graduação histopatológica já no terceiro dia após a retirada do DSS, enquanto os animais PAFR^{-/-} apresentam-se com o cólon em tamanho reduzido no quinto dia de retirada do DSS e graduação histopatológica aumentada até o terceiro dia após retirada do DSS (Figura 11 C e D). Com relação ao perfil inflamatório, no dia 12 experimental (5º dia após a retirada do DSS), os animais selvagens apresentaram retorno à concentração basal da citocina inflamatória IL1 β (Figura 12 B) e atividade de MPO (Figura 12 A). Já os animais PAFR^{-/-} apresentaram

maior concentração de IL1 β e atividade de MPO aumentada ainda no quinto dia após a retirada do DSS quando comparados aos animais selvagens (FIGURA 12 B e A, respectivamente). Não encontramos diferenças estatísticas nas concentrações da quimiocina CXCL1 no diferentes grupos (Figura 12 C)

Na tentativa de entender melhor o perfil inflamatório e direcionar nossos futuros passos para investigar o processo de recuperação da colite nos animais PAFR^{-/-}, nós realizamos o ensaio de PCR dos mediadores anti-inflamatórios ANXA1, IL-10 e GILZ (Figura 13). Os resultados desses ensaios não nos permitiu observar diferenças estatisticamente significativas entre o grupos controle e os grupos selvagem e PAFR^{-/-}.

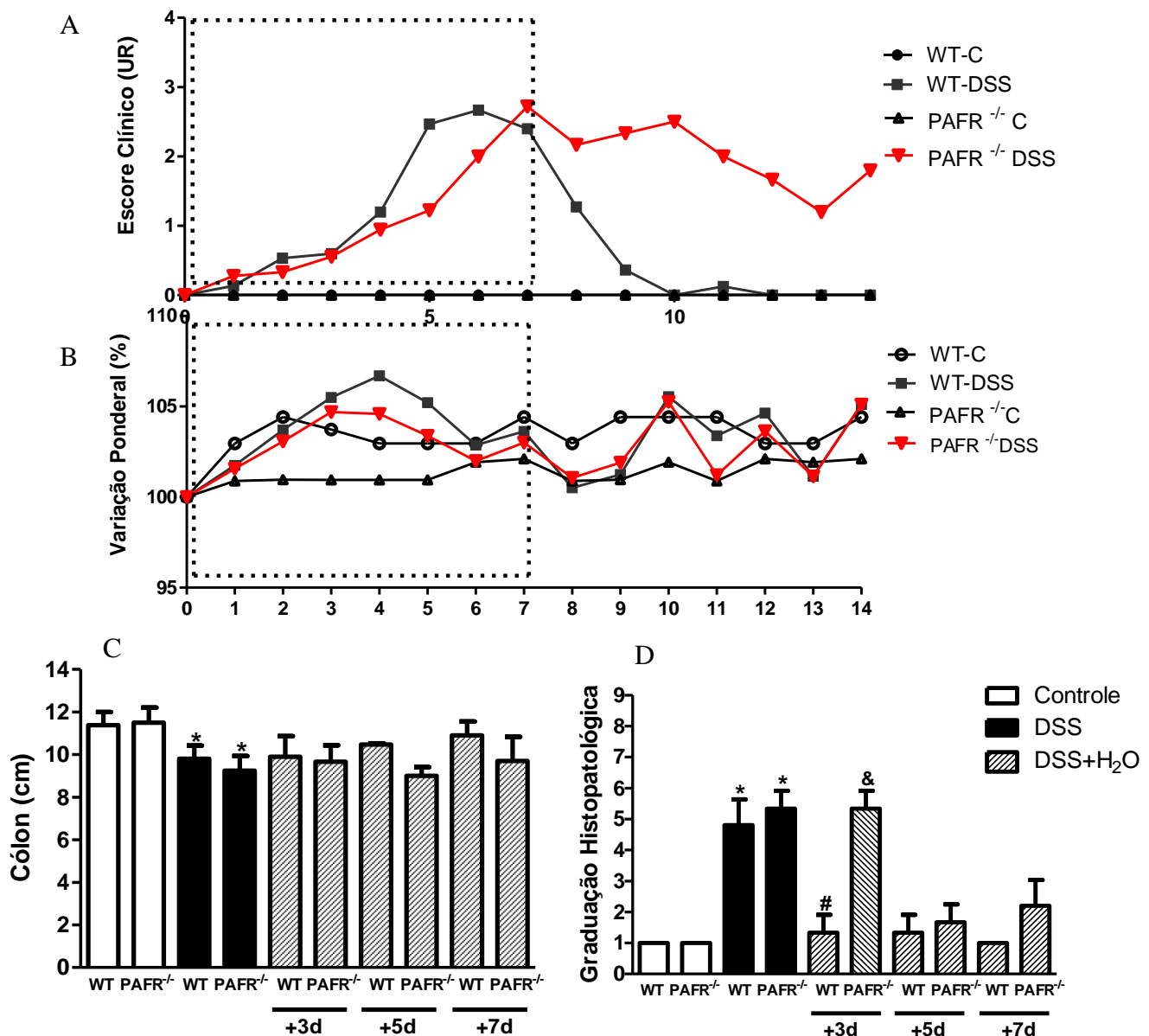


Figura 11: Avaliação do fenótipo de camundongos com deleção genética de PAFR submetidos ao protocolo de recuperação da colite aguda por DSS.

Os camundongos receberam DSS na concentração de 2% diluído em água por sete dias. No sétimo dia o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água por mais sete dias. A fase de recuperação foi avaliada no terceiro, no quinto e no sétimo dia após a retirada do DSS, ou seja, nos dias 10, 12 ou 15 após o início do experimento. Os camundongos foram avaliados diariamente quanto à variação ponderal (A) e sinais clínicos da doença (B). Ao final do terceiro, quinto ou sétimo dia de descanso com água ocorreu a eutanásia e o cólon foi retirado e medido com uma régua (C). Posteriormente foi realizada a fixação do cólon em formol 10%, processamento, inclusão em parafina e coloração por H&E e avaliada a gradação histopatológica segundo o grau de inflamação, lesão tecidual, estrutura criptal e presença de células caliciformes (D). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR, WT-DSS+H₂O = Grupo Selvagem Colite + 3, 5 ou 7 dias de recuperação com água, PAFR^{-/-} DSS+ H₂O= Grupo Colite com deleção genética do PAFR + 3, 5 ou 7 dias de recuperação com água. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C, #P<0,05 vs Grupo WT-DSS ou &P<0,05 vs Grupo WT-DSS+5H₂O.

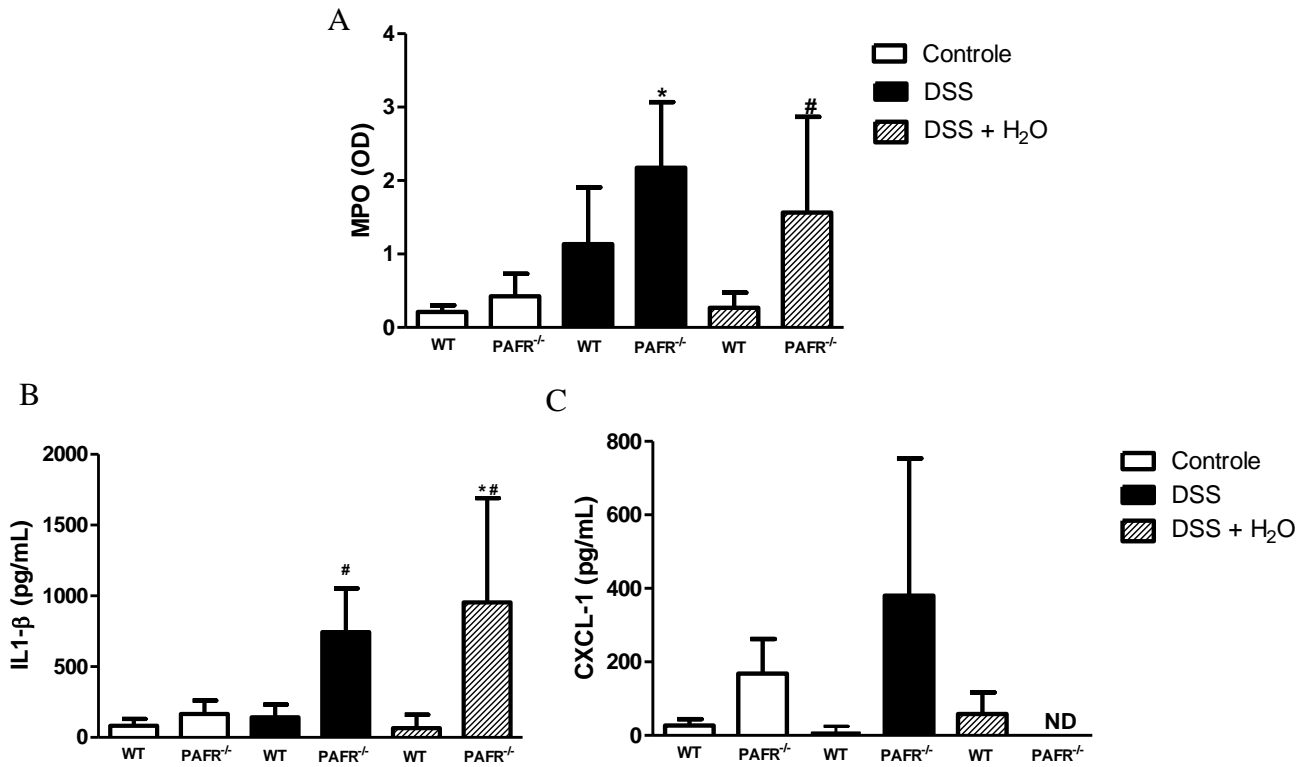


Figura 12: Atividade de MPO e produção de mediadores inflamatórios IL1-β e CXCL1 na recuperação da colite ulcerativa aguda.

Os camundongos receberam DSS na concentração de 2% diluído em água por sete dias. No sétimo dia o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água por mais sete dias. No dia 12, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente realizado o ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (A) e avaliado por ELISA as concentrações dos mediadores inflamatórios IL1β (B) e CXCL1 (C) em 100 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR, WT-DSS+H₂O = Grupo Selvagem Colite +5 dias de recuperação com água, PAFR^{-/-} DSS+ H₂O= Grupo Colite com deleção genética do PAFR+5 dias de recuperação com água. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs Grupo WT-DSS.

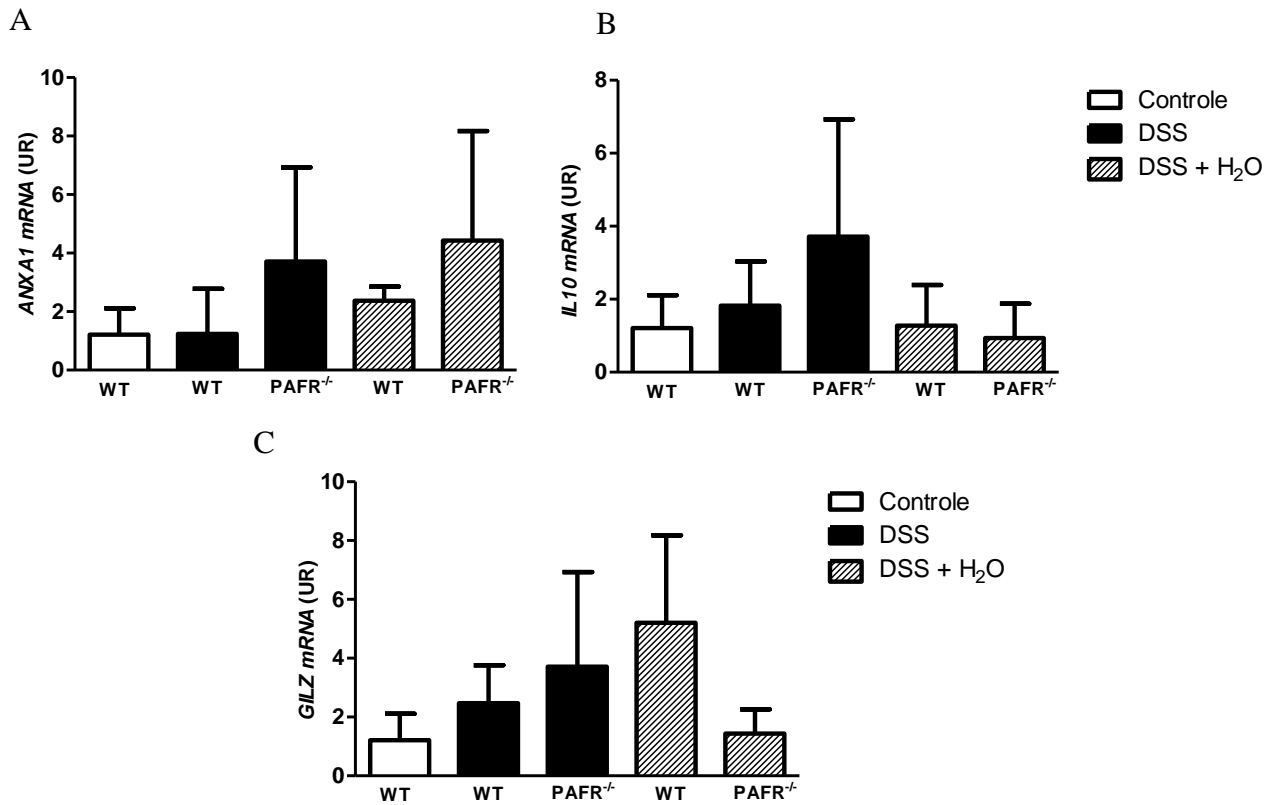


Figura 13: Mediadores inflamatórios ANXA1, IL10 e GILZ na recuperação da colite ulcerativa aguda.

Os camundongos receberam DSS na concentração de 2% diluído em água por sete dias. No sétimo dia o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água por mais sete dias. No dia 12, após eutanásia, o colón foi retirado e posteriormente realizado a análise das quantidades de RNAm de ANXA1 (A) IL10 (B) e GILZ (C) em 50 mg de cólon. WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-} DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR, WT-DSS+H₂O = Grupo Selvagem Colite +5 dias de recuperação com água, PAFR^{-/-} DSS+ H₂O= Grupo Colite com deleção genética do PAFR+5 dias de recuperação com água. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. *P<0,05.

5.4. O ANTAGONISTA DO RECEPTOR (PCA4248) NÃO INTERFERE NA INDUÇÃO E NA RECUPERAÇÃO APÓS DESAFIO COM O DSS.

Para avaliar se o bloqueio da via PAF/PAFR via antagonista do receptor garante a mesma resposta do bloqueio via deleção genética do receptor PAFR, nós utilizamos o PCA4248, um antagonista do receptor PAFR. A administração do antagonista do receptor durante os 7 dias de indução da colite aguda com DSS a 2% não interferiu na indução e gravidade da colite. Os animais que receberam o PCA apresentaram a evolução da colite igualmente aos animais selvagens (Figura 14). Os animais que receberam o antagonista do receptor PAFR apresentaram graduação clínica (Figura A), variação ponderal (Figura 14 B), encurtamento do cólon e histopatológica (Figura 14 C e D, respectivamente) igual aos animais selvagens que receberam a solução veículo. O mesmo foi observado quanto a atividade da enzima MPO que foi igualmente aumentada nos animais veículo (Figura 14 E).

O mesmo padrão foi observado ao executarmos o protocolo de colite aguda seguida de recuperação por 5 dias após retirada do DSS. Os animais que receberam o antagonista do PAFR apresentaram ausência dos sinais clínico da doença já no terceiro dia após a retirada do DSS, igualmente aos animais selvagens que não receberam o antagonista do receptor. Já os animais com deleção genética do PAFR apresentaram sinais clínicos da doença mesmo após 5 dias de retirada do DSS (Figura 15 A). Não observamos diferenças significativas na variação ponderal dos diferentes grupos avaliados (Figura 15 B). O comprimento do cólon dos animais que receberam o PCA apresentou-se igual ao grupo que não recebeu o antagonista do receptor, diferente do grupo com deleção genética do PAFR que apresentou encurtamento do comprimento do cólon mesmo após 5 dias de retirada do DSS (Figura 15 C). Não foram observadas

diferenças na atividade de MPO entre os diferentes grupos (Figura 15 D). Esses dados sugerem que a administração do antagonista de PAFR PCA-4248 não interferiu no curso da colite ulcerativa aguda ou na recuperação da mesma, contrastando com o observado nos animais com deleção genética do PAFR.

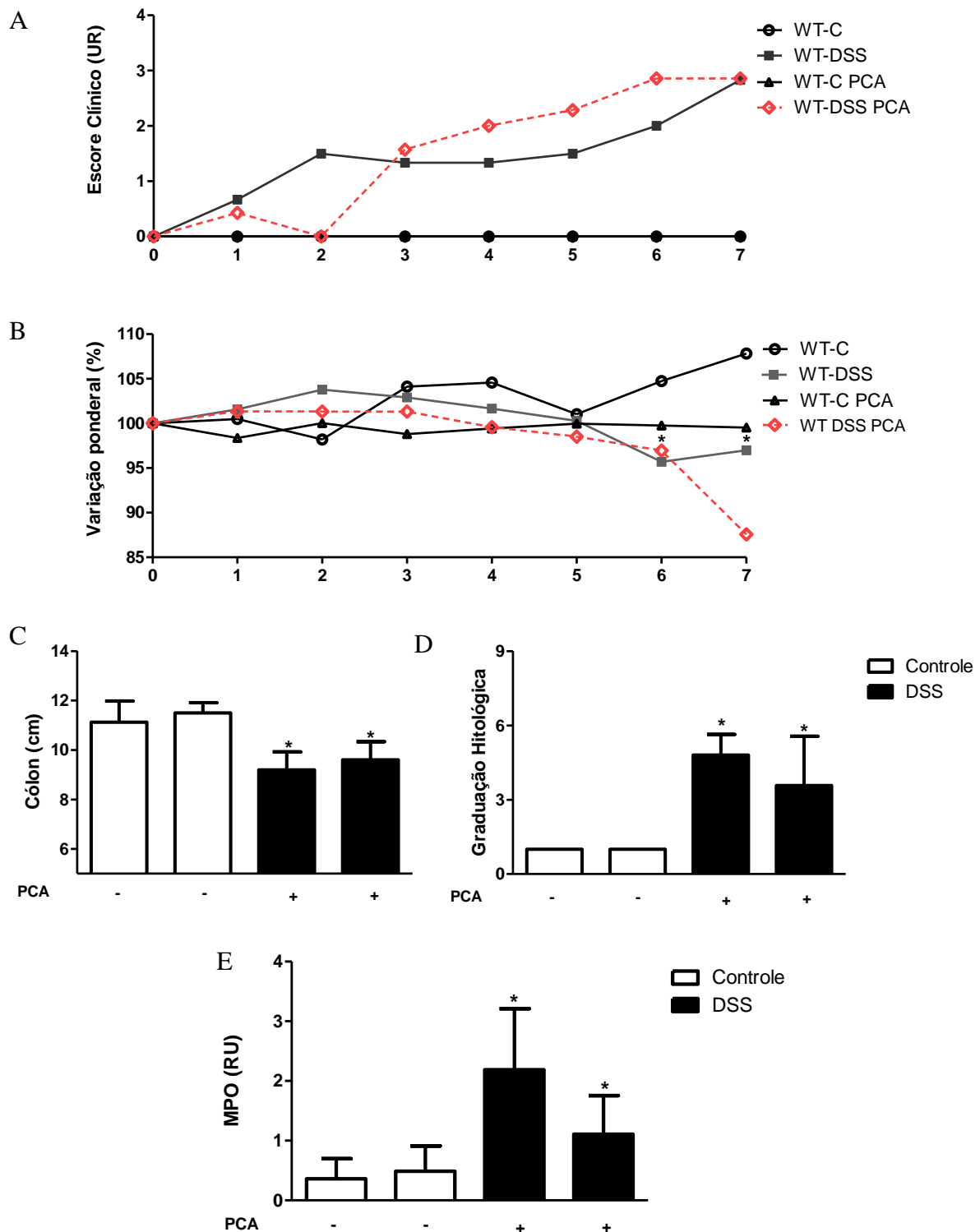


Figura 14: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens submetidos ao protocolo de indução de colite aguda por DSS associado ao tratamento com um antagonista do

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 2% em água para camundongos selvagens durante 7 dias. O PCA 4248 foi administrado na concentração de 5mg/kg diluído em 5% de etanol em PBS e injetado via subcutânea duas vezes ao dia durante os 7 dias do experimento. Foram avaliados diariamente os sinais clínicos da doença (A) e a variação ponderal (B) e, no sétimo dia, após eutanásia, o cólon foi removido para medição do seu comprimento (C); a análise histopatológica (D) e a atividade da enzima mieloperoxidase (E). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 6-8. * $P < 0,05$ vs C ou # $P < 0,05$ vs Grupo WT-DSS.

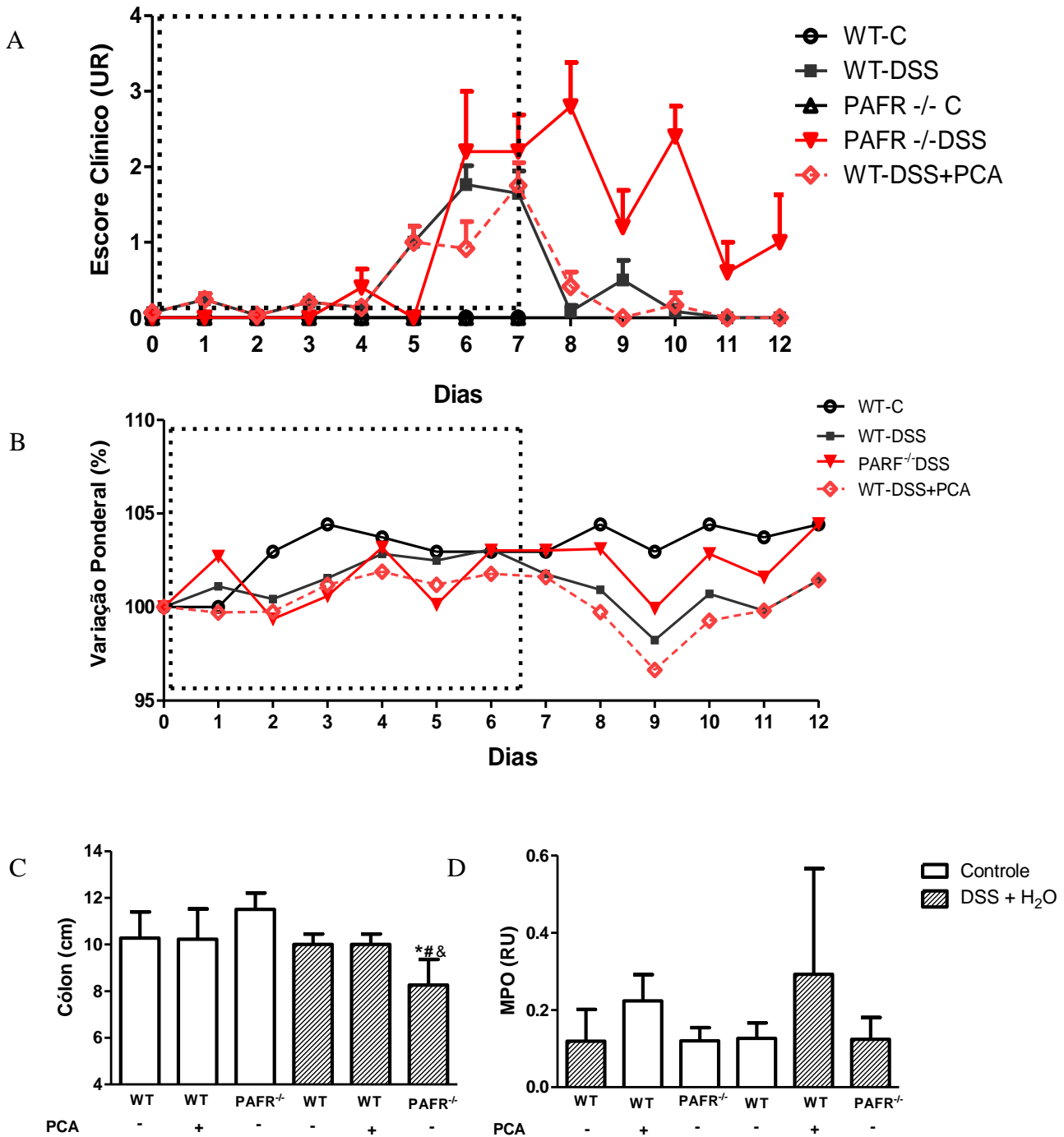


Figura 15: Avaliação do fenótipo de camundongos selvagens submetidos ao protocolo de recuperação da colite aguda induzida por DSS associado ao tratamento com um antagonista do PAFR.

A colite foi induzida por administração de DSS na concentração de 2% em água para camundongos selvagens ou com deleção genética do PAFR durante 7 dias. Um outro grupo de animais foi tratado com PCA 4248 (Tocris Bioscience) dose de 5mg/kg diluído em 5% de etanol em PBS e injetado via subcutânea duas vezes ao dia do dia 6 ao dia 12 (5º dia após a retirada do DSS). Foram avaliados diariamente os sinais clínicos da doença (A) e a variação ponderal (B) e no sétimo dia, após eutanásia, o cólon foi removido para medição do seu comprimento (C) e para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (D). WT-C = Grupo Selvagem Controle, WT-DSS= Grupo Selvagem Colite, PAFR^{-/-} C= Grupo Controle com deleção genética do PAFR, PAFR^{-/-}

DSS= Grupo Colite com deleção genética do PAFR, WT-DSS+H₂O = Grupo Selvagem Colite +5 dias de recuperação com água, PAFR^{-/-} DSS+5 dias de recuperação com H₂O= Grupo Colite com deleção genética do PAFR+5 dias de recuperação com água. As barras representam a média ± erro padrão. n= 6-8. **P*<0,05 vs C, #*P*<0,05 vs Grupo WT-DSS ou & *P*<0,05 vs Grupo WT-DSS+PCA.

6. DISCUSSÃO

A etiologia exata das IBDs é desconhecida, mas sabe-se que fatores genéticos e ambientais, resposta imune alterada e o perfil da microbiota possuem forte influência na ocorrência e desenvolvimento dessas doenças (DALAL et al, 2014). O tratamento das IBDs envolve terapias farmacológicas, como drogas anti-inflamatórias, antibióticos e outros agentes biológicos e até mesmo intervenções cirúrgicas em pacientes com doença crítica (RANDHAWA et al, 2014). Os sintomas característicos das IBDs que são a perda de peso, diarreia crônica, dor abdominal e presença de sangue e muco nas fezes, acarretam redução da qualidade de vida dos pacientes (RANDHAWA et al, 2014). Além disso, existe forte risco de desenvolvimento de outras doenças graves associadas, como o câncer colo-retal (SALEH e TRINCHIERI, 2011). Os vários tratamentos utilizados atualmente mostram-se eficientes em amenizar os sintomas da doença apesar de estarem associados a vários efeitos colaterais, e de não atenderem a todos os casos, uma vez que não são todos os pacientes que respondem positivamente às terapias existentes (RANDHAWA et al, 2014). A partir dessas informações, torna-se evidente a importância de se obter maiores detalhes da patogênese dessas doenças para se aproximar cada vez mais da forma de prevenção e/ou de um tratamento eficiente das IBDs. Dessa forma, o principal objetivo desse trabalho foi entender como a via PAF/PAFR pode interferir na gravidade e resolução da colite induzida pelo DSS e na resposta inflamatória desse modelo.

Sabe-se que o PAF é um mediador fosfolipídico importante na ocorrência e gravidade de várias doenças inflamatórias (SOUZA et al, 2000 e 2003, CAMUESCO et al, 2011; MADEIRA et al, 2013, MENEZES-GARCIA et al, 2013; CASTOR et al, 2012; LIMA et al, 2014). No intestino, a ativação de PAFR está envolvida na inflamação local e sistêmica induzidas por isquemia e reperfusão (I/R) intestinal, interferindo na intensidade da lesão tecidual e na letalidade do modelo (SOUZA et al, 2000 e 2003). Sugere-se também que o

aumento da concentração de PAF em pacientes com doença de Crohn, colite ulcerativa e enterocolite necrotizante neonatal está correlacionado diretamente com a gravidade dessas doenças (MERENDINO et al, 1999; CAPLAN et al, 2005). A ativação de PAFR é associada também a amplificação da resposta inflamatória em modelos de doenças infecciosas, como por exemplo, em resposta à toxina de *Pseudomonas aeruginosa* (LIMA et al, 2014). No estudo de Camuesco e colaboradores, DS (*desalazine sodium*), um composto que consiste na ligação química do antagonista de PAFR UR-12715 ao ácido amino-5-salicílico apresentou atividade anti-inflamatória tanto no modelo de colite induzida por TNBS quanto por DSS por meio da inibição da expressão de IL-17 (CAMUESCO et al, 2011).

A partir dessas informações, nas quais o PAF se apresenta como potente fator pró-inflamatório, nós investigamos como os animais com deleção genética de PAFR responderiam a indução da colite por DSS. Surpreendentemente, nossos resultados demonstraram que os animais com deleção genética do receptor do PAF apresentaram exacerbação da resposta ao desenvolvimento da colite, quando esses foram comparados aos animais selvagens. Em todos os protocolos realizados de diferentes formas, tanto em relação à dose de DSS quanto ao tempo de indução da doença, os animais PAFR^{-/-} se destacaram quanto à exacerbação dos sinais clínicos e inflamatórios da colite induzida por DSS.

No protocolo de colite aguda os animais PAFR^{-/-} apresentaram exacerbação dos sinais clínicos da doença em resposta ao DSS, principalmente grande perda de sangue pelas fezes e pelo ânus o que, possivelmente, foi refletido no índice de hematócrito menor nesses animais comparados aos seus controles e aos animais selvagens desafiados com o DSS. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram grande perda de peso, induzida pela maior gravidade da doença, explicitada na avaliação histopatológica que justificou a grande redução no comprimento do cólon provocada pela maior lesão no tecido destes animais comparados aos selvagens. A atividade da enzima MPO no cólon dos animais com deleção genética do PAFR

indicou a maior presença de neutrófilos nesse órgão, indicando o aumento exacerbado do infiltrado inflamatório e corroborou a maior concentração de mediadores inflamatórios IL-1B, IL-6, TNF α e CXCL1 nesse tecido, sinalizando o processo inflamatório mais grave desses animais comparados aos selvagens. Dessa forma, pode-se sugerir que a ativação do PAFR é importante para controlar a produção de mediadores inflamatórios e o influxo de leucócitos durante a colite, inibindo, assim, a lesão tecidual e as manifestações clínicas da doença.

Provavelmente, a ativação do PAFR pode desempenhar um papel semelhante ao demonstrado por TLRs na colite ulcerativa. Sabe-se que a interrupção de outras vias inflamatórias por meio da deleção genética de receptores da imunidade inata ou moléculas adaptadoras associadas a essas vias, também pode interferir de forma a favorecer o desenvolvimento da colite. Animais com deleção genética de MyD88, TLR2 ou TLR4 possuem maior susceptibilidade a lesões induzidas por DSS quando comparados aos animais selvagens (RAKOFF-NAHOUM et al, 2004; ARAKI et al, 2005; FUKATA et al, 2005). Após lesão epitelial induzida por DSS, camundongos MyD88^{-/-} ou TLR4^{-/-} apresentam menor proliferação celular e aumento de apoptose (ABREU, FUKATA e ARDITI, 2005; BROWN et al, 2007). O mesmo foi observado após utilização de antagonista de TLR4 (FORT et al, 2005; UNGARO et al, 2009). Animais selvagens tratados com antibióticos de amplo espectro (RAKOFF-NAHOUM et al, 2004) ou antagonista do TLR4 (UNGARO et al, 2009) apresentam-se similarmente susceptíveis aos danos induzidos por DSS quando comparados aos animais deficientes de TLRs, sugerindo que tanto a microbiota quanto os TLRs são necessários para a proliferação adequada de células epiteliais. Outro estudo demonstrou que, em adição aos PAMPs, ácido hialurônico, que é produzido após o dano epitelial induzido por DSS, pode se ligar ao TLR4 e promover proteção ao epitélio (ZHENG, RIEHL E STENSON, 2009). O receptor TLR4 é fundamental para a indução da expressão da cicloxigenase 2 (COX2) após lesão induzida por DSS. E a COX2 acarreta a produção de

prostaglandina E₂ (PGE₂) e indução de anfiregulina, um membro da família do fator de crescimento epitelial (EGF) (FUKATA et al, 2006). As células epiteliais normalmente expressam o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) e secretam (especialmente em resposta à lesão) ligantes do EGFR como o TNF- α , EGF, anfiregulina, β -celunina, ligante de heparina (HB)-EGF e epiregulina, que induzem a proliferação e migração de células epiteliais intestinais (GIRAUD, 2000). Os TLRs “detectam” a lesão no intestino e modulam o surgimento dos danos epiteliais por induzir redução na taxa de apoptose, regular vias pró-inflamatórias e promover maior proliferação de células epiteliais (ZENG et al, 2006). Assim, sugere-se que a ativação de PAFR poderia desempenhar um papel importante na regeneração do intestino lesado, da mesma forma que a ativação de TLRs favorece o reparo epitelial durante a colite. No entanto, outros experimentos são necessários para confirmar essa hipótese.

Por se tratar de uma doença crônica e recidivante, Rose e colaboradores procuraram investigar os mecanismos chaves no reparo intestinal da colite ulcerativa experimental. Esses autores observaram aumento da gravidade da doença, precipitação do início e atraso no desaparecimento dos sinais clínicos da colite em animais com deleção genética do receptor TLR9. Esses dados indicam que o receptor TLR9 exerce importante papel na proteção contra a lesão intestinal e reparo tecidual induzido por DSS (ROSE et al, 2012). Nesse sentido, nós investigamos o papel do PAFR no desenvolvimento da colite crônica e observamos o fenótipo dos animais com deleção genética do PAFR na recuperação após a retirada do DSS por vários ciclos de descanso. Nós realizamos o protocolo de colite crônica no qual ocorreram vários ciclos de indução da colite intercalados por períodos de descanso e observamos que os animais PAFR^{-/-} apresentaram um déficit na recuperação do peso, consistência das fezes e sangramento. Esses animais, diferentemente dos animais selvagens, durante o período de descanso no qual não recebiam o DSS, apresentaram um estado de

manutenção da colite, sinalizada pelos sinais clínicos da doença. Esse fenótipo se manteve durante todos os seis ciclos de indução da doença intercalados com períodos de descanso. Esses resultados vão ao encontro do estudo de Rose e colaboradores, citado acima, que após a interrupção genética de outra via inflamatória (de um receptor da imunidade inata), observaram além da maior gravidade da doença o atraso na ausência dos sinais clínicos da colite em animais TLR9^{-/-} (ROSE et al, 2012). Em nosso estudo, a maior gravidade da doença e a não recuperação (ausência de sinais clínicos) dos animais PAFR^{-/-} foi tão acentuada que acarretou em morte no grupo PAFR^{-/-}. A colite crônica foi caracterizada a partir do fato de, mesmo depois de cessar o estímulo com o DSS (final do sexto ciclo de descanso) os animais selvagens apresentarem comprometimento do cólon e manutenção do processo inflamatório, o que foi comprovado pelo encurtamento do cólon, influxo de neutrófilos e altas concentrações de importantes mediadores inflamatórios, como o IL1B e o CXCL1, comparados aos seus controles. Porém, nós observamos que os animais PAFR^{-/-}, mesmo após a retirada do estímulo inflamatório, no final do sexto ciclo de descanso com água, mantiveram o processo inflamatório exacerbado. Os animais com deleção genética do PAFR apresentaram maior gravidade e atraso na recuperação da doença, o que foi observado pelo maior encurtamento do cólon e maior graduação histopatológica, comprovando manutenção de lesão tecidual mais grave nesses animais, comparados aos selvagens. Esses animais também apresentaram concentração aumentada de IL1β e CXCL1 quando comparados aos seus controles, e maior influxo e a permanência de neutrófilos nesse tecido quando comparados aos animais selvagens. Assim, pode-se concluir que, seja no modelo agudo, seja no modelo crônico, a ausência de PAFR acarreta em exacerbação dos sinais clínicos, da lesão tecidual e do processo inflamatório.

Na tentativa de entender melhor como ocorre esse processo de recuperação da colite nos animais desafiados com o DSS. Nós realizamos um protocolo agudo de colite mais amena,

seguida de um período de recuperação. Observamos que no protocolo de recuperação da colite, os animais PAFR^{-/-} apresentaram atraso na redução dos sinais clínicos da doença, mesmo após três, cinco ou sete dias de retirada do DSS, repetindo o atraso da recuperação dos animais PAFR^{-/-} observado no protocolo de colite crônica. Como já observado na literatura, apenas um ciclo de indução da colite por DSS foi o suficiente para se visualizar, após a retirada do DSS, a recuperação dos sinais clínicos da doença, mimetizando os períodos de cronicidade e recidiva apresentados na colite crônica clínica (ROSE et al, 2012). Os animais PAFR^{-/-} apresentaram escore clínico semelhante aos animais selvagens no pico da doença, porém esses animais não retomaram o escore clínico mínimo até o sétimo dia após a retirada do DSS. Enquanto os animais selvagens no terceiro dia após a indução da doença pelo DSS já retomavam as condições iniciais, sinalizadas pela ausência dos sinais clínicos da doença e manutenção do peso corporal. O cólon desses animais permaneceu encurtado no quinto dia de recuperação, apesar da lesão tecidual desses animais terem diminuído em relação ao pico da doença. No quinto dia de recuperação também ressaltamos a alta atividade de MPO indicando a presença marcante dos neutrófilos no tecido e, novamente, a elevada concentração de IL1- β nos animais com a deleção genética do PAFR, mesmo após o quinto dia de retirada do DSS.

É importante ressaltar que o PAF é descrito na literatura como importante mediador inflamatório no recrutamento de neutrófilos para o sítio de lesão tecidual (MONTRUCCHIO, 2000; PRESCOTT et al, 2000; SOUZA, 2003). Souza e colaboradores mostraram a importância do papel do bloqueio da via PAF/PAFR via deleção genética do receptor ou via a utilização do antagonista do receptor na interrupção do influxo de neutrófilos para o intestino em modelo de I/R (SOUZA et al, 2003). Na colite induzida por DSS, o PAFR parece exercer efeito diferente na indução e progressão da doença. No nosso trabalho o bloqueio de PAFR realizado pela deleção genética do receptor apresentou aumento da

atividade de MPO no pico da doença. E de forma interessante, o bloqueio dessa via com o PCA 4248 (antagonista do PAFR) não apresentou efeito na indução, na progressão e na recuperação da colite como observado de forma marcante nos animais PAFR^{-/-}. Os animais PAFR^{-/-} apresentaram, ainda, altas concentrações de IL1 β no pico da doença, que permaneceu mesmo após a retirada do agente indutor do processo inflamatório, demonstrando um déficit na resolução da resposta inflamatória, o que não foi observado nos animais selvagens que rapidamente resolvem a lesão e cessam o processo inflamatório local.

Sugere-se que, como o PAF participa da modulação de vários processos celulares (ISHII e SHIMUZI, 2000; CAPLAN et al, 2005), incluindo a regulação de genes envolvidos na proliferação celular, apoptose e migração celular (FEUERHERM et al, 2013), a ausência desse receptor pode estar relacionada ao comprometimento de renovação celular no cólon e déficit na recuperação desses animais, ocasionando maior gravidade da doença. Além disso, devido à não recuperação desses animais após a retirada do DSS, sugere que nos animais com deleção genética do receptor PAFR haja uma falência na fase de recuperação da inflamação, marcada pela alta concentração de IL1 β e permanência dos neutrófilos no tecido.

A maior concentração do mediador inflamatório IL1 β nesses animais quando comparados aos selvagens, em todos os protocolos experimentais realizados nesse estudo, mesmo após o período de recuperação, pode ser o ponto chave na exacerbação do processo inflamatório observado nos animais PAFR^{-/-}. Estratégias para reduzir a concentração de IL1 β poderiam anemizar o fenótipo da colite nos animais com deleção genética do receptor PAFR? A citocina IL-1 β tem sido demonstrada como importante na iniciação e perturbação da colite, uma vez que há aumento na concentração dessa citocina em pacientes na fase ativa de IBD (ARAI et al, 1998; CAMUESGO et al, 2012) bem como em modelos experimentais dessas doenças (SIEGMUND et al, 2001; MELGAR et al, 2005). Em estudo de Arai e colaboradores, o tratamento com anticorpo neutralizante de IL-1 β suprimiu os sintomas

clínicos em modelo experimental de colite induzida por DSS (ARAI et al, 1998). Outro estudo observou, ainda, que animais com deleção genética da enzima conversora de IL1- β , a caspase-1, apresentaram proteção no ciclo de indução da colite crônica em relação aos sintomas clínicos, alterações histopatológicas, produção de IL1- β e ativação de células T (SIEGMUND et al, 2001). Assim, IL-1 β parece desempenhar papel fundamental na resposta inflamatória característica da colite ulcerativa experimental e a manutenção de elevadas concentrações dessa citocina na ausência de PAFR pode explicar a acentuada resposta inflamatória e lesão tecidual encontrada nos animais PAFR^{-/-} tratados com DSS.

Na elaboração da resposta inflamatória há produção de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias e também uma importante alteração na produção de moléculas anti-inflamatórias, principalmente de moléculas inflamatórias resolutivas, como as lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas e nitrolípidios que suprimem a inflamação, a produção de ROS, e melhoram a cicatrização da ferida e tem propriedades citoprotetoras (SERHAN et al, 2008; DAS, 2016). Essa carência na produção desses mediadores pró-resolutivos resulta em inflamação inapropriada, atraso na cura/ou no processo de reparo e promovem o dano tecidual em IBDs (DAS, 2016). Em nosso trabalho esse atraso no processo de reparo foi estendido nos animais com deleção genética do receptor PAFR, sugerindo assim que, na ausência desse receptor, a fase de resolução da inflamação e renovação do epitélio intestinal pode estar prejudicada. Interessantemente, o mesmo não ocorreu quando a via PAF/PAFR foi bloqueada por meio do antagonista do receptor. Isso indica que a deleção genética do PAFR induz outras alterações além de apenas bloqueio dessa via.

Um fato fundamental que pode explicar essa resposta diferente à indução da doença e o atraso na recuperação dos animais PAFR^{-/-} é lembrar a importância da microbiota intestinal na formação adequada do epitélio e no crescimento e reparo da mucosa intestinal após lesão tecidual (PULL et al, 2005). Atentos aos vários experimentos realizados nesse trabalho, e

ainda não finalizados (DADOS NÃO FINALIZADOS), nós observamos que um grupo de microrganismos presente no intestino dos animais PAFR ^{-/-} parece ser mais resistente ao tratamento com o coquetel de antibióticos, não havendo total depleção da microbiota intestinal mesmo após trinta dias de tratamento com o coquetel de antibióticos, protocolo padrão utilizado em nosso laboratório e eficiente em animais selvagens. E sabendo-se que mediadores inflamatórios podem alterar a composição da microbiota indígena, fortalecemos nosso questionamento quanto ao papel de PAFR no desenvolvimento e recuperação da colite experimental, possivelmente via modulação da microbiota intestinal em resposta ao DSS. Um estudo recente de Alam e colaboradores observou que diferentes subpopulações da microbiota associada a mucosa sadia expandem-se e colonizam sítios de mucosa lesionada em resposta a estímulos do microambiente lesionado (ALAM et al, 2016). Segundo esses autores, ocorre alteração na camada de muco após injúria tecidual, o que permite contato direto da mucosa com bactérias endógenas. Nesse estudo foi demonstrado que ocorre um microambiente que influencia a composição da microbiota intestinal no sítio da lesão e promove o reparo tecidual. O receptor FPR1 (formyl peptide receptor 1) e a enzima NOX2 (neutrophilic NADPH oxidase) tem papel fundamental na depleção do oxigênio, resultando em maior presença de bactérias anaeróbias (ALAM et al, 2016). Além disso, *Akkermansia muciniphila* (uma bactéria anaerobia simbiótica), encontrada em abundância no epitélio após lesão, estimula a proliferação e migração de enterócito adjacentes nas lesões colônicas via FPR1 e NOX1 (ALAM et al, 2016). Ou seja, o microambiente criado pelo processo inflamatório é capaz de modificar a composição local da microbiota no intestino, favorecendo a recuperação da lesão tecidual (ALAM et al, 2016). Nesse sentido nos questionamos se a deleção genética do PAFR é capaz de alterar a resposta inflamatória de modo a modificar a microbiota a favor da manutenção da colite induzida por DSS.

Inicialmente, neste trabalho, nós utilizamos estratégias de modulação da microbiota, via utilização de micro-organismos probióticos, como ferramenta para o controle da gravidade da colite ulcerativa (VER FIGURA 2 - ADENDO). E, de forma interessante, observamos que o probiótico *Bifidumbacterium breve* foi capaz de modular o desenvolvimento da colite, amenizando os sinais clínicos da doença e prevenindo o encurtamento do cólon e a concentração de IL1 β no tecido (VER FIGURA 2 - ADENDO). Esses dados nos desafiam a investigar a fundo o papel da via PAF/PAFR na modulação da produção de IL1 β e, possivelmente, na modulação do perfil da microbiota intestinal em animais desafiados com o DSS.

Os resultados do nosso trabalho demonstram que, surpreendentemente, os animais com deleção genética do receptor PAFR apresentam uma resposta inflamatória exacerbada a indução da colite ulcerativa por DSS, caracterizada principalmente por aumento da atividade de MPO e produção de IL-1 β . E, de forma intrigante, esses animais apresentam um déficit na recuperação da doença após a retirada do estímulo do DSS. Assim, sugere-se que a deleção genética do PAFR interfira de forma a atrasar a fase de resolução da inflamação e consequentemente a renovação do epitélio intestinal.

7. PERSPECTIVAS E PRÓXIMOS PASSOS

A partir desses resultados temos como perspectivas entender como a ausência de PAFR acarreta esse fenótipo, bem como qual o papel da microbiota desses animais nessa resposta. E torna-se essencial para o fechamento do trabalho executar os próximos passos:

- 1- Entender o papel do PAFR na modulação da produção de IL1 β na colite induzida por DSS e verificar a participação dessa citocina no aumento de neutrófilos e da lesão tecidual no cólon;
- 2- Conhecer o perfil da microbiota indígena dos animais PAFR^{-/-} desafiados com o DSS e verificar o efeito da depleção da microbiota intestinal na resposta inflamatória à indução da colite ulcerativa em camundongos selvagens e com a deleção genética para o PAFR com colite induzida por DSS;
- 3- Entender os mecanismos envolvidos na maior gravidade da colite nos animais PAFR^{-/-} por meio de estudo da resolução da resposta inflamatória e renovação celular epitelial do cólon, para se esclarecer o déficit de recuperação da doença apresentado por esses animais.

8. ADENDO – EFEITO DOS PROBIÓTICOS NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS

Tendo em vista que as alterações na microbiota são essenciais para o desenvolvimento da colite ulcerativa (PULL et al, 2005, LUPP et al, 2007; NABEETHA et al, 2011; SALEH e TRINCHIERI, 2011; NABEETHA et al, 2011) e que a resposta inflamatória pode modular a composição da microbiota intestinal (GARRETT et al, 2007; ALAM et al, 2016), temos associações importantes a serem investigadas: o papel da microbiota na patogênese da colite e a participação de PAF nessa doença. Assim, é de extrema importância avaliar como a modificação da microbiota indígena possui influencia na indução e na gravidade da doença, bem como o papel do PAFR na disbiose característica do modelo de colite induzida por DSS. Assim inicialmente, nosso objetivo foi avaliar o efeito da utilização de probióticos para a modulação da microbiota intestinal indígena na prevenção ou atenuação das alterações inflamatórias induzidas por colite ulcerativa.

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde (Food and Agriculture Organization of the United Nation – World Health Organization) como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas como parte da alimentação, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os microrganismos mais comumente utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*. Os probióticos têm sido aplicados como uma forma alternativa na prevenção e no tratamento de várias doenças intestinais, incluindo IBDS (VANDERPOOL, YAN E POLK, 2008)

De maneira promissora, os probióticos têm sido estudados quanto à modulação da resposta inflamatória exacerbada em modelos de doenças intestinais (YAN e POLK, 2010). Vanderpool e colaboradores (2008) propuseram três mecanismos celulares distintos e

complementares para a ação dos probióticos. Primeiro, os probióticos bloqueiam o efeito patogênico de bactérias por meio da produção de substâncias bactericidas e por competir com microrganismos patogênicos e toxinas para aderir no epitélio intestinal. Segundo, os probióticos regulam a resposta imunológica por meio da ativação da resposta imune inata e modulação da inflamação induzida por patógenos, via receptores do tipo Toll (TLRs). Terceiro, os probióticos regulam a homeostase do epitélio intestinal por meio da promoção da sobrevivência das células epiteliais, manutenção da função da barreira epitelial e proteção do epitélio intestinal por meio de várias vias de sinalização (VANDERPOOL, YAN e POLK, 2008). No entanto, sabe-se que a aplicação clínica dos probióticos tem duas limitações: a biodisponibilidade e a biosegurança. Prova disso é a bacteremia associada à terapia com probiótico ocorrida em crianças e pacientes imunocompetentes (APOSTOLOU et al, 2001; LAND et al, 2005). Assim, a identificação de um microrganismo que pode ser utilizado como probiótico envolve não somente o mecanismo de ação, mas também a potencial aplicação clínica.

Metodologia de Tratamento com os probióticos:

Avaliamos o efeito do probiótico *S. boulardii* em camundongos selvagens na indução da colite ulcerativa. Para isso foi realizado um teste dose resposta para a determinação da dose mais eficaz do probiótico *S. boulardii* nesse modelo. Assim, inicialmente dividimos os camundongos em diferentes grupos para testarmos a dose do probiótico: 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC de *S. boulardii*. A dose de 10^8 UFC foi testada também após inativação por calor (autoclavagem). Para a realização do teste dose resposta, os animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle – Animais sem indução de colite e com administração de solução veículo; Grupo Controle SB – Animais sem indução de colite após administração oral de *S. boulardii* na dose de 10^8 UFC. Grupo

DSS – Animais com indução de colite ulcerativa por DSS. Grupo DSS+SB 10^4 – Animais com indução de colite ulcerativa por DSS após cinco dias de administração oral de *Saccharomyces boulardii* na dose de 10^4 UFC; Grupo DSS+SB 10^6 – Animais com indução de colite ulcerativa por DSS após administração oral de *Saccharomyces boulardii* na dose de 10^6 UFC; Grupo DSS+SB 10^8 – Animais com indução de colite ulcerativa por DSS após administração oral de *Saccharomyces boulardii* na dose de 10^8 UFC; Grupo DSS+SB 10^8 inativado por calor – Animais indução de colite ulcerativa por DSS após administração oral de *Saccharomyces boulardii* após autoclavagem na dose de 10^8 UFC. O probiótico foi introduzido diariamente, via oral, cinco dias antes e durante a indução da colite. E a partir da determinação da dose melhor de *S. boulardii*, foram avaliados os parâmetros acima citados em camundongos selvagens. A levedura *S. boulardii* foi gentilmente cedida pela Merck Indústrias Farmacêuticas (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A levedura foi crescida em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C por 24 h sob agitação constante (150 rpm) e concentradas para obter uma quantidade de 10^9 UFC/ml. Os animais dos grupos controle receberam inóculos de água destilada estéril de acordo com o esquema descrito para os respectivos grupos experimentais. A presença da levedura foi verificada periodicamente nas fezes dos animais, por crescimento em meios específicos (MARTINS *et al.*, 2009).

Avaliamos o efeito dos probióticos *Bifidumbacterium breve*, *Bifidumbacterium bifidum* e *Echerichia coli* EMO e um tratamento conjunto de *S. boulardii*, *B breve* e *E.coli* EMO na colite ulcerativa induzida por DSS 3% em água por sete dias. Os probióticos *Bifidumbacterium breve*, *Bifidumbacterium bifidum* e *Echerichia coli* EMO foram introduzidos via oral, diariamente na dose de 10^8 UFC. Esses probióticos foram

cedidos pelo laboratório de Agentes Bioterapêuticos do departamento de Microbiologia da UFMG.

Principais resultados:

A utilização do probiótico *Saccharomyces boulardii* vivo ou inativado por calor não interferiu na indução de colite ulcerativa por DSS

Nossos resultados demonstraram que os animais que receberam o DSS para indução de colite, apresentaram maior escore clínico e maior perda de peso (Figura 1A), esses animais apresentaram também maior encurtamento do comprimento do cólon (Figura 1B) quando comparados ao grupo controle. Os animais que receberam o DSS e foram tratados com o probiótico *S. boulardii*, no inóculo 10^8 vivo ou inativado por calor, não apresentaram diferenças expressivas quanto aos parâmetros avaliados na doença. Esses animais apresentaram escore clínico da doença e variação ponderal (Figura 1A esquerda e 1A direita, respectivamente) não diferente dos animais com indução da colite que não receberam o tratamento com o probiótico vivo ou inativado. E ao avaliarmos o comprimento do cólon, nós verificamos que o encurtamento foi semelhante aos observados no grupo com indução da doença que não recebeu o tratamento com o probiótico vivo ou inativado (Figura 1B).

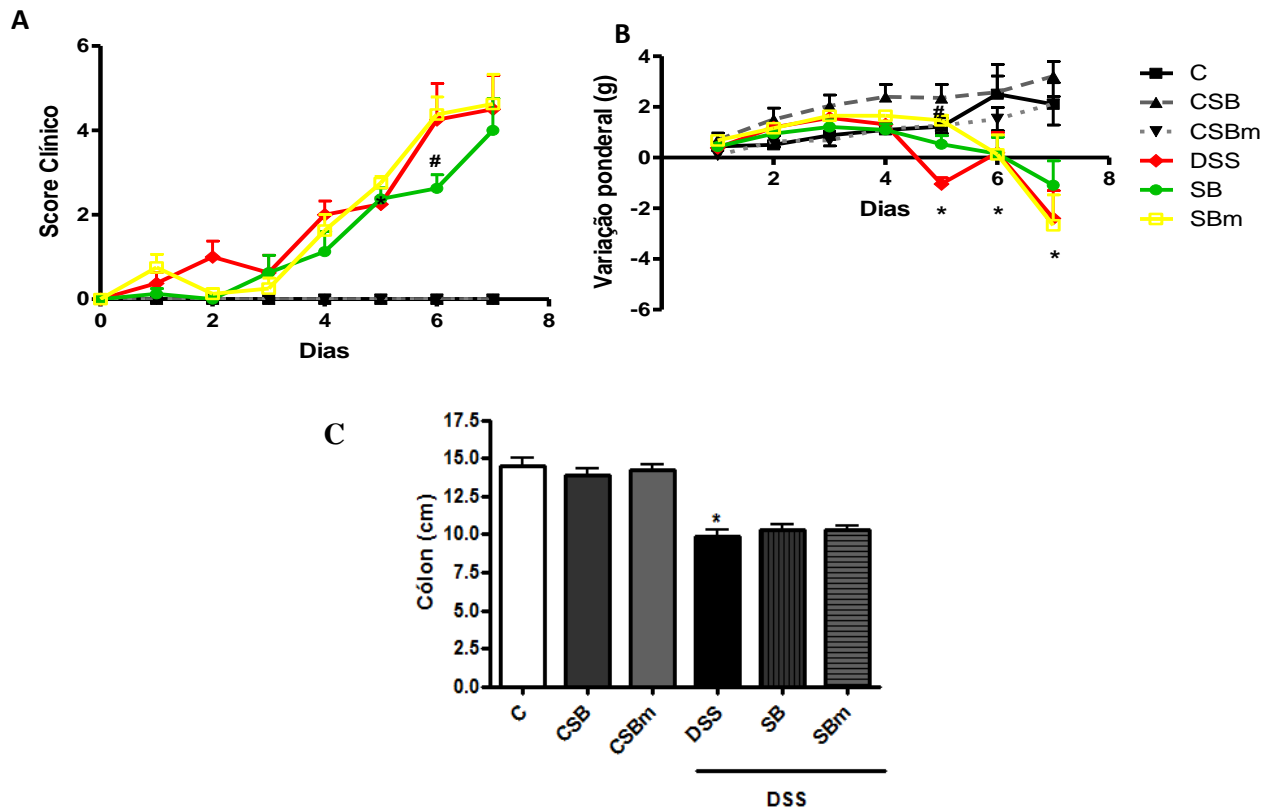


FIGURA 1 - ADENDO. Efeito do probiótico *S. boulardii* vivo ou inativado por calor na indução da colite ulcerativa por DSS. A colite foi induzida por DSS na concentração de 3% em água em camundongos C57/B6 durante 5 dias. Foram avaliados diariamente os sinais clínicos da doença (A) e a variação ponderal (B). No quinto dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e o comprimento do cólon foi averiguado por régua (C). C = Grupo Controle, CSB = Grupo controle + *S. boulardii*, CSBm = Grupo controle + *S. boulardii*, DSS = Grupo Colite (DSS a 3%), SB = Grupo Colite + *S. boulardii*, SBm = Grupo colite + *S. boulardii* inativado por calor. As barras representam a média \pm erro padrão. n = 6-8. * $P < 0,05$ vs C.

A utilização de diferentes probióticos na indução de colite ulcerativa por DSS

Para a avaliação dos efeitos da modulação da microbiota indígena durante doenças inflamatórias intestinais, nós verificamos a efetividade do tratamento com probióticos na indução da colite ulcerativa. Para isso, foram utilizados quatro probióticos diferentes, administrados diariamente antes (pré-tratamento) e durante a indução da doença. Foram testados os probióticos *Saccharomyces boulardii*, *Bifidumbacterium breve*, *Bifidumbacterium bifidum*, *Escherichia coli EMO* e um tratamento conjunto de *S. boulardii*, *B. breve* e *E. coli EMO*. Os probióticos *S. boulardii* e *B. breve* apresentaram proteção moderada contra a indução da doença, observada pela atenuação do escore clínico (Figura 2 A) e perda de peso (Figura 2 B) e prevenção do encurtamento do cólon (Figura 2 C). Porém, o tratamento não alterou outros parâmetros importantes da doença como o influxo de neutrófilos para o cólon indicado pela atividade de MPO (Figura 3A) e as concentrações de TNF- α (Figura 3B) e CXCL-1 (Figura 3D). A concentração de IL1- β foi modulada apenas pelo tratamento com o probiótico *B. breve* (Figura 3C). Os outros probióticos não atenuaram a indução da colite ulcerativa por DSS (dados não apresentados). Dessa forma, concluiu-se que apenas o tratamento com o probiótico *B. breve* interferiu de forma marcante na indução do processo inflamatório na colite. Os outros probióticos utilizados nesse estudo não interferem de forma significativa no curso da colite ulcerativa experimental induzida por DSS.

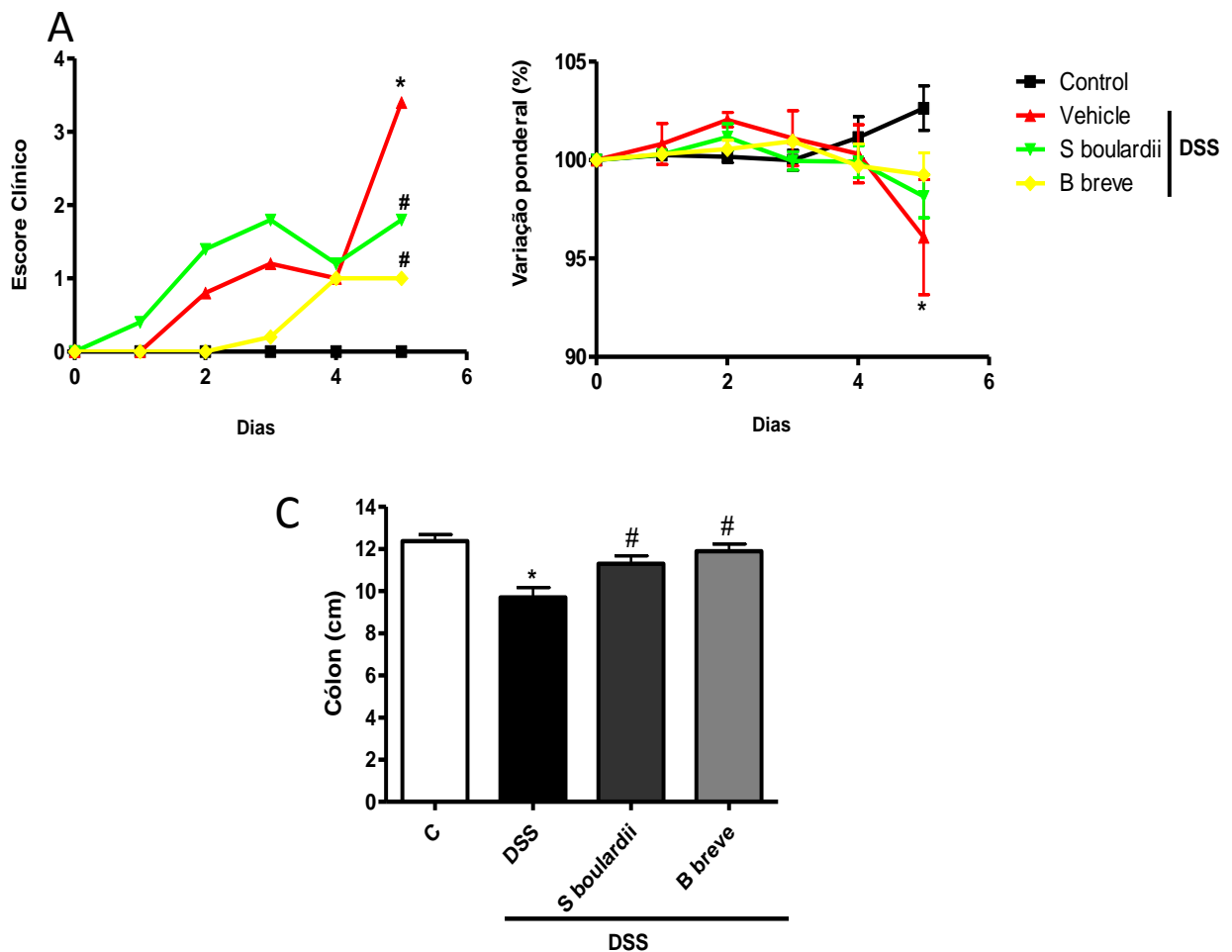


FIGURA 2 - ADENDO. Efeito do probiótico *S. boulardii* e *B. breve* na colite ulcerativa por DSS. A colite foi induzida por DSS na concentração de 3% em água em camundongos C57/B6 durante 5 dias. Foram avaliados diariamente os sinais clínicos da doença (A) e a variação ponderal (B). No quinto dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e o comprimento do cólon foi averiguado por régua (C). C = Grupo Controle, DSS= Grupo Colite (DSS a 3%), *S. boulardii* = Grupo colite + probiótico *S. boulardii*, *B. breve*= Grupo colite + probiótico *B. breve*. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 6-8. * $P < 0,05$ vs Co u # $P < 0,05$ vs Grupo DSS.

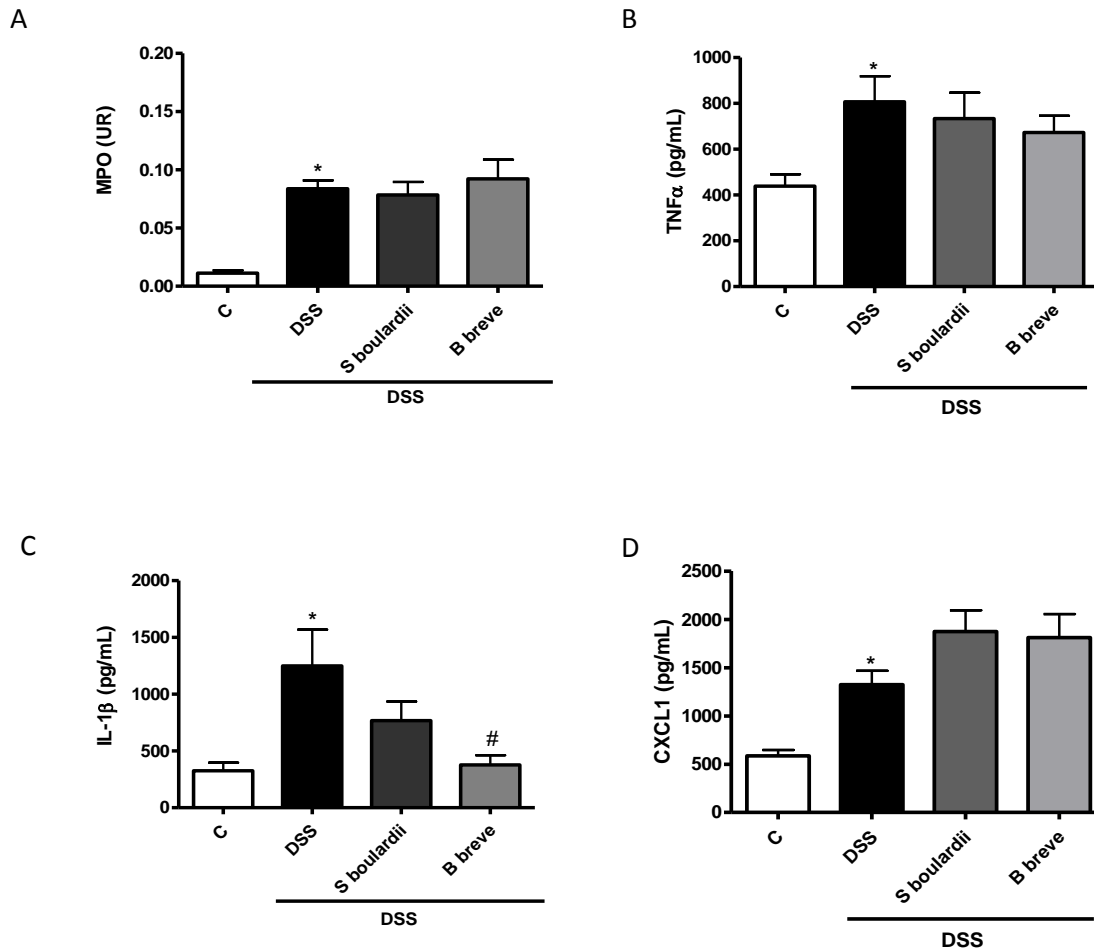


FIGURA 3 - ADENDO. Perfil inflamatório na colite associada ao tratamento com os probióticos *S. boulardii* e *B. breve*. A colite foi induzida por DSS na concentração de 3% em água em camundongos C57/B6 durante 5 dias. No quinto dia, após eutanásia, o cólon foi retirado e posteriormente realizado o ensaio de atividade da enzima mieloperoxidase (A) e avaliado por ELISA as concentrações dos mediadores inflamatórios TNF- α (B), IL1 β (C) e CXCL1 (D) em 100g de cólon. C = Grupo Controle, DSS= Grupo Colite (DSS a 3%), *S. boulardii* = Grupo colite + probiótico *S. boulardii*, *B. breve*= Grupo colite + probiótico *B. breve*. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 6-8. * $P < 0,05$ vs Co u # $P < 0,05$ vs Grupo DSS.

Discussão:

Vários estudos demonstram que a utilização de probióticos em modelos de doenças inflamatórias é eficiente para a modulação da inflamação e o mesmo é visto em humanos (MICKLEFIELD, 2014). A *Saccharomyces boulardii*, por exemplo, é uma levedura comumente usada em muitos países como agente preventivo e terapêutico no tratamento da diarreia e de outras alterações do trato gastrointestinal ocorridas devido ao uso de antibacterianos (CZERUCKA, PICHE e RAMPAL, 2007; MICKLEFIELD, 2014). *S. boulardii* também pode agir como um imunoregulador no lúmen intestinal ou mesmo sistemicamente (MCFARLAND, 2010). Chen e colaboradores observaram que a *S. boulardii* inibe a ativação de ERK1/2 e MAPK, que estimulam a produção de IL-8 e a necrose celular em modelos experimentais de *loop* ileal e *in vitro* (CHEN et al, 2006). *S. boulardii* parece interferir na produção de células T reguladoras no nódulo linfóide mesentérico, modulando, dessa forma também, o processo inflamatório (DALMASSO et al, 2006). *Bifidobacterium breve* e *Streptococcus thermophilus* são capazes de liberar metabólitos que inibem a produção de TNF- α induzida por LPS (MENARD et al, 2004). Kato e colaboradores demonstraram que a utilização de Bifidobacteria de leite fermentado (BFM) contendo *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* associado ao tratamento de colite ulcerativa ativa, resultou em efetividade do tratamento da doença. Isso porque os vinte pacientes tratados por doze semanas com o BFM ou placebo apresentaram melhora significativa no índice de atividade clínica, na endoscopia e no escore histológico do colon (KATO et al, 2004). Sabe-se que os mecanismos envolvidos na modulação da inflamação pela ação dos probióticos são diversos e, é possível que muitos não tenham sido descobertos ainda (OREL e TROP, 2014). E como as IBD possuem particularidades na patogênese e os probióticos também possuem diferentes mecanismos de ação, sugere-se que seja dada maior atenção ao probiótico adequado a cada tipo de inflamação e principalmente a cada fase da

doença intestinal. Dessa forma, encontra-se uma dificuldade grande em se comparar uniformemente os estudos com probióticos, tornando-se complicado obter conclusões definitivas quanto a efetividade de cada tratamento (OREL e TROP, 2014; VEERAPPAN et al, 2011; SCALDAFERRI et al, 2013).

Inicialmente, nós focamos em modular a microbiota indígena por meio da utilização de probióticos, porém a prevenção ou atenuação da doença por meio dos probióticos foi pouco expressiva e não conclusiva, impossibilitando a continuidade de utilização dessa ferramenta até o momento. Lembrando que na prática clínica o tratamento com probióticos é coadjuvante e associado a outros tipos de intervenções para maior efetividade (NG et al, 2009; VEERAPPAN et al, 20011; OREL e TROP, 2014).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM A, et al. The microenvironment of injured murine gut elicits a local pro-restitutive microbiota. *Nature Microbiology*. Vol 1, 2016
- ALIP BORTHAKUR, et al. Platelet-activating factor-induced NF- κ B activation and IL-8 production in intestinal epithelial cells are Bcl10 dependent 2010
- AMARAL F A et al. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1052193e2197, 2008
- APOSTOLOU E, et al. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 31(1):35-39, 2001
- ARAI Y et al. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* 10: 890–896, 1998
- ARTIS, D. Epithelial cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Rev. Immunol*. 8:411-420, 2008
- AYROLDI E et al. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. *FASEBJ* 28(12):5055–70, 2014
- BORMAN RA, JEWELL R e HILLIER K. Investigation of the effects of platelet activating factor (PAF) on ion transport and prostaglandin synthesis in human colonic mucosa in vitro. *Br J Pharmacol*. 1998
- BORTHAKUR A et al. Platelet activating factor-induced NF- κ B activation and IL-8 production in intestinal epithelial cells are Bcl10-dependent. *Inflamm Bowel Dis*, 2010
- CAMUESCO et al, The intestinal antiinflammatory effect of darsalazine sodium is related to a downregulation in IL-17 production in experimental models of rodent colitis. *British Journal of Pharmacology*, 2011

CAPLAN MS et al. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*. 14, 2005

CASELLI M et al . Probiotics: Science or business? *World J Gastroenterol*. 19(10): 1527-1540, 2013

CASTOR M.G et al. . Platelet-activating factor receptor plays a role in the pathogenesis of graft-versus-host disease by regulating leukocyte recruitment, tissue injury, and lethality. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 91, p. 1-11, 2012

CHEN X et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J Biol Chem*. 281:24449-24454, 2006

CHEN GY et al. A functional role for NLRP6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J. Immunol*. 186:7187–7194, 2011

CHENG Q et al. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases- similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. *Front Pharmacol*, 2014

CHO J H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol*. 8, 458–466, 2008

COUTURIER-MALLARD A et al. NOD2-mediated dysbiosis pre-disposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest*. 2013

CZERUCKA D, PICHE T e RAMPAL P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 26:767-778, 2007;

DAS U N. inflammatory bowel disease as a disorder of na imbalance between pro-and antiinflammatory molecules and deficiency of resolution bioactive lipids. *Lipids in Health and Disease*. 11-15, 2016

DALMASSO et al. *Saccharomyces boulardii* Inhibits Inflammatory Bowel Disease by Trapping T Cells in Mesenteric Lymph Nodes. *Gastroenterology*. 131:1812–1825, 2006

ELINA V E et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 145:745–757, 2011

ESMON C T. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 1:1343-1348, 2003;

FAGUNDES, C. T., D. G. SOUZA, et al. Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. *Microbes Infect*, v.13, n.14-15, Dec, p.1121-32. 2011

FASANO A e NATARO J P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Adv. Drug Deli.Rev*. 56:795-807, 2004;

FEUERHERM et al. Platelet-activating factor induces proliferation in differentiated keratinocytes. *Mol Cell Biochem*, 2013

FRANKE A et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet*. 42, 1118–1125, 2010

FUKATA M et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131:862–877, 2006

GARRETT W S et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*. 131:33–45, 2007

GERKE V. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 6, 449–461, 2005

GIBSON G R e RODENFROID M B. Dietary modulation of colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The J. of Nutr*.125:1401-1412, 1995;

GILL SR et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome, *Science* 312, 2006

HIROTA AS et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel Disease*. 2011

- ISHII, S and T. SHIMIZU. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.* 39: 41–82. 2, 2000
- JOHANSSON, M. E. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 15064–15069 (2008).
- KARRASH T et al. Gnotobiotic IL-10^{-/-} ; NF-κB^{EGFP} Mice reveal the critical role of TLR/NF-κB signaling in commensal bacteria-induced colitis. *J. Immunol.* 178:6522-6532, 2007;
- KATO K et al. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 20, 2004
- KAWAI T and AKIRA S. *Cell Death and Differentiation.* 13, 816–825, 2006
- KO HM, JUNG HH, SEO KH, et al. Platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation enhances VEGF expression through a decrease in p53 activity. *FEBS Lett.* 2006
- LAND M H, et al. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics.* 115(1):178-181, 2005
- LIMA CDM, et al. Central role of PAFR signalling in ExoU-induced NF-κB activation. *Cellular Microbiology* .16(8), 2014
- LOFTUS E V Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517, 2004
- LUPP C et al. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host & Microbe* 2, 119–129, 2007
- MADEIRA M F M et al. PAF receptor blockade ameliorates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice. *Infection and Immunity*, 2013

MAGALHAES J G, TATTOLI I e GIRARDIN S T. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.*19(2):106-15, 2007

MAHIDA YR et al. 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 32: 50–54, 1991

MARTINS F S et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. *Arch Microbiol.* 191: 623-630, 2009;

MCFARLAND L. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterology.* 16(18):2202-2222,2010;

MCGOVERN D.P et al. Genetics Consortium.Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 332–337, 2000

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008

MEDZHITOV R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 2010

MELGAR S et al. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2288: G1328–G1338, 2005

MENARD, S et al. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*, 53, 821–828, 2004

MENEZES-GARCIA Z et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. *Obesity*, 2013

MERENDINO N, DWINELL MB, VARKI N, et al. Human intestinal epithelial cells express receptors for platelet-activating factor. *Am J Physiol.* 1999;

- MICKLEFIELD G. *Saccharomyces boulardii* in the treatment and prevention of antibiotic-associated diarrhea, *MMW Fortschr Med*, 2014
- MONTRUCCHIO, G., ALLOATTI, G. & CAMUSSI, G. (2000). Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol.Rev.*, 80, 1669 – 1699, 2000
- MORAND E F et al. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76, 195–202, 1995
- MORGAN M E et al. Toll-like receptor 6 stimulation promotes T-helper 1 and 17 responses in gastrointestinal-associated lymphoid tissue and modulates murine experimental colitis. *Mucosal Immunology.* 7 (5), 2014
- MULLA A et al. Correlation between the antiinflammatory protein annexin 1 (lipocortin 1) and serum cortisol in subjects with normal and dysregulated adrenal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 557–562, 2005
- NABEETHA A, et al. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of DSS colitis, 2011
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev. Immunol.* 6, 173–182, 2006
- NG S C et al. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. *Inflamm Bowel Dis* 2009
- NORMAND S et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial selfrenewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:9601–9606, 2011
- OREL R and TROP T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 7; 20(33): 11505-11524, 2014
- PERRETTI M and FLOWER R J. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J. Leukoc. Biol.* 75, 25–29, 2004

- PERRETTI and FLOWER. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 62–70, 2009
- PERSE AND CERAR. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012
- PRESCOTT S M et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69:419–45, 2000
- PODOLSKY D K. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417–429, 2002.
- POTHOULAKIS C. Review article: Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther.* 30(8):826-833, 2009
- POWELL N et al. The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by Interleukin-7 Receptor+ Innate Lymphoid Cells. *Immunity.* 37:674–684, 2012
- PRESCOTT S et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 419–445, 2000
- PULL, S L. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 99–104, 2005
- QUINTANILHA A G et al. A novel sample method for the investigation of gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 13(29):3990-3995, 2007
- RAKOFF-NAHOUM S et al. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229–241, 2004
- RANDHAWA P K et al. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean J Physiol Pharmacol.* Vol 18: 279 - 288, 2014
- ROSE et al. Multifunctional role of dextran sulfate sodium for in vivo modeling of intestinal diseases. *BMC Immunology*, 2012

SALEH M e ELSON C O. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota diagog. *Cell Immunity Review*. 34:293-302, 2011;

SALEH M e TRINCHIERI G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal câncer. *Nature Reviews Immunology*. 11:9-20, 2011

SERHAN CN. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and proresolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 8:349–61, 2008 SCALDAFERRI F et al. Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility. *BioMed Research International*, 2013 SIEGMUND B et al. IL-1 β -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13249–13254, 2001

SIMONA R et al . GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Frontiers in Endocrinology*, vol 6, 2015

SHINDOU H et al. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem* 282: 6532–6539, 2007

SOUZA MH et al. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil. *Arquivos de gastroenterologia* 39(2): 98-105, 2002

SOUZA D G et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol*.131, 1800 –1808, 2000

SOUZA D G et al. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *British Journal of Pharmacology*, 2003

SOUZA D G et al. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J. Immunol*. 170: 4759–4766, 2003

SOUZA D G et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J immunology*. 173(6):4137-46, 2004

- SOUZA D G et al. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunology*. 179(12):8533-43, 2007
- SOUZA D G et al. The Long Pentraxin PTX3 Is Crucial for Tissue Inflammation after Intestinal Ischemia and Reperfusion in Mice. *Am J Pathol*. v. 174(4) p.1309-18, 2009
- SHANAHAN F and BERNSTEIN CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 25(4):301-5, 2009
- STROBER W, FUSS I e MANNON P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J C Investigation*. 117(3):514-521, 2007
- STROBER W. The Impact of the Gut Microbiome on Mucosal Inflammation. *Trends Immunol*. 34(9): 423–430, 2013
- TANNOCK G W. What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Seminars in Immunology*. 19: 94–105, 2007
- TARGAN S. Current limitations of IBD treatment:where do we go from here? *Ann N Y Acad Sci*. 1072:1-8, 2006
- VANDERPOOL C, YAN F e POLK D B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic application in inflammatory bowel diseases. *Inflam Bowel Disease*. 14(11):1585-1596, 2008
- VEERAPPAN G R et al. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease,” *CurrentGastroenterology Reports*, vol. 14, no. 4, pp. 324–333, 2012
- VIEIRA A T et al. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am J Pathology*. 175(6):2382-2391, 2009
- VICTORIA CR, SASSAK LY, NUNES HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arquivos de gastroenterologia* 46(1): 20-25, 2009

WIRTZ *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*.2:541 – 546, 2007

XAVIER R J e PODOLSKY D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Review*. 448:427-434, 2007

YAN F e POLK D B. Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol*. 26:95-101, 2010

YOSHIDA H, RUSSELL J e GRANGER DN. Thrombin mediates the extraintestinal thrombosis associated with experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295:G904–G908, 2008

YOSHIDA H et al. Role of the protein C pathway in the extraintestinal thrombosis associated with murine colitis. *Gastroenterology*.135:882– 888, 2008

YOSHIDA H e GRANGER D N. Inflammatory bowel disease: A paradigm for the link between coagulation and inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 15:1245-1255, 2009

YOSHIDA H, YILMAZ C E e GRANGER D N. Role of tumor necrosis factor- α in the extraintestinal thrombosis associated with colonic inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2010

YOSHIDA H et al. Interleukin-1 β mediates the extra-intestinal thrombosis associated with experimental colitis. *Am. J of Pathology*. 177(6):2774-2781, 2010