

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Allisson Freire Bento**

**MEDIADORES QUÍMICOS E RESPOSTA CELULAR NA  
COLITE INDUZIDA PELO DSS: PAPEL DOS MEDIADORES  
LIPÍDICOS DERIVADOS DO OMEGA-3 NA RESOLUÇÃO DA  
COLITE EXPERIMENTAL**

Florianópolis  
2012



Allisson Freire Bento

**MEDIADORES QUÍMICOS E RESPOSTA CELULAR NA  
COLITE INDUZIDA PELO DSS: PAPEL DOS MEDIADORES  
LIPÍDICOS DERIVADOS DO OMEGA-3 NA RESOLUÇÃO DA  
COLITE EXPERIMENTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Daniela Ferraz Pereira Leite

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B478m Bento, Allisson Freire

Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo DSS [tese] : papel dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 na resolução da colite experimental / Allisson Freire Bento ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2012.

136 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Intestinos - Doenças - Inflamação. 3. Colite. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Dedico esta tese aos meus  
pais Clóvis e Irany.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre presente, ajudando a superar os momentos mais difíceis e por proporcionar tantas alegrias em minha vida.

Ao Professor Dr. João Batista Calixto, pela inestimável orientação que possibilitou meu crescimento como profissional e como pessoa e, sobretudo pelo apoio, paciência, rigidez, incentivos constantes e pelo exemplo de competência, dedicação, determinação e perseverança.

Aos meus pais, Clóvis e Irany, pelo amor incondicional, apoio, educação e incentivo, sempre me ajudando a superar obstáculos e alcançar meus sonhos. Sem vocês nada seria.

Aos meus irmãos, Cleverson e Juliana, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, me ensinando valores que nem podem imaginar.

A minha noiva Natália, por ser minha base, meu conforto, meus sonhos, meu amor, minha vida. Obrigado pela compreensão e apoio incondicional nessa minha jornada. Te amo.

A querida Professora Dra. Mariangela S. Azevedo, por ter acreditado em mim e por ser um exemplo como profissional e como ser humano.

A amiga e companheira de trabalho Daniela Leite, pela amizade e ajuda crucial na realização deste trabalho. Obrigado por tudo.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina por terem contribuído em minha formação e servirem como modelo de competência e dedicação.

Aos grandes amigos e irmãos R3 (Rodrigo Marcon, Rafaela Claudino e Rafael Dutra), pela amizade, apoio e ajuda incondicional nos momentos bons e ruins durante todo esse período. Vocês fazem parte da minha família, jamais os esquecerei.

As grandes amigas Maíra Cola, Flávia Meotti e Juliana Gonçalves, por terem me ajudado de forma inesquecível durante todos os passos dessa caminhada. Vocês sempre estarão em meu coração.

Aos amigos de laboratório, Edinéia, Marianne, Fabiana, Gecioni, Robson, Aline, Carol, Jarbas, Lizi, Maíra Bicca, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Katryn, Ana Flávia, Israel, Kéllen e Raquel, pela convivência, amizade e conhecimentos passados.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia Diana, Pedro, Rita pela atenção e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

E por fim, a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e a todos àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



*“Tente mover o mundo - o primeiro  
passo será mover a si mesmo”.*

***Platão***



## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) representam um grupo de disfunções do trato gastrointestinal, que acometem milhões de pessoas em todo o mundo e, até o momento, possuem poucos tratamentos eficazes. Neste sentido, os modelos de colite experimental têm contribuído de forma crucial para o estudo dos eventos patofisiológicos que ocorrem nas IBD e, também, na busca por alternativas terapêuticas que venham a prevenir e/ou tratar essas doenças. Recentemente, a necessidade da suplementação humana com os ácidos graxos poliinsaturados, do tipo ômega-3, tem ganhado grande atenção, devido ao fato desse lipídio ser precursor de vários mediadores químicos envolvidos em diversas funções celulares e na promoção da resolução da inflamação. Dessa forma, o presente estudo buscou mapear a cinética de produção de alguns mediadores inflamatórios e células envolvidas no modelo de colite aguda e crônica induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS), bem como, avaliar o papel antiinflamatório dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA, em diferentes modelos de inflamação intestinal. Nossos resultados demonstraram que a população de neutrófilos foi predominante nos estágios iniciais da colite induzida pelo DSS, sendo que esse aumento do infiltrado celular foi acompanhado da produção e da expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$ , IL-12 e CXCL1/KC. Ademais, observamos que durante as fases de recuperação da inflamação ocorreu aumento na expressão de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ . Por outro lado a fase crônica foi caracterizada pela massiva liberação de mediadores pró-inflamatórios; porém, com a co-produção de citocinas antiinflamatórias, além da significativa participação de macrófagos e linfócitos T, caracterizando assim intensa atividade inflamatória na mucosa intestinal e cronificação da colite experimental. Além disso, verificamos que o tratamento preventivo sistêmico com a AT-RvD1, RvD2 ou com o 17R-HDHA reduziu de forma marcante a severidade da doença, o dano tecidual colônico e a infiltração de neutrófilos nos modelos de colite induzida pelo DSS ou pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em camundongos. Adicionalmente, constatamos que o efeito benéfico desses mediadores lipídicos foi devido à redução na produção e na expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, e pela atividade reduzida do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Por fim, demonstramos, através de experimentos *in vitro* que o efeito da AT-RvD1, mas não da RvD2 ou do 17R-HDHA, sobre a redução na

secreção de mediadores pró-inflamatórios, foi dependente da ativação do receptor ALX/FPR2. Estes resultados corroboraram aqueles da colite induzida pelo DSS, que demonstraram que o bloqueio farmacológico do receptor ALX/FPR2 reverteu significativamente o efeito benéfico da AT-RvD1 sobre a severidade da colite experimental. Em conclusão, nossos resultados ampliaram os conhecimentos acerca do modelo de colite induzida pelo DSS, além de sugerir importantes implicações terapêuticas. Além disso, demonstramos que a AT-RvD1, RvD2 ou o 17R-HDHA podem ser promissores candidatos na prevenção ou tratamento das IBD.

**Palavras-chave:** doenças inflamatórias intestinais; ômega-3; resolvinas; colite.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) represents a group of gastrointestinal disorders, affecting millions of people around the world, and, until now, have few effective treatments. Therefore, experimental models of colitis have contributed crucially to the study of pathophysiological events that occur in IBD, and also in the investigations for effective therapies that may prevent and/or treat these diseases. Recently, the human supplementation with polyunsaturated fatty acids, such as omega-3, has emerged and received much attention, because this lipid is a precursor of some chemical mediators involved in various cellular functions and in promoting the resolution of inflammation. Thus, this study aimed to investigate the kinetics of the production of some inflammatory mediators and cells involved in the model of acute and chronic colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS), and to assess the role of anti-inflammatory lipid mediators derived from omega-3, AT-RvD1, RvD2 and 17R-HDHA, in different models of intestinal inflammation. Our results showed that neutrophil infiltration was predominant in the early stages of DSS-induced colitis, and this increase was accompanied by the production and expression of pro-inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$ , IL-12 and CXCL1/KC. Furthermore, we observed that during the recovery phase, the expression of inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  was increased in the colonic tissue. On the other hand, the chronic phase was characterized by the massive release of pro-inflammatory mediators; however, with the co-production of anti-inflammatory cytokines and significant participation of macrophages and T lymphocytes, featuring intense inflammatory activity in the intestinal mucosa and chronicity of experimental colitis. In addition, we found that preventive systemic treatment with AT-RvD1, RvD2 or 17R-HDHA markedly prevented the disease activity, the colonic tissue damage and neutrophil infiltration in DSS or 2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) in mice. Additionally, we showed that the beneficial effect of these lipid mediators was due to reduced production and expression of pro-inflammatory cytokines/chemokines, adhesion molecules, and the reduced activity of nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Finally, we demonstrated that the AT-RvD1, but not RvD2 or 17R-HDHA, reduced the secretion of pro-inflammatory mediators, in LPS-induced macrophages, in an ALX/FPR2 dependent manner. Moreover, the pharmacological blockade of ALX/FPR2 receptor significantly reversed the beneficial effects of AT-RvD1 in DSS-induced colitis. In conclusion, our results largely

extended the knowledge about the model of DSS-induced colitis, and suggest important therapeutic implications. Finally, we demonstrated that AT-RvD1, RvD2 or 17R-HDHA can be promising candidates for the prevention and/or treatment of IBD.

**Keywords:** inflammatory bowel diseases; omega-3; resolvins; colitis.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Vias de interação entre microbiota e células do sistema imune nas IBD.....	5
<b>Figura 2.</b> Linha do tempo da inflamação aguda e seu processo de resolução.....	13
<b>Figura 3.</b> Novas famílias de mediadores lipídicos e suas ações na inflamação.....	14
<b>Figura 4.</b> Modelo de colite aguda e crônica induzida pelo DSS.....	23
<b>Figura 5.</b> Tratamento preventivo com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 durante a colite induzida pelo DSS.....	26
<b>Figura 6.</b> Protocolo experimental da colite induzida pelo TNBS.....	27
<b>Figura 7.</b> Peso corporal, índice de atividade da doença e sobrevivência na colite induzida pelo DSS.....	40
<b>Figura 8.</b> Dano colônico e atividade da MPO na colite induzida pelo DSS.....	42
<b>Figura 9.</b> Peso corporal e índice de atividade da doença nas fases aguda e crônica da doença na colite induzida pelo DSS.....	43
<b>Figura 10.</b> Atividade das enzimas MPO, EPO e NAG nas fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS.....	45
<b>Figura 11.</b> População de linfócitos T CD4+ e CD8+ no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	47
<b>Figura 12.</b> População de linfócitos T CD4+CD25+ no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	48
<b>Figura 13.</b> População de linfócitos T CD8+CD25+ no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	49
<b>Figura 14.</b> Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	50
<b>Figura 15.</b> Dosagem de IL-12 e CXCL1/KC em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	51

<b>Figura 16.</b>	Dosagem de IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	52
<b>Figura 17.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	53
<b>Figura 18.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para CXCL1/KC e IL-17 em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	54
<b>Figura 19.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para IL-10 e TGF- $\beta$ em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	55
<b>Figura 20.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para as mol $\acute{e}$ culas de ades $\tilde{a}$ o VCAM-1 e ICAM-1 em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	56
<b>Figura 21.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para a enzima COX-2 e para o receptor ALX/FPR2 em $\alpha$ lons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	57
<b>Figura 22.</b>	Express $\tilde{a}$ o do RNAm para o fator de transcri $\tilde{c}$ o FoxP3 e o marcador celular CD25 durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	58
<b>Figura 23.</b>	Express $\tilde{a}$ o do $\kappa$ B - $\alpha$ e NF $\kappa$ B fosforilados durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	59
<b>Figura 24.</b>	Efeito da AT-RvD1 sobre os par $\acute{a}$ metros macrosc $\acute{o}$ picos da colite experimental induzida pelo DSS.....	60
<b>Figura 25.</b>	Efeito da RvD2 sobre os par $\acute{a}$ metros macrosc $\acute{o}$ picos da colite experimental induzida pelo DSS.....	61
<b>Figura 26.</b>	Efeito do precursor para resolvinas da s $\acute{e}$ rie D 17R-HDHA sobre os par $\acute{a}$ metros macrosc $\acute{o}$ picos da colite experimental induzida pelo DSS.....	62
<b>Figura 27.</b>	Efeito dos tratamentos com os mediadores lip $\acute{d}$ icos derivados do $\omega$ -3 sobre a apar $\acute{e}$ ncia e tamanho do $\alpha$ lon na colite experimental induzida pelo DSS.....	63
<b>Figura 28.</b>	Efeito dos mediadores lip $\acute{d}$ icos AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a atividade da enzima MPO na colite induzida pelo DSS.....	65



<b>Figura 29.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre o dano tecidual microscópico na colite induzida pelo DSS.....	66
<b>Figura 30.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ na colite induzida pelo DSS.....	67
<b>Figura 31.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de CXCL1/KC e MIP-2 na colite induzida pelo DSS.....	68
<b>Figura 32.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de IL-17 e IL-10 na colite induzida pelo DSS.....	69
<b>Figura 33.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do RNAm para moléculas de adesão na colite induzida pelo DSS.....	70
<b>Figura 34.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do NF $\kappa$ B na colite induzida pelo DSS.....	72
<b>Figura 35.</b>	Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão das enzimas COX-2 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.....	74
<b>Figura 36.</b>	Efeito da AT-RvD1 sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.....	76
<b>Figura 37.</b>	Efeito da AT-RvD1 sobre a secreção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em cultura primária de macrófagos.....	76
<b>Figura 38.</b>	Efeito da RvD2 sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.....	77
<b>Figura 39.</b>	Efeito da RvD2 sobre a secreção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em cultura primária de macrófagos.....	78
<b>Figura 40.</b>	Efeito do 17R-HDHA sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.....	79
<b>Figura 41.</b>	Efeito do 17R-HDHA sobre a secreção de IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em cultura primária de macrófagos.....	80
<b>Figura 42.</b>	Efeito do bloqueio do receptor ALX/FPR2 sobre o peso corporal e atividade da doença na ação antiinflamatória da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS.....	81

<b>Figura 43.</b>	Efeito do bloqueio do receptor ALX/FPR2 sobre o dano macroscópico e encurtamento do cólon na ação antiinflamatória da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS.....	82
<b>Figura 44.</b>	Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a taxa de sobrevivência e peso corporal na colite induzida pelo TNBS.....	83
<b>Figura 45.</b>	Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre o dano macroscópico e atividade da MPO na colite induzida pelo TNBS.....	84
<b>Figura 46.</b>	Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a análise histológica e dano microscópico na colite induzida pelo TNBS.....	85
<b>Figura 47.</b>	Eventos inflamatórios durante a colite experimental induzida pelo DSS.....	103
<b>Figura 48.</b>	Diagrama esquemático ilustrando a formação e os efeitos benéficos dos mediadores lipídicos derivados do DHA.....	116

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Grade de escores para avaliação do dano macroscópico total na colite induzida por DSS.....	24
<b>Tabela 2.</b> Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS.....	28
<b>Tabela 3.</b> Grade de escores para avaliação de dano microscópico na colite induzida por TNBS.....	29



## LISTA DE ABREVIACÕES

- 17R-HDHA** - 17R-hidrÓxi-docosaenaénico  
**ALX** - Receptor de lipoxina  
**ASA** - Ácido 5-aminosalicílico  
**AT** - Produzido pela aspirina (do inglês, aspirin-triggered)  
**AT-RvD1** - Resolvina D1 formada pela via da aspirina  
**CARD15** - Domínio de recrutamento de caspase 15  
**CD** - Doença de Crohn  
**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais  
**COX** - Ciclooxygenase  
**CXCR** - Receptor para quimiocinas CXC  
**DAB** - 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico  
**DMEM** - Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco  
**DNac** - Ácido desoxirribonucléico complementar  
**dNTPs** - Deoxinucleotídeos  
**DSS** - Sulfato sódico de dextrana  
**DTT** - Ditioneitol  
**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético  
**ELISA** - Ensaio imunoenzimático  
**EPO** - Eosinófiloperoxidase  
**H&E** - Hematoxilina e eosina  
**HEPE** - Hidroxieicosapentaenóico  
**HTAB** - Hexadeciltrimetilamônio  
**i. col.** - Intracolônico  
**i.v.** - Intravenoso  
**IAD** - Índice de atividade da doença  
**IBD** - Doenças inflamatórias intestinais  
**ICAM** - Molécula intercelular de adesão 1  
**IFN** - Interferon  
**IL** - Interleucina  
**IκB** - Proteína inibitória do NFκB  
**KC** - Quimiocina derivada de queratinócitos  
**KO** - Knockout  
**LAFEX** - Laboratório de Farmacologia Experimental  
**LCCM** - Meio de cultura condicionado de células L929  
**LFA** - Antígeno associado à função dos linfócitos  
**LOX** - Lipoxigenase  
**LPS** - Lipopolissacarídeo  
**LTB4** - Leucotrieno B4  
**LXA4** - Lipoxina A4

**MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógeno  
**MCP1** - Proteína quimiocítica de monócitos 1  
**M-CSF** - Fator estimulador de formação de colônias de macrófagos  
**MDP** - Dipeptídeo muramíl  
**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade  
**MIP** - Proteína inflamatória de macrófagos  
**M-MLV** - Moloney Murine Leukemia Virus  
**MPO** - Mieloperoxidase  
**MUC-2** - Mucina 2  
**NAG** - *N*-acetilglucosaminidase  
**NFκB** - Fator nuclear κB  
**NOD** - Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo  
**NOS** - Sintase do óxido nítrico  
**OCTN1** - Transportador de cátions orgânicos do tipo N1  
**PBS** - Tampão fosfato salina  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**PGE** - Prostaglandina  
**PMN** - Polimorfonuclear  
**PMSF** - Fluoreto de fenilmetilsulfonila  
**PPR** - Receptores de reconhecimento padrão  
**RNA** - Ácido ribonucléico  
**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro  
**RNasin** - Inibidor de RNase  
**RvD2** - Resolvina D2  
**SFB** - Soro fetal bovino  
**STAT** - Proteína transdutora de sinais e ativadora de transcrição  
**TCR** - Receptores de células T  
**TGF** - Fator de crescimento transformante  
**Th** - Célula T auxiliar  
**TLR** - Receptores de reconhecimento padrão do tipo toll  
**TMB** - Tetrametilbenzidina  
**TNBS** - Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico  
**TNF-α** - Fator de necrose tumoral α  
**Treg** - Célula T regulatória  
**UC** - Colite Ulcerativa  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina  
**VCAM** - Molécula vascular de adesão celular

# SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Doenças inflamatórias intestinais.....	1
1.2 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais.....	7
1.3 Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais.....	9
1.4 Resolução do processo inflamatório.....	11
1.5 Resolvendo a colite: uma dieta rica em ômega-3 pode ajudar?.....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 Geral.....	21
2.2 Específico.....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Animais.....	22
3.2 Colite experimental induzida pelo DSS.....	22
3.2.1 Índice de atividade da doença (IAD).....	23
3.2.2 Escore macroscópico.....	23
3.2.3 Escore microscópico.....	25
3.2.4 Tratamentos.....	25
3.3 Colite experimental induzida por TNBS.....	26
3.3.1 Tratamentos.....	27

3.3.2	Escore macroscópico.....	27
3.3.3	Escore microscópico.....	28
3.4	Análise histológica.....	29
3.5	Atividade das enzimas MPO, EPO e NAG.....	29
3.6	Dosagem de citocinas.....	30
3.7	Análise imunistoquímica.....	30
3.8	Extração do RNA total.....	32
3.9	Confecção do DNA complementar (reação de transcrição reversa).....	33
3.10	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	33
3.11	Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea.....	34
3.12	Estimulação, incubação e coleta dos macrófagos derivados da medula óssea.....	34
3.13	Preparação dos extratos citosólicos e nucleares.....	35
3.14	Western blot.....	35
3.15	Quantificação de linfócitos por citometria de fluxo.....	36
3.16	Drogas e reagentes.....	36
3.17	Análise estatística.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1	Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo DSS.....	39
4.1.1	Padronização do modelo de colite experimental induzida pelo DSS em camundongos.....	39



4.1.2 Severidade da doença durante as fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS.....	42
4.1.3 Migração celular durante a colite induzida pelo DSS.....	44
4.1.4 Produção de citocinas durante as fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS.....	50
4.1.5 Expressão do RNAm para alguns mediadores inflamatórios durante a colite induzida pelo DSS em camundongos.....	52
4.1.6 Expressão do RNAm para marcadores de células T regulatórias durante a colite induzida pelo DSS.....	57
4.1.7 Ativação da via do NFκB durante a colite induzida pelo DSS.....	58
4.2 Papel dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 na resolução da colite experimental.....	59
4.2.1 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA na severidade da doença da colite induzida pelo DSS.....	59
4.2.2 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a atividade da enzima MPO e dano tecidual microscópico na colite induzida pelo DSS.....	64
4.2.3 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre os níveis teciduais de citocinas na colite induzida pelo DSS.....	67
4.2.4 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a expressão do RNAm para moléculas de adesão na colite induzida pelo DSS.....	69
4.2.5 Efeito da AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do NFκB na colite induzida pelo DSS.....	70

4.2.6 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a expressão das enzimas COX-2 e NOS2 em cultura primária de macrófagos estimulados com LPS.....	72
4.2.7 Efeito e possível mecanismo de ação da AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a secreção de citocinas em cultura primária de macrófagos estimulados com LPS.....	75
4.2.8 Efeito do bloqueio farmacológico do receptor ALX/FPR2 sobre a ação benéfica da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS.....	80
4.2.9 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 na colite induzida pelo TNBS.....	82
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) podem ser classificadas genericamente como um grupo de disfunções inflamatórias do trato digestivo que são caracterizadas por dano e inflamação da mucosa intestinal. As duas principais IBD são a colite ulcerativa (do inglês ulcerative colitis, UC) e a Doença de Crohn (do inglês Crohn's disease, CD) (Aharoni *et al.*, 2006). Ambas são também caracterizadas por serem de origem desconhecida e podem levar o indivíduo a outras complicações de saúde, incluindo o aumento na incidência de câncer colorretal (Podolsky, 2002).

A CD é uma doença inflamatória transmural, ou seja, que pode acometer todas as camadas teciduais do trato digestivo, podendo ocorrer desde a boca até o ânus. Os sintomas clínicos dessa doença incluem diarreia ou obstrução intestinal, dor abdominal, febre, bem como eliminação de sangue e/ou muco nas fezes. Por outro lado, a UC é uma doença inflamatória não transmural que geralmente está restrita à região do cólon, sendo que sua sintomatologia inclui diarreia sanguinolenta, dor abdominal e eliminação de pus e/ou muco durante as evacuações (Weylandt *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos mostram que a incidência das IBD no mundo ocidental vem aumentando consideravelmente desde 1950. Pesquisas recentes indicam que a incidência das IBD está em ascensão em áreas antes consideradas de baixa prevalência, como Sul da Europa, Ásia e países em desenvolvimento. Porém, vem se estabilizando em regiões consideradas de alta ocorrência, como a América do Norte e o norte europeu. Estudos mostram que na América do Norte, a incidência da CD para latinos (4,1 para 100.000) e asiáticos (5,6 para 100.000) é muito menor do que a incidência observada em brancos (43,6 para 100.000) e negros (29,8 para 100.000). Embora as IBD ocorram em todos os grupos étnicos, existe uma maior prevalência em judeus, sugerindo que fatores ambientais e o estilo de vida predisõem ao desenvolvimento dessas doenças (Niv *et al.*, 2000).

Um fator ambiental importante para o desenvolvimento das IBD é o tabagismo. Diversos trabalhos têm mostrado que em pacientes com CD, o tabagismo agrava os sintomas clínicos da doença, promove a formação de fístulas e estenoses (Rubin e Hanauer, 2000). Por outro lado, embora os componentes do cigarro responsáveis por essas manifestações não tenham sido ainda identificados, o uso de adesivos

transdérmicos de nicotina, juntamente com terapias convencionais, amenizam os sintomas de pacientes com UC moderada (Pullan *et al.*, 1994). Alguns estudos sugerem efeitos opostos da nicotina na UC e CD. Na UC parece desenvolver papel benéfico, o qual está relacionado ao aumento na produção de muco, diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, além de melhora na função da barreira intestinal. Já na CD, a aplicação de nicotina parece estar relacionada ao aumento no influxo de neutrófilos para a lâmina própria, o que pode ocasionar uma amplificação não controlada da resposta inflamatória intestinal (Cosnes, 2004).

Desde a descrição original por Crohn e colaboradores em 1930, as IBD têm sido apresentadas como doenças com bases genéticas e ambientais (Crohn *et al.*, 2000). Essas evidências foram descritas pelo próprio Crohn, devido as suas observações sobre a ocorrência das IBD dentro de uma mesma família. De modo semelhante, Crohn observou que o diagnóstico da CD exibia várias semelhanças com infecções intestinais, tais como as derivadas de bactérias patogênicas, sugerindo a participação de potenciais componentes ambientais (Greenstein, 2003). A partir dessa observação, foram feitas inúmeras buscas mal sucedidas por microorganismos patogênicos que poderiam levar ao desenvolvimento das IBD. Entretanto, após anos, foi estabelecido que as IBD são determinadas por fatores genéticos e também por uma resposta imune inapropriada, não apenas a um patógeno, mas a uma série de componentes da microbiota comensal (Kaser *et al.*, 2010b).

Aproximadamente 10% dos pacientes com IBD apresentam histórico familiar da ocorrência de UC ou CD (Halme *et al.*, 2006). Além disso, a ocorrência das IBD em gêmeos monozigóticos é bastante elevada, sendo aproximadamente 800 vezes maior que na população geral (Halme *et al.*, 2006). De forma semelhante, a ocorrência da UC em gêmeos monozigóticos é da ordem de 10 a 20% (Halme *et al.*, 2006). Embora o risco para o desenvolvimento da UC em gêmeos monozigóticos seja menor do que o observado na CD, não é descartado o envolvimento significativo dos fatores genéticos na patogênese da UC (Kaser *et al.*, 2010a). Entretanto, essas diferenças podem estar relacionadas com uma complexa interação entre a suscetibilidade genética e exposições a fatores ambientais distintos, os quais caracterizam essa hereditariedade com uma provável natureza poligênica na maioria dos pacientes com IBD (Kaser *et al.*, 2010a).

Pesquisas recentes têm mostrado que o desenvolvimento das IBD logo nos primeiros anos de vida pode ocorrer devido a mutações em um único gene. Por exemplo, famílias com mutações nos genes para

o receptor da interleucina (IL)-10  $\alpha$  e  $\beta$ , os quais regulam a resposta citocina antiinflamatória IL-10, estão associadas ao desenvolvimento de CD (Glocker *et al.*, 2009). Em concordância com esses dados, já está bem descrito na literatura que camundongos deficientes em IL-10 são suscetíveis ao desenvolvimento de colite e que a sinalização da IL-10 através de seu receptor envolve outros fatores de risco genético que podem estar associados às IBD (Kuhn *et al.*, 1993). Além disso, a citocina IL-22 parece estar associada com a proteção contra a inflamação intestinal devido sua ação na produção de muco pelas células *goblet* intestinais (Sugimoto *et al.*, 2008). De fato, as células *goblet* constituem um componente importante do epitélio intestinal, pois são responsáveis pela produção de peptídeos que são cruciais tanto para a defesa como para o reparo do epitélio da mucosa intestinal (Mashimo *et al.*, 1996). Recentemente, foi demonstrado que a mucina-2 (MUC2), uma glicoproteína secretada em grande quantidade pelas células *goblet*, apresenta mutação em pacientes com IBD. Foi demonstrado ainda que camundongos com deleção gênica para a MUC2 (MUC<sup>-/-</sup>) são deficientes em células *goblet* e desenvolvem colite espontânea (Strober *et al.*, 2007).

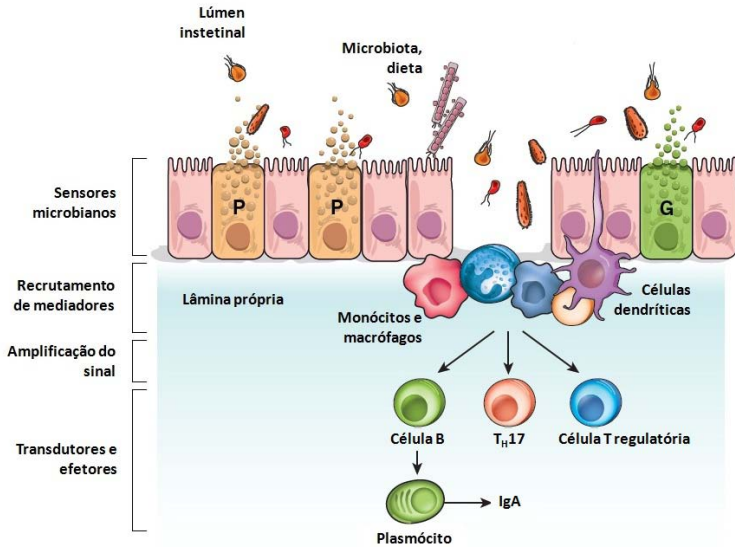
Além do exposto, outros estudos indicaram que alterações genéticas em pacientes portadores de IBD podem resultar em defeitos na resposta imunológica, favorecendo a proliferação de diversos tipos de bactérias patogênicas na mucosa intestinal (Swidsinski *et al.*, 2002). Neste contexto, foi observada a ocorrência de mutações no gene CARD15 (do inglês, *caspase recruitment domain 15*), em cerca 10 a 15% de pacientes com CD (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Esse gene codifica proteínas intracelulares como a NOD2 (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain 2*), que são responsáveis pelo reconhecimento de fragmentos derivados de bactérias, tais como o dipeptídeo muramil (MDP, do inglês *muramyl dipeptide*) (Inohara *et al.*, 2003; Strober *et al.*, 2006). A ativação destas proteínas desencadeia uma via de sinalização celular que aciona a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), bem como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) durante processos inflamatórios (Inohara *et al.*, 2003). Além disso, outros estudos demonstraram que o transportador de cátions orgânicos do tipo N1 (OCTN1, do inglês *organic cation transporter N1*) também está envolvido na suscetibilidade ao desenvolvimento das IBD (Lamhonwah *et al.*, 2003).

Diante do exposto, é evidente que as mutações em genes relacionados à manutenção da homeostase intestinal entre o sistema imunológico e as bactérias comensais são extremamente importantes

para a patogênese das IBD. Ademais, os estudos anteriormente apresentados demonstraram que a mutação em um único gene pode resultar no desenvolvimento das IBD. Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os pacientes que apresentam essas mutações desenvolvem inflamação intestinal, o que destaca ainda mais as potenciais interações entre genes e o meio ambiente para o desenvolvimento das disfunções inflamatórias (Kaser *et al.*, 2010a).

Enquanto o sistema imunológico de um intestino normal está sobre um delicado e controlado balanço com a flora intestinal, nas IBD ocorre o inadequado funcionamento desses mecanismos imunoregulatórios (Garrett *et al.*, 2010). De fato, a ativação descontrolada das células efectoras da mucosa intestinal tem sido identificada como um dos principais mecanismos envolvidos na iniciação e perpetuação da reação inflamatória intestinal (Powrie, 1995; Neurath *et al.*, 2001). A ativação contínua dessas células induz a produção anormal de vários mediadores inflamatórios, os quais coordenam a ação e amplificação do processo inflamatório intestinal (Sartor, 1994; Atreya *et al.*, 2000). Neste sentido, estudos têm demonstrado que ao contrário dos demais tecidos, a mucosa do intestino delgado e grosso possui um estado inflamatório pequeno, constante e fisiológico, devido ao direto contato do epitélio intestinal com os microorganismos presentes no lúmen (Macdonald *et al.*, 2011).

No tecido linfóide da mucosa intestinal estão presentes células T, células B, granulócitos, mastócitos e células *natural killers*, as quais estão localizadas no tecido conectivo da lâmina própria. Adicionalmente, uma população de enterócitos altamente especializada atua como interface entre o lúmen intestinal e o tecido linfóide subjacente. Essas células possuem pequenas vilosidades e servem como um canal de condução para antígenos, possibilitando o encontro com uma variedade de linfócitos presentes nas placas de *Peyer* e folículos linfóides. Nessa ocasião ocorre o encontro entre as células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos, e os antígenos provenientes do lúmen intestinal (Mach *et al.*, 2005). Além disso, como pode ser observado na Figura 1, as células dendríticas podem abrir as junções oclusivas entre as células epiteliais e projetar seus dendritos para fora do epitélio e entrar em contato direto com fragmentos bacterianos do lúmen.



Fonte: Adaptado de Khor *et al.*, (2011)

**Figura 1. Vias de interação entre microbiota e células do sistema imune nas IBD.** A homeostase intestinal envolve uma ação coordenada entre células epiteliais e células da resposta imune inata e adaptativa. A permeabilidade na barreira intestinal permite a penetração de micróbios, os quais são detectados pelo sistema imune inato. Esse, por sua vez, coordena a resposta inflamatória através da liberação extracelular de mediadores que auxiliam no recrutamento de componentes celulares, tais como células do sistema imune adaptativo. Variações genéticas, microbiota e fatores imunológicos afetam o balanço entre esses sinais. **P** = células de Paneth; **G** = células goblet.

As células dendríticas são cruciais no controle da imunidade contra patógenos e na tolerância à flora comensal. Ao contrário das células epiteliais e das células imunes efetoras, as células dendríticas expressam todo o conjunto de receptores do tipo *toll* (TLR, do inglês *toll like receptor*) e receptores do tipo *nod* (NLR, do inglês *nod like receptor*), o que parece lhes garantir a capacidade de distinção entre bactérias comensais e patógenos, além de permitir ativar ou silenciar a resposta de células T (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

As funções das células dendríticas são reguladas por sua localização, número e estado de maturação (Banchereau e Steinman, 1998). Em indivíduos saudáveis, essas células apresentam fenótipo imaturo e estimulam a diferenciação das células T naive em células T regulatórias CD4<sup>+</sup>, as quais são responsáveis por controlar a ativação excessiva de linfócitos e atenuar a resposta inflamatória (Banchereau e

Steinman, 1998). Entretanto, até o momento ainda não se sabe qual população de células dendríticas induz essa diferenciação. Dados da literatura sugerem que a interação entre células dendríticas e certas linhagens de bactérias probióticas induz a mudança de fenótipo das células dendríticas e a produção rápida da interleucina-10 (IL-10), citocina a qual conduz à diferenciação de células T naive em células T regulatórias (Hart *et al.*, 2004). No entanto, é de consenso geral que quando essas células entram em contato com sinais de dano celular ou patógenos ocorre o processo de maturação e consequente indução da resposta imunológica. Este processo pode ocorrer, por exemplo, após a ativação dos TLR por lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias provenientes do lúmen intestinal (West *et al.*, 2004).

Juntamente com as células dendríticas, os macrófagos residentes participam do monitoramento e manutenção da homeostase intestinal, pois essas células aumentam a fagocitose e a atividade bactericida, e ainda podem liberar mediadores antiinflamatórios (Swirski *et al.*, 2009). Ademais, estudos recentes mostraram que tanto macrófagos murinos, como macrófagos humanos, podem apresentar características fenotípicas únicas e vias de sinalização diferente das observadas nos monócitos encontrados no sangue periférico (Denning *et al.*, 2007; Smythies *et al.*, 2010). Por exemplo, certos macrófagos intestinais não secretam citocinas pró-inflamatórias após estimulação dos receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *pattern recognition receptor*) tais como os receptores da família dos TLR (Smythies *et al.*, 2005; Smythies *et al.*, 2010). Além disso, podem secretar seletivamente citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e, auxiliar no processo de resolução da inflamação intestinal (Denning *et al.*, 2007). Entretanto, a migração indiscriminada e a ativação descontrolada de macrófagos é considerada um dos fatores cruciais para a patogênese das IBD em indivíduos geneticamente suscetíveis (Weber *et al.*, 2009).

Embora inúmeros trabalhos retratem o papel de células T, macrófagos e células dendríticas na patogênese das IBD, as células do epitélio intestinal também merecem destaque para a compreensão da fisiopatologia dessas doenças. As células epiteliais do intestino podem influenciar a migração de células T para o trato gastrointestinal através da secreção de quimiocinas. Além disso, estudos têm demonstrado que a secreção da quimiocina CXCL8, pelas células do epitélio intestinal, pode também controlar a migração de neutrófilos para o tecido gastrointestinal (Macdonald *et al.*, 2011). Interessantemente, algumas células epiteliais especializadas podem secretar mucinas ou defensinas,



as quais estão diretamente relacionadas à manutenção da homeostase intestinal e proteção contra microorganismos patogênicos (Smithson *et al.*, 1997; Buisine *et al.*, 2001; Selsted e Ouellette, 2005).

Neste sentido, Hermiston e Gordon (1995) constataram que um defeito na produção de  $\alpha$ -defensina pelas células do epitélio intestinal leva a ruptura ou mau funcionamento da barreira epitelial, estando relacionada à ocorrência da CD. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que camundongos deficientes para N-caderina, os quais perdem as junções oclusivas entre as células, desenvolvem uma inflamação severa na mucosa intestinal. Estudos em humanos também corroboram esses achados, demonstrando que pacientes com CD apresentam permeabilidade intestinal aumentada, mesmo estando em períodos de remissão da doença (Hollander *et al.*, 1986). Análises genéticas indicam que o aumento da permeabilidade intestinal em pacientes com CD está relacionada a uma mutação no gene que codifica NOD2 (Buhner *et al.*, 2006). Esta mesma mutação tem sido associada à diminuição na produção de IL-10 em células mononucleares do sangue periférico (Noguchi *et al.*, 2009). Uma das hipóteses que poderia explicar esse aumento da permeabilidade intestinal seria a produção anormal do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), levando a uma disfunção na barreira epitelial mesmo na fase de remissão da doença (Turner, 2009).

Alguns estudos mostraram que citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  modificam a função de barreira das junções oclusivas do epitélio intestinal (Madara e Stafford, 1989; Taylor *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que um dos efeitos mais marcantes da terapia com anticorpos contra o TNF- $\alpha$  para a CD é a notável restauração da integridade da barreira epitelial (Suenart *et al.*, 2002). Além disso, estudos relataram que o aumento na produção de TNF- $\alpha$  pode contribuir, de forma significativa, para o aumento da permeabilidade da barreira intestinal e o consequente aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de colite em camundongos com deficiência na biossíntese de mucinas (Van Der Sluis *et al.*, 2006; Heazlewood *et al.*, 2008). Embora alguns trabalhos abordem a permeabilidade da barreira intestinal meramente como um indicador sensível da ativação da resposta imune, é importante ressaltar que esse fator é potencialmente relevante para a progressão das IBD (Turner, 2009).

## **1.2 Tratamento das doenças inflamatórias intestinais**

O tratamento para as IBD inclui alterações no estilo de vida, acompanhamento médico e intervenções cirúrgicas. Até recentemente, o arsenal terapêutico disponível para tratar UC e CD era relativamente limitado, compreendendo essencialmente os compostos do ácido 5-

aminosalicílico (ASA), esteróides e a azatioprina/6-mercaptopurina. Durante a década de 1990, novas alternativas terapêuticas foram testadas, e os agentes imunorreguladores como o metotrexato e a ciclosporina passaram a serem empregados no tratamento das IBD (Korzenik e Podolsky, 2006).

A azatioprina e a 6-mercaptopurina são usadas, em baixas doses, para o tratamento de UC e CD e, são geralmente co-administradas com corticosteróides. Essas drogas atuam na redução da população de linfócitos durante o processo inflamatório (Xu *et al.*, 2004). O metotrexato é um medicamento bastante utilizado para o tratamento de artrite reumatóide e psoríase; entretanto, esse composto exerce efeitos benéficos em pacientes portadores de IBD. Essa droga é utilizada quando o tratamento com corticosteróides ou com azatioprina/6-mercaptopurina não geram efeitos satisfatórios (Xu *et al.*, 2004; Sandborn *et al.*, 2008).

Estas terapias clássicas utilizadas para o tratamento das IBD estão associadas à incidência de efeitos colaterais importantes, sobretudo com a utilização dos imunossuppressores e imunomoduladores. Alguns dos efeitos não desejados causados pela utilização de corticosteróides incluem a síndrome de *Cushing*, acne, infecções, hipertensão, estrias, diabetes melitus, osteoporose, catarata e glaucoma (Marshall e Irvine, 1997; Lichtenstein *et al.*, 2006). A azatiopreno e a 6-mercaptopurina, por sua vez, podem causar pancreatite, febre, náuseas, diarreia, trombocitopenia, leucopenia, infecções e linfoma (Kandiel *et al.*, 2005; Rutgeerts *et al.*, 2005).

Um grande avanço na terapia das IBD foi a introdução do tratamento com o anticorpo monoclonal para a citocina TNF- $\alpha$ , o qual é efetivo particularmente para a CD. A eficácia dessa terapia provavelmente reflete os efeitos marcantes do TNF- $\alpha$  nas IBD. Entretanto, a utilização do anti-TNF- $\alpha$  é também frequentemente limitada devido à perda da eficácia em alguns pacientes, ressaltando a necessidade de busca por novas terapias (Abraham e Cho, 2009). O tratamento com anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , como o infliximab, apresenta boa eficácia quando usado em altas doses, o que pode aumentar a incidência de efeitos colaterais. Outro grande problema do tratamento com infliximab é o preço elevado, podendo custar até 30 mil dólares por ano, para um único paciente.

Recentemente, o anticorpo monoclonal para a subunidade p40 das citocinas IL-12 e IL-23 tem apresentado bons resultados no tratamento da psoríase e CD (Krueger *et al.*, 2007). A utilização do anti-p40 bloqueia as vias de sinalização tanto para IL-12 quanto para a IL-

23, impedindo a perpetuação da resposta  $T_H1$  e  $T_H17$ , respectivamente. Além disso, o bloqueio seletivo da IL-23 pode também ser feito através da subunidade p19 (Yen *et al.*, 2006; Elson *et al.*, 2007). Porém, a utilização do anticorpo anti-p19 não tem apresentado efeito em todos os modelos experimentais de IBD (Becker *et al.*, 2006). No entanto, a inibição seletiva da IL-23 pode interferir nas vias de sinalização de células T e causar consequências indesejáveis (Sandborn *et al.*, 2008).

A inibição da migração celular vem sendo alvo de diversos estudos e tem-se mostrado vantajosa, uma vez que reduz indiretamente a produção local de diversas citocinas. Inibidores seletivos de moléculas de adesão interferem na migração de leucócitos para o sítio inflamatório, uma vez que essas moléculas são essenciais para que ocorra tal processo (Korzenik e Podolsky, 2006; Weylandt *et al.*, 2007). Dois estudos em fase clínica II mostraram que o Natalizumab, um anticorpo monoclonal anti- $\alpha4$ -integrina, foi eficaz no tratamento de pacientes com CD (Gordon *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2003). Outro anticorpo monoclonal para molécula de adesão, MLN02 (anti- $\alpha4\beta7$ -integrina), mostrou-se eficaz na terapia de pacientes com UC (Sandborn *et al.*, 2008).

Embora existam algumas opções de tratamentos farmacológicos para as IBD, há pacientes que não respondem a esses tratamentos mesmo quando combinados, de modo que em muitos casos, uma intervenção cirúrgica se faz necessária. Em outros casos, os pacientes se tornam dependentes das medicações e o uso de imunossupressores pode aumentar o risco de infecções oportunistas. Em vista das limitações dos tratamentos disponíveis para as IBD, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que combinem alta eficácia com baixa incidência de efeitos indesejáveis, se faz necessária. Neste sentido, também há uma grande necessidade de ampliar os conhecimentos acerca da prevenção da doença, sobretudo no que diz respeito ao estilo de vida e a dieta.

### **1.3 Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais**

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das IBD, vários modelos animais vêm sendo desenvolvidos (Wirtz e Neurath, 2000). Embora esses modelos não representem na totalidade a complexidade da doença que acomete o homem e, não substituam a utilização de tecidos humanos doentes, eles constituem ferramentas valiosas para análise de muitos aspectos importantes das IBD que são difíceis de serem estudados em humanos, tais como mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas fases iniciais do

desenvolvimento da UC e a busca por alternativas terapêuticas emergentes (Wirtz e Neurath, 2007).

Os modelos de colite induzidos por agentes químicos são os mais comumente utilizados e reproduzem vários aspectos imunológicos e histopatológicos das IBD em humanos. O aparecimento da inflamação intestinal nesses modelos é rápida, o que torna sua utilização relativamente simples (Wirtz *et al.*, 2007). Alguns modelos químicos são realizados através da inserção de um catéter no cólon do animal (camundongos, ratos ou coelhos) para instilação de um determinado agente. Dois modelos bastante conhecidos e que utilizam esse tipo de técnica são o do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e o da oxazolona. Ambos agentes requerem a diluição em etanol, que tem como função quebrar a barreira da mucosa intestinal facilitando o contato de antígenos luminiais com as células do sistema imune presentes na lamina própria (Morris *et al.*, 1989; Wirtz *et al.*, 2007). A resposta desencadeada por estes haptenos é mediada por um infiltrado massivo de leucócitos, que liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, além de espécies reativas de oxigênio (Morris *et al.*, 1989; Palmen *et al.*, 1995).

Outro agente químico que pode induzir inflamação intestinal é o sulfato sódico de dextrana (DSS). Esse agente é diluído na água que os animais bebem e é administrado durante vários dias. Já foi descrito sua utilização em ratos, camundongos e cobaias. O desenvolvimento da inflamação intestinal causada pelo DSS é caracterizado principalmente por diarreia, ulcerações e infiltração de granulócitos. Este modelo é um dos mais utilizados por pesquisadores em todo o mundo e reproduz bem a doença em humanos (Okayasu *et al.*, 1990).

Existem também modelos animais em que as IBD desenvolvem-se espontaneamente. Nestes modelos, as mutações genéticas relacionadas aos componentes do sistema imune causam processos inflamatórios intestinais de diversos tipos e, nestes casos, a sintomatologia inflamatória geralmente se intensifica progressivamente até a morte do animal (Wirtz e Neurath, 2000; Elson *et al.*, 2005; Wirtz *et al.*, 2007). Por exemplo, animais com deleção de genes que codificam receptores de células T (TCR) ou de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), apresentam quadro de inflamação no cólon após 3 a 4 meses de vida e acabam morrendo de UC (Takahashi *et al.*, 1999). Um erro na codificação do fator de transcrição STAT3 (do inglês, signal transducer and activator of transcription 3) em macrófagos e neutrófilos de camundongos pode causar uma enterocolite espontânea

e, além disso, pode gerar o desenvolvimento de adenocarcinoma coloretal em animais mais velhos (Takeda *et al.*, 1999).

A deleção de genes responsáveis pela transcrição de algumas citocinas também pode favorecer o desenvolvimento de colite espontânea em animais. Dentre estes modelos se destacam os que utilizam camundongos knockout (KO) para as citocinas IL-10 e IL-2. Os animais com essas características desenvolvem enterocolite espontânea, devido à desregulação da interação entre as células do sistema imune e a flora entérica. A utilização destes modelos é considerada altamente reproduzível e também influenciável por fatores ambientais (Kuhn *et al.*, 1993; Sadlack *et al.*, 1993).

Por fim, além dos modelos genéticos e de indução química, os modelos de transferência adaptativa têm demonstrado grande relevância para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nas IBD. A transfecção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pré-ativado com proteína de choque reativo 60 (hsp-60, do inglês *heat shock protein-60*), causa inflamação severa no intestino delgado, que independe da flora bacteriana intestinal para o acometimento da doença (Steinhoff *et al.*, 1999). A transfecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressam altos níveis da proteína CD45RB leva à manifestação de inflamação intestinal semelhante a que ocorre nos modelos químicos de indução de colite, caracterizada por hiperplasia e inflamação no cólon, o que geralmente leva o animal à morte dentro de semanas após a transfecção (Elson *et al.*, 1995).

#### **1.4 Resolução do processo inflamatório**

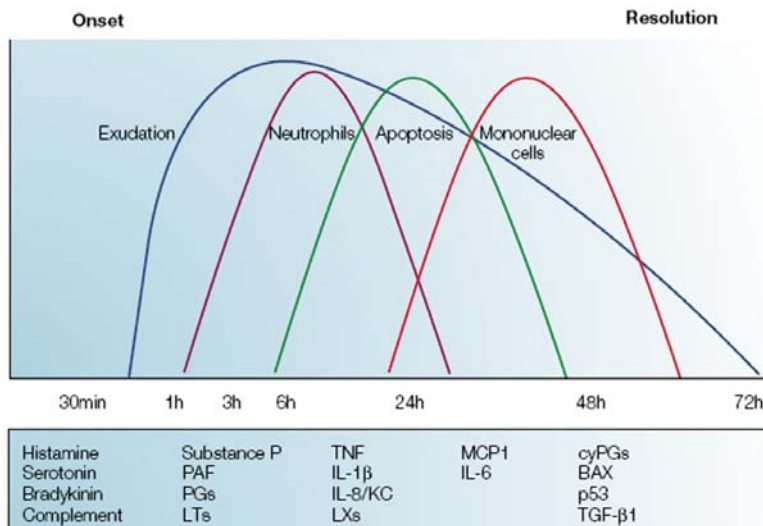
A resposta inflamatória tem sido descrita como um fenômeno crucial, tanto em processos fisiológicos, quanto em patológicos. Entretanto, os mecanismos moleculares e os eventos biológicos que regulam a progressão e a resolução da inflamação ainda permanecem pouco compreendidos (Serhan e Petasis, 2011). Pesquisas recentes têm fornecido fortes evidências de que a resolução da inflamação não é um processo passivo como era descrito no passado (Levy *et al.*, 2001). Ao contrário do que se pensava, a resolução da inflamação é um processo biossinteticamente ativo, regulado por mediadores bioquímicos, vias de ativação de receptores e mediadores lipídicos com atividades “pré-resolução” (Serhan e Petasis, 2011).

A inflamação aguda faz parte da resposta normal do hospedeiro ao dano tecidual e infecção por microorganismos patogênicos. Embora essa resposta inflamatória tenha o papel de proteger o hospedeiro, se descontrolada, pode levar à inflamação crônica e ao desenvolvimento de diversas disfunções sistêmicas. Além disso, algumas das doenças mais

comuns e de difícil tratamento estão relacionadas à inflamação excessiva, descontrolada ou crônica, tais como doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, asma, diabetes e IBD, além de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (Libby, 2002; Hansson e Libby, 2006). Embora o envolvimento das vias inflamatórias na fase aguda dessas doenças seja bem conhecida, a contribuição real da inflamação na progressão dessas doenças ainda não está bem estabelecida. Os achados recentes que indicam que a resolução da inflamação é regulada por mediadores especializados têm criado novos paradigmas para a compreensão e tratamento dessas condições (Serhan e Petasis, 2011).

Um argumento tradicional é de que o catabolismo dos mediadores inflamatórios é suficiente para cessar o processo inflamatório. Entretanto, atualmente, se sabe que isso é apenas parte do processo, pois a correta e eficaz remoção das células polimorfonucleares (PMN) é essencial para que não ocorra lesão tecidual adicional e cronificação da resposta inflamatória (Serhan *et al.*, 2007). Dessa forma, um processo inflamatório normal engloba também a morte de PMN por apoptose, com sua consequente fagocitose e remoção pelos vasos linfáticos (Serhan *et al.*, 2007), como pode ser observado na Figura 2. Essa sequência de eventos é desencadeada pela ação de mediadores especializados que iniciam o processo de resolução da inflamação, o qual resulta no retorno à homeostase tecidual.

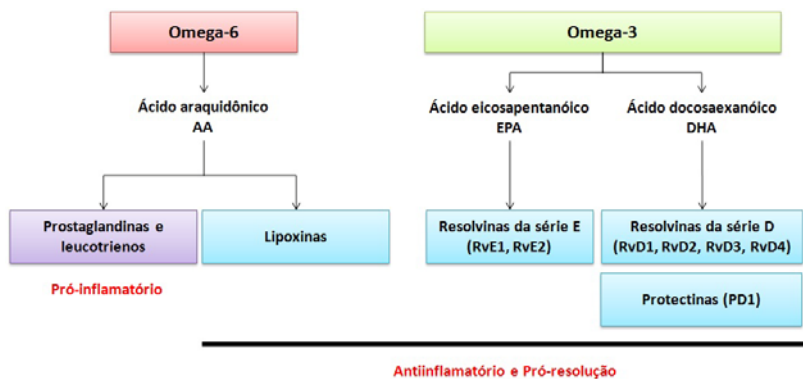
Recentemente, o papel de novas classes de mediadores lipídicos na regulação do processo de resolução da inflamação tem sido descrito em inúmeros trabalhos científicos (Serhan, 2005; Serhan e Savill, 2005; Serhan *et al.*, 2008; Serhan e Petasis, 2011). Particularmente, foi descoberto que uma nova classe de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados, os quais são gerados endogenamente durante a inflamação, possuem uma potente atividade antiinflamatória e são denominados como mediadores especializados “pró-resolução” (Serhan e Chiang, 2008; Serhan, 2010).



Fonte: Lawrence *et al.*, (2002)

**Figura 2. Linha do tempo da inflamação aguda e seu processo de resolução.** Esse esquema ilustra a cinética celular da inflamação e a sequencial liberação de mediadores inflamatórios baseado em modelos experimentais agudos em animais. Inicialmente ocorre a liberação de aminas vasoativas e mediadores lipídicos que estão envolvidos na formação de exudato e edema; isso é seguido pela expressão de citocinas e quimiocinas que ativam o endotélio e medeiam a migração de neutrófilos. Finalmente, mediadores antiinflamatórios, tais como a lipoxinas atenuam a migração celular, promovem a fagocitose de células apoptóticas por células mononucleares, além de acionarem a liberação de mediadores antiinflamatórios, tais como o fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

Estes novos mediadores lipídicos estão classificados em três famílias que incluem as resolvinas, as protectinas e as maresinas, as quais são biossintetizadas a partir do ácido graxo poliinsaturado  $\omega$ -3. Juntamente com essas novas classes estão incluídas as lipoxinas, as quais são derivadas do ácido graxo poliinsaturado  $\omega$ -6 e também são conhecidas por possuírem uma vasta ação pró-resolução e antiinflamatória (Figura 3) (Serhan *et al.*, 2007).



**Figura 3. Novas famílias de mediadores lipídicos e suas ações na inflamação.** Mediadores químicos envolvidos no início da inflamação aguda, tais como prostaglandinas e leucotrienos amplificam os sinais inflamatórios e auxiliam no recrutamento de PMN para o tecido lesionado. Com o decorrer do processo a classe de mediadores químicos é alterada e ocorre a formação de mediadores lipídicos especializados na resolução do processo inflamatório. Esses mediadores incluem as lipoxinas, as quais são derivadas do ácido graxo ômega-6, e as resolvinas e protectinas, derivadas do ácido graxo ômega-3. Esses mediadores estão envolvidos em mecanismos antiinflamatórios e pró-resolução, uma vez que promovem a remoção de células apoptóticas e promovem o reparo tecidual.

Essas famílias de mediadores endógenos pró-resolução não atuam como imunossupressores, mas acionam a resolução da inflamação pela ativação de mecanismos específicos e multifatoriais que promovem a homeostase tecidual. De forma geral, as lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas fornecem sinais potentes que regulam negativamente a infiltração de neutrófilos e eosinófilos; estimulam o recrutamento não-flogístico de monócitos, ou seja, sem a participação de mediadores pró-inflamatórios; induzem a fagocitose de microorganismos e células apoptóticas por macrófagos, e aumentam a saída dos fagócitos do tecido inflamado pelos vasos linfáticos, estimulando a expressão de moléculas envolvidas na defesa antimicrobiana (Canny *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2007).

No início dos anos 1990, pesquisadores comprovaram que as lipoxinas atuavam sobre neutrófilos e monócitos humanos, porém exerciam diferentes funções nesses tipos celulares (Serhan *et al.*, 1993). De fato, vários grupos de pesquisa demonstraram que as lipoxinas efetivamente bloqueavam o recrutamento de PMN, mas por outro lado, aumentavam a ativação não-flogística de monócitos (Serhan, 2011).



Essas funções ambíguas sobre esses dois tipos celulares classificaram as lipoxinas não apenas como mediadores antiinflamatórios, mas também como moléculas intrinsecamente envolvidas no reparo tecidual e na resolução do processo inflamatório (Maddox e Serhan, 1996; Serhan, 1997).

As lipoxinas e os leucotrienos são formados por transformações sequenciais do ácido graxo poliinsaturado ômega-6 sob ação de diferentes lipoxigenases. Por exemplo, a 5-lipoxigenase origina o leucotrieno A<sub>4</sub> a partir do ácido araquidônico, enquanto que a 12-lipoxigenase dá origem a lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>). Essas transformações ocorrem endogenamente logo após as primeiras horas da inflamação aguda (Weylandt *et al.*, 2007). No entanto, devido à rápida degradação desses mediadores no organismo, muitos estudos têm buscado moléculas mais estáveis para a elucidação de seus mecanismos e para o tratamento de disfunções inflamatórias. O desenvolvimento de análogos estáveis das lipoxinas permitiu a realização de experimentos cruciais para demonstrar que esses mediadores podiam bloquear o recrutamento de PMN, regular a inflamação, reduzir a fibrose e estimular os macrófagos a fagocitar células em apoptose (Takano *et al.*, 1997; Takano *et al.*, 1998; Godson *et al.*, 2000; Serhan, 2005). Essas descobertas foram críticas para diferenciar as lipoxinas dos demais mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, tais como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); e também para esclarecer em qual local, e momento, esses mediadores são endogenamente produzidos (Takano *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2001).

Recentemente, foi descoberto que o ácido acetilsalicílico (aspirina), além de ser um conhecido inibidor da formação de prostaglandinas pró-inflamatórias, induz a formação de mediadores lipídicos antiinflamatórios e pró-resolução. A aspirina modifica covalentemente o resíduo de serina próximo ao sítio ativo da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), a qual passa a converter o ácido araquidônico em moléculas precursoras que dão origem as lipoxinas (Serhan, 2007). De forma semelhante, a COX-2 acetilada pela aspirina converte os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) em precursores que originam as resolvinas da série E e o docosaexaenóico (DHA) em precursores das resolvinas da série D (Serhan *et al.*, 2007). Esses achados mostraram uma nova visão sobre uma droga usada há décadas, a qual se tornou novamente alvo de estudos por inúmeros grupos de pesquisa, pelo fato de ser capaz de auxiliar não apenas no bloqueio da resposta pró-inflamatória, mas também na geração de epímeros estáveis

de mediadores lipídicos pró-resolução, denominados de mediadores lipídicos originados pela aspirina.

As resolvinas da série E compreendem a resolvina E1 (RvE1) e a resolvina E2 (RvE2). A formação de RvE1 pode ocorrer durante a inflamação quando células endoteliais interagem com leucócitos. Por exemplo, na presença de aspirina, o EPA pode ser enzimaticamente transformado em ácido 18R-hidroxi-eicosapentaenóico (18R-HEPE) pela COX-2 do endotélio. A aspirina acetila a COX-2 impedindo a formação de prostanóides. No entanto, essa acetilação promove a conversão do EPA em 18R-HEPE, resultando na formação das resolvinas da série E. Durante as interações célula-célula, o 18R-HEPE é liberado a leucócitos vizinhos e consequentemente convertido pela 5-lipoxigenase (5-LOX) a RvE1 (Serhan *et al.*, 2000; Arita, Bianchini *et al.*, 2005). A RvE1 está presente no sangue humano e pode ser aumentada pela ingestão de aspirina (Arita *et al.*, 2005). A RvE2 [ácido 5S,18(R/S)-diidroxieicosapentaenóico] é sintetizada a partir do EPA em polimorfonucleares humanos (Tjonahen *et al.*, 2006).

O DHA é o precursor de dois grupos de resolvinas, referidas como resolvinas D 17S e 17R, as quais são produzidas por diferentes rotas durante a fase de resolução da inflamação (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). O DHA endógeno é convertido *in vivo* através de mecanismos catalisados pela lipooxigenase (LOX) a séries de quatro resolvinas contendo 17S-hidroxi, conhecidas como resolvinas D1 a D4 (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003). Especificamente, a biossíntese da RvD1 envolve oxigenações sequenciais pela 15-LOX e 5-LOX. Porém, no caso do tratamento com aspirina, a COX-2 acetilada dá origem ao 17R-hidroxi-DHA (17R-HDHA), a qual sob subsequente oxigenação pela 5-LOX resulta na produção da 17-epi-RvD1, também conhecida como resolvina D1 formada pela aspirina (AT-RvD1) (Serhan *et al.*, 2002; Serhan e Chiang, 2004). Já foi demonstrado em alguns estudos que as resolvinas da série D reduzem a dor inflamatória, bloqueiam a transcrição da IL-1 $\beta$  induzida pelo TNF- $\alpha$  em células microgliais e também atuam como reguladores potentes da migração de PMN nos processos inflamatórios do cérebro, do peritônio e da pele (Serhan *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Marcheselli *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2010). Além disso, ambas as resolvinas D 17R e 17S apresentam ações antiinflamatórias pronunciadas *in vivo* (Hong *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007).

Diante do exposto, é possível observar que as novas famílias de mediadores lipídicos derivados dos ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA, ou seja, as resolvinas e as protectinas, juntamente com as

lipoxinas provenientes do ácido araquidônico permitiram abrir novos caminhos para a compreensão do processo inflamatório como um todo. A descoberta desses mediadores está permitindo a realização de diversos estudos que visam acelerar o processo de resolução da inflamação a fim de prevenir o surgimento e complicação de doenças crônicas que são importantes problemas de saúde em escala global. Além disso, terapias que possam restaurar a homeostase do organismo se tornam mais interessantes do que a inibição da resposta inflamatória, por meio de drogas, que muitas vezes estão relacionadas a efeitos colaterais pronunciados.

### **1.5 Resolvendo a colite: uma dieta rica em ômega-3 pode ajudar?**

Os seres humanos são dependentes da suplementação nutricional de dois tipos de ácidos graxos poliinsaturados essenciais, o ômega-6 e ômega-3. Assim como muitos outros suplementos alimentares, tais como as vitaminas e oligoelementos, esses ácidos graxos são cruciais para o funcionamento celular. Como exposto anteriormente, esses ácidos graxos são precursores de mediadores lipídicos críticos para uma variedade de vias celulares (Weylandt *et al.*, 2007). Apesar da importância do consumo de ômega-6 para o funcionamento normal do organismo, vários estudos têm demonstrado que uma dieta rica neste ácido graxo pode aumentar significativamente a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, enquanto que uma dieta rica em ômega-3 parece exercer inúmeros benefícios sem efeitos indesejáveis (Bernstein, 2010).

Estudos recentes revelaram que pacientes com IBD estão sempre em busca de informações sobre dietas e sua relação com a doença. Entretanto, pouco ainda se sabe como os alimentos podem influenciar o desenvolvimento das IBD. Devido à grande prevalência das IBD em países desenvolvidos ocidentais e a uma menor ocorrência em países desenvolvidos do oriente, é comum questionar se o estilo de vida e os diferentes tipos de dieta nesses países poderiam contribuir para o surgimento dessas patologias (Bernstein, 2010). Poderia uma dieta rica em peixes, o qual é fonte abundante de ômega-3, comparada a dietas ricas em carne vermelha e açúcares fazerem a diferença? Sem dúvida, a chamada *fast food* dos países ocidentais se espalhou por todo o mundo, e de fato um estudo japonês demonstrou que o aumento da incidência da CD no Japão aumentou consideravelmente após um maior consumo de proteína animal e a introdução do *fast food*, além do aumento no consumo de ácido graxo ômega-6, comparado ao de ômega-3 (Shoda *et al.*, 1996). Além disso, um estudo pediátrico realizado no Canadá

demonstrou que crianças com CD tinham dieta pobre em peixes, frutas e demais fontes de ômega-3 (Amre *et al.*, 2007).

Neste contexto, as atividades antiinflamatórias das lipoxinas e seus epímeros formados pela presença da aspirina, bem como de análogos estáveis têm sido demonstrado recentemente em modelos animais de colite e IBD, tanto *in vivo* como *in vitro* (Weylandt *et al.*, 2007). Por exemplo, Gewirtz e colaboradores (2002) demonstraram que um análogo estável da LXA<sub>4</sub> suprimiu a atividade do NFκB em cultura de células do epitélio intestinal. Esses dados foram confirmados *in vivo* neste mesmo estudo, uma vez que a administração oral de 10 µg/ml de 15-epi-16-para-fluoro-phenoxy-LXA<sub>4</sub> causou redução da severidade da colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS), com conseqüente diminuição na expressão de genes para proteínas pró-inflamatórias. Outro estudo similar evidenciou que administração de um análogo estável da lipoxina formado pela via da aspirina, o ZK-192, melhorou significativamente os sinais inflamatórios da colite induzida pelo ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em camundongos (Fiorucci *et al.*, 2004). Adicionalmente, um estudo realizado em humanos demonstrou que a produção de lipoxina em cólons de pacientes com UC é drasticamente reduzida em relação aos cólons de indivíduos saudáveis (Mangino *et al.*, 2006). Esses achados estão de acordo com estudos que observaram que a capacidade na síntese de lipoxinas é bastante reduzida em leucócitos do sangue periférico de pacientes com asma severa (Levy *et al.*, 2005).

Os modelos experimentais de inflamação intestinal têm sido amplamente aplicados para descoberta de novos alvos terapêuticos e, alguns estudos visando desvendar o real envolvimento dos ácidos graxos ômega-3 e seus derivados na prevenção e tratamento das IBD têm demonstrado resultados surpreendentes. Um estudo realizado por Camuesco e colaboradores (2005) demonstrou que o tratamento com óleo de oliva suplementado com óleo de peixe rico em EPA e DHA, reduziu significativamente o índice de atividade da doença e os níveis de TNF-α e LTB<sub>4</sub> no cólon de ratos com colite induzida pelo DSS. Outro estudo semelhante evidenciou que a suplementação diária com DHA reduziu drasticamente o dano tecidual colônico, bem como, a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e o TNF-α no cólon de camundongos com colite experimental induzida pelo DSS (Cho *et al.*, 2011).

Estes e vários outros estudos relatam que um aumento no consumo de ácidos graxos derivados do ômega-3 como o EPA e o DHA, resulta no aumento proporcional desses ácidos graxos nas membranas

fosfolipídicas das células inflamatórias (Lee *et al.*, 1985; Healy *et al.*, 2000). Além disso, pesquisas demonstraram que a incorporação do EPA e DHA nas células inflamatórias ocorre de forma dependente da dose (Healy *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 2006), e que isso, em parte, reduz significativamente a incorporação e os níveis celulares de ácido araquidônico. Como resultado disso, há menos substrato para a produção de prostanoídes pró-inflamatórios como a PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> e tromboxanos, além de uma maior oferta de precursores para a formação de mediadores pro-resolução como as resolvinas em processos inflamatórios (Calder, 2008).

Após a descoberta e a purificação dos mediadores provenientes do ômega-3, muitos grupos de estudo ao redor do mundo se interessaram fortemente em pesquisar a ação direta desses mediadores lipídicos em diferentes doenças de caráter inflamatório. A primeira resolvina a ser totalmente identificada quanto a sua estrutura química e propriedades antiinflamatórias foi a RvE1 (2005). Neste estudo, Arita e colaboradores verificaram que em doses na ordem de nanomolar a RvE1 reduziu a inflamação dérmica, a peritonite, a migração de células dendríticas e a produção da citocina pró-inflamatória IL-12. Ademais, neste mesmo estudo foi descoberto que a ação da RvE1 era mediada através de sua ligação ao receptor órfão de membrana denominado ChemR23, o qual desencadeia uma cascata intracelular que reduz a atividade do NFκB.

primeiro estudo envolvendo as resolvinas e IBD foi realizado por Arita e colaboradores (2005). Neste trabalho foi demonstrado que a administração sistêmica preventiva da RvE1 (1 µg/animal) aumentou significativamente a taxa de sobrevivência, protegeu contra a perda de peso corporal e dano tecidual do cólon de animais com colite induzida pelo TNBS. Além disso, o tratamento com RvE1 reduziu a infiltração de PMN, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), bem como os níveis de RNAm para os mediadores pró-inflamatórios IFN-γ, IL-12, TNF-α e COX-2 no tecido colônico (Arita, Yoshida *et al.*, 2005).

Este mesmo grupo de pesquisa observou ainda que a administração de RvE1 na mesma dose reduziu o índice de atividade da doença, o dano tecidual do cólon, os níveis teciduais de TNF-α, IL-6 e IL-1β, bem como a ativação do NFκB no modelo de colite experimental induzido pelo DSS (Ishida *et al.*, 2010). Além disso, esses trabalhos também comprovaram o envolvimento direto entre o receptor ChemR23 e a RvE1 durante o processo inflamatório intestinal. Esses achados corroboram outro estudo que demonstrou que camundongos transgênicos para proteína fat-1, os quais apresentam níveis elevados de

ômega-3, apresentam resistência no desenvolvimento de colite experimental (Hudert *et al.*, 2006). Em conjunto, esses estudos sugerem existir um papel fundamental dos mediadores derivados do ômega-3 no controle da inflamação intestinal.

Diante da variedade de mediadores derivados do ômega-3, tais como as resolvinas da série E e D, maresinas e protectinas, pouco ainda se sabe sobre as ações fisiológicas e moleculares de cada um desses mediadores lipídicos, bem como seus efeitos benéficos e pró-resolução no processo inflamatório em diferentes doenças importantes como as IBD. Dessa forma, estudar os mecanismos envolvidos no processo de resolução da inflamação nas IBD se mostra altamente necessário, uma vez que a problemática em torno desta patologia e o alto custo dos tratamentos mais eficazes dificultam muito o tratamento adequado dos pacientes. Assim, o desenvolvimento de pesquisas que procurem avaliar o efeito antiinflamatório e pró-resolução dos mediadores anteriormente citados, bem como desvendar os mecanismos pelos quais tais efeitos são desencadeados, pode ser fundamental para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para a prevenção e/ou tratamento das IBD.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a cinética de produção de mediadores inflamatórios e a resposta celular durante as fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS, bem como avaliar o efeito de mediadores lipídicos derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 em modelos de colite experimental em camundongos.

### **2.2 Específico**

Para atingir o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, apresentados nos seguintes objetivos específicos:

- Padronizar o modelo agudo e crônico de colite induzida pelo DSS em camundongos;
- Avaliar os parâmetros clínicos, bem como a cinética de migração celular na colite induzida pelo DSS;
- Investigar a expressão e produção de mediadores inflamatórios nas fases de surto e remissão da colite induzida pelo DSS;
- Averiguar a ação antiinflamatória e pró-resolução dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, ácido 17R- docosaexaenóico, AT-resolvina D1 e resolvina D2 nos modelos experimentais de colite induzida pelo DSS ou TNBS;
- Avaliar o possível mecanismo de ação dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 através da utilização de técnicas *in vitro* e *in vivo*.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

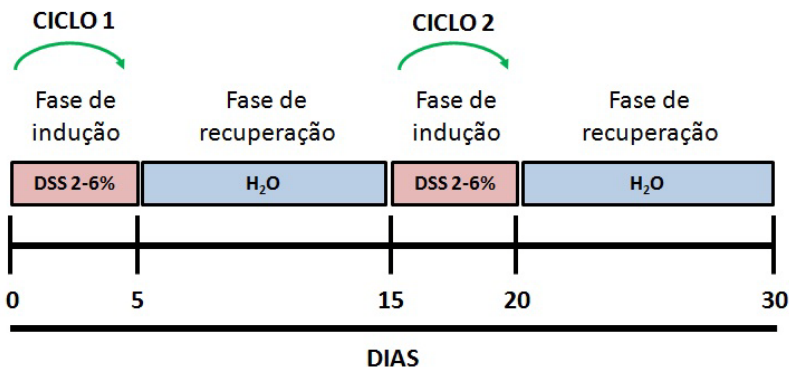
#### **3.1 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos pesando entre 20 – 25 g, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (06:00-18:00). Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC (CEUA, processo número PP00568).

#### **3.2 Colite experimental induzida pelo DSS**

A colite experimental induzida por DSS foi realizada através da administração de sulfato sódico de dextrana (DSS, de peso molecular: 36,000-50,000, obtido da ICN Biomedicals, Solon, OH, EUA) na água de beber. Os animais receberam DSS em diferentes concentrações (2, 3, 4 e 6 % em água filtrada) ad libitum por um período de cinco dias seguido por um período de dois dias recebendo apenas água filtrada (Gewirtz et al., 2002). Adicionalmente, para a avaliação das fases aguda, recuperação e crônica, os animais receberam DSS nas concentrações de 2, 4 e 6 % durante cinco dias, seguido de um período de 10 dias recebendo apenas água filtrada. Após esse período, os animais receberam novamente DSS (2-6%) por cinco dias, seguido por mais 10 dias de água filtrada, resultando em dois ciclos de DSS (Figura 4). Ao longo do protocolo foi avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais foram monitorados diariamente em relação à mudança de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência fecal. Ao final de cada fase, os animais foram eutanasiados, os cólons coletados, lavados em solução salina (0,9 %), pesados e seus comprimentos mensurados. Os tecidos colônicos foram armazenados em freezer -70 oC para análises bioquímicas, ou alternativamente, armazenados em formaldeído tamponado a 4 % em temperatura ambiente até o processamento das amostras para análise histológica.





**Figura 6. Modelo de colite aguda e crônica induzida pelo DSS.** Animais da linhagem BALB/c machos receberam DSS (2-6 %) durante cinco dias na água de beber. No quinto dia o DSS foi retirado e substituído por água filtrada, a qual foi ofertada por 10 dias. Um novo ciclo de DSS (2-6 %) foi condicionado aos animais por cinco dias, seguidos por mais 10 dias de água filtrada, resultado em um total de 30 dias de protocolo experimental. As fases que o DSS foi ofertado foram designadas como fase de indução; já quando ocorreu oferta apenas de água filtrada as fases foram denominadas de fase de recuperação.

### 3.2.1 Índice de atividade da doença (IAD)

Durante o protocolo experimental da colite induzida pelo DSS os animais foram examinados diariamente em relação ao índice de atividade da doença (IAD) como descrito anteriormente (Ghia et al., 2008). O IAD é o somatório combinado de escores referentes à perda de peso corporal, consistência fecal e sangramento das fezes. Os escores foram definidos de acordo com os seguintes parâmetros: a consistência das fezes foi pontuada como escore 0 para ausência de diarreia e fezes consistentes; escore 2 para fezes frouxas e mal formadas; e escore 4 para diarreia e fezes muito aquosas. A presença de sangue nas fezes foi avaliada como escore 0 para ausência de sangue nas fezes; escore 2 para a presença de sangue oculto (Feca-cult, INLAB, SP, Brasil); ou escore 4 para sangue evidente nas fezes. A perda de peso corporal foi avaliada como escore 0 para ausência de perda de peso ou perda de até 1 % do peso inicial dos animais; 1 para perda de peso de 1-5 %; escore 2 para perda de peso de 5-10 %; escore 3 para perda de peso de 10-15%; e escore 4 para perda de peso maior que 15 % do peso inicial.

### 3.2.2 Escore macroscópico

Ao final de cada ciclo de DSS e das fases de recuperação (protocolo de 30 dias), ou sete dias após o início do tratamento com DSS (protocolo de cinco dias com DSS e dois dias com água filtrada), os

animais foram eutanasiados, os cólons removidos e abertos longitudinalmente (em toda a extensão) e cuidadosamente limpos com solução salina 0,9 %. A severidade do dano ao cólon foi avaliada utilizando-se uma escala de dano macroscópico conforme descrita originalmente por Kimball e colaboradores (Kimball et al., 2004; Kimball et al., 2006) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Grade de escores para avaliação do dano macroscópico total na colite induzida por DSS {Kimball, 2004 #443; Kimball, 2006 #61}.

<b>PESO DO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Ganho de peso <5%.
1	Ganho de peso de 5 – 14%.
2	Ganho de peso de 15 – 24%.
3	Ganho de peso de 25 – 35%.
4	Ganho de peso > 35%.
<i>*Presença de sangue visível nas fezes: somar +1 ao escore.</i>	
<b>ENCURTAMENTO DO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Encurtamento <5%.
1	Encurtamento de 5 – 14%.
2	Encurtamento de 15 – 24%.
3	Encurtamento de 25 – 35%.
4	Encurtamento > 35%.
<b>CONSISTÊNCIA DAS FEZES PRESENTES NO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Normal (bolos fecais bem formados).
1	Bolos fecais úmidos e frouxamente formados.
2	Bolos fecais amorfos, úmidos e pegajosos.
3	Diarréia.
<i>*Presença de sangue visível nas fezes: somar +1 ao escore.</i>	
<b>DANO AO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Sem sinais de inflamação.
1	Inflamação leve, hiperemia localizada.
2	Inflamação moderada ou distribuída mais amplamente.
3	Inflamação severa e/ou distribuída extensivamente.
4	Úlceras penetrantes e lesões sanguinolentas.

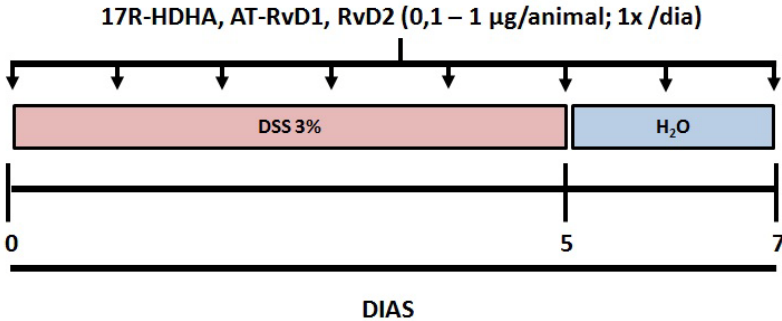
### 3.2.3 Escore microscópico

Após a confecção das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E), por empresa terceirizada (Lab onLine, Florianópolis –SC), os tecidos colônicos foram analisados em microscópico óptico (Nikon Eclipse 50i, Melville, NY, EUA). A inflamação intestinal foi quantificada de acordo com a escala proposta por Van der Sluis e colaboradores (2006): presença de células goblet (0-4), espessamento da mucosa (0-4), presença de células inflamatórias (0-4), infiltração celular na submucosa (0-4), destruição da arquitetura tecidual (0-4), ulceração (0-4) e abscessos nas criptas (0-4). Os escores obtidos em cada parâmetro (graduados conforme a intensidade de cada um) foram somados para a quantificação do dano microscópico total. Foram analisados três cortes histológicos obtidos do cólon de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído por no mínimo quatro animais.

### 3.2.4 Tratamentos

Com o objetivo de avaliar o efeito dos mediadores lipídicos derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 na colite induzida pelo DSS (protocolo de sete dias), os animais foram tratados pela via intravenosa (i.v.) nas doses de 0,1; 0,3 e 1 µg/animal com a resolvina D1 gerada na presença de aspirina [AT-RvD1 (7S,8R,17R-trihidroxi-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-DHA)], resolvina D2 [RvD2 (7S,16R,17S-trihidroxi-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-DHA)], ou o precursor das resolvinas da série D gerado na presença de aspirina [17R-HDHA (17R-hidroxi-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-DHA)] todos adquiridos da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA), uma vez ao dia do dia 0 ao dia 7 (Figura 5).

Em outro bloco de experimentos os animais foram tratados com uma injeção i.v. do antagonista seletivo para o receptor de lipoxina A4 (ALX/FPR2) N-t-BOCPHE-LEU-PHE-LEU-PHE (BOC-1) (2 mg/kg, uma vez ao dia). Os animais foram tratados apenas com BOC-1 ou em combinação com AT-RvD1 (0,3 µg/animal, i.v.), 30 minutos antes, desde o dia 0 ao dia 7. A escolha das doses dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 e do BOC-1 foi baseada em estudos anteriormente publicados (Amre et al., 2007; Sun et al., 2007; Spite et al., 2009). Todos os compostos foram solubilizados em solução salina (0,9 %). As soluções veículo foram utilizadas para o tratamento dos respectivos animais controles.



**Figura 5. Tratamento preventivo com os mediadores lipídicos derivados do omega-3 durante a colite induzida pelo DSS.** Animais da linhagem BALB/c receberam solução de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos de dois dias de água filtrada. Os animais foram sistemicamente tratados do dia 0 ao dia 7, uma vez ao dia, com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (0,1; 0,3 e 1 µg/animal, i.v.). Os animais do grupo controle receberam apenas solução de NaCl 0,9 %. Durante o protocolo experimental os animais foram avaliados quanto ao índice de atividade da doença e ao final de sete dias foram eutanasiados e tiveram seus cólons removidos para análise futuras.

### 3.3 Colite experimental induzida por TNBS

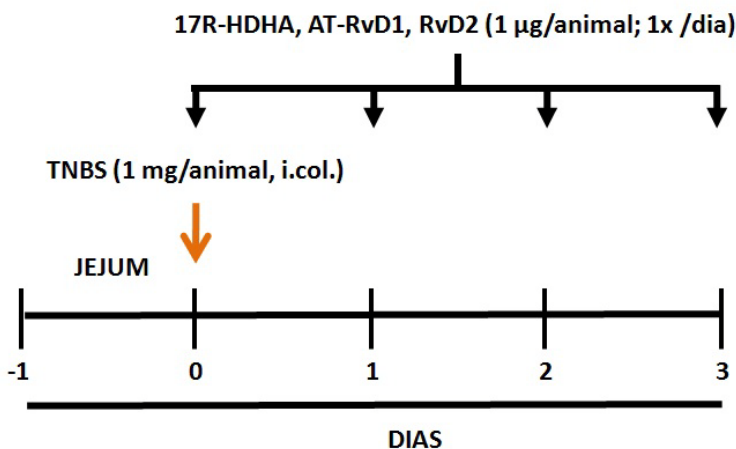
A colite experimental foi induzida conforme método descrito originalmente para ratos (Wallace et al., 1989) e modificado para camundongos (Mccafferty et al., 1999), com poucas adaptações às nossas condições experimentais (Bento et al., 2008).

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e foram mantidos em jejum sólido com livre acesso à solução de glicose 5% por 24 horas. Após o jejum sólido, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (80 mg/kg, i.p.), e a colite foi induzida através da administração intracolônica (i.col.) de 0,1 ml do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, 1 mg/animal em 35 % de etanol), utilizando-se um cateter de polietileno PE – 50 (4 cm) acoplado a uma microseringa. Os animais controle receberam 0,1 ml de uma solução de salina 0,9 %. Após a indução da colite, os animais foram mantidos, durante dois minutos na posição de Trendelenburg, isto é, em decúbito dorsal com corpo inclinado a 45 ° e cabeça posicionada abaixo do trem posterior. Decorridas 4 horas da indução, os animais tiveram livre acesso a ração e água filtrada. Durante todo o experimento, os animais foram monitorados em relação à mudança de peso corporal e taxa de sobrevivência. Os animais foram eutanasiados 72 horas (3 dias) após a indução da colite. Os cólons foram removidos e as fezes presentes retiradas. Para algumas análises, os tecidos colônicos foram

abertos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, lavados com solução salina estéril, pesados e acondicionados em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para outras, após a retirada das fezes, os cólons foram acondicionados em formaldeído tamponado a 4 % e mantidos a temperatura ambiente até seu processamento.

### 3.3.1 Tratamentos

A fim de avaliar o efeito dos mediadores lipídicos pró-resolução na colite experimental induzida por TNBS, os animais foram tratados com, AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA ( $1\ \mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v., uma vez ao dia). Os tratamentos iniciaram 30 minutos antes da instilação do TNBS (dia 0) e continuaram até o dia 3 (Figura 6). Setenta e duas horas após a indução da colite os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os animais controle receberam apenas solução salina (0,9 %), i.v.



**Figura 6. Protocolo experimental.** Após 24 horas de jejum os animais receberam por via intracolônica 0,1 mL de uma solução do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS  $1\ \text{mg}/\text{animal}$  em 35 % de etanol). Os animais controle receberam 0,1 mL de salina 0,9 %. Trinta minutos antes à instilação do TNBS foram iniciados os tratamentos. Os animais foram tratados com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA ( $1\ \mu\text{g}/\text{animal}$ ) pela via i.v. uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 3. Após 72 horas (dia 3) à indução da colite, os animais foram sacrificados e tiveram seus cólons removidos para análises posteriores.

### 3.3.2 Escore macroscópico

Após a eutanásia dos animais, a porção final do cólon foi removida, aberta longitudinalmente e cuidadosamente limpa com solução salina 0,9 %. A severidade do dano ao cólon foi avaliada usando-se a escala de dano macroscópico baseada na tabela descrita por

Wallace (1989) para ratos, mas adaptado para camundongos por McCafferty (1999) com poucas modificações para as nossas condições experimentais (Bento *et al.*, 2008) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS {Bento, 2008 #734; Wallace, 1989 #24; McCafferty, 1999 #31}.

ESCORE	PARÂMETROS
0	Ausência de danos
1	Hiperemia sem úlceras
2	Hiperemia e espessamento da parede do intestino sem a presença de úlceras.
3	Um sítio de ulceração sem espessamento da parede do intestino.
4	Dois ou mais sítios de ulceração ou inflamação.
5	0,5 cm de inflamação.
6-10	1 cm de inflamação. O escore é aumentado em 1 para cada 0,5 cm de dano observado chegando ao máximo de 10.
0 ou 1	Ausência ou presença de diarreia
0 ou 1	Ausência ou presença de estreitamento (estreitamento do lúmen dificultando a passagem das fezes).
0; 1 ou 2	Ausência ou presença de adesão média ou severa.

### 3.3.3 Escore microscópico

Após a remoção da porção distal do cólon, o tecido foi histologicamente analisado em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 X. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, EUA). Para avaliar a severidade do dano, foram analisados três cortes histológicos de amostras de cada animal, sendo que cada grupo experimental possuía no mínimo um número de quatro animais. A severidade do dano foi avaliada usando-se a escala proposta por Neurath (1995) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Grade de escores para avaliação de dano microscópico na colite induzida por TNBS (Neurath *et al.*, 1995).

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	Sem sinais de inflamação.
1	Pouca infiltração celular para o tecido.
2	Moderada infiltração celular para o tecido.
3	Grande quantidade de infiltração celular; aumento da densidade vascular; espessamento da parede do intestino.
4	Infiltração transmural; perda de células goblet.

### 3.4 Análise histológica

Ao final dos protocolos experimentais de colite induzida pelo DSS ou TNBS, a porção distal do cólon foi removida, lavada com solução salina 0,9 % estéril para a retirada das fezes, e então imediatamente fixada em solução de formaldeído 4 %. Os tecidos foram emblocados em parafina, seccionados a uma espessura de 5  $\mu\text{m}$ , transferidos para lâminas de vidro, desparafinizados e corados com o uso de hematoxilina e eosina (H&E), por empresa terceirizada (Lab OnLine, Florianópolis, SC) e analisadas em microscópio óptico, como exposto nos tópicos de escore microscópico descritos anteriormente.

### 3.5 Atividade das enzimas MPO, EPO e NAG

A migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o tecido do cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo peroxidase (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG), respectivamente. Para isso, os cólons foram removidos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7), e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi resuspenso em tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Foi adicionado então, NaCl 0,2 % gelado e após 30 segundos, NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi resuspenso em tampão 2 gelado (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB); pH 5,4), e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio

líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a  $10.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ; e  $25 \mu\text{l}$  do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO, EPO e NAG. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB)  $1,6 \text{ mM}$ ,  $\text{NaPO}_4$   $80 \text{ mM}$  e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $0,3 \text{ mM}$ . A reação enzimática para EPO foi realizada com a adição de o-fenilenediamina  $1,5 \text{ mM}$ , Tris-HCl  $0,075 \text{ mM}$  e peróxido de hidrogênio  $6,6 \text{ mM}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Finalmente, a atividade da NAG foi determinada pela adição de  $25 \mu\text{l}$  de p-nitrofenil-2-acetamida- $\beta$ -D-glucopiranosida  $2,25 \text{ mM}$  e  $100 \mu\text{l}$  de tampão citrato (pH 4,5). A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690, 490 e 405 nm para MPO, EPO e NAG respectivamente, sendo que todos os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

### 3.6 Dosagem de citocinas

Os níveis teciduais de IL- $1\beta$ , CXCL1/KC, MIP-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-12, IL-4 e TGF- $\beta$  foram avaliados como descrito anteriormente (Campos et al., 2002) com poucas modificações. Resumidamente, os cólons foram removidos e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, composição: NaCl  $137 \text{ mM}$ , KCl  $2 \text{ mM}$  e tampão fosfato  $10 \text{ mM}$ , pH 7,2-7,4) contendo Tween 20 ( $0,05 \%$ ), fluoreto de fenilmetilsulfonila  $0,1 \text{ mM}$ , cloreto de benzometônio  $0,1 \text{ mM}$ , EDTA sódico  $10 \text{ mM}$ , e aprotinina A  $2 \text{ ng/ml}$ . O homogenato foi centrifugado a  $3.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  até o momento da análise. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos como a quantidade de citocina por miligrama de proteína da amostra. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se Kits específicos de ELISA (do inglês, enzyme-linked immuno-sorbent assay), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.7 Análise imunoistoquímica

A expressão da subunidade p65 fosforilada do fator de transcrição nuclear  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  foi detectada em cortes  $5 \mu\text{m}$  de xilol confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras da porção final do cólon. Os cortes teciduais de espessura de  $5 \mu\text{m}$  foram mantidos em estufa a uma temperatura de  $70-90^\circ\text{C}$  até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados em xilol (xileno) e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol  $90 \%$ ,



etanol 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 minutos, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0. As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 minutos. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

O anticorpo primário anti-fosfo-p65 NFκB (1:50) adquirido da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA) foi diluído em solução Reinascence® (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com um polímero de detecção (PicTure™ MAX Polymer detection kit), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico (DAB). Após a revelação, foram realizadas as seguintes etapas: contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris; desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto); diafanização em xilol e montagem em Entellan®. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 x, sendo analisados todos os campos da lâmina. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Foram analisados três cortes histológicos da amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de,

no mínimo, três animais. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. Todos os grupos experimentais foram processados sob as mesmas condições experimentais. As configurações para aquisição das imagens foram idênticas para todos os tecidos. As imagens foram transferidas para um computador onde a intensidade da coloração dos pixels para a fosfo-p65 NFκB foi calculada para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

### **3.8 Extração do RNA total**

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos pelo kit SV Total RNA Isolation System Z3100 (Prômega, Madison, WI, EUA), Para isso, 70 -100 mg de tecido foram homogeneizados com 175 µl de RNA Lysis Buffer, com auxílio de homogeneizador portátil, em tubo de centrifuga de 5 ml de capacidade. Ao lisado obtido, foram adicionados 350 µl de RNA dilution buffer e as amostras foram incubadas a 70°C por 3 minutos, seguindo centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes contendo o RNA total foram transferidos para novo tubo de microcentrifuga (1,5 ml) contendo 200 µl de etanol 95 % (Merk, Alemanha). Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma coluna de filtração e foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. O RNA total retido no filtro foi lavado com 600 µl de RNA wash solution. Após centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto, foi adicionado diretamente sobre as membranas das colunas de filtração o mix de DNase contendo: 40 µl de yellow core buffer, 5 µl de MnCl<sub>2</sub> 0,09 M e 5 µl de DNase I enzyme, seguindo incubação por 15 minutos a 25 °C. Foram então adicionados 200 µl de DNase stop solution sobre as membranas e as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. Novamente, as membranas foram lavadas com 600 µl de RNA wash solution e centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto. As colunas foram então transferidas para novos tubos de microcentrifuga e o RNA total foi eluído com 100 µl de água livre de nucleases, com centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Alemanha). O RNA foi aliquotado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### 3.9 Confeção do DNA complementar (reação de transcrição reversa)

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador para o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), molécula de adesão vascular -1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), Integrina  $\beta$ 2 (LFA-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), sintase do óxido nítrico 2 (NOS2), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$ , quimiocina derivada de queratinócitos (CXCL1/KC), IL-17, IL-10, fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), receptor de lipoxina A4 (ALX/FPR2), fator de transcrição FoxP3 e proteína CD25, no cólon de camundongos, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para a reação da transcrição reversa, as amostras contendo 100 ng de RNA total foram incubadas com 1  $\mu$ l de oligo dT 15, 1  $\mu$ l do mix de dNTP (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12  $\mu$ l. Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65 °C, resfriadas por 5 minutos a 4 °C e acrescidas de 4  $\mu$ l de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2  $\mu$ l de DTT 0,1 mM, e 1  $\mu$ l de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37 °C por 2 minutos e a enzima M-MLV (1  $\mu$ l, 200 U) adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 minutos e a inativação da reação foi realizada por incubação a 75 °C por 15 minutos. O DNA complementar (DNAc) foi estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

### 3.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com sondas e probes específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para o NF $\kappa$ B (Mm00476361\_m1), VCAM-1 (Mm01320970\_m1), ICAM-1 (Mm00516024\_g1), LFA-1 (Mm01278854\_m1), COX-2 (Mm01307334\_g1), NOS2 (Mm01309898\_m1), TNF- $\alpha$  (Mm00443258\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm01336189\_m1), CXCL1/KC (Mm00433859\_m1), IL-17 (Mm00439618\_m1), IL-10 (Mm00439614\_m1), TGF- $\beta$  (Mm01178820\_m1), ALX/FPR2 (Mm00484464\_s1), FoxP3 (Mm00475165\_m1) e CD25 (Mm01340213\_m1), e marcação MGB e VIC para o GAPDH (NM\_008084.2), o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1  $\mu$ l de DNAc, 5  $\mu$ l de master mix, 0,5  $\mu$ l de primer e 3,5  $\mu$ l de água ultrapura, em um volume final de 10  $\mu$ l. As amplificações

foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 50 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método 2- $\square\square$  Ct para a quantificação relativa.

### **3.11 Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea**

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos da linhagem BALB/c foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e tiveram seus fêmures e as tíbias extraídos. A extremidade proximal e distal destes ossos foi seccionada e injetada com 3 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) sem soro em cada osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1.000 r.p.m. por 10 minutos, e o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml/por animal de suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO) e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70  $\mu$ m (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram ressuspensionadas em 2 ml de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 6 poços na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> células/poço. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 20% de sobrenadante de cultura de L929 filtrado (LCCM, L929 cell conditioned medium), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas foram então incubadas a 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Quatro dias após o plaqueamento das células, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também 20% de LCCM.

### **3.12 Estimulação, incubação e coleta dos macrófagos derivados da medula óssea**

Dez dias após o plaqueamento das células, os macrófagos foram isolados e incubados em placa de 96 poços 2 x 10<sup>5</sup> células/poço a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub> e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (1  $\mu$ g/ml) por 24 horas, na presença ou ausência de, AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço). Adicionalmente, as células com ou sem estimulação com LPS foram incubadas apenas com BOC-1 (antagonista seletivo do receptor ALX/FPR2, 10  $\mu$ M/poço), ou 30 minutos antes da incubação com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço). Vinte

e quatro horas após a incubação as placas foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos, e os sobrenadantes resultantes foram congelados a -70 °C para posterior dosagem de citocinas.

As citocinas IL-6, proteína quimioatrante de monócitos 1 (MCP-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  foram dosadas pelo Kit Bead Array Mouse Inflammation, através da quantificação usando o citometro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As análises foram realizadas utilizando FCAP Array Soft Flow USA (BD Biosciences). As células aderentes foram coletadas para a realização de PCR em tempo real para COX-2 e NOS2 como descrito anteriormente.

### **3.13 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares**

Os cólons foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e então homogeneizados em tampão contendo HEPES 10 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 10 mM, fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) 1 mM, leupeptina 1 mg/ml, pepstatina A 1 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, ortovanadato de sódio 1 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, fluoreto de sódio 50 mM e ditiotreitól 0,5 mM. Após a centrifugação (14.000 x g/1 h), o sobrenadante contendo a fração citosólica foi coletado e acondicionado em freezer -70 °C para posterior análise. Para a extração da fração nuclear, o pellet foi resuspenso em tampão (HEPES 20 mM, pH 7,8, NaCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25 %, PMSF 0,5 mM, DTT 0,5 mM, aprotinina 1  $\mu$ g/ml, leupeptina 1  $\mu$ g/ml e pepstatina A 1  $\mu$ g/ml) por 30 minutos em gelo e centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos. As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método Bradford (Bradford, 1976). Os extratos foram congelados em freezer -70 °C para posterior análise.

### **3.14 Western blot**

As amostras de proteínas (35  $\mu$ g) foram adicionadas ao tampão contendo; Tris 200 mM, glicerol 10 %, SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04 % e, em seguida, foram fervidas durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de acrilamida 10 % e eletrotransferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, a fim de evitar ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas inicialmente com leite desnatado diluído em TBS (Tris buffered saline) overnight a 4 °C e então foram lavadas com TBS e Tween-20 a 5 % (TBST), por três vezes durante 5 minutos cada. Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos para as proteínas de interesse: anti-p-IkBa, anti-p-p65, anti-lamin A/C

(1:200, todos adquiridos da Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA), e anti- $\beta$ -tubulin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST por três vezes de 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:800 por 1 h. As membranas foram novamente lavadas com TBST e então incubadas com streptavidina por 30 minutos. A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunoreativas foram visualizadas utilizando-se kit de aumento de quimioluminescência e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

### **3.15 Quantificação de linfócitos por citometria de fluxo**

Os linfonodos mesentéricos de animais com colite induzida pelo DSS (5, 10, 15, 20 e 30 dias) foram removidos e macerados com PBS gelado em 1% de BSA, e posteriormente filtrados em separadores de nylon com malha de 70  $\mu$ m (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), para a remoção de detritos. As células foram quantificadas e posteriormente repicadas em placas de 96 poços (1x10<sup>6</sup> células por poço), em seguida foram incubadas com anticorpos específicos contra proteínas presentes na superfície de linfócitos: anti-CD4-APC (eBioscience, San Diego, CA, EUA), anti-CD8-FITC (BD Biosciences), e o marcador de ativação celular anti-CD25-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os anticorpos foram incubados por 30 minutos no escuro a 4 oC, em seguida a placa foi centrifugada a 1.500 r.p.m. por 10 minutos a 4 oC e o sobrenadante foi descartado, em seguida as células foram ressuspensas em paraformaldeído 1% para fixação das células aos anticorpos. Os dados foram analisados utilizando citometro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e os resultados foram analisados através do programa FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EUA).

### **3.16 Drogas e reagentes**

O DSS (P.M. 36.000–50.000) e BOC-1 foram adquiridos da MP Biomedicals (Solon, OH, EUA). Os anticorpos monoclonais anti-anti-fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-fosfo-p65, anti-lamin A/C para camundongo foram obtidos da Cell Signaling Technology, Inc., (Beverly, MA, EUA), e anti- $\beta$ -tubulin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo secundário Ab EnVision Plus, estreptavidina-HRP, e 3,39-diaminobenzidina foram adquiridos da DakoCytomation (Carpinteria, CA, EUA). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tween 20,

Tween 80, EDTA, aprotinina, PBS, H&E, tetrametilbenzidina (TMB), 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e lipopolissacarídeo (LPS) (sorotipo 0111:B4) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os Kits para a dosagem de IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC, MIP-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-12, IL-4 e TGF- $\beta$  foram provenientes da R&D systems (Minneapolis, EUA). O Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), o Azul de Trypan, o soro fetal bovino, água ultrapura a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas da GIBCO BRL Life technologies (Gaithersburg, MD, EUA). A enzima transcriptase reversa, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), o oligo dT 15, os deoxinucleotídeos (dNTPs), o tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa, o inibidor de RNase (RNasin) e o dietiltreitol (DTT), foram procedentes da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

O kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, a placa de reação óptica de 96 poços, os primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os NF- $\kappa$ B (Mm00476361\_m1), VCAM-1 (Mm01320970\_m1), ICAM-1 (Mm00516024\_g1), LFA-1 (Mm01278854\_m1), COX-2 (Mm01307334\_g1), NOS2 (Mm01309898\_m1), TNF- $\alpha$  (Mm00443258\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm01336189\_m1), CXCL1/KC (Mm00433859\_m1), IL-17 (Mm00439618\_m1), IL-10 (Mm00439614\_m1), TGF- $\beta$  (Mm01178820\_m1), PPAR $\gamma$  (Mm00440940\_m1), ALX/FPR2 (Mm00484464\_s1), FoxP3 (Mm00475165\_m1), CD25 (Mm01340213\_m1) e GAPDH (NM\_008084.2) foram todos procedentes da Applied Biosystems (São Paulo, SP, Brasil).

O DAB, o entellan®, o formaldeído e a hematoxicilina de Harris foram adquiridos da Merck, (Darmstadt, Alemanha), o reagente de Bradford foram provenientes da Bio-Lab Laboratories (Richmond, VA, EUA); a quetamina da Sespo (São Paulo, SP, Brasil); a xilazina da Vetbrands (São Paulo, Brasil) e o xilol da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). O corante Diffquick foi adquirido da Laborclin (Pinhais, PR, Brasil). O anticorpo para citometria de fluxo anti-CD4-APC foi adquirido da eBioscience (San Diego, CA, EUA), e os anticorpos anti-CD8-FITC, anti-CD69-PE, e o Bead Array Mouse Inflammation para dosagem de IL-6, MCP-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram adquiridos da (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

### **3.17 Análise estatística**

Todos os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística dos dados não paramétricos foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para dados paramétricos com dois grupos foi utilizado o teste t não pareado. A análise estatística entre mais de 2 grupos foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste Student Newman-Keuls. Para os grupos com mais de duas variáveis foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software Graphpad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

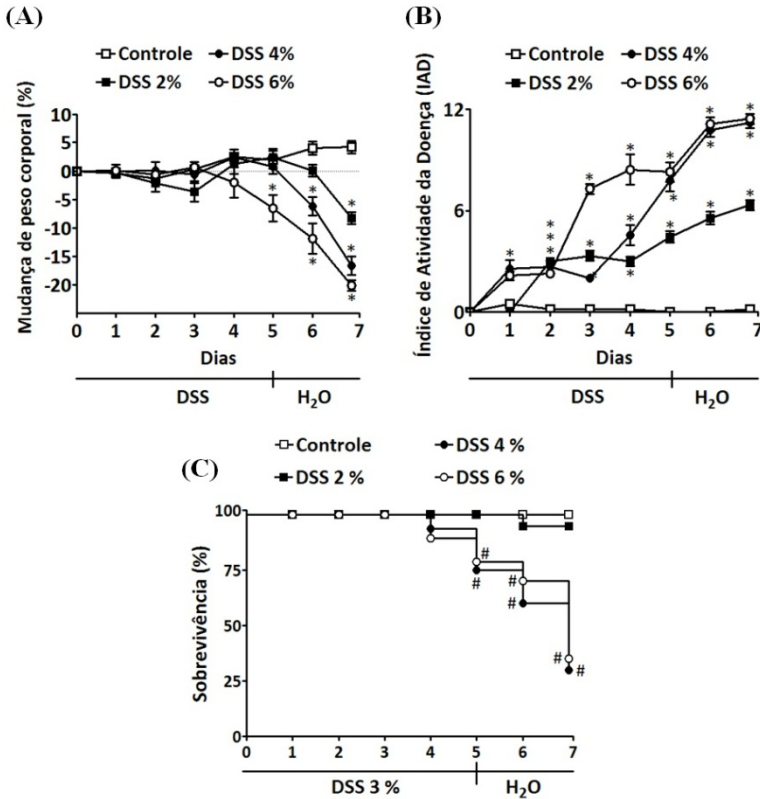


## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo DSS**

#### **4.1.1 Padronização do modelo de colite experimental induzida pelo DSS em camundongos**

Inicialmente uma série de experimentos foi realizada com o objetivo de padronizar uma dose efetiva e funcional de DSS aplicada a camundongos da linhagem BALB/c. Como descrito anteriormente, o DSS foi oferecido através de solução na água de beber dos animais, nas concentrações de 2, 4 e 6 %. Como detalhado anteriormente, o protocolo experimental consistiu na administração de DSS por um período de cinco dias seguidos por dois dias de oferta de água filtrada. Esse protocolo experimental teve como objetivo a determinação de uma dose de DSS capaz de induzir colite experimental sem interferir, de forma significativa, na sobrevida dos animais, fator este determinante para a realização de ciclos adicionais de DSS. Como pode ser observado na figura 7 A, a administração de DSS (2-6 %) durante cinco dias, causou perda gradativa do peso corporal dos animais, sendo que as doses de 4 e 6 % apresentaram perda de peso significativa a partir do quinto e quarto dias, respectivamente. Além disso, a perda de peso corporal foi acompanhada de diarreia e presença de sangue nas fezes, sintomas os quais podem ser observados pela somatória de escores representados pelo índice de atividade da doença (IAD) (Figura 7 B). Todas as doses avaliadas (2-6 %) foram capazes de induzir colite experimental, ressaltando que as doses de 4 e 6 % chegaram ao final da avaliação com um escore máximo de 12 (doze), as quais causaram sintomas de colite experimental severa, levando cerca de 70 % dos animais a morte (Figura 7 C).

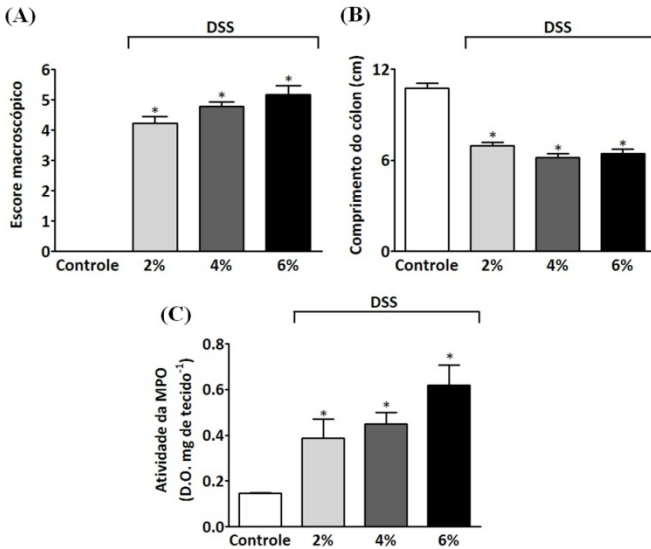


**Figura 7. Peso corporal, índice de atividade da doença e sobrevivência na colite induzida pelo DSS.** Durante sete dias os animais foram monitorados quanto a mudança de peso corporal, índice de atividade da doença e taxa de sobrevivência. Os animais receberam DSS (2-6 %) na água de beber durante cinco dias. Após esse período o DSS foi retirado e então foi oferecida água filtrada por dois dias. (A) Todas as doses de DSS foram capazes de reduzir de forma significativa o peso corporal dos animais em relação ao peso basal (dia 0). (B) Apresentação do IAD das diferentes doses de DSS avaliadas. As doses de 4 e 6 % atingiram um escore máximo de 12 ao final de sete dias, indicando alto grau de severidade da colite experimental. A dose de 2% apresentou aumento gradativo do IAD de forma consistente e moderada. (C) Taxa de sobrevivência apresentando alto índice de mortalidade nos grupos tratados com DSS 4 e 6 %. Os resultados representam a média de 6-10 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni).

Além dos parâmetros sintomatológicos observados, os colóns dos animais dos diferentes grupos experimentais foram avaliados quanto ao dano macroscópico, tamanho do cólon e atividade da enzima MPO.

A figura 8 A apresenta o escore macroscópico do cólon, o qual considera parâmetros como lesões epiteliais, espessamento e pontos de ulceração no epitélio intestinal colônico. Os resultados demonstraram que todas as doses de DSS (2-6 %) foram eficazes na indução da lesão tecidual colônica, bem como no encurtamento do tamanho do cólon (Figura 8 A e B). Ademais, a infiltração de células polimorfonucleares (PMN) para o cólon foi mensurada indiretamente através da atividade da enzima MPO. Como demonstrado na figura 8 C, a administração de DSS (2-6 %) provocou aumento significativo na atividade da MPO quando avaliados sete dias após o início do tratamento com DSS, indicando a presença de PMN, sobretudo neutrófilos, no epitélio intestinal dos animais com colite experimental.

Diante dos achados, concluiu-se que as doses de DSS de 4 e 6 % foram capazes de induzir colite de forma severa e consistente; entretanto ao final de sete dias de protocolo experimental poucos animais sobreviveram ao regime de DSS. Por essa razão, optou-se pela escolha da dose 2 % para a realização de experimentos futuros, pois a mesma demonstrou ser eficaz na indução de todos os parâmetros clássicos da colite induzida pelo DSS, além de não interferir com a sobrevivência dos animais na fase aguda desse modelo.

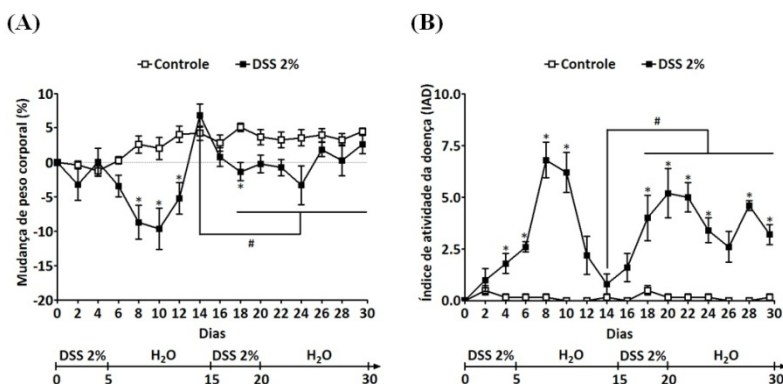


**Figura 8. Dano colônico e atividade da MPO na colite induzida pelo DSS.** Sete dias após o início do tratamento com DSS os animais foram sacrificados e tiveram seus cólons removidos para análises de escore macroscópico, comprimento do cólon e atividade da MPO. (A) O dano macroscópico foi significativamente maior em todas as doses de DSS avaliadas em relação ao grupo controle. (B) Como característica clássica do modelo de colite induzida pelo DSS os animais apresentaram redução no comprimento do cólon após o regime de DSS (2-6 %). (C) A atividade da MPO, a qual é um indicativo indireto da migração de neutrófilos, foi significativamente maior em todos os grupos que receberam DSS, quando comparado ao grupo controle. Os resultados representam a média de 6-10 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.1.2 Severidade da doença durante as fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS

Após a caracterização das diferentes doses de DSS (2-6 %), foi definida a utilização da dose de DSS 2 % para a realização de ciclos adicionais de DSS, como descrito no tópico anterior. Como exposto na seção de matérias e métodos, os animais foram submetidos a um regime de DSS 2 % durante cinco dias (ciclo 1), ao final desse ciclo o DSS foi removido e os animais permaneceram 10 dias recebendo água filtrada. Após esse período, os animais foram submetidos a um novo ciclo de DSS por cinco dias (ciclo 2), e subsequentemente foram submetidos a mais uma fase de 10 dias de recuperação com água filtrada. Como pode ser observado na figura 9 A, os animais apresentaram redução significativa do peso corporal no primeiro ciclo de DSS 2 %, o qual

retornou gradativamente aos índices basais após o período de recuperação com água filtrada. Após o segundo ciclo de DSS 2 % os animais voltaram a apresentar perda de peso significativa, a qual não retornou ao índice adquirido ao final da primeira fase de recuperação, mesmo 10 dias após o cessar do tratamento com DSS (Figura 9 A). De forma semelhante, o IAD aumentou de forma marcante após o primeiro ciclo de DSS 2 %; entretanto, esse parâmetro foi reduzido significativamente ao final da fase de recuperação (Figura 9 B). Após a indução do segundo ciclo de DSS, os animais voltaram a apresentar aumento na atividade da doença, a qual permaneceu significativamente elevada em relação ao grupo controle e 14º dia, até o final da segunda fase de recuperação (30º dia), indicando possível cronificação da inflamação intestinal. É importante ressaltar, que apenas no 26º dia não houve diferença significativa entre o grupo controle ou 14º dia e o grupo DSS.

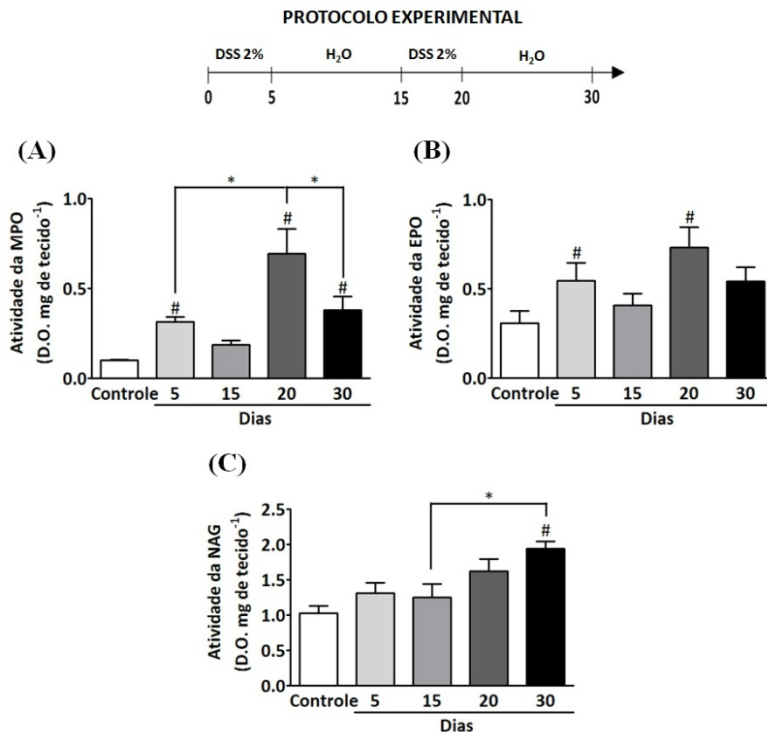


**Figura 9. Peso corporal e índice de atividade da doença nas fases aguda e crônica da doença na colite induzida pelo DSS.** Os animais foram submetidos a dois ciclos de DSS 2 %, sendo o primeiro do dia 0 ao dia 5, e o segundo do dia 15 ao dia 20. Os períodos de recuperação correspondem ao tratamento com água filtrada (H<sub>2</sub>O) do dia 5 ao dia 15, e do dia 20 ao dia 30. (A) A solução de DSS 2 % causou perda de peso corporal no primeiro ciclo de DSS, o qual retornou aos níveis basais após o período de recuperação. Após o segundo ciclo de DSS foi observado novamente a perda de peso corporal, a qual não retornou aos valores observados ao final da primeira fase de recuperação. (B) Semelhante aos resultados do painel A, ocorreu aumento do IAD no primeiro ciclo de DSS, o qual foi atenuado após a primeira fase de recuperação. Após o segundo ciclo de DSS houve aumento do IAD, o qual permaneceu significativamente diferente em relação ao final do primeiro período de recuperação e aos animais do grupo controle. Os resultados representam a média de 6-10 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; #  $p < 0,05$  quando comparado ao 14º dia (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni).

### 4.1.3 Migração celular durante a colite induzida pelo DSS

Com o objetivo de estudar as populações celulares de linhagem mielóide nas fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS, realizou-se as medidas das atividades enzimáticas para MPO, EPO e NAG, para determinar indiretamente as populações de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, respectivamente. Como demonstrado na figura 10 A, cinco dias após o início do tratamento com DSS 2 %, a atividade da MPO aumentou, de forma significativa, em comparação ao grupo controle. Após a primeira fase de recuperação, os níveis de MPO não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Entretanto, ao final do segundo ciclo de DSS, ocorreu aumento marcante na atividade da MPO, a qual diferiu significativamente do grupo controle e dos resultados obtidos do primeiro ciclo de DSS, indicando agravamento da migração de neutrófilos para o tecido colônico. Ademais, ao final de 30 dias, os cólons dos animais com colite experimental apresentaram aumento significativo da atividade da MPO em relação ao grupo controle, sugerindo a cronificação da inflamação intestinal ou possíveis falhas no processo de resolução da inflamação.

De modo semelhante, foi observado aumento significativo para a atividade da enzima EPO ao final do primeiro e segundo ciclo de DSS, quando comparado ao grupo controle, evidenciando a participação de eosinófilos principalmente nas fases de surto (ciclo 1 e 2) da colite experimental induzida pelo DSS (Figura 10 B). Por outro lado, nas fases de recuperação (5-15 e 20-30 dias), não foi observado nenhuma diferença importante nos níveis teciduais da enzima EPO. Interessantemente, e de forma diferente dos resultados observados para as atividades das enzimas MPO e EPO, não foi verificado aumento na atividade da NAG após o primeiro e segundo ciclos de DSS, sendo este aumento observado apenas 30 dias após o início do tratamento com DSS (segunda fase de recuperação). Esse dado sugere que células mononucleares parecem ter participação significativa principalmente em estágios crônicos da colite induzida pelo DSS (Figura 10 C).



**Figura 10. Atividade das enzimas MPO, EPO e NAG nas fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS.** A infiltração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o tecido do cólon foram indiretamente avaliadas pela medida das atividades das enzimas MPO, EPO e NAG, respectivamente. (A) A atividade da MPO apresentou aumento após o primeiro e segundo ciclo de DSS, o qual continuou significativo ao final de 30 dias de protocolo experimental. (B) A enzima EPO apresentou níveis elevados, ao final de cinco (5) e vinte (20) dias da colite induzida pelo DSS, a qual caracteriza os pontos finais de dois ciclos de DSS. (C) A atividade da NAG apresentou aumento apenas 30 dias após o início do tratamento com DSS. Os resultados representam a média de 6-10 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

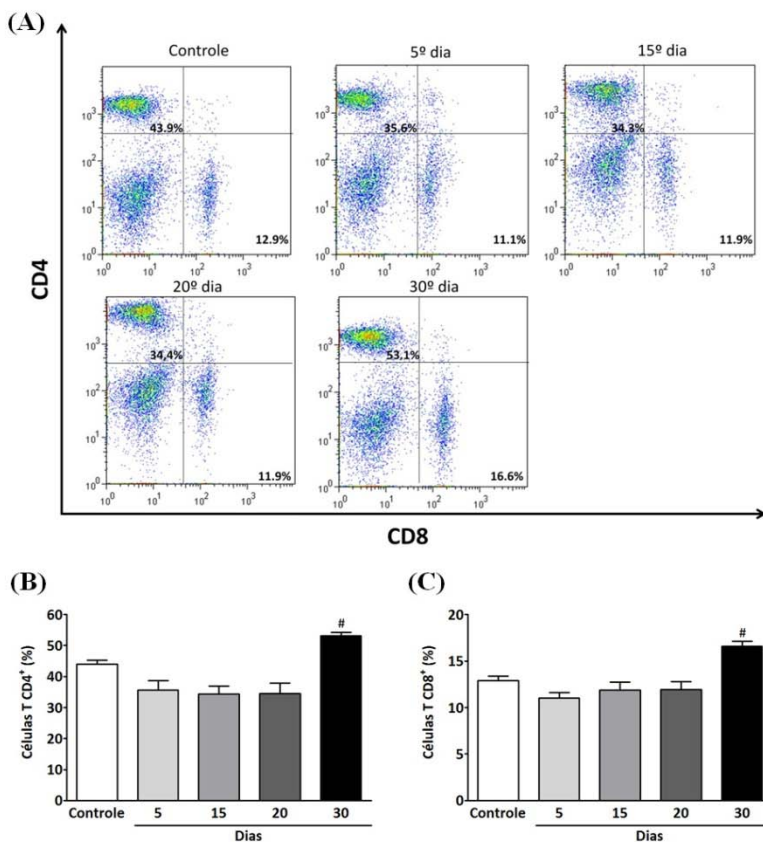
Além da medida indireta de migração de células de linhagem mielóide, foi realizada a quantificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> por citometria de fluxo, nos linfonodos mesentéricos dos animais com colite induzida pelo DSS. Os animais foram sacrificados nos dias 5, 15, 20 ou 30, como descrito anteriormente, e tiveram os linfonodos mesentéricos removidos para análise. A figura 11 A apresenta a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos diferentes grupos experimentais. Nota-se

que apenas 30 dias após o início do protocolo experimental, foi possível verificar aumento significativo da população de linfócitos T CD4+ e CD8+. A quantificação desses resultados demonstrou que de fato, ocorreu aumento de células T CD4+ e CD8+ ao final da segunda fase de recuperação (30º dia), sugerindo envolvimento dessas células inflamatórias nas fases tardias do modelo de colite induzida pelo DSS (Figura 11 B e C).

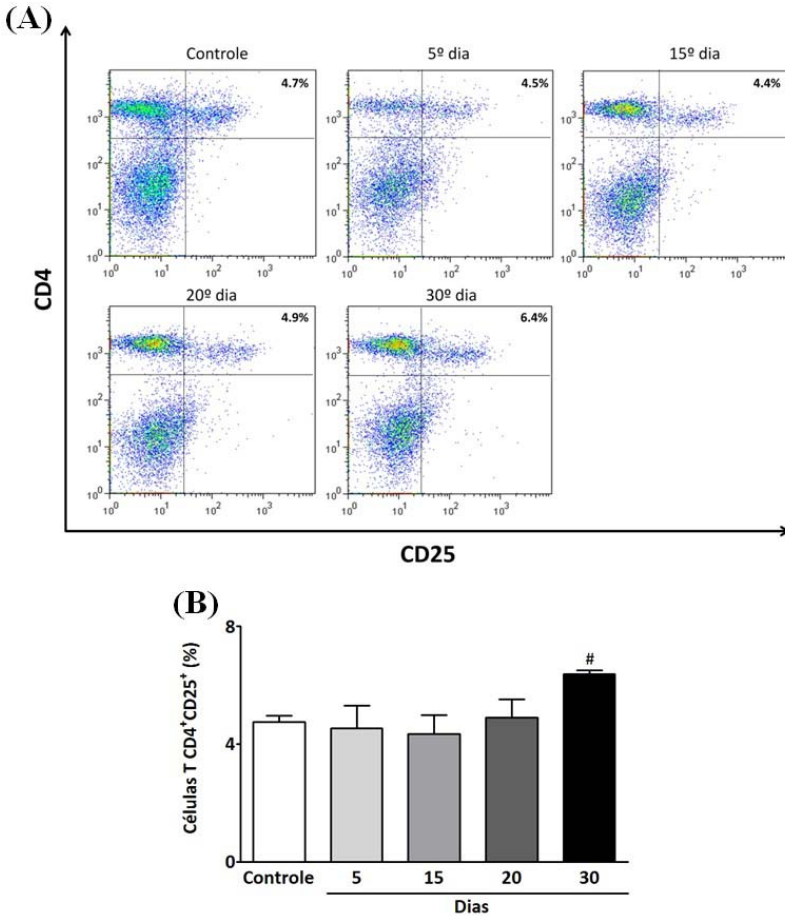
Além disso, a fim de verificar a população de linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados, ou seja, com co-expressão do marcador celular CD25, foi realizada a dupla marcação para células T CD4+CD25+ e CD8+CD25+, entre os diferentes grupos experimentais como exposto anteriormente. Como pode ser observado na figura 12 A e B, a população de linfócitos T CD4+ encontra-se ativada significativamente apenas 30 dias após o início da indução da colite, ou seja, quando a população dessas células encontra-se elevada no linfonodo mesentérico.

Diferentemente dos resultados encontrados na quantificação de linfócitos T CD4+CD25+, a marcação de linfócitos T CD8+CD25+ demonstrou que, mesmo ocorrendo aumento de células T CD8+ 30 dias após o início da indução da colite (Figura 11 C), essas células não se encontram ativadas (Figura 13 A e B). A quantificação da população celular demonstrou que os linfócitos T CD8+CD25+ não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 13 B).

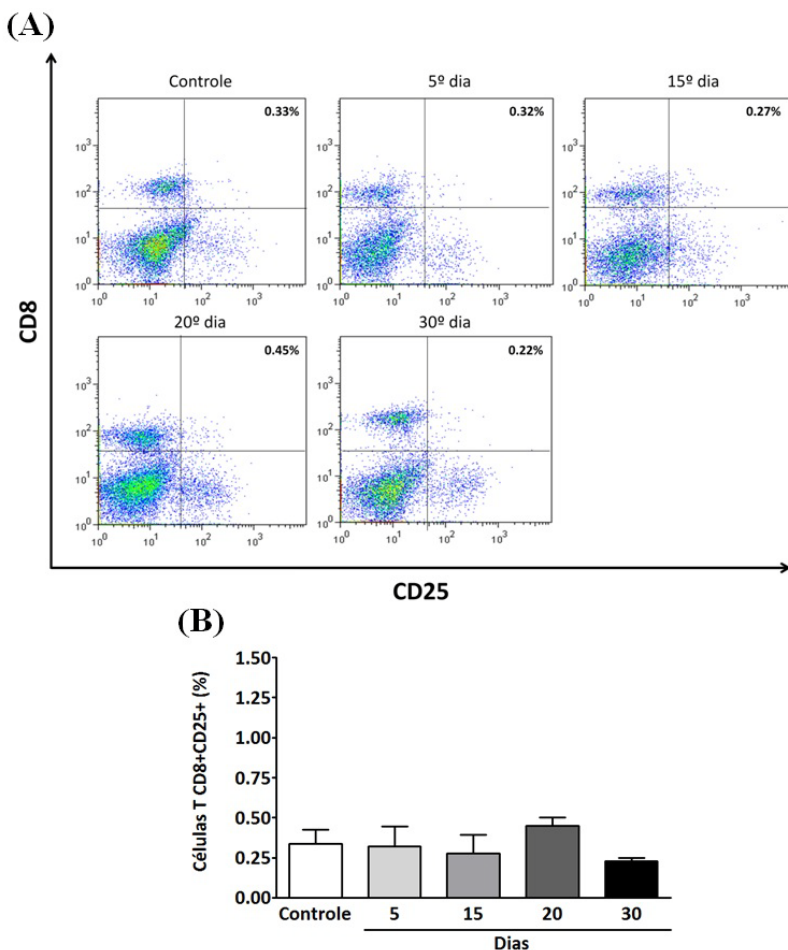




**Figura 11. População de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** Os animais tiveram o linfonodo mesentérico removido nos períodos de 5, 15, 20 e 30 dias, de acordo com o protocolo experimental exposto na seção de materiais e métodos e figura 10. (A) Apresentação da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (eixo y) e T CD8<sup>+</sup> (eixo x). (B) Quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no diferentes períodos de tempo, onde pode ser observado aumento significativo desta população celular 30 dias após o início do protocolo experimental. (C) Quantificação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no diferentes períodos de tempo, onde pode ser observado aumento significativo desta população celular 30 dias após o início do protocolo experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).



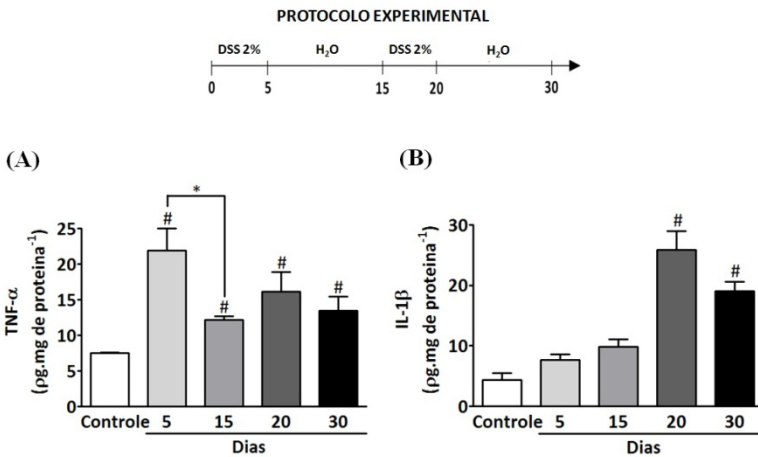
**Figura 12. População de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** Os animais tiveram o linfonodo mesentérico removido nos períodos de 5, 15, 20 e 30 dias, de acordo com o protocolo experimental exposto na seção de materiais e métodos e figura 10. (A) Apresentação da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (eixo y) e CD25<sup>+</sup> (eixo x). (B) Quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no diferentes períodos de tempo, onde pode ser observado aumento significativo da ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> 30 dias após o início do protocolo experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. # p<0,05 quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).



**Figura 13. População de linfócitos T CD8+CD25+ no linfonodo mesentérico de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** Os animais tiveram o linfonodo mesentérico removido nos períodos de 5, 15, 20 e 30 dias, de acordo com o protocolo experimental exposto na seção de materiais e métodos e figura 10. (A) Apresentação da população de linfócitos T CD8+ (eixo y) e CD25+ (eixo x). (B) Quantificação dos linfócitos T CD8+CD25+ no diferentes períodos de tempo, onde não foi observado aumento significativo da ativação dos linfócitos T CD8+ entre nenhum dos grupos avaliados. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

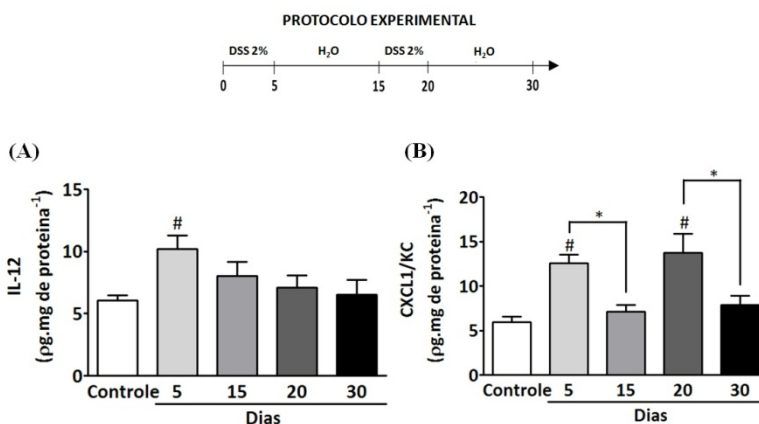
#### 4.1.4 Produção de citocinas durante as fases aguda e crônica da colite induzida pelo DSS

Com o objetivo de avaliar quais mediadores inflamatórios estão sendo produzidos e liberados durante as diferentes fases da colite induzida pelo DSS, os cólons dos animais foram removidos ao final de cada fase (0-5; 5-15; 15-20; 20-30), como descrito na seção de materiais e métodos, e procedeu-se a quantificação de citocinas no tecido colônico através da técnica de ELISA. A quantificação para os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  apresentou aumento significativo em todas as fases analisadas, quando comparada ao grupo controle, sendo que este aumento foi mais pronunciado na fase aguda da colite experimental (5<sup>o</sup> dia) (Figura 14 A). Por outro lado, a figura 14 B indica que os níveis colônicos da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  encontram-se aumentados de forma significativa, em relação ao grupo controle após o segundo ciclo de DSS 2 %, o qual permaneceu elevado ao final da segunda fase de recuperação, sugerindo seu possível papel na cronificação da inflamação intestinal.



**Figura 14. Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em ótons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação dos níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi realizada no tecido do cólon através da técnica de ELISA. (A) Os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  apresentaram aumento significativo em todos os dias analisados, sobretudo cinco dias após o início do tratamento com DSS 2 %. (B) A quantificação colônica de IL-1 $\beta$  apresentou aumento marcante 20 e 30 dias após o início do protocolo experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

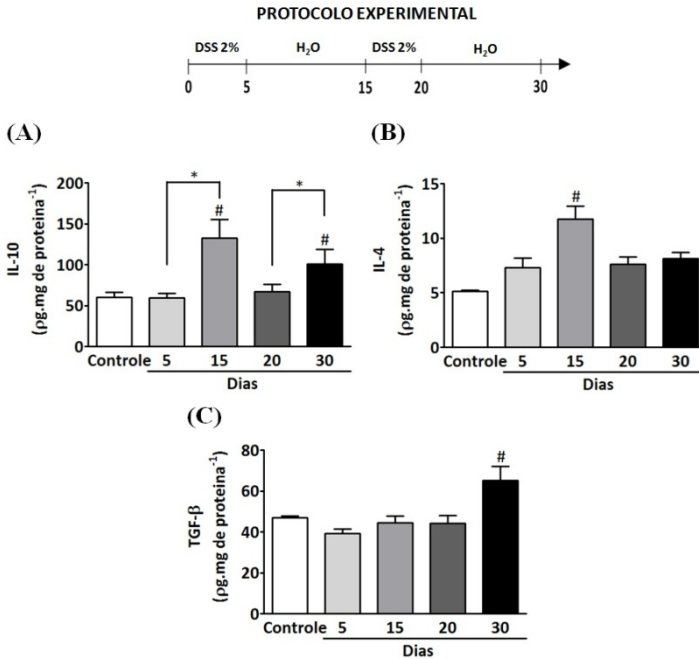
Os níveis teciduais da citocina pró-inflamatória IL-12 e da quimiocina CXCL1/KC também foram quantificados nos tempos anteriormente citados, de acordo com o protocolo experimental. A figura 15 A apresenta a quantificação para IL-12, a qual apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle somente cinco dias após o início da administração de DSS 2 %. De forma interessante, a citocina quimiotática para neutrófilos CXCL1/KC, teve seus níveis elevados significativamente ao final dos dois ciclos de DSS (5° e 20° dias) (Figura 15 B). Além disso, foi observado que após as duas fases de recuperação (15° e 30° dias), os níveis teciduais retornaram aos índices encontrados em animais controle.



**Figura 15. Dosagem de IL-12 e CXCL1/KC em colons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação dos níveis teciduais de IL-12 e CXCL1/KC foi realizada no tecido do cólon através da técnica de ELISA. (A) Os níveis teciduais de IL-12 apresentaram aumento significativo apenas cinco dias após o início do tratamento com DSS 2 %. (B) A quantificação colônica de CXCL1/KC apresentou aumento significativo em 5 e 20 dias após o início do protocolo experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Adicionalmente, os níveis teciduais para as citocinas antiinflamatórias IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  foram quantificados no tecido colônico dos animais. Diferentemente do observado para as citocinas pró-inflamatórias, houve aumento significativo na produção de IL-10 ao final das duas fases de recuperação (15° e 30° dias), o qual não foi observado no primeiro e segundo ciclos de DSS 2 %, quando comparado ao grupo controle (Figura 16 A). A figura 16 B mostra o aumento nos níveis de IL-4 quinze dias após o início do protocolo experimental, mas

não nos outros períodos avaliados, em relação ao grupo controle. Por fim, a quantificação para o TGF- $\beta$  apresentou aumento somente 30 dias após o início do protocolo experimental (Figura 16 C), sugerindo sua maior relevância durante a fase crônica da colite experimental induzida pelo DSS.

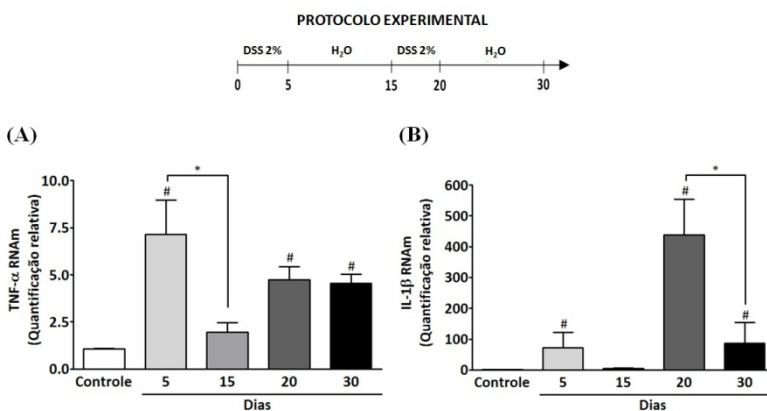


**Figura 16. Dosagem de IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação dos níveis teciduais de IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  foi realizada no tecido do cõlon através da técnica de ELISA. (A) Os níveis teciduais de IL-10 apresentaram aumento significativo ao final das fases de recuperação. (B) A quantificação colônica de IL-4 apresentou aumento significativo 15 dias após o início do protocolo experimental (1<sup>o</sup> fase de recuperação). (C) Os níveis teciduais de TGF- $\beta$  apresentaram aumento significativo no cõlon dos animais 30 dias após o início do tratamento com DSS. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.1.5 Expressão do RNAm para alguns mediadores inflamatórios durante a colite induzida pelo DSS em camundongos

Nessa etapa experimental, foi realizado um mapeamento de alguns mediadores inflamatórios, receptores e moléculas importantes para o processo de inflamação intestinal durante as diferentes fases da

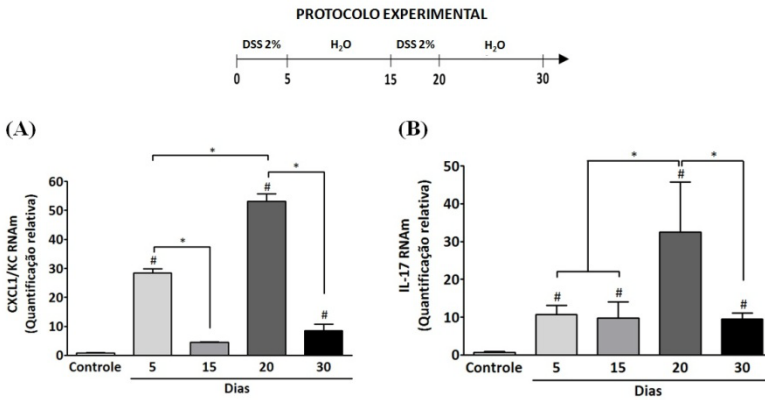
colite experimental induzida pelo DSS. O RNAm foi extraído do tecido do cólon dos animais, os quais foram coletados como descrito anteriormente e de acordo com protocolo experimental apresentado na figura 17. A expressão do RNAm para a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  apresentou aumento expressivo cinco dias após o início do protocolo experimental, o qual foi reduzido significativamente após a primeira fase de recuperação (Figura 17 A). Entretanto, após o segundo ciclo de DSS 2 % ocorreu novamente aumento da expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo controle. Além disso, foi observado aumento na expressão do RNAm para a citocina IL-1 $\beta$  cinco dias após o início do tratamento com DSS, o qual foi reduzido na primeira fase de recuperação. Entretanto, ocorreu aumento marcante do RNAm para a IL-1 $\beta$  ao final do segundo ciclo de DSS (Figura 17 B), processo que permaneceu significativamente maior que o nível detectado no grupo controle mesmo após a segunda fase de recuperação.



**Figura 17. Expressão do RNAm para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi realizada no tecido do cólon através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para TNF- $\alpha$  apresentou aumento significativo nos períodos de 5, 20 e 30 dias após o início do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica do RNAm para IL-1 $\beta$  apresentou aumento significativo também em 5, 20 e 30 dias após o início do protocolo experimental, porém com maior ênfase após o segundo ciclo de DSS. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

A expressão do RNAm para a quimiocina CXCL1/KC e para a citocina IL-17 também foi quantificada no tecido colônico durante a

colite experimental. A expressão do RNAm para a CXCL1/KC encontrou-se elevada, de forma significativa, em relação ao grupo controle, nos dias 5, 20 e 30 após a indução da colite (Figura 18 A). Notavelmente, a expressão do RNAm para a CXCL1/KC após o segundo ciclo de DSS apresentou aumento marcante e significativamente diferente de todos os demais períodos avaliados. Além disso, foi observado aumento significativo na expressão do RNAm para a citocina IL-17 em todos os períodos avaliados, e de forma semelhante à CXCL1/KC, demonstrou aumento expressivo ao final do segundo ciclo de DSS (Figura 18 B).

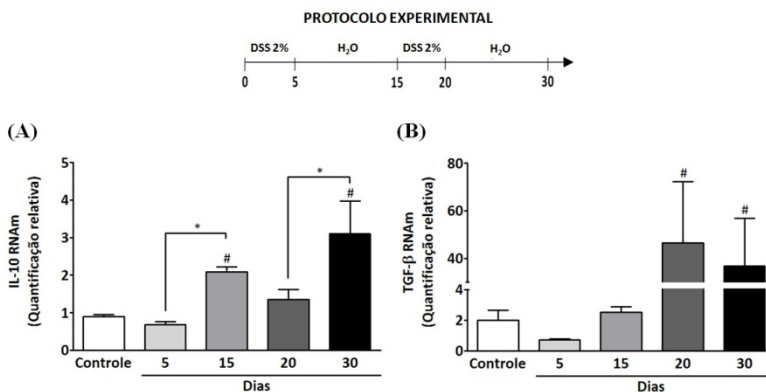


**Figura 18. Expressão do RNAm para CXCL1/KC e IL-17 em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para CXCL1/KC e IL-17 foi realizada no tecido do cólon através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para CXCL1/KC apresentou aumento significativo nos períodos de 5, 20 e 30 dias após o início do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica do RNAm para IL-17 apresentou aumento significativo em todos os períodos avaliados. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Ainda com o objetivo de verificar a expressão do mRNA para citocinas no tecido do cólon de camundongos durante a colite experimental, foi realizada a quantificação do RNAm para as citocinas antiinflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . Como apresentado na figura 19 A, a expressão do RNAm para a IL-10 apresentou aumento significativo nas duas fases de recuperação (15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias), assim como observado com os níveis dessas citocinas. Além disso, foi observado aumento nos níveis

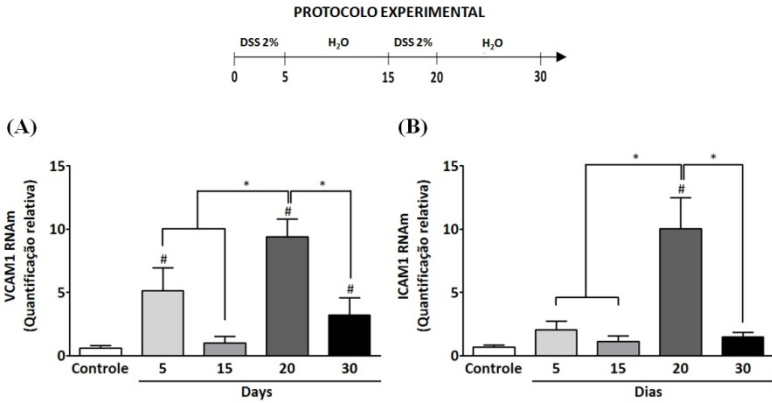


de RNAm para o TGF- $\beta$  após o segundo ciclo de DSS (20º dia), o qual perdurou mesmo ao final da fase de recuperação (Figura 19 B).



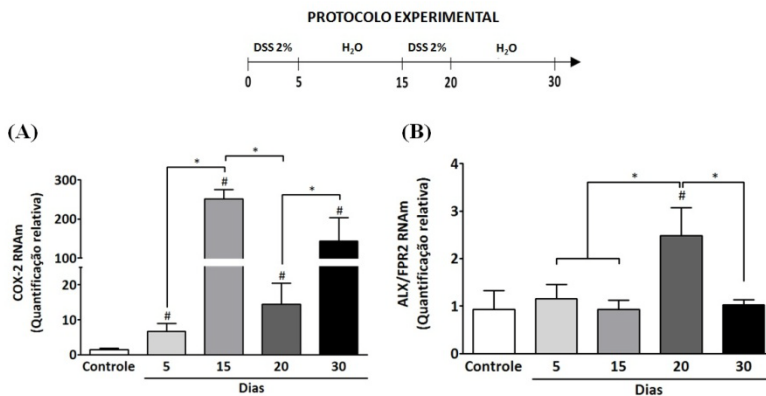
**Figura 19. Expressão do RNAm para IL-10 e TGF- $\beta$  em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para IL-10 e TGF- $\beta$  foi realizada no tecido dólono através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para IL-10 apresentou aumento significativo nos períodos de 15 e 30 dias após o início do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica do RNAm para TGF- $\beta$  apresentou aumento apenas após o segundo ciclo de DSS (20º e 30º dias). #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Devido aos resultados obtidos sobre o aumento de células inflamatórias no cólon dos animais com colite induzida pelo DSS, e em função do perfil de mediadores inflamatórios produzidos e liberados no tecido do cólon, foi realizada a avaliação da expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, as quais estão diretamente ligadas à transmigração de células, tais como neutrófilos, para o tecido inflamado. A figura 20 A apresenta a expressão do RNAm para VCAM-1, que revelou aumento significativo nos períodos de 5, 20 e 30 dias após o início da indução da colite, quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos da expressão do RNAm para ICAM-1 demonstraram aumento significativo somente ao final do segundo ciclo de DSS (20º dia), indicando seu possível papel na produção de ICAM-1 nas fases mais tardias da colite induzida pelo DSS.



**Figura 20. Expressão do RNAm para as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para VCAM-1 e ICAM-1 foi realizada no tecido do cólon através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para VCAM-1 apresentou aumento significativo nos períodos de 5, 20 e 30 dias após o início do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica do RNAm para ICAM-1 apresentou aumento apenas após o segundo ciclo de DSS (20º dia). #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Além da avaliação dos níveis teciduais colônicos de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, foi verificado a expressão do RNAm para enzima COX-2, que apresenta papel crucial para a produção de eicosanóides, e para o receptor de lipoxina (ALX/FPR2), uma vez que desempenha papel importante nas fases de recuperação e resolução do processo inflamatório. De forma interessante, a expressão do RNAm para a COX-2 apresentou aumento significativo em todos os períodos analisados (Figura 21 A), porém com expressivo aumento nas fases de resolução do processo inflamatório intestinal (15º e 30º dias). Por outro lado, a expressão do receptor ALX/FPR2 apresentou aumento somente 20 dias após o início do protocolo experimental (Figura 21 B).

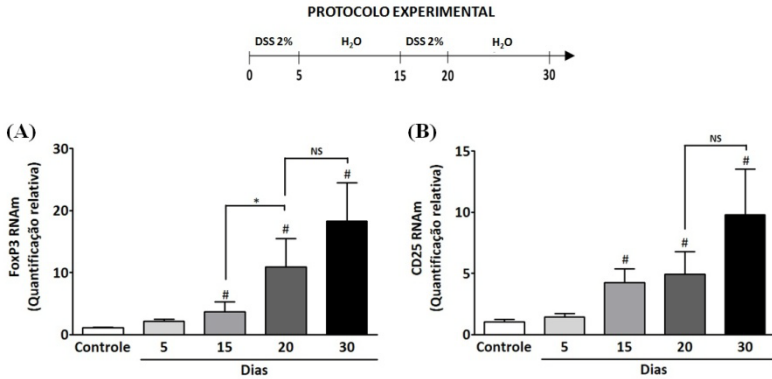


**Figura 21. Expressão do RNAm para a enzima COX-2 e para o receptor ALX/FPR2 em cólons de camundongos durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para COX-2 e ALX/FPR2 foi realizada no tecido do cólon através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para COX-2 apresentou aumento significativo em todos os períodos analisados, sobretudo ao final das fases de recuperação. (B) A quantificação colônica do RNAm para o receptor ALX/FPR2 apresentou aumento apenas após o segundo ciclo de DSS (20º dia). #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.1.6 Expressão do RNAm para marcadores de células T regulatórias durante a colite induzida pelo DSS

Diante das inúmeras evidências de estudos envolvendo os linfócitos T regulatórios nas doenças inflamatórias intestinais, e de seu papel intrínseco na regulação e manutenção da homeostase da mucosa e epitélio intestinal, foi realizado a quantificação do RNAm para os marcadores característicos de células T regulatórias, o fator de transcrição FoxP3 e marcador de membrana CD25.

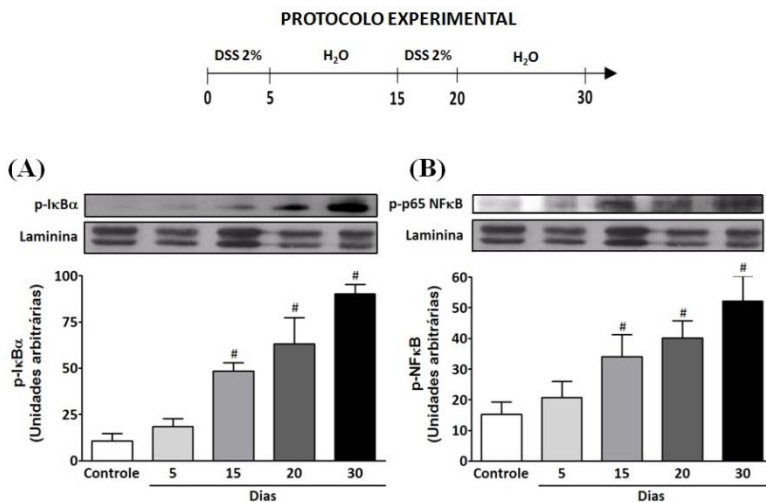
A quantificação de ambos, FoxP3 e CD25, apresentou aumento significativo após a primeira fase de recuperação (15º dia), os quais apresentaram aumento gradativo até o 30º dia de protocolo experimental (Figura 22 A e B). Esses resultados parecem indicar a presença das células T regulatórias em fases de cronicidade da inflamação intestinal, e que as mesmas parecem ser requeridas para o controle e redução dos mediadores pró-inflamatórios produzidos e liberados durante essas fases.



**Figura 22. Expressão do RNAm para o fator de transcrição FoxP3 e o marcador celular CD25 durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para FoxP3 e CD25 foi realizada no tecido do cólon através da técnica de PCR em tempo real. (A) A expressão do RNAm para FoxP3 apresentou aumento significativo a partir do 15º dia, o qual aumentou gradativamente até o final do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica do RNAm para o CD25 apresentou resultado semelhante à expressão de FoxP3, ou seja, a partir do 15º dia. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls). NS = não significativo.

#### 4.1.7 Ativação da via do NF $\kappa$ B durante a colite induzida pelo DSS

Devido o fato de que grande parte dos mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória intestinal serem transcritos pela via do NF $\kappa$ B, foi avaliada a expressão das proteínas fosforiladas (ativadas) para o I $\kappa$ B- $\alpha$  (p- I $\kappa$ B- $\alpha$ ) e NF $\kappa$ B (p- NF $\kappa$ B), através da técnica de Western blot. A figura 23 A apresenta a expressão do p- I $\kappa$ B- $\alpha$ , onde foi verificado aumento significativo em relação ao grupo controle, a partir do 15º dia. Esse aumento apresentou incremento gradativo no 20º e 30º dias após o início da indução da colite, indicando aumento da clivagem do I $\kappa$ B- $\alpha$  e a liberação das subunidades do NF $\kappa$ B. Esses dados corroboram com a avaliação da expressão para a subunidade p-p65 do NF $\kappa$ B, o qual também apresentou aumento significativo no tecido do cólon a partir do 15º dia de protocolo experimental, tendo sua expressão aumentada gradativamente até o 30º dia (Figura 23 B).



**Figura 23. Expressão do  $\kappa B$  - $\alpha$  e NF $\kappa B$  fosforilados durante a colite experimental induzida pelo DSS.** A quantificação da expressão do RNAm para p-I $\kappa B$ - $\alpha$  e p-p65 NF $\kappa B$  foi realizada no tecido do cólon através da técnica de Western blot. (A) A expressão da proteína fosforilada para I $\kappa B$ - $\alpha$  apresentou aumento significativo a partir do 15<sup>o</sup> dia, o qual aumentou gradativamente até o final do protocolo experimental. (B) A quantificação colônica da proteína ativada para a subunidade p65 do NF $\kappa B$  apresentou resultado semelhante à expressão de FoxP3, ou seja, aumento significativo a partir do 15<sup>o</sup> dia. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

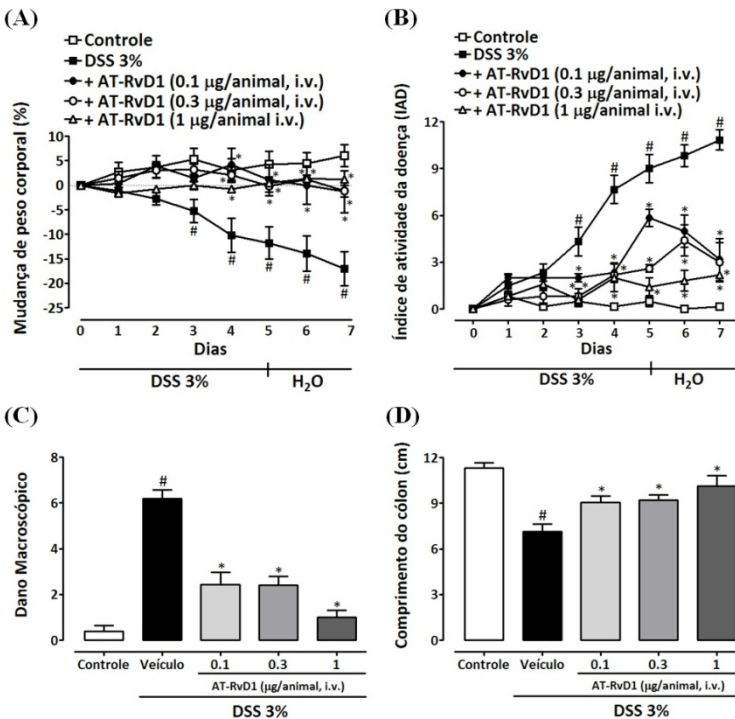
## 4.2 Papel dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 na resolução da colite experimental

### 4.2.1 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA na severidade da doença da colite induzida pelo DSS

A realização desse protocolo experimental consistiu na administração de DSS 3 % como descrito na seção de materiais e métodos (figura 5), e de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (Bento et al., 2011). A administração de DSS 3 % por cinco dias consecutivos causou inflamação intestinal severa caracterizada por diarreia sanguinolenta e gradativa perda de peso corporal. Com o objetivo de avaliar o efeito pró-resolução e antiinflamatório dos ácidos graxos poliinsaturados derivados do ômega-3 na fase aguda da colite experimental, animais da linhagem BALB/c foram tratados uma vez ao dia com, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA em três diferentes doses (0,1; 0,3 e 1  $\mu g$ /animal, i.v.). A administração do DSS 3 % resultou em perda

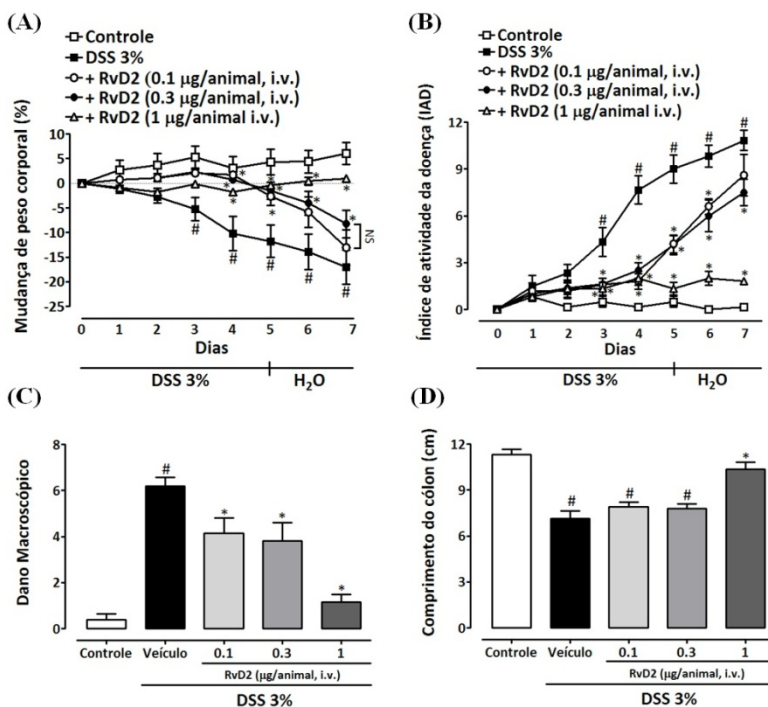
sustentada de peso corporal, aumento do índice de atividade da doença, além de inflamação do cólon associada com hiperemia, pontos de ulceração, espessamento do epitélio intestinal, os quais culminaram em aumento do escore do dano macroscópico do cólon e redução do tamanho do mesmo (Figura 24 A-D).

Notavelmente, o tratamento com AT-RvD1 (0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) preveniu significativamente a perda de peso corporal e o aumento do IAD. Além disso, atenuou o dano macroscópico em  $65 \pm 12$ ,  $65 \pm 17$  e  $89 \pm 17$  %, respectivamente. O tratamento com AT-RvD1 também protegeu contra a redução do tamanho do cólon (Figura 24 A-D), sobretudo nas doses de 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ .



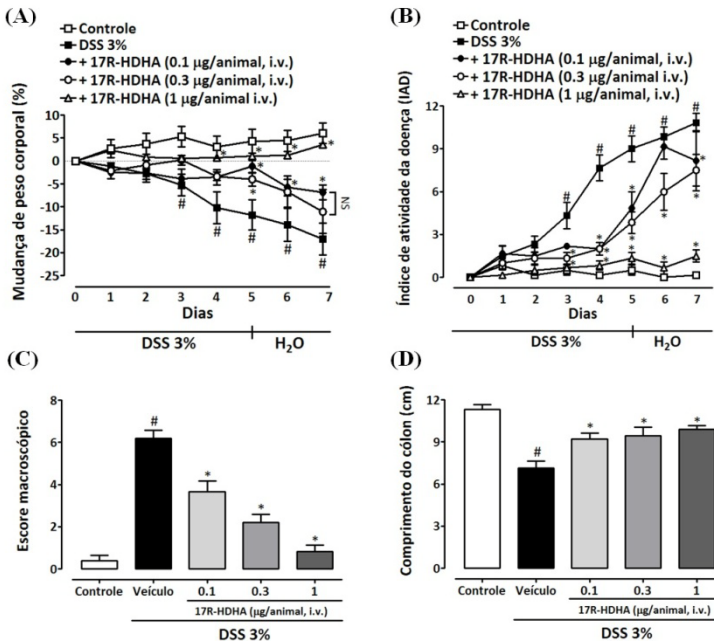
**Figura 24. Efeito da AT-RvD1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite experimental induzida pelo DSS.** Os camundongos receberam solução de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos por dois dias com água filtrada. Os animais foram tratados com AT-RvD1 (0,1 – 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) do dia 0 ao dia 7. (A) O tratamento sistêmico com AT-RvD1, em todas as doses avaliadas, preveniu a perda de peso corporal, (B) o aumento da severidade da doença, (C) o incremento do dano tecidual macroscópico do cólon, e (D) a redução do tamanho do cólon. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Além disso, o tratamento com RvD2 (0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) também preveniu, de forma significativa, todos os sinais inflamatórios da colite induzida pelo DSS, como a redução do peso corporal e o IAD. O dano macroscópico foi reduzido em  $35 \pm 1$ ,  $41 \pm 7$  e  $86 \pm 14$  %, respectivamente. Ademais o mesmo tratamento inibiu significativamente a redução do tamanho do cólon, principalmente nas doses de 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$  (Figura 25 A-D).



**Figura 25. Efeito da RvD2 sobre os parâmetros macroscópicos da colite experimental induzida pelo DSS.** Os camundongos receberam solução de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos por dois dias com água filtrada. Os animais foram tratados com RvD2 (0,1 – 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) do dia 0 ao dia 7. (A) O tratamento sistêmico com RvD2, principalmente nas doses de 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , preveniu a perda de peso corporal e (B) o aumento da severidade da doença. (C) Todas as doses de RvD2 avaliadas preveniram de forma significativa o aumento do dano tecidual macroscópico do cólon, e (D) a dose de 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$  preveniu a redução do tamanho do cólon. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

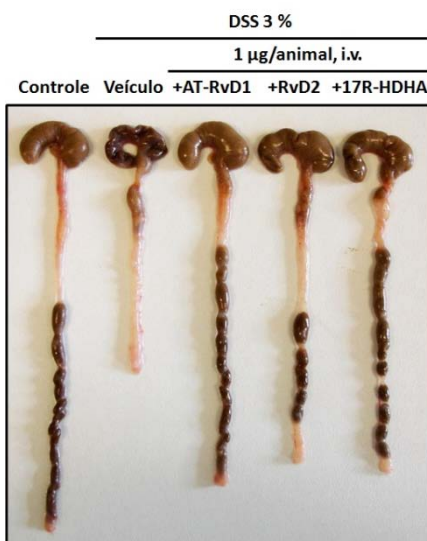
A atividade antiinflamatória do precursor para as resolvinas da série D, o 17R-HDHA, foi também avaliada através do tratamento sistêmico nas doses de 0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Os resultados apresentados na figura 26 A-D demonstraram que o tratamento com o 17R-HDHA, sobretudo nas doses de 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , resultou em prevenção marcante da perda de peso corporal e do aumento do índice de atividade da doença. O dano macroscópico na mucosa epitelial do intestino foi reduzido em  $43 \pm 12$ ,  $68 \pm 14$  e  $92 \pm 17$  % para as doses de 0,1; 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , respectivamente. Além disso, o tratamento com o 17R-HDHA preveniu significativamente a redução no tamanho do cólon em todas as doses avaliadas.



**Figura 26. Efeito do precursor para resolvinas da série D 17R-HDHA sobre os parâmetros macroscópicos da colite experimental induzida pelo DSS.** Os animais foram tratados com 17R-HDHA (0,1 – 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) do dia 0 ao dia 7. (A) O tratamento sistêmico com 17R-HDHA, principalmente nas doses de 0,3 e 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , preveniu a perda de peso corporal, e (B) o aumento da severidade da doença. (C) Todas as doses de 17R-HDHA avaliadas preveniram de forma significativa o aumento do dano tecidual macroscópico do cólon, e (D) a redução do tamanho do cólon. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + DSS 3% (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).



Como demonstrado nas figuras 24-26, os tratamentos com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 apresentaram eficácia na prevenção e na atenuação da severidade da colite experimental induzida pelo DSS. Dentre as doses avaliadas, a administração sistêmica de 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de cada composto apresentou redução consistente de todos os parâmetros clínicos e macroscópicos avaliados. A figura 27 apresenta a aparência e tamanho do cólon do diferentes grupos experimentais, onde foi observada redução significativa do tamanho do cólon dos animais que receberam apenas DSS 3 % em comparação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento sistêmico com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), também preveniu o encurtamento e danos macroscópicos provocados pela ingestão de DSS.

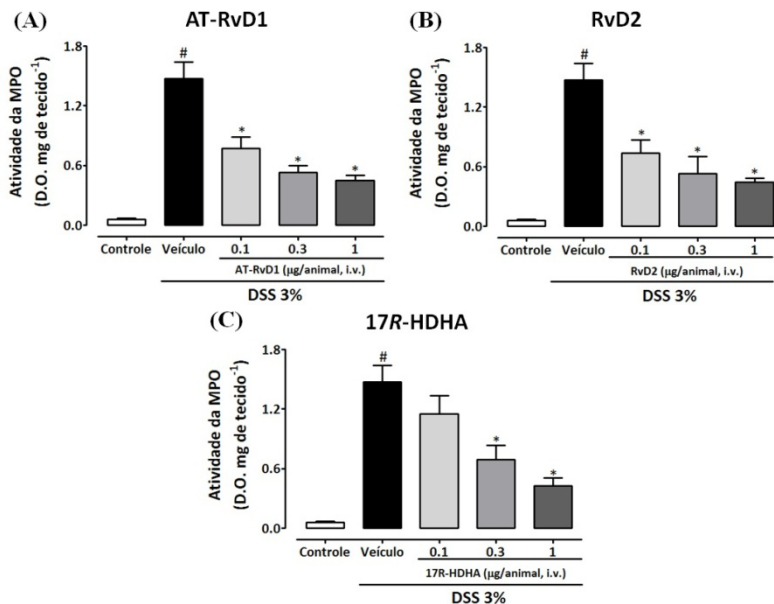


**Figura 27.** Efeito dos tratamentos com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a aparência e tamanho do cólon na colite experimental induzida pelo DSS. Os camundongos receberam solução de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos por dois dias com água filtrada. Os animais foram tratados com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) do dia 0 ao dia 7. A figura ilustra o efeito benéfico do tratamento sistêmico com os diferentes mediadores lipídicos, os quais preveniram o encurtamento do cólon, dano macroscópico colônico e formação de fezes frouxas e/ou diarréicas.

#### **4.2.2 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a atividade da enzima MPO e dano tecidual microscópico na colite induzida pelo DSS**

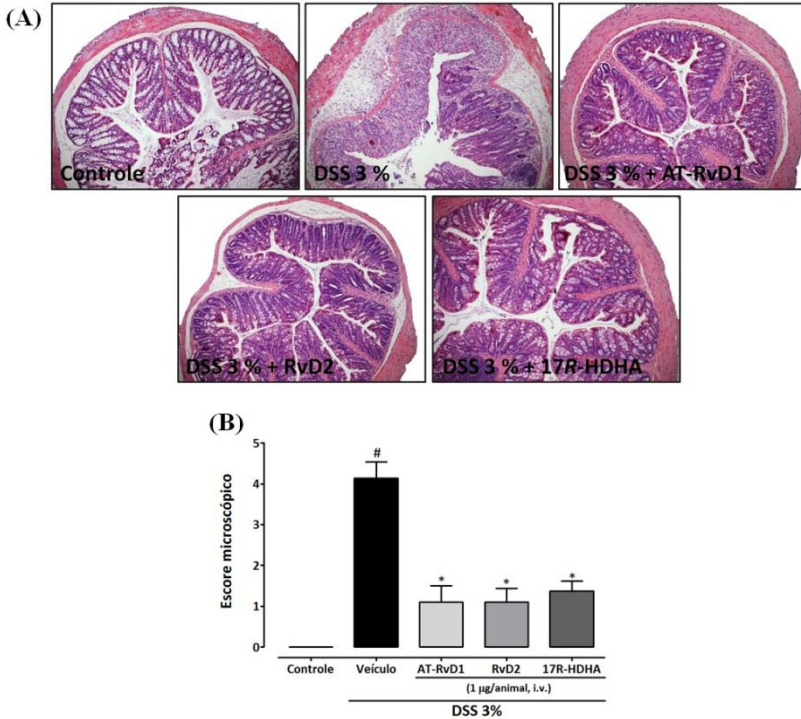
A migração de neutrófilos foi avaliada indiretamente através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), no cólon de animais dos diferentes grupos experimentais. Sete dias após o início da administração do DSS 3 %, os animais foram sacrificados e tiveram seus cólons removidos para o ensaio enzimático. A figura 28 demonstra que a administração de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos por dois dias de água filtrada, provocou aumento significativo da atividade da MPO em comparação ao grupo controle. Além disso, foi observado que o tratamento sistêmico com AT-RvD1 ou RvD2 (0,1; 0,3 e 1 µg/animal, i.v.) preveniu significativamente o aumento dos níveis de MPO no tecido do cólon com inibições de  $49 \pm 8$ ,  $66 \pm 13$  e  $72 \pm 10$  % para AT-RvD1 (0,1 – 1 µg/animal), e  $52 \pm 6$ ,  $66 \pm 10$  e  $72 \pm 13$  % para RvD2 (0,1 – 1 µg/animal) (Figura 28 A e B).

Além disso, foi observado que o tratamento intravenoso com o precursor para as resolvinas da série D (17R-HDHA, 0,3 e 1 µg/animal), reduziu, de forma significativa, a atividade da MPO no cólon dos animais com colite experimental em  $55 \pm 2$  e  $74 \pm 16$  %, respectivamente (Figura 28 C).



**Figura 28. Efeito dos mediadores lipídicos AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a atividade da enzima MPO na colite induzida pelo DSS.** Sete dias após o início da indução da colite a infiltração de neutrófilos foi indiretamente avaliada através da atividade da enzima MPO no cólon de camundongos. (A) O tratamento sistêmico com AT-RvD1 (0,1 – 1 µg/animal, i.v.) preveniu significativamente a atividade da MPO. (B) De forma semelhante, os animais que receberam administração intravenosa de RvD2 (0,1 – 1 µg/animal) apresentaram redução na atividade da MPO. (C) O tratamento com 17R-HDHA nas doses de 0,3 e 1 µg/animal, i.v., preveniu o aumento da atividade enzimática da MPO. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + DSS 3% (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Estudos prévios demonstraram que o dano tecidual no cólon durante a colite experimental está associado ao aumento de células inflamatórias, tais como neutrófilos, na mucosa intestinal (Bento et al., 2008). Por essa razão, e devido aos resultados apresentados anteriormente, foram realizados cortes histológicos e posterior análise do dano microscópico do cólon. Como demonstrado na Figura 29 A, o tratamento com a AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) reduziu drasticamente o dano tecidual do cólon, auxiliando na manutenção da estrutura epitelial, preservação das criptas intestinais, bem como redução massiva no infiltrado celular na mucosa intestinal.



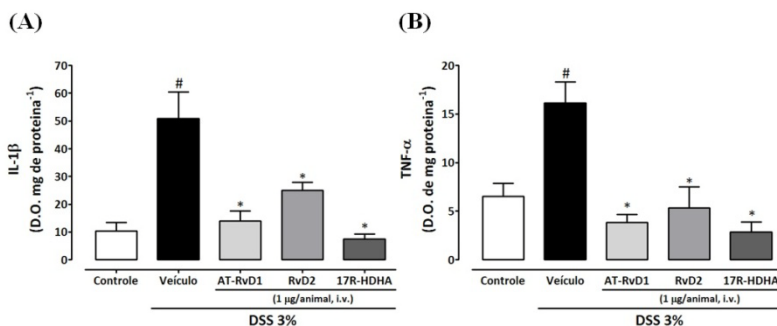
**Figura 29. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre o dano tecidual microscópico na colite induzida pelo DSS.** Ao final do protocolo experimental de colite induzida pelo DSS o dano tecidual microscópico foi avaliado entre os diferentes grupos experimentais. (A) Imagens histológicas representativas do dano tecidual do cólon de animais controle (naive), Veículo + DSS 3 %, ou tratados com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.). (B) O tratamento sistêmico com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) reduziu significativamente o dano tecidual microscópico. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls). Cortes histológicos corado com H&E, aumento de 100 X.

A figura 29 B apresenta o escore obtido das análises histológicas, e demonstra que o tratamento sistêmico com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.), mostraram-se eficazes na redução do dano tecidual microscópico observado no cólon de camundongos com colite experimental, quando comparado ao grupo veículo + DSS 3 %. As análises do dano tecidual

microscópico revelaram inibições de  $73 \pm 17$  (AT-RvD1),  $73 \pm 15$  (RvD2) e  $66 \pm 18$  % (17R-HDHA).

#### 4.2.3 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre os níveis teciduais de citocinas na colite induzida pelo DSS

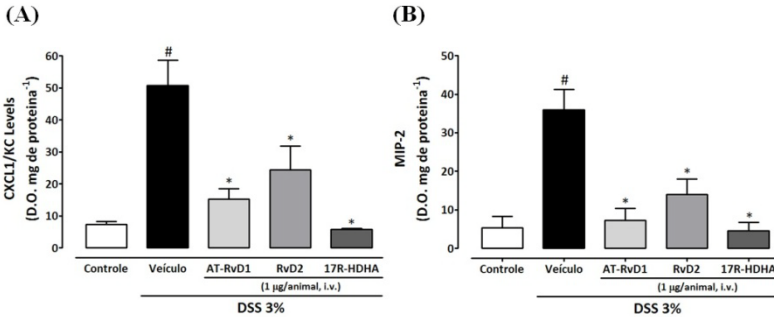
Seguindo o mesmo protocolo experimental para a avaliação do efeito dos mediadores derivados do ômega-3 na colite induzida pelo DSS, ao final de sete dias os animais tiveram os cólons removidos e processados para avaliação dos níveis teciduais de citocinas inflamatórias. Como pode ser observado na figura 30 A e B, os níveis teciduais colônicos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estão significativamente aumentados nos animais que receberam apenas DSS 3 % em relação ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA (1  $\mu$ g/animal, i.v.) reduziu significativamente os níveis teciduais de IL-1 $\beta$  ( $86 \pm 3$ ,  $71 \pm 8$  e  $98 \pm 8$  %, respectivamente) e TNF- $\alpha$  ( $98 \pm 2$ ,  $90 \pm 4$  e  $97 \pm 6$  %, respectivamente), comparados ao grupo veículo + DSS 3 %.



**Figura 30. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na colite induzida pelo DSS.** A dosagem de citocinas no cólon foi realizada sete dias após o início da indução da colite através da técnica de ELISA. (A) O tratamento intravenoso com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu$ g/animal) reduziu significativamente os níveis teciduais de IL-1 $\beta$ . (B) De forma semelhante, o tratamento sistêmico com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu$ g/animal, i.v.) reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  no tecido do cólon dos animais em comparação ao grupo veículo + DSS 3 %. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

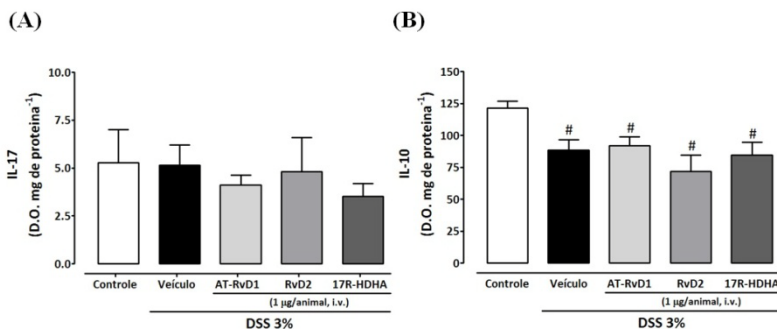
Os níveis teciduais colônicos da quimiocina CXCL1/KC foram também significativamente reduzidos nos grupos experimentais tratados com AT-RvD1 ( $84 \pm 1$  %), RvD2 ( $66 \pm 3$  %) ou 17R-HDHA ( $99 \pm 1$  %)

(1 µg/animal, i.v.), em comparação ao grupo veículo + DSS 3 % (Figura 31 A). Além disso, os níveis teciduais para a quimiocina MIP-2 foram reduzidos em  $92 \pm 11$ ,  $75 \pm 10$  e  $95 \pm 6$  % para as doses de AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.), respectivamente.



**Figura 31. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de CXCL1/KC e MIP-2 na colite induzida pelo DSS.** A dosagem de citocinas no cólon foi realizada sete dias após o início da indução da colite através da técnica de ELISA. (A) O tratamento intravenoso com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal) reduziu significativamente os níveis teciduais de CXCL1/KC. (B) De forma semelhante, o tratamento sistêmico com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) reduziu os níveis de MIP-2 no tecido do cólon dos animais em comparação ao grupo veículo + DSS 3 %. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle, \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

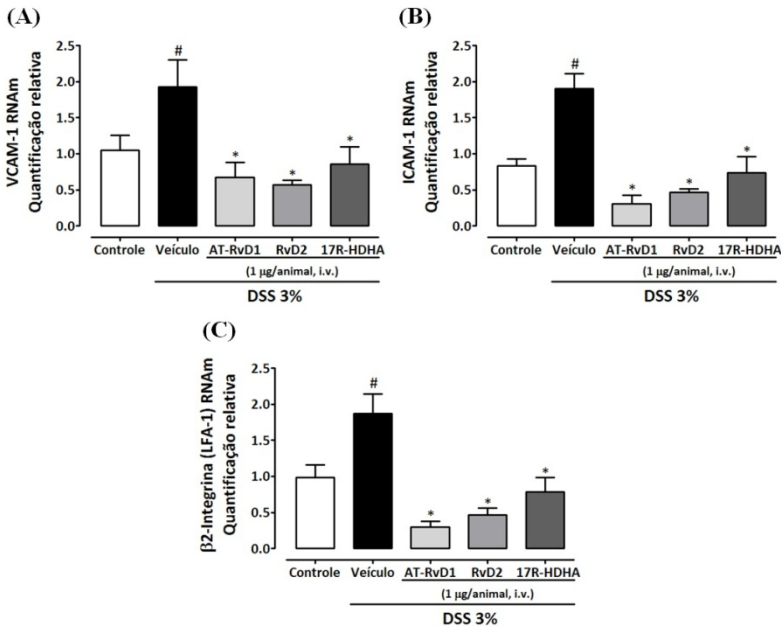
A quantificação da citocina pró-inflamatória IL-17 também foi realizada entre os grupos experimentais. De forma intrigante, não foi observada diferença significativa nos níveis teciduais de IL-17 entre os grupos controle e veículo + DSS 3 % (Figura 32 A). Ademais, os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.), não alteraram os níveis teciduais de IL-17 em comparação aos demais grupos experimentais. Por outro lado, a figura 32 B demonstra que a administração de DSS 3 % causou redução significativa nos níveis de IL-10 em relação ao grupo controle. Entretanto, os tratamentos com os mediadores AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.), não alteraram significativamente os níveis de IL-10, quando comparados ao grupo veículo + DSS 3 %, sugerindo que a ação antiinflamatória e pró-resolução desses mediadores é pouco dependente de IL-10.



**Figura 32. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre os níveis teciduais de IL-17 e IL-10 na colite induzida pelo DSS.** A dosagem de citocinas no cólon foi realizada sete dias após o início da indução da colite através da técnica de ELISA. (A) A administração do DSS 3 % ou os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal) não interferiram com os níveis teciduais colônicos de IL-17. (B) A administração de DSS 3 % reduziu de forma significativa os níveis teciduais de IL-10. Porém os tratamentos sistêmicos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) não recuperaram os níveis de IL-10 no cólon de camundongos com colite experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.2.4 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a expressão do RNAm para moléculas de adesão na colite induzida pelo DSS

Com o objetivo de avaliar a expressão das moléculas de adesão envolvidas na transmigração de células inflamatórias para o cólon inflamado, foi realizada a quantificação do RNAm para as moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e LFA-1. A extração do RNA total foi realizada no tecido do cólon, sendo que o RNA obtido foi submetido a reação de PCR em tempo real com sondas e primers específicos, como descrito na seção de materiais e métodos. Como pode ser observado na figura 33 A-C, a administração de DSS 3 % provocou aumento significativo na expressão do RNAm para VCAM-1, ICAM-1 e LFA-1, quando comparado ao grupo controle. Interessantemente, os tratamentos com a AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.), foram eficazes em reduzir a expressão do RNAm para a VCAM-1 ( $97 \pm 4$ ,  $99 \pm 1$  e  $94 \pm 6$  %, respectivamente), ICAM-1 ( $99 \pm 9$ ,  $99 \pm 7$  e  $96 \pm 2$  %, respectivamente) e LFA-1 ( $98 \pm 2$ ,  $89 \pm 5$  e  $95 \pm 3$  %, respectivamente) (Figura 33 A-C), indicando o possível papel regulador dessas moléculas sobre a transmigração de células inflamatórias para o tecido inflamado.



**Figura 33. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do RNAm para moléculas de adesão na colite induzida pelo DSS.** (A) A administração de AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal) reduziu de forma significativa a expressão do RNAm para VCAM-1 no cólon de camundongos com colite experimental. Resultados semelhantes foram obtidos com expressão de (B) ICAM-1 e (C) LFA-1. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo + DSS 3 % (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

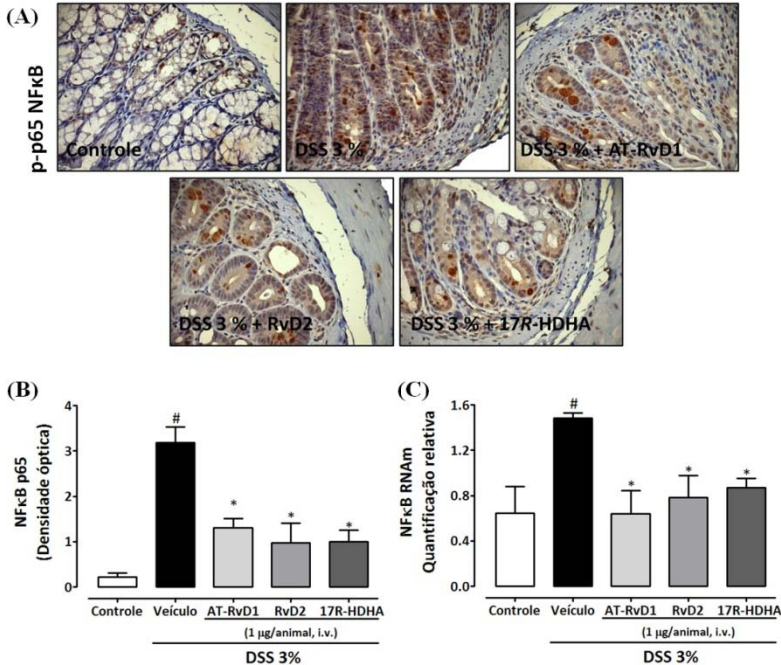
#### 4.2.5 Efeito da AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do NFκB na colite induzida pelo DSS

A atividade do NFκB é conhecida por influenciar a transcrição de diversos mediadores inflamatórios, tais como citocinas e moléculas de adesão. Por essa razão, foram realizados ensaios para avaliação da expressão da subunidade fosforilada p65 do NFκB (p-p65 NFκB) através do método de imunistoquímica nos diferentes grupos experimentais. Adicionalmente, ao final do tratamento com DSS 3 %, os cólons foram removidos e processados para a análise dos níveis de RNAm para o NFκB. Como apresentado na figura 34 A, foi observado aumento expressivo para marcação da p-p65 NFκB no cólon dos animais que receberam apenas solução de DSS 3 %, quando comparado ao cólon de animais do grupo controle. Por outro lado, o tratamento



sistêmico com a AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.), reduziu a marcação para p-p65 NF $\kappa$ B no  $\acute{o}$ lon de animais com colite experimental. A quantificação (densidade óptica) da expressão da p-p65 NF $\kappa$ B está apresentada na figura 34 B, onde é possível observar aumento significativo na expressão do NF $\kappa$ B no grupo veículo + DSS 3 %, além de redução significativa da expressão do NF $\kappa$ B no  $\acute{o}$ lon de animais tratados com os mediadores lipídicos AT-RvD1 ( $63 \pm 4$  %), RvD2 ( $74 \pm 6$  %) ou 17R-HDHA ( $73 \pm 6$  %) (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.).

Além disso, foi observado aumento na expressão do RNAm para o NF $\kappa$ B no  $\acute{o}$ lon de animais com colite induzida pelo DSS 3 % (Figura 34 C). Assim como observado na imunistoquímica, a quantificação do RNAm para do NF $\kappa$ B foi significativamente menor no  $\acute{o}$ lon de animais tratados sistemicamente com AT-RvD1 ( $89 \pm 12$  %), RvD2 ( $85 \pm 14$ ) ou 17R-HDHA ( $84 \pm 7$  %) (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) (Figura 34 C).



**Figura 34. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão do NFκB na colite induzida pelo DSS.** A expressão da proteína fosforilada e do RNAm no cólon foi realizada sete dias após o início da indução da colite. (A) A administração de AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) reduziu de forma significativa a expressão de p-p65 NFκB no cólon de camundongos com colite experimental. (B) Quantificação dos dados do painel A, apresentando as médias das densidades óptica obtida dos diferentes grupos experimentais. (C) A quantificação do RNAm demonstrou que o tratamento com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) de fato reduziu a expressão do NFκB no cólon dos animais com colite experimental. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls). Aumento de 400 X.

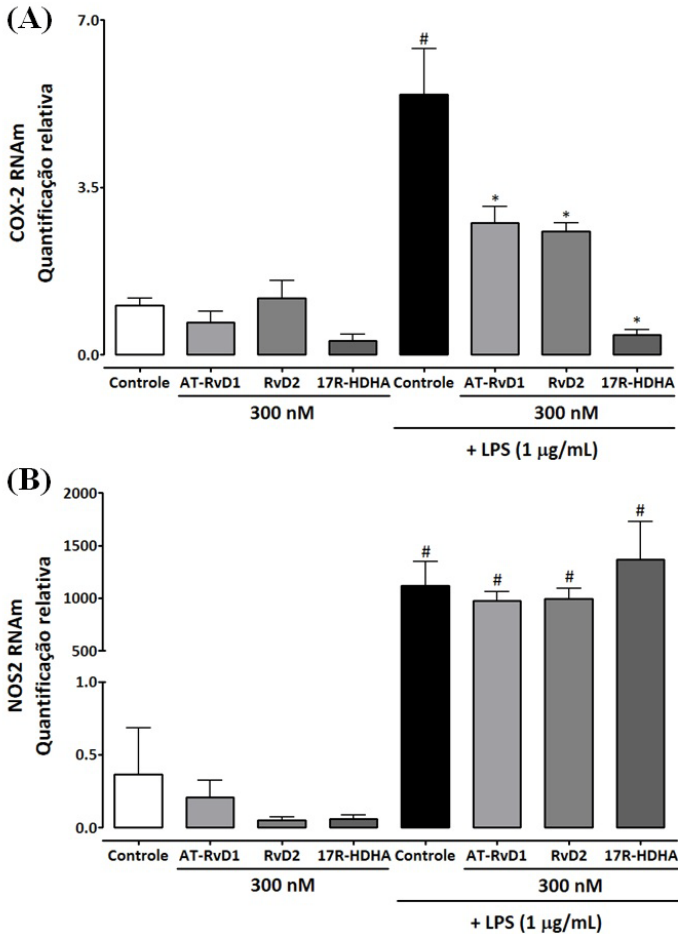
#### 4.2.6 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a expressão das enzimas COX-2 e NOS2 em cultura primária de macrófagos estimulados com LPS

Os macrófagos constituem algumas das principais células inflamatórias envolvidas na patogênese da colite experimental e das IBD em humanos, os quais produzem grandes quantidades de COX-2 e NOS2 durante estes estágios patológicos (Weylandt et al., 2007). Devido a essas evidências, foi realizada cultura primária de macrófagos

provenientes da medula óssea, os quais foram incubados com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço) apenas em meio de cultura, ou na presença de LPS (1 µg/ml), por um período de 24 horas. Ao final do protocolo experimental, as células aderidas foram coletadas para extração do RNA total e realização da quantificação de COX-2 e NOS2 por PCR em tempo real.

A figura 35 A mostra a quantificação do RNAm para COX-2 dos grupos com ou sem tratamento com AT-RvD1, RvD2, ou 17R-HDHA, na ausência ou presença do LPS. Os resultados demonstraram que a incubação por 24 horas com LPS (1 µg/ml) provocou aumento significativo na expressão da COX-2 em relação ao grupo controle. Entretanto, a pré-incubação (30 minutos antes) com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço), reduziu significativamente a expressão do RNAm da enzima COX-2 na presença de LPS em  $52 \pm 8$ ,  $68 \pm 4$  e  $97 \pm 3$  %, respectivamente.

A expressão para a enzima NOS2 foi quantificada usando o mesmo protocolo experimental descrito anteriormente. Na figura 35 B observa-se que o LPS ocasionou aumento expressivo nos níveis de RNAm para a enzima NOS2 em comparação ao grupo controle. Entretanto, de forma inesperada, a incubação prévia com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço), não foi capaz de reduzir a expressão do RNAm para a NOS2, sugerindo que o mecanismo de ação dos mediadores lipídicos em estudo parece não defender, de forma importante, da expressão de NOS2 nos macrófagos.

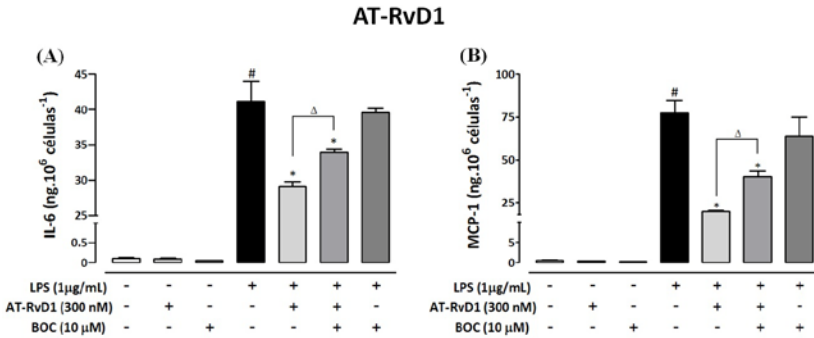


**Figura 35. Efeito dos mediadores AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a expressão das enzimas COX-2 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.** A expressão do RNAm para as enzimas COX-2 e NOS2 foi avaliada em macrófagos derivados da medula óssea e estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com de AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a expressão do RNAm para COX-2 na presença de LPS (1 µg/ml). (B) Diferentemente dos resultados obtidos para a expressão da COX-2, os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (300 nM/poço) não reduziram significativamente a expressão da NOS2 nos macrófagos estimulados com LPS. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

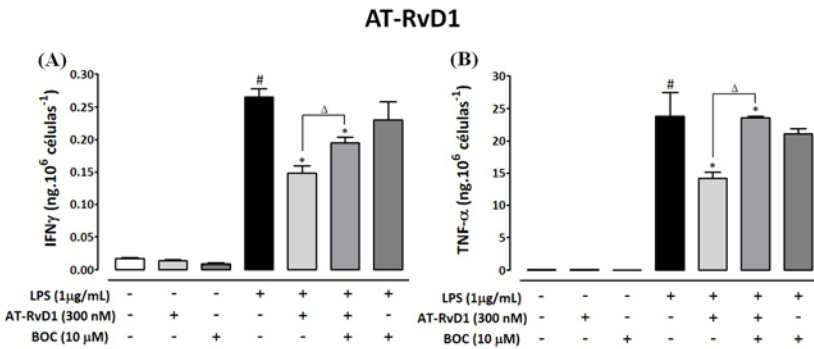
#### **4.2.7 Efeito e possível mecanismo de ação da AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA sobre a secreção de citocinas em cultura primária de macrófagos estimulados com LPS**

Vinte e quatro horas após a incubação com LPS (1 µg/ml), o sobrenadante da cultura de macrófagos foi coletado e preparado para dosagem de citocinas com anticorpos específicos por CBA (do inglês cytometric beads array) em citometro de fluxo. Com o objetivo de avaliar se o efeito dos mediadores lipídicos era dependente da ativação do receptor para lipoxina A4 (ALX/FPR2), além da incubação com AT-RvD1, RvD2, ou 17R-HDHA (300 nM/poço) na presença ou ausência de LPS, foi adicionado à cultura de macrófagos o BOC-1 (10 µM/poço) (antagonista seletivo do receptor ALX/FPR2), 30 minutos antes da incubação com os mediadores lipídicos. A figura 36 A e B apresenta os níveis de IL6 e MCP-1, respectivamente, e mostra que a incubação com LPS (1 µg/ml) foi significativamente eficaz em induzir a secreção de IL-6 e MCP-1 na cultura de macrófagos. Além disso, foi demonstrado que a pré-incubação com AT-RvD1 (300 nM/poço), reduziu de forma significativa os níveis de IL-6 ( $29 \pm 2$  %) (Figura 36 A) e MCP1 ( $74 \pm 1$  %) (Figura 36 B). Interessantemente, observou-se que o bloqueio do receptor ALX/FRP2, através da incubação com BOC-1 (10 µM/poço), reverteu de forma significativa o efeito da AT-RvD1 sobre a redução da secreção de IL-6 e MCP-1. Notou-se que a incubação somente com BOC-1 não interferiu significativamente com a secreção de IL-6 e MCP-1 (Figura 36 A e B).

De forma semelhante, a secreção das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi também reduzida frente ao pré-tratamento com AT-RvD1 (300 nM/poço), em macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml), com inibições de  $46 \pm 5$  % (IFN- $\gamma$ ) e  $40 \pm 5$  % (TNF- $\alpha$ ). Assim como observado na figura 36, a incubação prévia com BOC-1 (10 µM/poço) reduziu significativamente o efeito da AT-RvD1 sobre a redução da citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Figura 37 A e B).

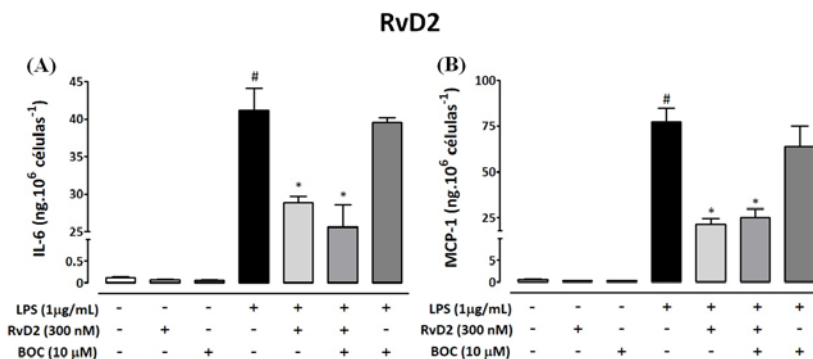


**Figura 36. Efeito da AT-RvD1 sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IL-6 e MCP-1 foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com AT-RvD1 (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IL-6 e (B) MCP-1 em macrófagos tratados com LPS (1 µg/ml). A incubação com BOC-1 reverteu parcialmente o efeito da AT-RvD1 na redução dos níveis de IL-6 e MCP-1. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. # p<0,05 quando comparado ao controle; \* p<0,05 comparado ao controle + LPS; p<0,05 quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).



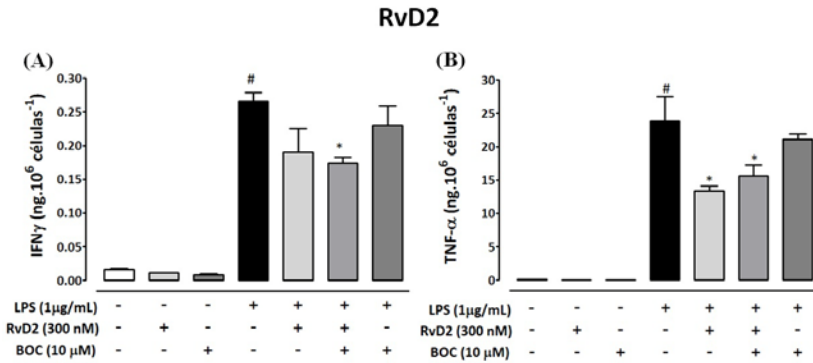
**Figura 37. Efeito da AT-RvD1 sobre a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com AT-RvD1 (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IFN- $\gamma$  e (B) TNF- $\alpha$  em macrófagos tratados com LPS (1 µg/ml). A incubação com BOC-1 reverteu parcialmente o efeito da AT-RvD1 na redução dos níveis IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. # p<0,05 quando comparado ao controle; \* p<0,05 quando comparado ao controle + LPS; p<0,05 quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Os resultados demonstraram ainda que, a pré-incubação com RvD2 (300 nM/poço) reduziu significativamente a secreção de IL-6 ( $30 \pm 2\%$ ) e MCP-1 ( $73 \pm 5\%$ ) na cultura de macrófagos derivados da medula óssea estimulados com LPS (figura 38 A e B). Entretanto, a incubação prévia com BOC-1 (10  $\mu$ M/poço) não interferiu com o efeito benéfico da RvD2 sobre a redução dos níveis das citocinas IL-6 e MCP-1 (Figura 38 A e B, respectivamente).



**Figura 38. Efeito da RvD2 sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IL-6 e MCP-1 foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com RvD2 (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IL-6 e (B) MCP-1 em macrófagos tratados com LPS (1  $\mu$ g/ml). A incubação com BOC-1 não interferiu com o efeito da RvD2 sobre a redução dos níveis de IL-6 e MCP-1. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle + LPS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

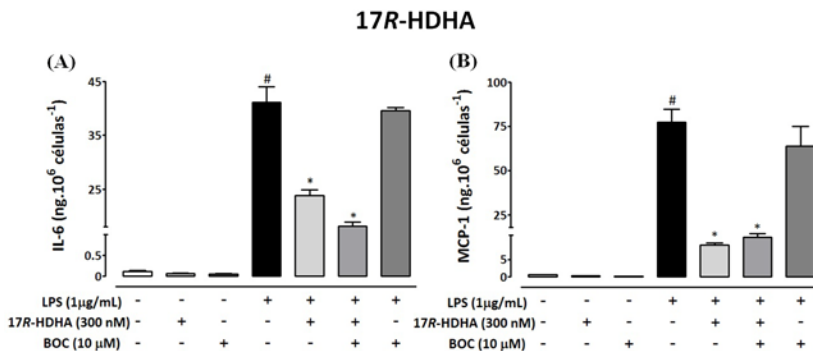
A secreção de  $\text{INF} \gamma$  e  $\text{TNF} - \alpha$  também foi reduzida frente ao tratamento das células com RvD2 (300 nM/poço) na cultura de macrófagos estimulada com LPS (1  $\mu$ g/ml), com inibições de  $30 \pm 16$  e  $44 \pm 3\%$ , respectivamente. Ademais, a pré-incubação com o BOC-1 (10  $\mu$ M/poço) também não interferiu na ação da RvD2 sobre a redução da secreção de  $\text{INF} \gamma$  e  $\text{TNF} - \alpha$  (Figura 39 A e B). Vale ressaltar, que a incubação somente com BOC-1 (10  $\mu$ M/poço), ou em combinação com LPS (1  $\mu$ g/ml), não interferiu nos níveis de citocinas entre os grupos experimentais.



**Figura 39. Efeito da RvD2 sobre a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com RvD2 (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IFN- $\gamma$  e (B) TNF- $\alpha$  em macrófagos tratados com LPS (1  $\mu$ g/ml). A incubação com BOC-1 não interferiu com o efeito da RvD2 sobre a redução dos níveis IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Os resultados representam a média de 4 -6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle + LPS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

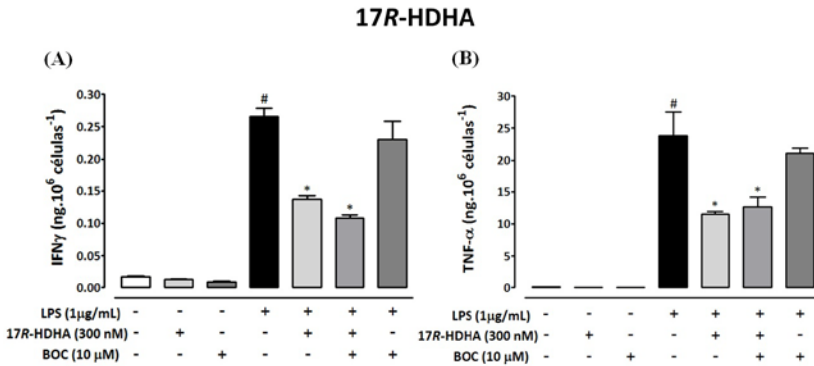
Além disso, foi avaliado o efeito da incubação com o precursor para as resolvinas da série D, o 17R-HDHA, em cultura de macrófagos estimulados com LPS. A figura 40 demonstra que o 17R-HDHA (300 nM/poço) foi eficaz em reduzir a secreção de IL-6 ( $42 \pm 3$  %) e MCP-1 ( $88 \pm 1$  %) em macrófagos estimulados com LPS (1  $\mu$ g/ml) (Figura 40 A e B). Resultados semelhantes aos obtidos para RvD2, foram observados com a incubação combinada entre BOC-1 (10  $\mu$ M/poço) e 17R-HDHA, ou seja, a incubação prévia com BOC-1 não interferiu com o efeito do 17R-HDHA sobre a redução das citocinas IL-6 e MCP-1.





**Figura 40. Efeito do 17R-HDHA sobre a secreção de IL-6 e MCP-1 em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IL-6 e MCP-1 foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com 17R-HDHA (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IL-6 e (B) MCP-1 em macrófagos tratados com LPS (1 µg/ml). A incubação com BOC-1 não interferiu com o efeito do 17R-HDHA sobre a redução dos níveis de IL-6 e MCP-1. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle + LPS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Por fim, os resultados obtidos da pré-incubação com 17R-HDHA (300 nM/poço) demonstraram também que a secreção das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  ( $51 \pm 3$  %) e TNF- $\alpha$  ( $51 \pm 2$  %) foi reduzida significativamente na cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) (Figura 41 A e B). Assim como observado para os níveis de IL-6 e MCP-1, a incubação prévia com o antagonista seletivo para o receptor ALX/FPR2 (BOC-1, 10 µM/poço), não interferiu de maneira significativa com o efeito do 17R-HDHA sobre a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados com LPS.



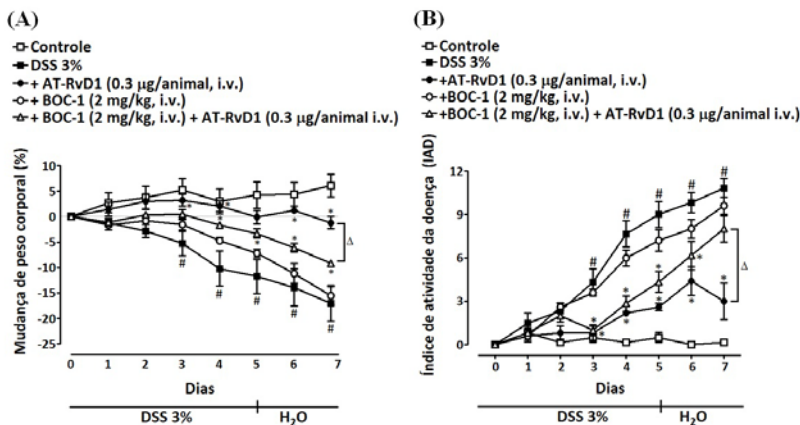
**Figura 41. Efeito do 17R-HDHA sobre a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em cultura primária de macrófagos.** Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. (A) A pré-incubação (30 minutos antes) com 17R-HDHA (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de (A) IFN- $\gamma$  e (B) TNF- $\alpha$  em macrófagos tratados com LPS (1  $\mu$ g/ml). A incubação com BOC -1 não interferiu com o efeito do 17R-HDHA sobre a redução dos níveis IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle + LPS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.2.8 Efeito do bloqueio farmacológico do receptor ALX/FPR2 sobre a ação benéfica da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS

As análises dos dados apresentados no tópico anterior demonstraram que a incubação com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA reduziu significativamente a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos derivados da medula óssea estimulados com LPS. Entretanto, o bloqueio do receptor ALX/FPR2 foi eficaz em reverter, de forma significativa, o efeito da AT-RvD1, mas não a da RvD2 ou do 17R-HDHA, sobre a redução na secreção dos mediadores inflamatórios. Em vista disso, e com a finalidade de avaliar o efeito do bloqueio do receptor ALX/FPR2 sobre a ação benéfica da AT-RvD1 na colite experimental e baseado em dados prévios da literatura, foi realizado tratamento in vivo com o antagonista seletivo do receptor ALX/FPR2 (BOC-1, 2 mg/kg, i.v.), uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 7, 30 minutos antes à administração da AT-RvD1 (0,3  $\mu$ g/animal, i.v.).

Como pode ser observado na figura 42 A e B, o tratamento com a AT-RvD1 (0,3  $\mu$ g/animal, i.v.), preveniu de forma significativa a perda de peso corporal e o índice de atividade da doença, como demonstrado

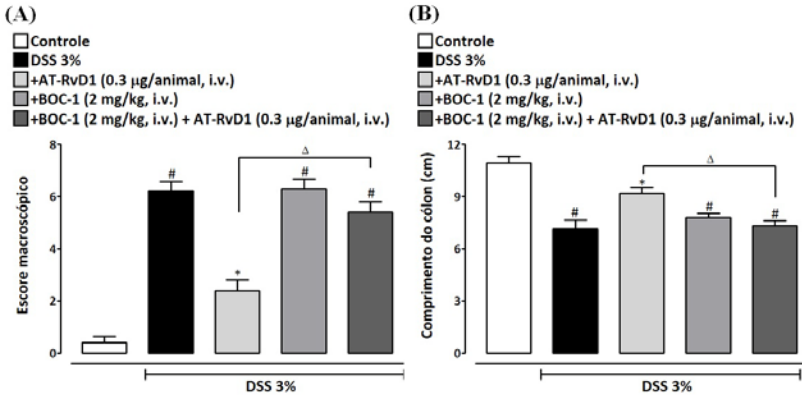
anteriormente. Entretanto, a administração sistêmica do BOC-1 (2 mg/kg), reverteu de forma significativa o efeito benéfico da AT-RvD1 sobre os sinais clínicos da colite induzida pelo DSS, sugerindo que o efeito antiinflamatório e pró-resolução causado pela AT-RvD1 parece ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação do receptor ALX/FPR2 (Figura 42 A e B).



**Figura 42. Efeito do bloqueio do receptor ALX/FPR2 sobre o peso corporal e atividade da doença na ação antiinflamatória da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS.** Os camundongos receberam solução de DSS 3 % durante cinco dias, seguidos por dois dias com água filtrada. Os animais foram tratados com AT-RvD1 (0,3 µg/animal, i.v.) do dia 0 ao dia 7. O tratamento sistêmico com AT-RvD1 preveniu a (A) perda de peso corporal e (B) o aumento da severidade da doença. A administração prévia do antagonista seletivo do receptor ALX/FPR2 (BOC-1, 2 mg/kg, i.v.) reverteu significativamente o efeito benéfico da AT-RvD1 na mudança de (A) peso corporal e (B) o índice de atividade da doença. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. # p<0,05 quando comparado ao controle; \* p<0,05 quando comparado ao veículo + DSS 3 %; p<0,05 quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Além dos parâmetros clínicos observados durante o desenvolvimento da colite experimental induzida pelo DSS, os cólons foram analisados quanto ao dano tecidual macroscópico e comprimento. Sete dias após o início da indução da colite foi observado que o tratamento com AT-RvD1 (0,3 µg/animal, i.v.), reduziu significativamente o escore macroscópico do cólon, além de prevenir a redução do comprimento do cólon em relação ao grupo que recebeu apenas DSS 3 %. Notavelmente, o tratamento sistêmico prévio com o BOC-1 (2 mg/kg), bloqueou o efeito benéfico da AT-RvD1 sobre o dano tecidual macroscópico e encurtamento do cólon (Figura 43 A e B). O

tratamento somente com BOC-1 (2 mg/kg, i.v.), não interferiu significativamente em nenhum dos parâmetros analisados na colite induzida pelo DSS.

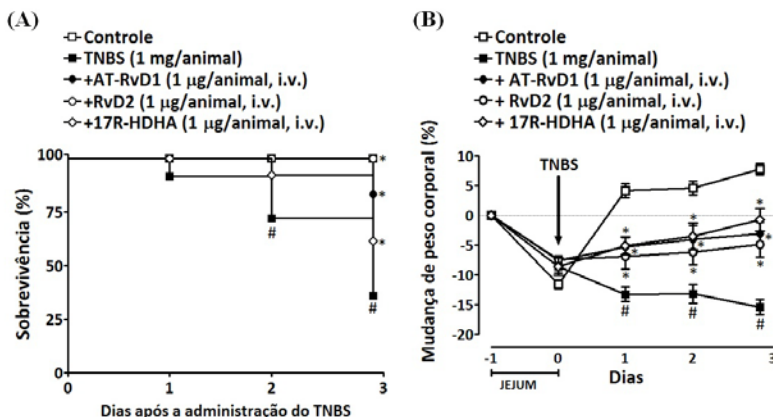


**Figura 43. Efeito do bloqueio do receptor ALX/FPR2 sobre o dano macroscópico e encurtamento do cólon na ação antiinflamatória da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS.** Os animais foram tratados com AT-RvD1 (0,3 µg/animal, i.v.) do dia 0 ao dia 7. O tratamento sistêmico com AT-RvD1 reduziu significativamente o (A) escore macroscópico e (B) preveniu o encurtamento do cólon. A administração prévia do antagonista seletivo do receptor ALX/FPR2 (BOC-1, 2 mg/kg, i.v.) reverteu de forma significativa o efeito benéfico da AT-RvD1 sobre o (A) dano tecidual macroscópico e (B) o tamanho do cólon. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. # p<0,05 quando comparado ao controle; \* p<0,05 quando comparado ao veículo + DSS 3%; p<0,05 quando comparado aos grupos selecionados (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

#### 4.2.9 Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 na colite induzida pelo TNBS

Diante dos achados apresentados anteriormente, foi questionado se os mediadores lipídicos AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA poderiam apresentar efeitos benéficos em outro modelo experimental de colite. Para isso, foi realizado o protocolo experimental de colite induzida pelo TNBS, o qual consiste na instilação do hapteno TNBS (1 mg/animal) em 35 % de etanol, através da via intracolônica. Três dias após a indução da colite o grupo que recebeu apenas TNBS apresentou taxa de sobrevivência de apenas 30 % dos animais (Figura 44 A). Por outro lado, os tratamentos sistêmicos com AT-RvD1, RvD2, ou 17R-HDHA (1 µg/animal), uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 3, apresentaram índices de sobrevivência de 80, 60 e 100 %, respectivamente, os quais foram

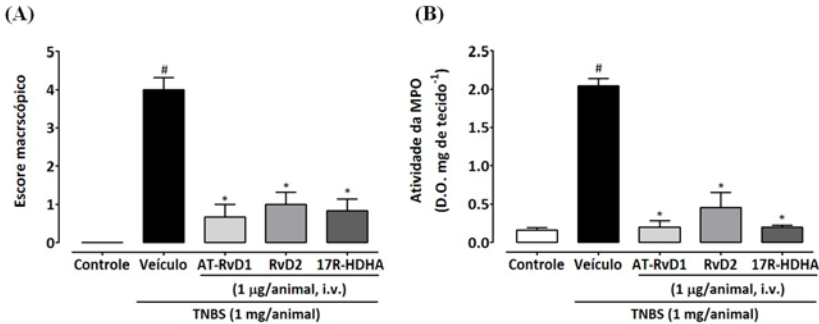
significativamente diferentes do grupo que recebeu apenas TNBS (Figura 44 A).



**Figura 44. Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a taxa de sobrevivência e peso corporal na colite induzida pelo TNBS.** Os camundongos permaneceram em jejum sólido durante 24 horas, e em seguida receberam instilação da solução de TNBS (1mg/animal, etanol 35 %). Os animais foram avaliados quanto ao índice de sobrevivência e mudança de peso corporal por até 3 dias após a indução da colite. Os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) aumentaram significativamente a (A) taxa de sobrevivência e (B) preveniram contra a perda de peso corporal. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

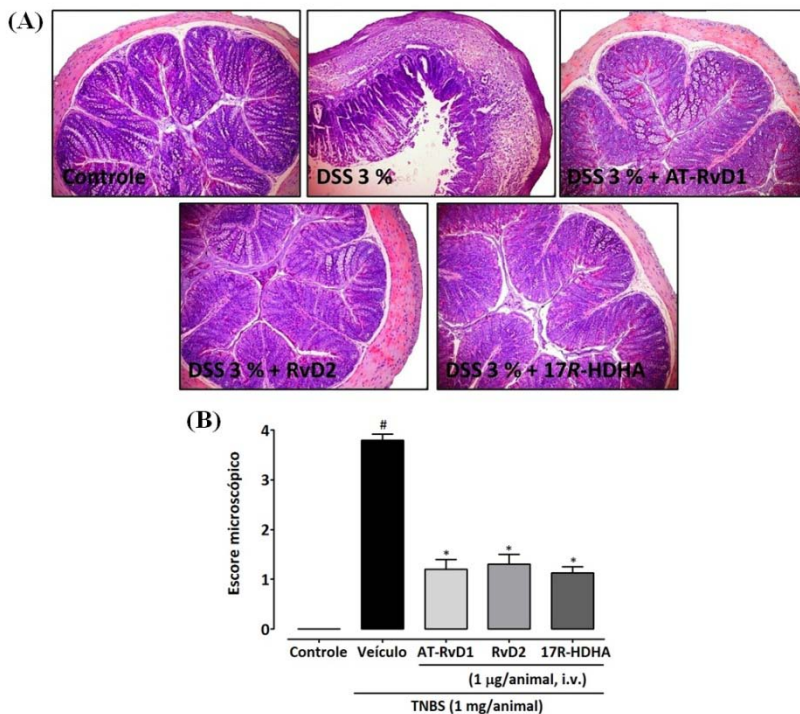
Adicionalmente, ao final de três dias, os animais foram sacrificados e tiveram seus cólons removidos para análise de dano tecidual macroscópico e atividade da MPO. A figura 45 A mostra o escore do dano tecidual macroscópico dos animais com colite experimental induzida pelo TNBS. O TNBS (1 mg/animal) induziu dano tecidual macroscópico severo, associado a forte hiperemia, espessamento do cólon e pontos de ulceração, o qual resultou em aumento significativo do escore macroscópico quando comparado aos animais controle. Entretanto, os tratamentos com AT-RvD1, RvD2, ou 17R-HDHA (1 µg/animal) reduziram significativamente o escore macroscópico encontrado nos animais com colite induzida pelo TNBS em  $97 \pm 6$ ,  $84 \pm 15$  e  $98 \pm 2$  %, respectivamente (Figura 45 A). Além disso, os cólons de animais que receberam apenas TNBS apresentaram

atividade elevada da enzima MPO, a qual foi reduzida de forma significativa com o tratamento preventivo com 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de AT-RvD1 (97  $\pm$  6 %) , RvD2 (84  $\pm$  15 %) ou 17R-HDHA (98  $\pm$  2 %) (Figura 45 B).



**Figura 45. Efeito dos mediadores lipídicos derivados do  $\omega$ -3 sobre o dano macroscópico e atividade da MPO na colite induzida pelo TNBS.** Três dias após a indução da colite os animais tiveram os cólons removidos e avaliados quanto ao dano tecidual macroscópico e atividade da enzima MPO. Os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , i.v.) reduziram significativamente o aumento do (A) escore macroscópico e (B) a atividade da enzima MPO. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. . #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Os cólons dos animais dos diferentes grupos experimentais foram também analisados histologicamente quanto ao dano tecidual microscópico. A instilação do TNBS (1 mg/animal) resultou em destruição da estrutura da mucosa intestinal, perda de células goblets e massivo infiltrado de células inflamatórias no epitélio intestinal (Figura 46 A). No entanto, os tratamentos com AT-RvD1, RvD2, ou 17R-HDHA (1  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ), preveniram a destruição da arquitetura colônica ocasionada pelo TNBS e mantiveram o tecido do cólon com aspecto semelhante ao encontrado em animais do grupo controle. A figura 46 B apresenta a quantificação do escore microscópico relativo aos cortes histológicos apresentados no painel A. Foi observado que o TNBS (1 mg/animal) induz dano microscópico severo, o qual foi reduzido nos grupos que receberam 1  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de AT-RvD1 (68  $\pm$  8 %), RvD2 (66  $\pm$  9 %) ou 17R-HDHA (70  $\pm$  4 %).



**Figura 46. Efeito dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a análise histológica e dano microscópico na colite induzida pelo TNBS.** Três dias após a indução da colite os animais tiveram os cólons removidos e preparados para confecção de lâminas histológicas. (A) Os tratamentos com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA (1 µg/animal, i.v.) reduziram significativamente o dano tecidual e o infiltrado celular. (B) Os tratamentos com os mediadores lipídicos reduziram significativamente o dano tecidual microscópico, comparado ao grupo veículo + TNBS. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao veículo + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls). Cortes histológicos corados com H&E, aumento de 100 X.

## 5 DISCUSSÃO

Diante da necessidade de melhor elucidar alguns dos eventos celulares e moleculares que ocorrem nas IBD, o presente estudo investigou o processo inflamatório decorrente da administração de DSS em camundongos, com o objetivo de mapear as populações celulares e mediadores inflamatórios nas fases aguda, de remissão e crônica durante a colite experimental. Nossos resultados demonstraram que na fase aguda da colite induzida pelo DSS ocorreu infiltração massiva de neutrófilos e aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios. Por outro lado, observamos que durante a fase de recuperação, houve redução dos níveis de células e de mediadores pró-inflamatórios e aumento substancial de mediadores antiinflamatórios. A análise das fases crônicas do processo inflamatório intestinal revelou ainda aumento na produção e na expressão de alguns mediadores pró-inflamatórios, bem como de células inflamatórias, os quais contribuem para retardar a recuperação do quadro clínico dos animais e retardo no processo de resolução da inflamação.

Além disso, buscamos avaliar o possível efeito antiinflamatório dos mediadores lipídicos pró-resolução derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA em diferentes modelos de inflamação intestinal. Nossos dados demonstraram claramente que os tratamentos preventivos com os mediadores lipídicos, reduziram a severidade da doença, o dano tecidual colônico, a infiltração de células inflamatórias e a produção e expressão de mediadores pró-inflamatórios, tanto nos estudos *in vivo* como *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que o efeito da AT-RvD1 é, em parte, dependente da ativação do receptor ALX. Ademais, resultados semelhantes foram obtidos no modelo experimental de colite induzida pelo TNBS, os quais demonstraram que o tratamento com AT-RvD1, RvD2 ou com o 17R-HDHA melhoraram os sinais da doença e a taxa de sobrevivência dos animais, bem como reduziram o dano tecidual no cólon e a atividade da MPO.

As IBD são doenças gastrointestinais caracterizadas por inflamação intestinal e dano à mucosa epitelial, decorrente de uma resposta imunológica alterada e de várias manifestações intra- e extra-intestinais (Jurjus *et al.*, 2004). Nas últimas duas décadas, o número de modelos experimentais de IBD tem aumentado de forma significativa, sendo que vários tipos de manifestações da doença nestes modelos, têm apresentado similaridade às IBD observada em humanos. A utilização desses modelos experimentais tem contribuído de forma crucial para



nossa atual compreensão sobre os mecanismos inflamatórios e o desenvolvimento de terapias utilizadas para o tratamento das IBD (Jurjus *et al.*, 2004).

Embora existam variações nos diferentes métodos de indução de colite experimental, a maioria dos modelos de IBD apresenta aspectos em comum, como o envolvimento de fatores ambientais e resposta imunológica alterada em linhagens de animais geneticamente susceptíveis. Nesse contexto, a indução química de colite pelo DSS é considerada um excelente modelo pré-clínico, o qual apresenta muitos fatores fenotípicos de relevância para as IBD em humanos (Clapper *et al.*, 2007). A colite induzida pelo DSS foi originalmente descrita por Ohkusa *et al.*, (1985), em *hamsters* e, posteriormente modificada para camundongos (Okayasu *et al.*, 1990). Em geral, a colite aguda é induzida pela administração de DSS na água de beber em concentrações que variam 1 – 6 %, por vários dias. Além disso, a exposição de DSS de 1 a 4 ciclos (cada ciclo de 3 – 7 dias de DSS, seguido de ciclo com água filtrada de 10 – 14 dias), mimetiza as fases de surto e remissão da doença em humanos, levando ao surgimento de úlceras na mucosa colônica e estabelecimento da inflamação intestinal crônica (Clapper *et al.*, 2007).

No presente estudo, realizamos a padronização do modelo de inflamação intestinal induzida pelo DSS em camundongos da linhagem BALB/c, e verificamos que na fase aguda do processo inflamatório intestinal (0 – 7 dias), a administração de DSS (2 – 6 %) causou redução significativa no peso corporal dos animais, associado à diarreia e à presença de sangue nas fezes, além de dano tecidual evidente no epitélio intestinal. De fato, muitos estudos têm relatado que o funcionamento inadequado da barreira epitelial pode contribuir para a inflamação intestinal (Strober *et al.*, 2002). Além disso, já é sabido que o bom desempenho da barreira epitelial depende tanto da integridade do epitélio intestinal, quanto da secreção de imunomoduladores por células epiteliais do intestino. Entretanto, a ruptura da barreira epitelial é um fator comum nos modelos experimentais de IBD, principalmente aqueles induzidos quimicamente, como o modelo do DSS ou do TNBS (Kitajima *et al.*, 1999).

Como descrito anteriormente, o modelo de colite induzida pelo DSS é caracterizado por sinais agudos, tais como diarreia e fezes sanguinolentas, além de presença de ulcerações e inflamação generalizada no tecido do cólon (Cooper *et al.*, 1993). De maneira interessante, esses sinais são precedidos pela perda precoce de criptas intestinais (dia 3 após o início da indução), o qual não é acompanhado

por inflamação, mas sim pela redução na expressão e função de glicoproteínas e, conseqüente aumento da permeabilidade da mucosa (Kitajima *et al.*, 1999; Iizasa *et al.*, 2003). Além disso, alguns estudos revelaram que, neste modelo, a inflamação pode ser um fenômeno secundário, pois a colite aguda induzida pelo DSS ocorre mesmo sem a participação de linfócitos T e B (Dieleman *et al.*, 1994). Entretanto, é de consenso que a participação da resposta imune inata na fase aguda da colite induzida pelo DSS é um fator crucial para o desenvolvimento de inflamação intestinal. Ademais, sabe-se que o TNF- $\alpha$ , a IL-12 e a IL-6 estão envolvidos nesse processo, principalmente em linhagens animais susceptíveis ao desenvolvimento de colite (Mahler *et al.*, 1998; Naito *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2003; Naito *et al.*, 2004). Diante do exposto, é comum considerar como principal mecanismo de ação do DSS a sua toxicidade às células epiteliais, que conseqüentemente leva ao aumento da permeabilidade da barreira epitelial e ao posterior encontro da microflora intestinal com granulócitos presentes na mucosa subjacente (Kitajima *et al.*, 1999).

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a administração de DSS por cinco dias consecutivos, causou além do dano tecidual no cólon, o aumento significativo na atividade da enzima MPO, a qual é um indicativo indireto da presença de polimorfonucleares (PMN), na sua maioria neutrófilos, no tecido inflamado. Dessa forma, esses resultados indicaram a associação direta entre o aumento da severidade da doença, dano ao epitélio intestinal e o conseqüente aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa do intestino. A padronização do modelo de colite experimental induzida pelo DSS consistiu na administração de DSS em três diferentes doses (2, 4 e 6 %), as quais apresentaram êxito na indução de todos os sinais patológicos e celulares avaliados. Entretanto, um agravante da aplicação desse modelo foi o baixo índice de sobrevivência dos animais tratados com as doses de 4 e 6 % de DSS, as quais causaram inflamação intestinal severa e debilitante, levando mais de 70 % dos animais à morte, inviabilizando dessa forma, o estudo da fase de recuperação dos animais, bem como da fase de inflamação intestinal crônica.

Com o modelo de colite experimental já padronizado em suas principais características, optamos pela utilização da dose 2 % de DSS, pois de acordo com os resultados apresentados anteriormente, a mesma foi eficaz na indução de colite, de uma forma moderada e consistente, possibilitando a realização de ciclos adicionais de DSS, para o estudo das fases tardias do processo inflamatório intestinal. Estudos têm relatado que a administração de vários ciclos de DSS induz inflamação

intestinal crônica e aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese em camundongos (Wirtz *et al.*, 2007). Além disso, o estudo do modelo de colite induzida pelo DSS, nas fases mais tardias do processo inflamatório agudo, permite estudar novos mecanismos, que podem auxiliar no tratamento das IBD e no monitoramento da patogênese da doença.

Nossos resultados mostraram que a oferta de DSS 2 % durante cinco dias, causou aumento significativo no índice de atividade da doença e redução do peso corporal, principalmente de 8 a 10 dias após o início do tratamento com o DSS. De forma interessante, tanto o peso corporal quanto o índice de atividade da doença, foram reduzidos ao final da primeira fase de recuperação, a qual corresponde ao período de oferta de dez dias com água filtrada. De acordo com esses resultados, notou-se que os sinais clínicos observados na fase aguda foram gradativamente abolidos, e que a administração do DSS provocou inflamação intestinal que se resolveu após um período moderado de recuperação. Muitos dos tratamentos atuais para as IBD consistem na administração de drogas que induzem a remissão da doença, ou seja, período de melhora do quadro clínico do paciente, sem necessariamente o desaparecimento total dos sintomas (Baumgart e Sandborn, 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre quais os tratamentos com maior eficácia para indução da fase de remissão, ou mesmo para ativar e amplificar os mecanismos de resolução da inflamação (Baumgart e Sandborn, 2007).

Após a primeira fase de recuperação, os animais foram novamente submetidos ao regime de DSS 2 % por cinco dias (ciclo 2), o qual resultou em novo aumento da severidade da doença e redução significativa do peso corporal. Como esperado, esses resultados demonstraram que a re-administração da solução de DSS causou piora dos sinais clínicos gerais, os quais não melhoraram significativamente, mesmo após a segunda fase de recuperação. Wirtz e Neurath (2007), relataram que a partir do segundo ciclo de DSS ocorre cronificação do processo inflamatório intestinal, o qual pode mimetizar muitos dos mecanismos patológicos que ocorrem nas IBD. Além disso, estudos demonstraram que as escassas informações sobre as diferentes populações celulares e marcadores moleculares, durante o processo inflamatório intestinal, dificultam o correto tratamento de cada paciente, pois dependendo da fase do processo patológico, algumas alternativas terapêuticas podem ser prejudiciais ou mesmo letais ao indivíduo (Xu *et al.*, 2004; Baumgart e Sandborn, 2007).

Diante dessas informações, procuramos elucidar quais as populações celulares, mediadores inflamatórios ou marcadores

moleculares desempenhavam papel relevante durante o processo agudo, de recuperação e crônico da inflamação intestinal induzida pelo DSS. Nossos resultados demonstraram que, o aumento da severidade da doença durante as fases de oferta de DSS foi acompanhado pelo incremento na atividade da MPO, principalmente no 2º ciclo de DSS, indicando possível participação dos neutrófilos nesses estágios inflamatórios. Por outro lado, os níveis de MPO foram significativamente reduzidos após a primeira fase de recuperação; entretanto, apresentou-se em níveis elevados após a segunda fase de recuperação, indicando participação dos neutrófilos também na cronificação do processo inflamatório intestinal.

Já é bem descrito na literatura que a mobilização rápida e adequada dos neutrófilos é um dos eventos essenciais para a proteção do organismo, entretanto, os vários tipos de metabólitos tóxicos que são liberados por esses leucócitos podem também causar dano ao próprio tecido do hospedeiro (Smith, 1994; Xiao *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2007). A MPO está presente nos grânulos azurófilos do citoplasma dos neutrófilos ativados, onde é responsável pela destruição dos microorganismos que são fagocitados por essas células, clivando estes agentes externos em pequenos peptídeos (Nauseef, 2007). Esta enzima é fundamental na regulação da bomba respiratória nos neutrófilos, mas pode ser altamente tóxica aos tecidos (Edwards e Swan, 1986). Adicionalmente, a MPO pode ser liberada para o exterior da célula, podendo dessa forma, aumentar a destruição tecidual (Klebanoff, 2005). De fato, nossos resultados demonstram uma correlação direta entre os níveis elevados de MPO e severidade da doença.

A formação de abscessos na mucosa epitelial, por exemplo, é uma característica da lesão causada pela transmigração de neutrófilos através do espaço paracelular. Este processo permite a separação dos enterócitos, causando a abertura de espaços entre as estreitas junções que unem as células epiteliais, fazendo com que os neutrófilos se acumulem no interior das criptas intestinais (Kucharzik *et al.*, 2001; Williams e Parkos, 2007). Uma vez ativados, os neutrófilos causam rápido consumo de oxigênio por meio de uma oxidase de membrana (NADPH oxidase), que reduz o oxigênio para ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Bruno *et al.*, 2004). Dessa forma, os neutrófilos presentes no tecido do cólon inflamado, induzem a formação de  $O_2^-$  e a liberação de enzimas presentes em seus grânulos citoplasmáticos. Estes agentes são um dos principais responsáveis pela lesão no tecido inflamado e contribuem de uma forma geral para o aumento da resposta inflamatória (Weiss, 1989; Bruno *et al.*, 2004). Deste modo, os neutrófilos são considerados uma

das principais células responsáveis pelas lesões e disfunções associadas às IBD (Kucharzik *et al.*, 2001; Williams e Parkos, 2007). Estudos realizados por Natsui e colaboradores (1997) demonstraram que o anticorpo monoclonal (RP-3), que provoca a depleção de neutrófilos, é capaz de reduzir o dano tecidual no cólon de ratos com colite experimental induzida pelo DSS. Outro estudo revelou que o bloqueio da adesão dos neutrófilos, por meio dos anticorpos para a integrina CD11b/CD18, reduz o infiltrado celular e o tamanho das ulcerações no modelo de colite induzida pelo TNBS (Palmen *et al.*, 1995).

Além da medida da atividade da MPO, nosso trabalho evidenciou que a atividade da EPO está elevada ao final das duas fases de indução, sugerindo participação dos eosinófilos no processo inflamatório intestinal, apenas nas fases de surto da doença. Estudos têm demonstrado que os eosinófilos são leucócitos multifuncionais, com capacidade de iniciar ou potencializar a resposta inflamatória, através da liberação de uma variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Gleich *et al.*, 1993; Rothenberg, 1998; Rothenberg *et al.*, 2001). Essas células podem produzir disfunções gastrointestinais através da ação de proteínas presentes em seus grânulos citoplasmáticos, como por exemplo, a eosinófilo peroxidase (EPO). Alguns estudos clínicos têm apontado correlação positiva entre o número de eosinófilos, através da atividade da EPO, e a severidade da UC em biópsias de tecido de pacientes (Carlson *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 1999; Jeziorska *et al.*, 2001; Sangfelt *et al.*, 2001). Essa enzima possui 70 % de homologia com a MPO (O'Brien, 2000), e também desempenha papel fundamental na lise de microorganismos patogênicos, porém, sua liberação em massa, pode contribuir para a lesão de tecidos subjacentes ao foco inflamatório (McCormick *et al.*, 1994).

Apesar da importância dos eosinófilos em modelos de colite experimental já ter sido descrita em diversos trabalhos (Forbes *et al.*, 2004; Al-Haddad e Riddell, 2005; Eijkelkamp *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2007), os neutrófilos é que parecem ter maior participação no dano tecidual verificado no cólon dos animais com colite experimental (Bento *et al.*, 2008). Além disso, os neutrófilos correspondem a cerca de 60 % de todos os leucócitos circulantes e formam a primeira linha de defesa celular do organismo em uma reação inflamatória (Smith, 1994). Diante desses dados, e de acordo com nossos resultados, a redução da atividade da MPO, ou mesmo o bloqueio da infiltração dos neutrófilos na mucosa intestinal, parece ser uma alternativa importante para a redução dos sintomas clínicos ou indução da fase de remissão das IBD.

Alguns estudos têm descrito que os macrófagos estão envolvidos na patogenicidade das IBD, principalmente por produzirem uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias (Rogler e Andus, 1998; Kanai *et al.*, 2001; Autschbach *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2003). Em concordância com esses dados, Kanai e colaboradores (2001) demonstraram que há um aumento do número de macrófagos ativados no cólon de animais com colite experimental, e que a depleção destas células reduz a inflamação intestinal. Além disso, essas células também podem gerar metabólitos reativos de oxigênio e de nitrogênio, além de proteases que degradam a matriz extracelular causando dano tecidual (Mahida, 2000). Entretanto, os macrófagos podem apresentar diferentes fenótipos funcionais, podendo, em alguns casos, produzir fatores imunossupressores e antiinflamatórios, os quais podem atuar no reparo do tecido lesado (Garside, 1999; Jurjus *et al.*, 2004). Por exemplo, no modelo de colite induzida por DSS, Qualls e colaboradores (2006) demonstraram que a depleção de macrófagos aumenta a lesão tecidual e o conteúdo de neutrófilos no cólon de camundongos.

Apesar da aparente contradição desses resultados, tanto Kanai quanto Qualls demonstraram que o número elevado de macrófagos só é detectado nas fases mais tardias da colite experimental (Kanai *et al.*, 2001; Qualls *et al.*, 2006), sugerindo que o período inicial do processo de inflamação intestinal não parece depender da migração de macrófagos, mas sim da atividade dos macrófagos residentes. Em concordância com esses resultados, nossos dados demonstraram que a atividade da enzima NAG, a qual indica a presença de macrófagos no tecido inflamado, não apresentou aumento significativo nas fases de indução, ou mesmo, na primeira fase de recuperação, sendo somente detectada, trinta dias após o início do tratamento com DSS, ou seja, na fase de cronificação da doença. Entretanto, devido as diferentes naturezas fenotípicas dos macrófagos, as sugestões de terapias que envolvam o bloqueio da atividade dessas células tornam-se extremamente arriscadas, uma vez que a migração dos macrófagos na fase crônica da colite, pode estar diretamente relacionada ao balanço homeostático intestinal e acionamento de mecanismos antiinflamatórios e de resolução da inflamação.

Ainda com o intuito de pesquisar as populações celulares presentes nos distintos períodos da colite induzida pelo DSS, foram realizadas as quantificações dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes no linfonodo mesentérico de animais com colite experimental. Os resultados revelaram que, assim como a atividade da NAG, as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentaram aumento apenas

ao final da segunda fase de recuperação (trinta dias após o início do tratamento com DSS), indicando a participação dos linfócitos na fase crônica da inflamação intestinal induzida pelo DSS. Além disso, observamos que apenas a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estava significativamente ativada, indicando que apesar do aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase crônica da colite experimental, apenas a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> parece desempenhar papel sobre a patogênese do modelo em estudo.

Assim como descrito anteriormente, o desenvolvimento de colite induzida pelo DSS depende principalmente de componentes da resposta imune inata na fase aguda da inflamação intestinal, não requerendo o envolvimento da resposta imune adaptativa. De fato, Dieleman e colaboradores (1994) demonstraram que o DSS causa inflamação intestinal em camundongos deficientes em linfócitos T e B, evidenciando pouca relevância dessas células no desenvolvimento da colite induzida pelo DSS, pelo menos na fase aguda do processo. Entretanto, Okayasu *et al.*, (1990), demonstraram que a colite crônica induzida pela DSS é também causada por linfócitos, os quais são ativados principalmente através de citocinas inflamatórias secretadas pelos macrófagos. De acordo com esses dados, nossos resultados apresentaram uma correlação entre o aumento da atividade da NAG (indicativo de migração de macrófagos) e aumento da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido pelo DSS. Assim, esses dados podem indicar que no processo inflamatório intestinal agudo pode haver pouca participação de linfócitos, os quais teriam maior relevância após períodos de reincidência do processo inflamatório intestinal. Entretanto, é de consenso que o desbalanço entre as sub-populações de linfócitos T, quais sejam as células T regulatórias, Th1, Th2 e Th17, induz a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e redução de citocinas anti-inflamatórias, impactando negativamente a homeostasia do cólon, favorecendo o surgimento ou agravamento das IBD (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

Essas evidências levam ao entendimento de que, a ativação prolongada e inadequada do sistema imunológico intestinal, exerce papel importante na patofisiologia da inflamação crônica da mucosa intestinal. Essa conclusão é baseada em observações que evidenciaram o aumento, em grande quantidade, de mediadores inflamatórios na mucosa intestinal inflamada, tanto em modelos experimentais, quanto em biópsias de cólon de pacientes. Além disso, testes clínicos têm demonstrado que o bloqueio de vários desses mediadores pró-

inflamatórios, principalmente citocinas, proporcionou melhora significativa no tratamento dos pacientes com IBD (James e Klapproth, 1996). Por essas razões, o papel das citocinas no sistema imunológico da mucosa intestinal tem sido amplamente estudado, e, além disso, estudos têm revelado que o desbalanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias é um dos pontos chave na patofisiologia das IBD (Rogler e Andus, 1998).

Nossos resultados demonstraram que, o aumento da severidade da doença e da migração de células da linhagem mieloide, está correlacionado com o aumento da produção e expressão do RNAm para a citocina TNF- $\alpha$ , principalmente na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido pelo DSS. Por outro lado, observamos aumento da produção e expressão do RNAm para a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , apenas após o segundo ciclo de DSS, indicando sua participação nos estágios crônicos desse modelo. Desse modo, esses dados parecem sugerir que o TNF- $\alpha$  está principalmente envolvido na gênese da colite induzida pelo DSS, ao passo que a IL-1 $\beta$  parece exercer papel crucial na manutenção e perpetuação dos estágios tardios da inflamação intestinal.

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pró -inflamatória considerada crucial na patofisiologia das IBD. Uma evidência dessa importância é a realização de vários estudos clínicos, nos últimos dez anos, com o objetivo de avaliar a eficácia de anticorpos monoclonais contra o TNF- $\alpha$  nas IBD (Rogler e Andus, 1998). A participação dessa citocina, no processo inflamatório intestinal, tem sido amplamente estudada, e, atualmente, o anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  é um dos medicamentos mais eficazes para o tratamento e indução da fase de remissão em pacientes com IBD (Popivanova *et al.*, 2008). Entretanto, estudos vêm demonstrando que cerca de 50% dos pacientes com CD não respondem a terapia com anti-TNF- $\alpha$  (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2008). Além disso, os dados publicados sobre a expressão do TNF- $\alpha$  nas IBD são contraditórios. Alguns grupos têm demonstrado aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em diferentes modelos de colite experimental (Braegger *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1992; Fiorucci *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2003). Por outro lado, outros estudos não foram capazes de detectar níveis significativos dessa citocina em pacientes com UC (Youngman *et al.*, 1993). Possivelmente, a discordância entre os dados da literatura, deve ser, pelo menos em parte, resultante da cinética de produção desta citocina, uma vez que nossos resultados e dados prévios do nosso grupo de pesquisa, sugerem que o TNF- $\alpha$  atua principalmente na fase aguda do processo inflamatório intestinal.



Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  é um importante e potente mediador inflamatório, que atua ativando diferentes células através de sua ligação ao seu receptor específico (IL-1R). Esta citocina induz a síntese e a secreção de quimiocinas e outras citocinas, promovendo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Lin et al., 2002). Estudos demonstraram que o bloqueio do receptor IL-1R diminui a severidade da inflamação em modelos crônicos de colite experimental (Bachmann et al., 2006). Além disso, muitos trabalhos têm verificado que a expressão da IL-1 $\beta$  está aumentada em pacientes com IBD (Mahida et al., 1989; Ligumsky et al., 1990; Isaacs et al., 1992; Youngman et al., 1993; Casini-Raggi et al., 1995; Radford-Smith e Jewell, 1996; Andus et al., 1997; Jurjus et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados e dados prévios da literatura, sugerem que uma possível terapia contra a citocina IL-1 $\beta$  poderia ser melhor aplicada nos estágios crônicos das IBD.

Outra importante citocina na patogênese das IBD é a IL-12. Estudos demonstraram que a colite experimental induzida pelo TNBS é completamente revertida com a utilização do anticorpo monoclonal contra a IL-12, que é considerada a principal citocina da resposta imune do tipo Th1 (Neurath *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001). Estes achados, juntamente com o fato de pacientes com CD apresentarem altos níveis de IL-12 na lâmina própria, levaram ao desenvolvimento do anticorpo humanizado direcionado a subunidade p40 da IL-12 (anti-IL-12p40), para o tratamento de pacientes com CD (Matsuoka *et al.*, 2004; Fuss *et al.*, 2006). Mannon e colaboradores (Mannon *et al.*, 2004), demonstraram que o tratamento com o anticorpo anti-IL-12p40 apresentou eficácia muito semelhante à utilização da terapia anti-TNF- $\alpha$ . Além disso, os mesmos autores evidenciaram que o anticorpo anti-IL-12p40 induz remissão em pacientes com CD resistentes ao tratamento com anti-TNF, colocando a citocina IL-12 como um dos principais alvos de estudo na patogênese das IBD. Nossos resultados demonstraram que a produção de IL-12 na colite induzida pelo DSS, foi significativamente maior que o grupo controle, apenas na fase aguda do processo inflamatório intestinal, sugerindo sua participação na gênese da colite experimental. De forma interessante, estudos recentes demonstraram que o TNF- $\alpha$ , induz particularmente, a secreção de IL-12 em estágios de surto de doenças autoimunes (Strober e Fuss, 2011). Desse modo, considerando essas evidências, nossos dados indicam a participação de ambas as citocinas na colite experimental induzida pelo DSS, sobretudo na fase aguda do processo inflamatório.

Os estudos de Mazzucchelli e colaboradores (1994), realizados em cólons de pacientes portadores de UC, demonstraram que a expressão da quimiocina CXCL1/KC, envolvida na migração dos neutrófilos, está intimamente relacionada com a severidade da inflamação. Desta forma, outra estratégia para a redução da migração de neutrófilos e, conseqüentemente, do dano tecidual, seria a depleção e/ou inibição dos receptores desta quimiocina. De fato, Buanne e colaboradores (2007) demonstraram recentemente que, camundongos com deleção gênica para o receptor CXCR2 apresentam drástica redução dos parâmetros histopatológicos avaliados no modelo de colite experimental induzida pelo DSS. Além disso, dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com anticorpo anti-KC reduziu acentuadamente a severidade da colite experimental (Bento *et al.*, 2008). Nossos dados evidenciaram que, tanto a expressão do RNAm, como os níveis proteicos da quimiocina CXCL1/KC, foram significativamente aumentados durante as fases de indução da colite, estando reduzidos nas fases de recuperação. Esses dados corroboram com o alto índice de atividade da MPO observado nos períodos de indução, sugerindo que a migração de neutrófilos para o cólon inflamado parece ser dependente da secreção de CXCL1/KC.

Outra citocina avaliada no presente estudo foi a IL-17. Na CD, a resposta Th1 parece estar influenciada pelas células Th17, que são caracterizadas pela produção massiva de IL-17 (Kolls e Linden, 2004). A produção desta citocina é estimulada pela IL-6, TGF- $\beta$  e IL-23, e por produtos secretados de neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, especialmente as células dendríticas (Sartor, 2006). Os níveis tanto de IL-23, quanto de IL-17, encontram-se aumentados em tecidos de pacientes com CD e em alguns tipos de colite experimental (Schmidt *et al.*, 2005). Entretanto, dados recentes revelaram que o tratamento com Fontolizumab, um anticorpo contra a IL-17, apresentou pouca eficiência em pacientes com CD e UC, sugerindo pequena participação desta nessas doenças (Reinisch *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram que a expressão do RNAm para a IL-17 apresentou um pequeno aumento, porém significativo, após o primeiro ciclo de DSS, o qual permaneceu elevado, mesmo após a fase de recuperação. Todavia, a expressão do RNAm para a IL-17 apresentou aumento marcante após a segunda fase de indução da colite, possivelmente devido ao aumento na expressão do RNAm para o TGF- $\beta$  neste mesmo período.

Apesar do TGF- $\beta$  induzir a diferenciação de células Th17, essa citocina tem sido descrita como benéfica nas IBD. Neste contexto, foi demonstrado que animais com mutações nos genes que codificam o

TGF- $\beta$  apresentaram aumento na severidade da colite em diferentes modelos experimentais (Jarry *et al.*, 2008). Ademais, animais tratados com o vetor carregado de DNAc para o TGF- $\beta$ , apresentaram redução nos sinais inflamatórios da colite induzida pelo TNBS. Além disso, o TGF- $\beta$  atua na inibição de monócitos, inibição da produção de radicais livres e bloqueio da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (Espevik *et al.*, 1987). Nossos resultados mostraram que na fase crônica da colite induzida pelo DSS ocorreu aumento significativo, tanto na expressão do RNAm, quanto nos níveis teciduais da TGF- $\beta$  no cólon dos camundongos. Dessa forma, os dados da literatura, juntamente com nossos resultados, parecem apontar para um papel regulatório do TGF- $\beta$  na fase crônica da colite induzida pelo DSS, uma vez que esta citocina pode estar contrabalaneando a expressão de mediadores pró-inflamatórios e auxiliando no processo de reparo tecidual durante a segunda fase de recuperação.

As citocinas antiinflamatórias IL-10 e IL-4 também foram pesquisadas na colite induzida pelo DSS, e nossos resultados demonstraram que os níveis dessas citocinas estavam elevados somente nas fases de recuperação do processo inflamatório intestinal. Diversos estudos apontam o papel dessas citocinas na regulação da atividade antiinflamatória, tanto em modelos experimentais de colite, como em pacientes com UC (Hong *et al.*, 2002; Ukil *et al.*, 2003). A citocina IL-10 é produzida por uma variedade de células, incluindo os linfócitos T e B, tímócitos, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células do epitélio intestinal (Papadakis e Targan, 2000). Camundongos com deleção gênica para a IL-10 desenvolvem colite espontânea, e esse processo pode ser prevenido através da reposição de IL-10 (Kuhn *et al.*, 1993; Papadakis e Targan, 2000; Lindsay *et al.*, 2004; Shiraki *et al.*, 2004). Essa citocina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Fiorentino *et al.*, 1991; Fiocchi, 1998). Além disso, a terapia gênica com IL-10 tem se mostrado eficiente em alguns modelos de colite experimental (Lindsay *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2004). Dessa forma, a IL-10 parece desenvolver um papel crucial no mecanismo de defesa do organismo e na regulação da resposta inflamatória na mucosa intestinal.

A IL-4 também possui propriedades antiinflamatórias e imunoregulatórias importantes nas IBD (Niessner e Volk, 1995). Esta citocina é capaz de inibir a formação de colônias de macrófagos e a liberação de mediadores inflamatórios, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Rogler e Andus, 1998). Desse modo, macrófagos residentes e/ou células epiteliais, poderiam liberar grandes quantidades dessas citocinas (IL-4 e

IL-10), que por sua vez, agiriam em conjunto sobre células inflamatórias, inibindo a secreção de mediadores pró-inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  e IL-12, contribuindo de um modo geral para a redução da severidade da colite durante as fases de recuperação, assim como observado neste estudo.

No processo inflamatório intestinal, células como os macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e as células epiteliais secretam grandes quantidades de citocinas e quimiocinas, que atuam na migração de neutrófilos e monócitos. Além disso, as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentam a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (Macdermott, 1999). Esse aumento na produção de citocinas e quimiocinas e, na expressão de moléculas de adesão, promove maior migração de macrófagos e granulócitos para a mucosa intestinal inflamada.

Após a avaliação de algumas das principais citocinas inflamatórias envolvidas nas IBD, foi verificada a expressão do RNAm para as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 no cólon, uma vez que estas são cruciais para a transmigração de leucócitos para o tecido inflamado, e conseqüente agravamento da colite experimental. Nossos resultados demonstraram que o aumento das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 nas fases de indução da colite corroboram com os achados para a atividade da MPO, indicando que ocorreu uma correlação entre o aumento da migração de neutrófilos para a mucosa intestinal, dependente da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 no tecido do cólon.

Estudos têm demonstrado que células inflamatórias residentes, como os macrófagos, podem liberar grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , o qual pode aumentar a expressão de moléculas de adesão, como a VCAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais, e assim, aumentar expressivamente o rolamento de leucócitos para a mucosa intestinal (Ley *et al.*, 2007). Além disso, a ativação dos receptores TLR4, por peptídeos bacterianos, induz a expressão de VCAM-1 e ICAM-1, possivelmente pelo contato excessivo da microflora intestinal com a camada de células subjacente ao epitélio lesionado, principalmente nas fases de surto das IBD (Goebel *et al.*, 2006).

Outro mediador inflamatório avaliado, no presente estudo, foi a enzima COX-2. A enzima COX-2 tem sido descrita como importante agente no processo de resolução da inflamação. Apesar, de vários estudos, sobretudo em IBD, apontarem para um papel pró-inflamatório dessa enzima, alguns autores têm evidenciado o papel intrínseco da

COX-2 no reparo do dano tecidual (McCafferty *et al.*, 1999; Wallace, 2006). De fato, parece haver um papel dual dessa enzima durante a inflamação intestinal, onde em determinados momentos apresenta características pró-inflamatórias e em outros parece ser fundamental para a recuperação da integridade tecidual. Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa diferença de resposta ainda permanecem pouco esclarecidos.

Diversos estudos demonstram a importância da produção de derivados do ácido araquidônico pela ação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e também da 5-lipoxigenase nas fases iniciais do processo inflamatório, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que é importante na geração de alterações vasculares que favorece a inflamação, e o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), que é importante para a migração de leucócitos até o foco inflamatório. Entretanto, nas fases de resolução da inflamação intestinal, foram observadas importantes alterações no metabolismo do ácido araquidônico, que têm como consequência a resolução da inflamação. Por exemplo, a interação entre plaquetas e neutrófilos aderidos ao endotélio torna possível a produção de lipoxina A<sub>4</sub> e B<sub>4</sub>, a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima COX-2 acetilada pela aspirina. Essas lipoxinas reduzem a migração de polimornucleares para o foco da inflamação, impedindo assim a amplificação da resposta inflamatória, além de promoverem a apoptose e fagocitose (Serhan e Savill, 2005). Adicionalmente, ocorre alteração na expressão das enzimas que participam do metabolismo do ácido araquidônico, que passam a produzir essencialmente prostaglandina D<sub>2</sub> e J<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>/PJD<sub>2</sub>), ao invés de PGE<sub>2</sub>. As PGD<sub>2</sub> e a PJD<sub>2</sub>, por sua vez participam de importantes processos relacionados à diminuição da inflamação como a inibição da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (Wallace, 2006). Desse modo, esses dados, somados aos nossos resultados, indicam que o aumento da expressão da enzima COX-2, observado no cólon dos animais durante as fases de recuperação da colite induzida pelo DSS, estão diretamente relacionados aos mecanismos de reparo tecidual e resolução da inflamação intestinal.

Devido ao fato de as lipoxinas serem fundamentais no processo de resolução da inflamação, foi também avaliada no presente estudo a expressão do RNAm para o receptor de lipoxina A<sub>4</sub> (ALX/FPR2) durante as diferentes fases da colite experimental induzida pelo DSS. Nossos dados revelaram que, apenas ao final do segundo ciclo de DSS ocorreu aumento do receptor ALX/FPR2 no tecido do cólon de camundongos. Esse receptor está expresso principalmente em macrófagos, e tem apresentado natureza promíscua, ou seja, pode ser

ativado por vários ligantes (Rabiet *et al.*, 2011). Esses ligantes compreendem peptídeos bacterianos, a proteína  $\alpha$ -amilóide, dentre outros, os quais desencadeiam respostas pró-inflamatórias, tais como secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da migração celular. Entretanto, foi verificado ainda que dependendo do sítio de ativação do receptor, é desencadeada a resposta antiinflamatória, que culmina em inibição de mediadores inflamatórios e no aumento da fagocitose de bactérias e de células apoptóticas (Serhan e Chiang, 2004). Dessa forma, a atividade desse receptor ainda é uma questão bastante intrigante em diversas condições patológicas. Assim, nossos resultados sugerem que a administração de agonistas desse receptor, com atividade pró-resolução, podem ser ferramentas importantes para o tratamento das IBD, principalmente nas fases de surto da doença.

Os altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  encontrados nas fases crônicas, sobretudo no período de recuperação, nos levaram a questionar sobre a possível participação das células T regulatórias no processo inflamatório intestinal induzido pelo DSS, uma vez que são as principais citocinas secretadas por esse tipo celular. Nossos resultados mostraram que o fator de transcrição FoxP3 e o receptor para a citocina IL-2, também conhecido como CD25, os quais são marcadores moleculares das células T regulatórias, estavam significativamente aumentados a partir da primeira fase de recuperação, atingindo o pico de expressão trinta dias após o início do tratamento com o DSS. Esses resultados indicam a possível relação entre o acúmulo dessas células na mucosa intestinal e o aumento na secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ , principalmente nas fases de resolução da inflamação.

A presença de bactérias da flora comensal proporciona um balanço entre células efetoras e regulatórias, de modo a controlar a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias, o que permite a manutenção da homeostasia do trato gastrointestinal (Macdonald e Monteleone, 2005); (Rescigno *et al.*, 2001). Adicionalmente, outros estudos demonstraram que as células T regulatórias estão intimamente relacionadas ao processo de resolução e a proteção da mucosa intestinal, pois representam um dos mecanismos de prevenção do hospedeiro contra doenças imunológicas durante processos crônicos de inflamação. O fator de transcrição FoxP3 desempenha papel crítico na função das células T regulatórias, sendo um componente essencial no mecanismo de ativação dessas células. Ademais, já foi demonstrado na literatura, que o aumento da atividade das células T regulatórias pode ser útil para o controle da resposta desenfreada de outras células T e pode também

inibir o desenvolvimento de doenças como a asma e as IBD (Coombes *et al.*, 2005).

Desse modo, esses dados, e nossos resultados, sugerem que parece haver um fino balanço entre os mediadores pró- e antiinflamatórios durante as fases de recuperação e crônica da colite induzida pelo DSS. Ademais, os estudos que investigaram a regulação da expressão dos diferentes mediadores inflamatórios, durante o processo prolongado de colite induzida pelo DSS, ainda são escassos. Por esse motivo, finalizamos a pesquisa sobre o modelo de colite aguda e crônica induzida pelo DSS com a realização do ensaio da expressão de proteínas da via do NF $\kappa$ B, o qual é um dos fatores de transcrição mais importantes para expressão da maioria dos mediadores inflamatórios avaliados nesse estudo. De forma interessante, nossos resultados mostraram que ocorreu aumento gradativo, a partir do 15º dia após o início do tratamento com DSS, da expressão da forma fosforilada da proteína inibitória do NF $\kappa$ B, o I $\kappa$ B $\alpha$ , quanto da subunidade p65 do NF $\kappa$ B, indicando aumento da atividade do NF $\kappa$ B tanto na segunda fase de indução, quanto nas fases de recuperação.

A elevação do nível de fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  indica aumento da atividade do NF $\kappa$ B, uma vez que sua fosforilação induz a liberação das subunidades p50 e p65 do NF $\kappa$ B, e a consequente ubiquitinação do I $\kappa$ B $\alpha$ . Além disso, o incremento na expressão da proteína fosforilada p65, sugere aumento na transcrição de genes importantes na patogênese da colite, tanto na segunda fase de indução (20º dia), como nas fases de recuperação (15º e 30º dias). Por exemplo, inúmeros dados demonstraram que citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 são transcritas pelo aumento da atividade do NF $\kappa$ B (Baumgart e Carding, 2007). Essas citocinas, uma vez secretadas, podem atuar em seus receptores específicos, e aumentar a atividade do NF $\kappa$ B, em um ciclo vicioso de ativação (Ghosh e Hayden, 2008). Além disso, a expressão de quimiocinas como a CXCL1/KC, bem como o aumento na expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, são positivamente reguladas pela atividade do NF $\kappa$ B (Macdonald *et al.*, 1992; Rhee *et al.*, 2011), sugerindo papel crucial desse fator de transcrição na regulação da resposta imune pró-inflamatória nas IBD.

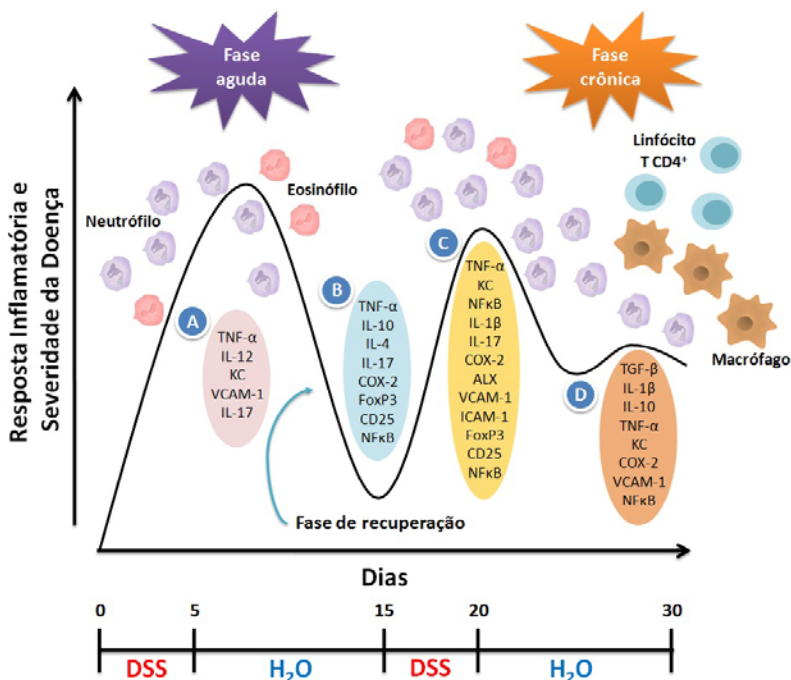
Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que o NF $\kappa$ B é crítico no processo de resolução da inflamação e reparo tecidual. De fato, foi demonstrado que a inibição do NF $\kappa$ B, na fase aguda de algumas condições inflamatórias, pode inibir a inflamação, porém, causa atraso significativo no reparo tecidual (Lawrence *et al.*, 2001). Além disso, outro estudo mostrou que a ativação do NF $\kappa$ B, através dos receptores do

tipo *toll*, é importante para a manutenção do epitélio intestinal (Lawrence *et al.*, 2001). Além das funções citadas anteriormente para o NFκB, é sabido que a transcrição das citocinas antiinflamatórias IL-4 e TGF-β, pode ser regulada por esse fator (Shen e Stavnezer, 1998; Lin *et al.*, 2011), as quais quando secretadas no cólon inflamado, podem favorecer o processo de reparo tecidual e a redução da resposta pró-inflamatória.

Diante dessas evidências, nossos resultados apontam para um papel dual do NFκB, durante a colite experimental induzida pelo DSS, atuando na regulação da expressão de mediadores pró-inflamatórios, e também nos mecanismos de reparo tecidual e secreção de citocinas antiinflamatórias. Embora o NFκB seja descrito, na sua maior parte, como agente indutor de mecanismos relacionados à inflamação e respostas deletérias em condições patológicas crônicas, nossos resultados, bem como os estudos anteriormente citados, apontam para um possível papel benéfico desse fator de transcrição na patogênese das IBD.

De modo geral, nosso estudo, até o momento, buscou mapear algumas das populações celulares, mediadores inflamatórios e marcadores moleculares importantes para o processo de inflamação intestinal induzido pelo DSS, assim como apresentado na figura 47. Além disso, essa etapa do estudo buscou auxiliar na compreensão do modelo de colite induzida pelo DSS e sugerir possíveis interferências terapêuticas para o tratamento das IBD. Entretanto, vale ressaltar que o estudo do modelo isolado de colite induzida pelo DSS não reproduz de forma fidedigna a patologia encontrada em humanos. Porém, acreditamos que a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas diferentes fases do modelo experimental, pode servir como informações valiosas para o diagnóstico das IBD, através da identificação de marcadores moleculares, e conseqüente direcionamento do correto tratamento nas fases específicas em que cada paciente se encontra.





**Figura 47. Eventos inflamatórios durante a colite experimental induzida pelo DSS. A resposta inflamatória aguda tem início durante a primeira fase de indução, ou seja, no primeiro ciclo de DSS. (A)** Apresenta alguns dos mediadores inflamatórios envolvidos na resposta aguda da colite induzida pelo DSS, evidenciando o aumento da infiltração de neutrófilos e eosinófilos, bem como a produção de mediadores pró-inflamatórios. **(B)** A redução da severidade da doença é acompanhada pelo aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios e redução do infiltrado celular, porém com pouca, mas persistente, produção de alguns mediadores pró-inflamatórios. **(C)** A oferta de um novo ciclo de DSS reinicia o aumento da resposta inflamatória no cólon dos animais, com aumento ainda maior na infiltração de neutrófilos e produção de alguns mediadores inflamatórios não observados na fase aguda. **(D)** Após o segundo ciclo de DSS, a resposta inflamatória colônica parece ser caracterizada pela produção de uma variedade de mediadores pró- e anti-inflamatórios, além do aumento significativo na migração de macrófagos e células da resposta imune adaptativa, como os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, caracterizando um quadro de inflamação crônica.

Em outro momento, o presente estudo buscou avaliar a importância do tratamento com mediadores lipídicos derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 na colite experimental. As pesquisas bibliográficas apresentam escassos estudos com esses mediadores em modelos de colite, mas revelam que a suplementação nutricional com os ácidos graxos poliinsaturados essenciais, tal como o ômega-3, tem

ganhado muita atenção nos últimos anos, devido ao fato desses ácidos graxos serem precursores de mediadores lipídicos que são críticos para várias vias de sinalização celular e por serem extremamente importantes no processo de resolução de diversas doenças inflamatórias (Arita, Bianchini et al., 2005; Arita, Yoshida et al., 2005).

Assim como abordado anteriormente, o processo de resolução da inflamação é altamente controlado e envolve a supressão da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da migração e ativação de leucócitos. Concomitantemente, este processo promove a remoção de microorganismos patogênicos e células inflamatórias do local da lesão através do aumento da fagocitose comumente mediada por macrófagos (Lawrence et al., 2002). A ativação das vias que culminam na resolução da inflamação pode estimular a produção e liberação de mediadores antiinflamatórios como o TGF- $\beta$ 1 e a IL-10, os quais reduzem a intensidade da resposta inflamatória (Bannenberg et al., 2005; Souza et al., 2007). Além disso, alguns mediadores lipídicos desempenham papel chave na manutenção da homeostase do organismo e no reparo a danos teciduais. As resolvinas, protectinas e lipoxinas são as principais classes de substâncias endógenas responsáveis pelo controle da resolução da inflamação (Schwab e Serhan, 2006).

As resolvinas foram originalmente isoladas de exudatos inflamatórios encontrados na fase de resolução da inflamação aguda, tanto em humanos como em roedores (Serhan et al., 2000; Serhan et al., 2002; Hong et al., 2003). Desde então, uma série de estudos têm sido realizados, os quais mostraram que as resolvinas possuem ações benéficas em diversos modelos experimentais de inflamação, e mais recentemente de nocicepção (Ji et al., 2011). Esses estudos vieram a confirmar o conhecido uso popular do óleo de peixe, o qual tem sido consumido por várias gerações no combate a diversas doenças. Entretanto, se acreditava que o efeito benéfico do óleo de peixe era unicamente devido os seus altos níveis de vitamina D, pois até a última década, pouco se sabia dos reais benefícios do ômega-3 na prevenção e no tratamento de doenças inflamatórias (Vilaseca et al., 1990). Contudo, após a descoberta dos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, e suas ações na prevenção de doenças, o consumo desse ácido graxo tem sido estimulado fortemente nas dietas atuais (Ji et al., 2011).

Atualmente sabe-se que os ácidos graxos derivados do ômega-3, EPA e DHA, são apenas armazenados nas células, e só sofrem metabolização para a formação de resolvinas, protectinas ou maresinas, durante respostas inflamatórias. Isso se deve ao fato de que o aumento na expressão das enzimas 5-LOX, 15-LOX ou COX-2, as quais são

responsáveis pela conversão do ômega-3 em resolvinas, estar aumentado apenas durante condições inflamatórias (Ji et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram também que a taxa de absorção oral do EPA e do DHA chega a ser maior que 95 %, enquanto a de outros ácidos graxos como os triglicerídeos e etil ésteres é de aproximadamente 65 e 21 %, respectivamente (Lawson e Hughes, 1988). Esses estudos revelaram ainda que, as células epiteliais do intestino assimilam rapidamente o ômega-3 na forma de ácido graxo livre, sem a necessidade de hidrólises anteriores, aumentando assim sua rápida disponibilidade para atuação em processos patofisiológicos (Lawson e Hughes, 1988).

Alguns estudos têm evidenciado os benefícios cardiovasculares importantes dos derivados do ômega-3, principalmente no tratamento de pacientes com infarto no miocárdio (Roth e Harris, 2010; Saravanan et al., 2010). Além disso, assim como descrito anteriormente, esses ácidos graxos têm apresentado boa eficácia no tratamento da artrite reumatóide, nas doenças neurodegenerativas e em doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (Fetterman e Zdanowicz, 2009). Entretanto, a grande maioria desses estudos utilizou como produto de tratamento o óleo de peixe, o qual contém uma mistura heterogênea de EPA e DHA, permitindo interpretação apenas parcial dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos desses ácidos graxos (Cho et al., 2011).

Recentemente, estudos clínicos foram realizados utilizando o mediador derivado do ácido graxo EPA, a RvE1, denominada clinicamente como RX-10001, em pacientes com diferentes doenças inflamatórias, tais como asma, doenças cardiovasculares e IBD. Apesar do RX-10001 ter apresentado bons resultados no tratamento dos pacientes, esses estudos ainda se encontram no início da fase II de pesquisa clínica. Além disso, um análogo sintético da RvE1, o RX-10004, está em estudo clínico de fase III para a síndrome do olho seco e doenças da retina ocular, o qual tem apresentado resultados promissores no tratamento dessas doenças (Lee, 2012). Apesar desses resultados positivos, poucos estudos clínicos, ou mesmo pré-clínicos, têm sido realizados com os mediadores derivados do ácido graxo poliinsaturado DHA, dessa forma, fazendo-se necessária a pesquisa do possível efeito das resolvinas da série D na melhora de patologias importantes para a clínica atual.

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que o tratamento preventivo com os mediadores isolados do ômega-3, a AT-RvD1 e a RvD2, bem como com o precursor das resolvinas, o 17R-HDHA, reduziram, de forma surpreendente, os sinais da doença e o dano tecidual colônico em dois diferentes modelos de colite experimental.

Ainda, tais tratamentos foram também capazes em reduzir os níveis, bem como a expressão de mediadores inflamatórios, tanto quando avaliado *in vivo* como *in vitro*. Além disso, demonstramos que o efeito antiinflamatório da AT-RvD1 foi dependente da ativação do receptor ALX/FPR2.

Assim como descrito anteriormente, as IBD são caracterizadas pela resposta imune desregulada, frente à microbiota comensal em indivíduos geneticamente susceptíveis (Ishida et al., 2010). Assim como observamos nos primeiros resultados dessa tese, a administração dos polímeros de DSS na água de beber leva ao desenvolvimento de um quadro de inflamação intestinal agudo com o desenvolvimento de diarreia sanguinolenta, perda de peso corporal sustentada, associado com a infiltração de células inflamatórias na mucosa intestinal. Entretanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA reduziu de forma consistente o índice de atividade da doença, a perda de peso corporal, o dano tecidual macroscópico e a infiltração celular na mucosa epitelial do cólon de camundongos com colite induzida pelo DSS.

De fato, já foi demonstrado que os ácidos graxos poliinsaturados são potentes mediadores antiinflamatórios, os quais atuam no controle da atividade da doença da colite induzida pelo DSS. Por exemplo, a administração oral do ácido graxo docosaexaenóico (DHA) resultou em inibição significativa da perda de peso corporal, redução do tamanho do cólon e do dano tecidual na colite experimental em camundongos (Cho et al., 2011). Além disso, o tratamento sistêmico com a RvE1, a qual é derivada do ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), apresentou redução marcante dos sinais inflamatórios na colite induzida pelo DSS e TNBS (Arita, Yoshida et al., 2005; Ishida et al., 2010), os quais estavam associados com diminuição significativa na infiltração de PMN no tecido do cólon de camundongos.

Como já demonstrado, o infiltrado celular tem um papel crucial em modelos animais de IBD, e seu controle é extremamente importante na atenuação dos sinais inflamatórios da colite (Bento et al., 2008). Recentemente, estudos demonstraram que a RvD1 e a RvD2 atuam na regulação da ativação e migração de leucócitos (Krishnamoorthy et al., ; Spite et al., 2009), sugerindo uma possível ação desses mediadores sobre o controle da migração celular na colite experimental. Nossos resultados mostraram que, os animais tratados com DSS apresentaram alta atividade da MPO, indicando aumento na infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal. De forma interessante, o tratamento com os mediadores lipídicos AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA bloqueou

significativamente a atividade da MPO na colite induzida, tanto pelo DSS, quanto ou pelo TNBS, sugerindo redução na infiltração de neutrófilos na mucosa colônica. Estudos prévios demonstraram que a administração do óleo de peixe rico em EPA e DHA, reduziu de forma significativa a atividade da MPO no cólon de camundongos (Camuesco et al., 2005; Camuesco et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento sistêmico com RvE1 demonstrou ser eficaz em suprimir a infiltração de PMN no tecido do cólon de animais com colite induzida pelo TNBS (Arita, Yoshida et al., 2005), bem como a diminuição da atividade da MPO na pata de camundongos tratados com carragenina (Xu et al., 2010).

Outro estudo recente, revelou que o tratamento sistêmico com a RvD1 reduziu drasticamente a atividade da MPO no pulmão de camundongos com lesão induzida pelo LPS (Wang et al., 2011). Ademais, foi demonstrado também que a RvD2 reduziu em aproximadamente 70 % a infiltração de PMN no modelo de peritonite induzida pelo zimosam (Spite et al., 2009). De forma interessante, Sun e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento com a AT-RvD1 (100 ng), reduziu em 40 % a infiltração de PMN na peritonite experimental, ressaltando ainda mais o efeito chave desses mediadores na diminuição do infiltrado de PMN e conseqüente redução na produção local de mediadores pró-inflamatórios.

Diante dessas evidências, observamos que a prevenção na infiltração de células inflamatórias, e no dano tecidual colônico, observado nos animais sistemicamente tratados com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA, apresentou associação com a redução nos níveis teciduais de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 e CXCL1/KC, os quais são mediadores envolvidos na migração celular e expressão de moléculas de adesão (Barker et al., 1991). Assim como demonstrado anteriormente neste estudo, as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  desempenham papel fundamental na patogênese das IBD e colite experimental (Cominelli et al., 1990; Neurath et al., 1997), e anticorpos contra o TNF- $\alpha$  são largamente utilizados para o tratamento clínico das IBD (Rutgeerts et al., 2005). Estudos prévios, demonstraram que o tratamento com a RvE1 aboliu a expressão do RNAm para o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na colite induzida pelo DSS ou TNBS (Arita, Yoshida et al., 2005; Ishida et al., 2010), o qual estava associada com significativa redução da infiltração de PMN na mucosa intestinal. Ademais, a redução nos níveis colônicos de MIP-2 e CXCL1/KC, observados em nosso estudo, pode estar correlacionado com a diminuição na atividade da MPO, uma vez que essas quimiocinas

estão implicadas na migração de PMN para o cólon inflamado (Bento et al., 2008).

Spite e colaboradores (2009), demonstraram que o tratamento sistêmico com a RvD2 reduziu de forma surpreendente os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 e CXCL1/KC no modelo experimental de sepse, acompanhado de redução da severidade da doença e aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais. De forma semelhante, Wang et al., (2011) observaram redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, os quais também apresentaram relação direta com a diminuição da severidade da doença pulmonar induzida pelo LPS. Desse modo, ambas as resolvinas da série D parecem ser importantes mediadores no controle da expressão e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para a diminuição da atividade de doenças e aceleração do processo de resolução da inflamação.

Algumas evidências têm indicado que citocinas e quimiocinas podem regular a expressão de moléculas de adesão (Essani et al., 1995; Stocker et al., 2000), as quais são cruciais para a adesão e transmigração leucocitária do vaso para o tecido inflamado (Danese et al., 2005). No presente estudo, foi demonstrada uma aparente associação entre os níveis de citocinas/quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão, uma vez que o tratamento sistêmico com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA, reduziu os níveis de citocinas e quimiocinas, bem como a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e LFA-1 no cólon de camundongos com colite induzida pelo DSS. De fato, a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 é um dos principais fatores determinantes no recrutamento de leucócitos para o intestino inflamado (Sans et al., 1999), e o tratamento com anticorpo anti-VCAM-1 apresentou efeitos benéficos na colite experimental (Soriano et al., 2000). Além disso, nossos resultados corroboram com estudos anteriores, os quais mostraram que a RvE1 e a RvD1 reduziram a transmigração de leucócitos através das células endoteliais da retina coróide, de forma dependente da expressão de VCAM-1 (Tian et al., 2009). Ainda, outro estudo evidenciou que a incubação com EPA ou com o DHA apresentou redução na expressão de VCAM-1, ICAM-1 e LFA-1 em cultura de células epiteliais humanas estimuladas com LPS (Khalfoun et al., 1996).

O controle da expressão das moléculas de adesão pelas resolvinas da série D parece ser um aspecto crítico nos seus efeitos sobre a redução da infiltração de PMN no tecido inflamado. De fato, foi demonstrado que o tratamento com RvD1 reduziu a expressão de

VCAM-1 e ICAM-1 em camundongos com lesão pulmonar experimental, e que essa redução foi acompanhada de diminuição expressiva do infiltrado de PMN no tecido lesionado (Wang et al., 2011). Além disso, foi demonstrado também que a administração sistêmica de RvD2 reduziu significativamente a adesão de leucócitos às células endoteliais no modelo murino de peritonite (Spite et al., 2009), evidenciado portanto, a participação das resolvinas derivadas do DHA sobre o controle da adesão leucocitária e a transmigração celular.

Estudos anteriores demonstraram que a expressão das moléculas de adesão pode ser regulada por citocinas pró-inflamatórias de maneira dependente do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Nishida e Gimbrone, 1997). Por essa razão, investigamos o efeito do tratamento com os mediadores lipídicos derivados do ômega-3 sobre a atividade do NF- $\kappa$ B. De forma notável, observamos que a administração sistêmica de AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA inibiu, de forma significativa, a fosforilação da proteína p65 do NF- $\kappa$ B, bem como reduziu a expressão do RNA para o NF- $\kappa$ B no cólon de camundongos com colite induzida pelo DSS. Nossos resultados confirmaram e estenderam dados de estudos anteriores, que demonstraram que o NF- $\kappa$ B é negativamente regulado na presença de mediadores derivados do ômega-3, como o DHA ou RvE1 (Rahman et al., 2008; Ishida et al., 2010). No modelo de dano pulmonar induzido pelo LPS, a administração sistêmica de RvD1 reduziu de forma significativa a atividade do NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2011). Além disso, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento sistêmico com o 17R-HDHA ou com a AT-RvD1 reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B, sendo que esse efeito apresentou direta associação com redução na produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na pata de ratos com artrite experimental (Lima-Garcia et al., 2011). Assim, a regulação da atividade do NF- $\kappa$ B pelos derivados do ômega-3 apresentados nesse estudo, parece ser um ponto crucial para a diminuição da resposta pró-inflamatória, uma vez que o NF- $\kappa$ B é um fator imprescindível para a transcrição de diversos genes envolvidos nas respostas pró-inflamatórias, principalmente aquelas relacionadas com a fase aguda do modelo de colite induzida pelo DSS.

Em conjunto, esses resultados podem sugerir que a produção de citocinas, quimiocinas e a redução na atividade do NF- $\kappa$ B, podem ser apenas uma consequência da diminuição da migração celular para o cólon. Todavia, para testar essa hipótese, avaliamos o efeito direto da AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA sobre a produção de mediadores inflamatórios em cultura de macrófagos derivados da medula óssea estimulados com LPS. Como descrito anteriormente, os macrófagos

desempenham papel importante na patogênese das IBD, os quais estão associados à produção de altos níveis de citocinas inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Hanauer, 2006), bem como com a expressão e atividade das enzimas COX-2 e NOS2 (Rafi et al., 2007). Além disso, tais células também têm sido descritas como um dos principais alvos de atuação das resolvinas durante processos inflamatórios (Titos et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a incubação com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA reduziu significativamente a expressão do RNAm para a COX-2, mas não para a NOS2, em macrófagos estimulados com LPS. A redução da expressão da COX-2 e da NOS2, por ácidos graxos poliinsaturados já foi descrita na colite experimental (Camuesco et al., 2005; Camuesco et al., 2006), sendo também relacionados como importantes na patogênese das IBD (Sklyarov et al., 2011). Entretanto, nossos resultados para a expressão do RNAm para a NOS2 estão de acordo com resultados prévios, que demonstraram que o DHA não inibe a expressão da NOS2 em cultura de células vasculares do músculo liso estimuladas com LPS (Hirafuji et al., 2002). Além disso, outros estudos sugeriram que a NOS2 e o óxido nítrico (NO) são mediadores críticos envolvidos na fagocitose de células em apoptose e na morte intracelular de bactérias (Satake et al., 2000; Marriott et al., 2004).

Um estudo recente demonstrou que a incubação *in vitro* com RvD2 aumenta a produção de NO, e que o tratamento *in vivo* com RvD2 em camundongos deficientes na isoforma da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS ou NOS3), não reduziu a infiltração de PMN, sugerindo modulação no tráfico de leucócitos, pela RvD2, de forma dependente da produção de NO (Spite et al., 2009). Assim, podemos sugerir que a atividade pró-resolução das resolvinas da série D, pode estar relacionada à regulação positiva da expressão da NOS2, e conseqüente produção de NO. Entretanto, a comparação entre a regulação da expressão da NOS3 e NOS2 pelas resolvinas da série D, nas células inflamatórias, requer estudos adicionais a fim de esclarecer essa hipótese.

No estudo sobre o modelo de colite induzida pelo DSS, apresentado anteriormente nesse trabalho, verificamos que a enzima COX-2 tem sua expressão aumentada principalmente nas fases de resolução do processo inflamatório. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado seu papel importante na produção de mediadores pró-inflamatórios como a PGE2 e o LTB4, em especial na fase aguda da inflamação intestinal (Sakamoto, 1998). Arita e colaboradores (2005), observaram redução significativa na expressão da COX-2 em colôns de camundongos tratados com RvE1 na colite induzida pelo TNBS. Além



disso, outro estudo demonstrou que o tratamento sistêmico com RvD1 reduziu de forma significativa a expressão da COX-2 no pulmão de camundongos com lesão pulmonar induzida pelo LPS (Wang et al., 2011). Ambos os estudos relacionaram a redução da expressão da COX-2, pelos mediadores lipídicos citados, como sendo benéfica nesses modelos experimentais, pelo menos na fase aguda. Dessa forma, essas evidências mostraram que a atividade ou a expressão da enzima COX-2 parece ser regulada pelos mediadores lipídicos derivados do ômega-3 durante a fase aguda do processo inflamatório, corroborando assim com os resultados obtidos no presente estudo.

Em seguida, foram realizados experimentos com o objetivo de avaliar *in vitro* os mecanismos envolvidos no efeito da AT-RvD1, RvD2 ou do 17R-HDHA sobre a redução de mediadores inflamatórios. Para isso, macrófagos derivados da medula óssea foram estimulados com LPS e pré-incubados com AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA na presença ou na ausência de BOC-1 (um antagonista seletivo para o receptor de lipoxina A4, ALX), uma vez que evidências recentes têm sugerido que a RvD1 atua e se liga ao receptor ALX (Krishnamoorthy et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que a incubação de macrófagos estimulados com LPS com a AT-RvD1, RvD2 ou o 17R-HDHA, inibiu de forma significativa a secreção das citocinas IL-6, MCP-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Esses resultados indicam que a produção de mediadores pró-inflamatórios não ocorre somente devido a redução do infiltrado celular no tecido inflamado, mas também por efeito direto dos mediadores derivados do DHA sobre a produção de citocinas nas células inflamatórias. Resultados semelhantes foram observados por Palmer e colaboradores (2011), os quais demonstraram que a incubação de macrófagos estimulados com LPS com AT-RvD1, RvD1, RvE1 ou LXA4 apresentaram redução na produção de diversas citocinas e quimiocinas. Entretanto, de forma interessante, nossos resultados mostraram que apenas a AT-RvD1 foi capaz de reduzir a secreção de mediadores inflamatórios *in vitro*, de forma dependente da ativação do receptor ALX/FPR2, sugerindo que o efeito benéfico da AT-RvD1 sobre a redução de mediadores pró-inflamatórios se deve a sua atuação no receptor ALX/FPR2.

Diante dessas evidências, investigamos em seguida se o tratamento sistêmico com o BOC-1 poderia reverter os efeitos benéficos da AT-RvD1 na colite induzida pelo DSS. Surpreendentemente, e em concordância com os resultados obtidos *in vitro*, o tratamento com BOC-1 reverteu de forma significativa o efeito protetor da AT-RvD1 sobre o índice de atividade da doença, perda de peso corporal, dano

tecidual colônico e encurtamento do cólon. De forma semelhante, um estudo recente demonstrou que o pré-tratamento com BOC-1 também reverteu de forma significativa o efeito benéfico do tratamento com RvD1 sobre o dano pulmonar induzido pelo LPS (Wang et al., 2011). Desse modo, nossos resultados confirmaram o papel intrínseco do receptor ALX na atividade antiinflamatória e pró-resolução da AT-RvD1.

Como descrito anteriormente, o receptor ALX/FPR2 foi identificado como alvo para a RvD1, apresentando efeitos similares aos encontrados na interação entre a LXA4 e o receptor ALX/FPR2 (Spite et al., 2009). Entretanto, outro possível alvo para a AT-RvD1 é o receptor acoplado à proteína G 32 (GPR32), o qual, até recentemente, era considerado um receptor órfão (Krishnamoorthy et al., 2010). Dados recentes demonstraram que tanto o receptor ALX, quanto o GPR32, aumentaram a habilidade da RvD1 em induzir fagocitose, sugerindo que a RvD1 atua de maneira dependente da ativação de ambos os receptores (Krishnamoorthy et al., 2010). Entretanto, até o momento, ainda não foi descrito um receptor com sequência significativamente homologa ao GPR32 em camundongos, dificultando assim a realização de estudos experimentais que venham a esclarecer a real importância do GPR32 sobre a atividade da RvD1 (Krishnamoorthy et al., 2010). Dessa forma, a redução dos efeitos da AT-RvD1 observados frente ao bloqueio do receptor ALX/FPR2, podem ser apenas parciais, não descartando, portanto, a hipótese referente a atuação da AT-RvD1 sobre o receptor GPR32.

Ainda está pouco esclarecido como a ativação desses receptores desencadeia a resposta pró-resolução, entretanto, acredita-se que a ativação do receptor ALX/FPR2 pela RvD1 também causa a mudança do fenótipo de ativação dos macrófagos de M1 (pró-inflamatório) para M2 (antiinflamatório), através da sinalização da transcrição de genes como o da arginase-1 (Titos et al., 2011). Essa mudança de fenótipo de ativação dos macrófagos tem sido relacionada com o bloqueio na secreção de citocinas do tipo Th1, como a IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$ , além da diminuição significativa na produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos (Titos et al., 2011). Esses achados contribuíram no esclarecimento de parte das ações antiinflamatórias da RvD1, entretanto, a elucidação total do mecanismo de ação desse mediador ainda permanece sob estudos.

Como descrito inicialmente neste trabalho, a AT-RvD1 é uma metabólito do 17R-HDHA, gerado na presença da aspirina, através de uma série de reações que incluem a epoxidação enzimática e hidrólises

(Sun et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram que tanto a RvD1, quanto a AT-RvD1, apresentam efeitos equipotentes sobre a redução da infiltração de PMN no modelo de peritonite induzida em camundongos, sem apresentarem diferenças significativas entre suas potências, sugerindo um sítio de ação comum nos PMN (Sun et al., 2007). De forma interessante, estudos prévios têm demonstrado que o 17R-HDHA pode originar diferentes tipos de resolvinas formadas pela aspirina, tais como a AT-RvD1 à AT-RvD4 (Spite e Serhan, 2011). Além disso, outros trabalhos demonstraram que no tecido do cólon de camundongos transgênicos para o fator supressor de tumor, fat-1, os quais apresentam aumento nos níveis endógenos de ômega-3, foram encontrados altos níveis de RvE1 e RvD3, e que tais animais apresentaram proteção contra o desenvolvimento de colite induzida pelo DSS (Hudert et al., 2006).

Os dados mencionados acima dão suporte à hipótese de que as ações pró-resolução exercida pelo 17R-HDHA, durante a inflamação intestinal, pode ser, pelo menos em parte, devido sua conversão em resolvinas da série D. Entretanto, nossos resultados mostraram também que não ocorreu nenhuma reversão do efeito do 17R-HDHA, sobre a redução na secreção de citocinas, através do bloqueio do receptor ALX na cultura de macrófagos estimulados com LPS. Considerando que parte do 17R-HDHA poderia ter sido transformado em AT-RvD1, esses dados sugerem que o 17R-HDHA pode possuir uma ação per se, em sítios de ação diferentes das resolvinas da série D, porém, estudos futuros são necessários para esclarecer essa hipótese.

Spite e colaboradores (2009), demonstraram que o tratamento sistêmico com a RvD2 protege camundongos contra a sepse experimental, através da redução da infiltração de leucócitos, produção de citocinas, bem como pelo aumento da eliminação de bactérias, dessa forma, prevenindo a mortalidade dos animais (Spite et al., 2009). Recentemente, Park e colaboradores (2011), demonstraram que a RvD2 é um potente agente anti-nociceptivo, durante quadros de dor inflamatória experimental, e também sugeriram que a RvD2 é um potente inibidor endógeno da atividade dos receptores TRPV1 e TRPA1, os quais estão implicados em respostas nociceptivas. Apesar disso, o possível receptor ou demais alvos de interação para a RvD2 ainda permanecem desconhecidos.

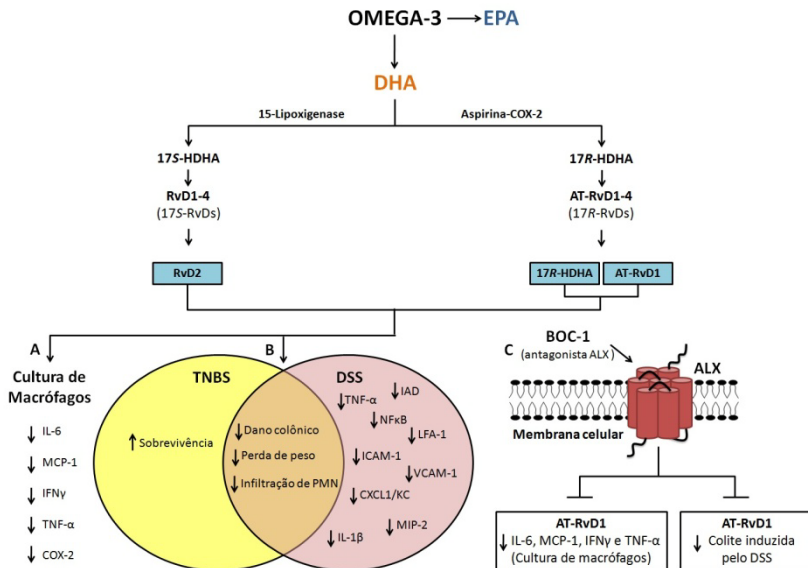
Outro modelo experimental utilizado nesse estudo foi de colite induzida pelo TNBS. O modelo murino de inflamação intestinal induzido pelo TNBS foi descrito em 1995, por Neurath e vem sendo amplamente utilizado em vários estudos, devido a sua similaridade com as IBD em humanos, principalmente relacionado à patogênese da CD.

Esse modelo é caracterizado pela resposta imunológica do tipo Th1 e têm apresentado significativa contribuição para a investigação dos mecanismos envolvidos nas IBD e também na descoberta de novas alternativas terapêuticas (Morris et al., 1989; Elson et al., 1995; Elson et al., 2005; Menozzi et al., 2006).

O TNBS penetra na parede intestinal causando ulcerações e necrose no tecido do cólon, que estão associadas à perda das junções entre as células epiteliais e ao aumento do infiltrado celular na lâmina própria, causando lesão das criptas intestinais (Torres et al., 1999; Menozzi et al., 2006). Essas alterações teciduais desencadeiam outras complicações sistêmicas, como a diminuição da absorção de nutrientes, perda de peso, diarreia e prolapso retal (Neurath et al., 1995; Kawada et al., 2007). De acordo com essas observações, o presente estudo demonstrou que a indução de colite, através da utilização do TNBS, foi capaz de promover aumento do dano tecidual, elevação da atividade da MPO, impedir o ganho de peso, assim como elevar a mortalidade dos animais (Sugimoto et al., 2002; Zhang et al., 2006; Antonioli et al., 2007; Zhao, J. et al., 2007). Entretanto, nossos resultados demonstraram que os tratamentos com a AT-RvD1, RvD2 ou com o 17R-HDHA melhoraram de forma proeminente a taxa de sobrevivência dos animais, a redução do peso corporal, bem como o dano tecidual macro e microscópico, e reduziram significativamente a atividade da MPO. Esses dados fortalecem nossos achados no modelo de colite induzida pelo DSS, demonstrando que os mediadores lipídicos em estudo apresentaram eficácia em dois importantes modelos de infamação intestinal, apresentando assim maior importância para a realização de estudos clínicos futuros com esse mediadores.

Esses resultados acrescentam de forma significativa as pesquisas acerca dos derivados do ômega-3 e mostra que os mediadores em estudo são componentes importantes no processo de resolução da inflamação intestinal aguda. Embora muitos estudos tenham sido realizados nos últimos anos, vários aspectos ainda requerem esclarecimentos. Além disso, as pesquisas apontam para a descoberta de novos mediadores lipídicos derivados do ômega-3, não descritos neste trabalho, como a RvE3 (Isobe et al., 2012), a qual foi recentemente caracterizada e parece desempenhar papel semelhante aos outros mediadores pró-resolução. Assim, os ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega-3, tem-se mostrado como uma fonte imprescindível de moléculas responsáveis não apenas por importantes funções celulares, mas também como fonte altamente promissora para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas.

Diante dos dados apresentados, nosso estudo demonstrou que os mediadores lipídicos derivados do ômega-3, a AT-RvD1, RvD2 e o 17R-HDHA foram efetivos em prevenir dois diferentes modelos de colite experimental. Além disso, eles mostraram que as ações benéficas desses mediadores, estão associadas com suas habilidades em inibir a infiltração de leucócitos, reduzir a atividade do NF- $\kappa$ B, diminuir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além e de algumas moléculas de adesão. Adicionalmente, demonstramos que o epímero da RvD1, a AT-RvD1, exerce seus efeitos benéficos de forma dependente da ativação do receptor ALX/FPR2, assim como apresentado esquematicamente na figura 48. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o precursor das resolvinas da série D, o 17R-HDHA, e seus produtos, AT-RvD1 e RvD2, possuem potencial terapêutico para ser usado na prevenção e tratamento das IBD.



**Figura 48. Diagrama esquemático ilustrando a formação e os efeitos benéficos dos mediadores lipídicos derivados do DHA.** O ômega-3 pode originar os ácidos graxos EPA e DHA. O DHA é convertido pela 15-lipoxigenase em 17S-hidroxi-DHA (17S-HDHA), o qual é precursor das 17S resolvinas da série D (RvD1-RvD4). Na presença da aspirina, a COX-2 transforma o DHA em 17R-HDHA, o qual produz as resolvinas da série D geradas pela aspirina (AT e ou 17R resolvinas). (A) A incubação com AT-RvD1, RvD2 ou 17R-HDHA inibiu a secreção dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, MCP-1, IFN-g, e TNF- $\alpha$ , bem como a expressão do RNAm para COX-2 em macrófagos estimulados com LPS. (B) Esses mediadores lipídicos preveniram os sinais inflamatórios da colite induzida pelo DSS ou TNBS, através da redução na infiltração de PMN e da inibição da produção de mediadores inflamatórios. (C) A administração da AT-RvD1 reduziu a secreção de mediadores pró-inflamatórios de maneira dependente da ativação do receptor ALX em cultura de macrófagos estimulados com LPS. Adicionalmente, os efeitos benéficos do tratamento com AT-RvD1 foram revertidos na presença do BOC-1 na colite induzida pelo DSS.

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo buscou mapear alguns mediadores inflamatórios, marcadores moleculares e células inflamatórias durante o modelo de colite induzida pelo DSS, a fim de esclarecer os eventos inflamatórios deste modelo, além de buscar relacionar os resultados obtidos para possíveis implicações clínicas. Em conjunto, embora não seja simples a transposição de estudos experimentais para aplicações clínicas, nossos resultados nos levaram a sugerir que o correto diagnóstico de cada fase da doença, poderia vir a permitir terapias específicas, a fim de se obter maior êxito no tratamento dos pacientes e, possivelmente, menores efeitos adversos. Além disso, nossos resultados estenderam substancialmente uma vasta rede de informações a respeito do modelo de colite induzida pelo DSS, auxiliando na melhor compreensão desse modelo experimental.

A análise dos resultados referentes à avaliação dos possíveis efeitos benéficos do tratamento com os mediadores lipídicos AT-RvD1, RvD2 e 17R-HDHA na colite experimental permitiram concluir que esses mediadores lipídicos podem ser uma interessante alternativa terapêutica para a prevenção de doenças com características inflamatórias, em especial as IBD. Por fim, os dados sobre os efeitos moleculares e celulares dos mediadores lipídicos obtidos no presente estudo, podem servir como valiosas informações para a compreensão do mecanismo de ação desses mediadores nas IBD.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Abraham, C. Cho, J.H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v.361, n.21, Nov 19, p.2066-78. 2009.

Aharoni, R., Kayhan, B., Brenner, O., Domev, H., Labunskay, G. Arnon, R. Immunomodulatory therapeutic effect of glatiramer acetate on several murine models of inflammatory bowel disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v.318, n.1, Jul, p.68-78. 2006.

Al-Haddad, S. Riddell, R.H. The role of eosinophils in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.54, n.12, Dec, p.1674-5. 2005.

Amre, D.K., D'souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G., Israel, D., Mack, D., Ghadirian, P., Deslandres, C., Chotard, V., Budai, B., Law, L., Levy, E. Seidman, E.G. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. **Am J Gastroenterol**, v.102, n.9, Sep, p.2016-25. 2007.

Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N.A. Serhan, C.N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. **J Exp Med**, v.201, n.5, Mar 7, p.713-22. 2005.

Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J.N., Petasis, N.A., Blumberg, R.S. Serhan, C.N. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.21, May 24, p.7671-6. 2005.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S. Neurath, M.F. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nat Med**, v.6, n.5, May, p.583-8. 2000.

Autschbach, F., Giese, T., Gassler, N., Sido, B., Heuschen, G., Heuschen, U., Zuna, I., Schulz, P., Weckauf, H., Berger, I., Otto, H.F. Meuer, S.C. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Virchows Arch**, v.441, n.5, Nov, p.500-13. 2002.

Banchereau, J. Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, Mar 19, p.245-52. 1998.



- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P., Sheron, N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. **J Pathol**, v.199, n.1, Jan, p.28-35. 2003.
- Baumgart, D.C. Carding, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, v.369, n.9573, May 12, p.1627-40. 2007.
- Baumgart, D.C. Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v.369, n.9573, May 12, p.1641-57. 2007.
- Becker, C., Dornhoff, H., Neufert, C., Fantini, M.C., Wirtz, S., Huebner, S., Nikolaev, A., Lehr, H.A., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Galle, P.R., Karow, M. Neurath, M.F. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. **J Immunol**, v.177, n.5, Sep 1, p.2760-4. 2006.
- Bento, A.F., Leite, D.F., Claudino, R.F., Hara, D.B., Leal, P.C. Calixto, J.B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol**, v.84, n.4, Oct, p.1213-21. 2008.
- Bernstein, C.N. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? **Dig Dis**, v.28, n.3, p.406-10. 2010.
- Bruno, O., Brullo, C., Arduino, N., Schenone, S., Ranise, A., Bondavalli, F., Ottonello, L., Dapino, P. Dallegrì, F. Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. **Farmaco**, v.59, n.3, Mar, p.223-35. 2004.
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H.H. Lochs, H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? **Gut**, v.55, n.3, Mar, p.342-7. 2006.
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.C., Colombel, J.F., Porchet, N. Aubert, J.P. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. **Gut**, v.49, n.4, Oct, p.544-51. 2001.
- Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Mol Nutr Food Res**, v.52, n.8, Aug, p.885-97. 2008.
- Campbell, E.L., Louis, N.A., Tomassetti, S.E., Canny, G.O., Arita, M., Serhan, C.N. Colgan, S.P. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. **Faseb J**, v.21, n.12, Oct, p.3162-70. 2007.
- Camuesco, D., Galvez, J., Nieto, A., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Concha, A., Xaus, J. Zarzuelo, A. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich

in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. **J Nutr**, v.135, n.4, Apr, p.687-94. 2005.

Canny, G., Levy, O., Furuta, G.T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R.B., Serhan, C.N. Colgan, S.P. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.6, Mar 19, p.3902-7. 2002.

Carlson, M., Raab, Y., Peterson, C., Hallgren, R. Venge, P. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. **Am J Gastroenterol**, v.94, n.7, Jul, p.1876-83. 1999.

Cho, J.Y., Chi, S.G. Chun, H.S. Oral administration of docosahexaenoic acid attenuates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **Mol Nutr Food Res**, v.55, n.2, Feb, p.239-46. 2011.

Clapper, M.L., Cooper, H.S. Chang, W.C. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. **Acta Pharmacol Sin**, v.28, n.9, Sep, p.1450-9. 2007.

Coomes, J.L., Robinson, N.J., Maloy, K.J., Uhlig, H.H. Powrie, F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. **Immunol Rev**, v.204, Apr, p.184-94. 2005.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S. Sedergran, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**, v.69, n.2, Aug, p.238-49. 1993.

Cosnes, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.18, n.3, Jun, p.481-96. 2004.

Crohn, B.B., Ginzburg, L. Oppenheimer, G.D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. **Mt Sinai J Med**, v.67, n.3, May, p.263-8. 2000.

Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R. Pulendran, B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. **Nat Immunol**, v.8, n.10, Oct, p.1086-94. 2007.

Dieleman, L.A., Ridwan, B.U., Tennyson, G.S., Beagley, K.W., Bucy, R.P. Elson, C.O. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. **Gastroenterology**, v.107, n.6, Dec, p.1643-52. 1994.

Edwards, S.W. Swan, T.F. Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils. **Biochem J**, v.237, n.2, Jul 15, p.601-4. 1986.

- Eijkelkamp, N., Heijnen, C.J., Lucas, A., Premont, R.T., Elsenbruch, S., Schedlowski, M., Kavelaars, A. G protein-coupled receptor kinase 6 controls chronicity and severity of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. **Gut**, v.56, n.6, Jun, p.847-54. 2007.
- Elson, C.O., Cong, Y., Mccracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G. Weaver, C.T. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immunol Rev**, v.206, Aug, p.260-76. 2005.
- Elson, C.O., Cong, Y., Weaver, C.T., Schoeb, T.R., Mcclanahan, T.K., Fick, R.B. Kastelein, R.A. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. **Gastroenterology**, v.132, n.7, Jun, p.2359-70. 2007.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S. Riddell, R.H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.109, n.4, Oct, p.1344-67. 1995.
- Espevik, T., Figari, I.S., Shalaby, M.R., Lackides, G.A., Lewis, G.D., Shepard, H.M. Palladino, M.A., Jr. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. **J Exp Med**, v.166, n.2, Aug 1, p.571-6. 1987.
- Fiorucci, S., Wallace, J.L., Mencarelli, A., Distrutti, E., Rizzo, G., Farneti, S., Morelli, A., Tseng, J.L., Suramanyam, B., Guilford, W.J. Parkinson, J.F. A beta-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.44, Nov 2, p.15736-41. 2004.
- Forbes, E., Murase, T., Yang, M., Matthaei, K.I., Lee, J.J., Lee, N.A., Foster, P.S. Hogan, S.P. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. **J Immunol**, v.172, n.9, May 1, p.5664-75. 2004.
- Fuss, I.J., Becker, C., Yang, Z., Groden, C., Hornung, R.L., Heller, F., Neurath, M.F., Strober, W. Mannon, P.J. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. **Inflamm Bowel Dis**, v.12, n.1, Jan, p.9-15. 2006.
- Garrett, W.S., Gordon, J.I. Glimcher, L.H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, v.140, n.6, Mar 19, p.859-70. 2010.
- Garside, P. Cytokines in experimental colitis. **Clin Exp Immunol**, v.118, n.3, Dec, p.337-9. 1999.
- Gewirtz, A.T., Collier-Hyams, L.S., Young, A.N., Kucharzik, T., Guilford, W.J., Parkinson, J.F., Williams, I.R., Neish, A.S. Madara, J.L. Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and

reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. **J Immunol**, v.168, n.10, May 15, p.5260-7. 2002.

Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F.H., Malchow, H.A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnaek, P., Zadorova, Z., Palmer, T. Donoghue, S. Natalizumab for active Crohn's disease. **N Engl J Med**, v.348, n.1, Jan 2, p.24-32. 2003.

Ghosh, S. Hayden, M.S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.11, Nov, p.837-48. 2008.

Gleich, G.J., Adolphson, C.R. Leiferman, K.M. The biology of the eosinophilic leukocyte. **Annu Rev Med**, v.44, p.85-101. 1993.

Glocker, E.O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schaffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hatscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K.W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustede, R., Woellner, C., Baumann, U., Salzer, U., Koletzko, S., Shah, N., Segal, A.W., Sauerbrey, A., Buderus, S., Snapper, S.B., Grimbacher, B. Klein, C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **N Engl J Med**, v.361, n.21, Nov 19, p.2033-45. 2009.

Godson, C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N.A., Hogg, N. Brady, H.R. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **J Immunol**, v.164, n.4, Feb 15, p.1663-7. 2000.

Goebel, S., Huang, M., Davis, W.C., Jennings, M., Siahaan, T.J., Alexander, J.S. Kevil, C.G. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.290, n.4, Apr, p.G648-54. 2006.

Gordon, F.H., Lai, C.W., Hamilton, M.I., Allison, M.C., Srivastava, E.D., Fouweather, M.G., Donoghue, S., Greenlees, C., Subhani, J., Amlot, P.L. Pounder, R.E. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.121, n.2, Aug, p.268-74. 2001.

Greenstein, R.J. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.8, Aug, p.507-14. 2003.

Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M. Kontula, K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v.12, n.23, Jun 21, p.3668-72. 2006.

Hansson, G.K. Libby, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.7, Jul, p.508-19. 2006.

Hart, A.L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M.A., Knight, S.C. Stagg, A.J. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut**, v.53, n.11, Nov, p.1602-9. 2004.

Healy, D.A., Wallace, F.A., Miles, E.A., Calder, P.C. Newsholm, P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. **Lipids**, v.35, n.7, Jul, p.763-8. 2000.

Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H., Goodnow, C.C. MCGuckin, M.A. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. **PLoS Med**, v.5, n.3, Mar 4, p.e54. 2008.

Hermiston, M.L. Gordon, J.I. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. **Science**, v.270, n.5239, Nov 17, p.1203-7. 1995.

Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T. Rotter, J.I. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. **Ann Intern Med**, v.105, n.6, Dec, p.883-5. 1986.

Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.L. Serhan, C.N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. **J Biol Chem**, v.278, n.17, Apr 25, p.14677-87. 2003.

Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N. Kang, J.X. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.30, Jul 25, p.11276-81. 2006.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M. Thomas, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, n.6837, May 31, p.599-603. 2001.

Hunter, M.M., Wang, A. McKay, D.M. Helminth infection enhances disease in a murine TH2 model of colitis. **Gastroenterology**, v.132, n.4, Apr, p.1320-30. 2007.

Iizasa, H., Genda, N., Kitano, T., Tomita, M., Nishihara, K., Hayashi, M., Nakamura, K., Kobayashi, S. Nakashima, E. Altered expression and function of P-glycoprotein in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **J Pharm Sci**, v.92, n.3, Mar, p.569-76. 2003.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L. Nunez, G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. **J Biol Chem**, v.278, n.8, Feb 21, p.5509-12. 2003.

Ishida, T., Yoshida, M., Arita, M., Nishitani, Y., Nishiumi, S., Masuda, A., Mizuno, S., Takagawa, T., Morita, Y., Kutsumi, H., Inokuchi, H., Serhan, C.N., Blumberg, R.S. Azuma, T. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v.16, n.1, Jan, p.87-95. 2010.

Iwasaki, A. Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v.5, n.10, Oct, p.987-95. 2004.

James, S.P. Klapproth, J.M. Major pathways of mucosal immunity and inflammation: cell activation, cytokine production and the role of bacterial factors. **Aliment Pharmacol Ther**, v.10 Suppl 2, p.1-9. 1996.

Jarry, A., Bossard, C., Bou-Hanna, C., Masson, D., Espaze, E., Denis, M.G. Laboisse, C.L. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. **J Clin Invest**, v.118, n.3, Mar, p.1132-42. 2008.

Jeziorska, M., Haboubi, N., Schofield, P. Woolley, D.E. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **J Pathol**, v.194, n.4, Aug, p.484-92. 2001.

Jurjus, A.R., Khoury, N.N. Reimund, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.50, n.2, Sep-Oct, p.81-92. 2004.

Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Sato, T., Yamazaki, M., Okamoto, S., Ishii, H., Totsuka, T., Iiyama, R., Okamoto, R., Ikeda, M., Kurimoto, M., Takeda, K., Akira, S. Hibi, T. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.121, n.4, Oct, p.875-88. 2001.

Kandiel, A., Fraser, A.G., Korelitz, B.I., Brensinger, C. Lewis, J.D. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. **Gut**, v.54, n.8, Aug, p.1121-5. 2005.

Kaser, A., Zeissig, S. Blumberg, R.S. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? **Dig Dis**, v.28, n.3, p.395-405. 2010a.

\_\_\_\_\_. Inflammatory bowel disease. **Annu Rev Immunol**, v.28, Mar, p.573-621. 2010b.

- Khor, B., Gardet, A. Xavier, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, n.7351, Jun 16, p.307-17. 2011.
- Kimball, E.S., Schneider, C.R., Wallace, N.H. Hornby, P.J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.291, n.2, Aug, p.G364-71. 2006.
- Kimball, E.S., Wallace, N.H., Schneider, C.R., D'andrea, M.R. Hornby, P.J. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **Neurogastroenterol Motil**, v.16, n.6, Dec, p.811-8. 2004.
- Kitajima, S., Takuma, S. Morimoto, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Exp Anim**, v.48, n.3, Jul, p.137-43. 1999.
- Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v.77, n.5, May, p.598-625. 2005.
- Kolls, J.K. Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, n.4, Oct, p.467-76. 2004.
- Korzenik, J.R. Podolsky, D.K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Drug Discov**, v.5, n.3, Mar, p.197-209. 2006.
- Krueger, G.G., Langley, R.G., Leonardi, C., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Dooley, L.T. Lebwohl, M. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. **N Engl J Med**, v.356, n.6, Feb 8, p.580-92. 2007.
- Kucharzik, T., Walsh, S.V., Chen, J., Parkos, C.A. Nusrat, A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. **Am J Pathol**, v.159, n.6, Dec, p.2001-9. 2001.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.
- Lamhonwah, A.M., Skaug, J., Scherer, S.W. Tein, I. A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). **Biochem Biophys Res Commun**, v.301, n.1, Jan 31, p.98-101. 2003.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R. Willoughby, D.A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. **Nat Med**, v.7, n.12, Dec, p.1291-7. 2001.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.10, Oct, p.787-95. 2002.

Lee, T.H., Hoover, R.L., Williams, J.D., Sperling, R.I., Ravalese, J., 3rd, Spur, B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A., Austen, K.F. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. **N Engl J Med**, v.312, n.19, May 9, p.1217-24. 1985.

Levy, B.D., Bonnans, C., Silverman, E.S., Palmer, L.J., Marigowda, G., Israel, E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.172, n.7, Oct 1, p.824-30. 2005.

Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., Serhan, C.N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat Immunol**, v.2, n.7, Jul, p.612-9. 2001.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.9, Sep, p.678-89. 2007.

Libby, P. Atherosclerosis: the new view. **Sci Am**, v.286, n.5, May, p.46-55. 2002.

Lichtenstein, G.R., Abreu, M.T., Cohen, R., Tremaine, W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.130, n.3, Mar, p.940-87. 2006.

Lin, W., Tsai, W.L., Shao, R.X., Wu, G., Peng, L.F., Barlow, L.L., Chung, W.J., Zhang, L., Zhao, H., Jang, J.Y., Chung, R.T. Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner. **Gastroenterology**, v.138, n.7, Jun, p.2509-18, 2518 e1. 2011.

Liu, Z., Geboes, K., Heremans, H., Overbergh, L., Mathieu, C., Rutgeerts, P., Ceuppens, J.L. Role of interleukin-12 in the induction of mucosal inflammation and abrogation of regulatory T cell function in chronic experimental colitis. **Eur J Immunol**, v.31, n.5, May, p.1550-60. 2001.

Macdermott, R.P. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. **J Clin Immunol**, v.19, n.5, Sep, p.266-72. 1999.

Macdonald, D., Lau, E., Chan, E.L., Mak, T., Woo, J., Leung, P.C., Swaminathan, R. Serum intact parathyroid hormone levels in elderly Chinese females with hip fracture. **Calcif Tissue Int**, v.51, n.6, Dec, p.412-4. 1992.



- Macdonald, T.T. Monteleone, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v.307, n.5717, Mar 25, p.1920-5. 2005.
- Macdonald, T.T., Monteleone, I., Fantini, M.C. Monteleone, G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. **Gastroenterology**, v.140, n.6, May, p.1768-75. 2011.
- Mach, J., Hsieh, T., Hsieh, D., Grubbs, N. Chervonsky, A. Development of intestinal M cells. **Immunol Rev**, v.206, Aug, p.177-89. 2005.
- Madara, J.L. Stafford, J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **J Clin Invest**, v.83, n.2, Feb, p.724-7. 1989.
- Maddox, J.F. Serhan, C.N. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. **J Exp Med**, v.183, n.1, Jan 1, p.137-46. 1996.
- Mahida, Y.R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v.6, n.1, Feb, p.21-33. 2000.
- Mahler, M., Bristol, I.J., Leiter, E.H., Workman, A.E., Birkenmeier, E.H., Elson, C.O. Sundberg, J.P. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. **Am J Physiol**, v.274, n.3 Pt 1, Mar, p.G544-51. 1998.
- Mangino, M.J., Brounts, L., Harms, B. Heise, C. Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.79, n.1-2, Mar, p.84-92. 2006.
- Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., Quezado, M., Yang, Z., Neurath, M.F., Salfeld, J., Veldman, G.M., Schwertschlag, U. Strober, W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **N Engl J Med**, v.351, n.20, Nov 11, p.2069-79. 2004.
- Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W.J., Tian, X.H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J.M., Chiang, N., Serhan, C.N. Bazan, N.G. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. **J Biol Chem**, v.278, n.44, Oct 31, p.43807-17. 2003.
- Marshall, J.K. Irvine, E.J. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v.40, n.6, Jun, p.775-81. 1997.

Mashimo, H., Wu, D.C., Podolsky, D.K. Fishman, M.C. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. **Science**, v.274, n.5285, Oct 11, p.262-5. 1996.

Matsuoka, K., Inoue, N., Sato, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kishi, Y., Sakuraba, A., Hitotsumatsu, O., Ogata, H., Koganei, K., Fukushima, T., Kanai, T., Watanabe, M., Ishii, H. Hibi, T. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. **Gut**, v.53, n.9, Sep, p.1303-8. 2004.

Mccafferty, D.M., Miampamba, M., Sihota, E., Sharkey, K.A. Kubes, P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut**, v.45, n.6, Dec, p.864-73. 1999.

Mccormick, M.L., Roeder, T.L., Railsback, M.A. Britigan, B.E. Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils. **J Biol Chem**, v.269, n.45, Nov 11, p.27914-9. 1994.

Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R. Wallace, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, n.3, Mar, p.795-803. 1989.

Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Ishikawa, T., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Yoshida, N., Minami, M., Kita, M., Imanishi, J. Yoshikawa, T. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. **J Gastroenterol Hepatol**, v.18, n.5, May, p.560-9. 2003.

Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Kuroda, M., Kokura, S., Ichikawa, H., Yanagisawa, R., Inoue, K., Takano, H., Satoh, M., Yoshida, N., Okanoue, T. Yoshikawa, T. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. **Int J Mol Med**, v.14, n.2, Aug, p.191-6. 2004.

Natsui, M., Kawasaki, K., Takizawa, H., Hayashi, S.I., Matsuda, Y., Sugimura, K., Seki, K., Narisawa, R., Sendo, F. Asakura, H. Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sodium-induced colitis in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v.12, n.12, Dec, p.801-8. 1997.

Nauseef, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunol Rev**, v.219, Oct, p.88-102. 2007.

Neurath, M.F., Finotto, S., Fuss, I., Boirivant, M., Galle, P.R. Strober, W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. **Trends Immunol**, v.22, n.1, Jan, p.21-6. 2001.

Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E. Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med**, v.182, n.5, Nov 1, p.1281-90. 1995.

- Niv, Y., Abuksis, G. Fraser, G.M. Epidemiology of ulcerative colitis in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. **Am J Gastroenterol**, v.95, n.3, Mar, p.693-8. 2000.
- Noguchi, E., Homma, Y., Kang, X., Netea, M.G. Ma, X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. **Nat Immunol**, v.10, n.5, May, p.471-9. 2009.
- O'Brien, P.J. Peroxidases. **Chem Biol Interact**, v.129, n.1-2, Dec 1, p.113-39. 2000.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G. Cho, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, n.6837, May 31, p.603-6. 2001.
- Ohkusa, T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. **Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi**, v.82, n.5, May, p.1327-36. 1985.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v.98, n.3, Mar, p.694-702. 1990.
- Palmen, M.J., Dijkstra, C.D., Van Der Ende, M.B., Pena, A.S. Van Rees, E.P. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. **Clin Exp Immunol**, v.101, n.2, Aug, p.351-6. 1995.
- Peyrin-Biroulet, L., Deltenre, P., De Suray, N., Branche, J., Sandborn, W.J. Colombel, J.F. Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.6, n.6, Jun, p.644-53. 2008.
- Podolsky, D.K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v.347, n.6, Aug 8, p.417-29. 2002.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C. Mukaida, N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest**, v.118, n.2, Feb, p.560-70. 2008.
- Powrie, F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. **Immunity**, v.3, n.2, Aug, p.171-4. 1995.

Pullan, R.D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J.S., Williams, G.T., Newcombe, R.G., Russell, M.A., Feyerabend, C., Thomas, G.A. Et Al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **N Engl J Med**, v.330, n.12, Mar 24, p.811-5. 1994.

Qualls, J.E., Kaplan, A.M., Van Rooijen, N. Cohen, D.A. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol**, v.80, n.4, Oct, p.802-15. 2006.

Rabiet, M.J., Macari, L., Dahlgren, C. Boulay, F. N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR2/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. **J Biol Chem**, v.286, n.30, Jul 29, p.26718-31. 2011.

Rees, D., Miles, E.A., Banerjee, T., Wells, S.J., Roynette, C.E., Wahle, K.W. Calder, P.C. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. **Am J Clin Nutr**, v.83, n.2, Feb, p.331-42. 2006.

Reinisch, W., De Villiers, W., Bene, L., Simon, L., Racz, I., Katz, S., Altorjay, I., Feagan, B., Riff, D., Bernstein, C.N., Hommes, D., Rutgeerts, P., Cortot, A., Gaspari, M., Cheng, M., Pearce, T. Sands, B.E. Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. **Inflamm Bowel Dis**, v.16, n.2, Feb, p.233-42. 2011.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v.2, n.4, Apr, p.361-7. 2001.

Rhee, W.J., Ni, C.W., Zheng, Z., Chang, K., Jo, H. Bao, G. HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.15, Apr 13, p.6858-63. 2011.

Rogler, G. Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Surg**, v.22, n.4, Apr, p.382-9. 1998.

Rothenberg, M.E. Eosinophilia. **N Engl J Med**, v.338, n.22, May 28, p.1592-600. 1998.

Rothenberg, M.E., Mishra, A., Brandt, E.B. Hogan, S.P. Gastrointestinal eosinophils. **Immunol Rev**, v.179, Feb, p.139-55. 2001.

Rubin, D.T. Hanauer, S.B. Smoking and inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.12, n.8, Aug, p.855-62. 2000.

Rutgeerts, P., Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J., Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S.B., Lichtenstein, G.R., De Villiers, W.J., Present, D., Sands, B.E. Colombel, J.F. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **N Engl J Med**, v.353, n.23, Dec 8, p.2462-76. 2005.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C. Horak, I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. **Cell**, v.75, n.2, Oct 22, p.253-61. 1993.

Saitoh, O., Kojima, K., Sugi, K., Matsuse, R., Uchida, K., Tabata, K., Nakagawa, K., Kayazawa, M., Hirata, I. Katsu, K. Fecal eosinophil granule-derived proteins reflect disease activity in inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v.94, n.12, Dec, p.3513-20. 1999.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Scherl, E., Fleisher, M.R., Katz, S., Johanns, J., Blank, M. Rutgeerts, P. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.135, n.4, Oct, p.1130-41. 2008.

Sangfelt, P., Carlson, M., Thorn, M., Loof, L. Raab, Y. Neutrophil and eosinophil granule proteins as markers of response to local prednisolone treatment in distal ulcerative colitis and proctitis. **Am J Gastroenterol**, v.96, n.4, Apr, p.1085-90. 2001.

Sartor, R.B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v.106, n.2, Feb, p.533-9. 1994.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v.3, n.7, Jul, p.390-407. 2006.

Schmidt, C., Giese, T., Ludwig, B., Mueller-Molaian, I., Marth, T., Zeuzem, S., Meuer, S.C. Stallmach, A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v.11, n.1, Jan, p.16-23. 2005.

Selsted, M.E. Ouellette, A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nat Immunol**, v.6, n.6, Jun, p.551-7. 2005.

Serhan, C.N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? **Prostaglandins**, v.53, n.2, Feb, p.107-37. 1997.

\_\_\_\_\_. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.73, n.3-4, Sep-Oct, p.141-62. 2005.

\_\_\_\_\_. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v.25, p.101-37. 2007.

\_\_\_\_\_. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Am J Pathol**, v.177, n.4, Oct, p.1576-91. 2010.

\_\_\_\_\_. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. **Faseb J**, v.25, n.5, May, p.1441-8. 2011.

Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G. Wallace, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **Faseb J**, v.21, n.2, Feb, p.325-32. 2007.

Serhan, C.N. Chiang, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resolomics. **Rheum Dis Clin North Am**, v.30, n.1, Feb, p.69-95. 2004.

\_\_\_\_\_. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. **Br J Pharmacol**, v.153 Suppl 1, Mar, p.S200-15. 2008.

Serhan, C.N., Chiang, N. Van Dyke, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.5, May, p.349-61. 2008.

Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N. Gronert, K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **J Exp Med**, v.192, n.8, Oct 16, p.1197-204. 2000.

Serhan, C.N., Fiore, S., Brezinski, D.A. Lynch, S. Lipoxin A4 metabolism by differentiated HL-60 cells and human monocytes: conversion to novel 15-oxo and dihydro products. **Biochemistry**, v.32, n.25, Jun 29, p.6313-9. 1993.

Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G. Moussignac, R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **J Exp Med**, v.196, n.8, Oct 21, p.1025-37. 2002.

Serhan, C.N. Petasis, N.A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. **Chem Rev**, Jul 18. 2011.

Serhan, C.N. Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**, v.6, n.12, Dec, p.1191-7. 2005.

- Shen, C.H. Stavnezer, J. Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. **Mol Cell Biol**, v.18, n.6, Jun, p.3395-404. 1998.
- Shoda, R., Matsueda, K., Yamato, S. Umeda, N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. **Am J Clin Nutr**, v.63, n.5, May, p.741-5. 1996.
- Smith, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **J Leukoc Biol**, v.56, n.6, Dec, p.672-86. 1994.
- Smithson, J.E., Campbell, A., Andrews, J.M., Milton, J.D., Pigott, R. Jewell, D.P. Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. **Gut**, v.40, n.2, Feb, p.234-40. 1997.
- Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M. Smith, P.D. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **J Clin Invest**, v.115, n.1, Jan, p.66-75. 2005.
- Smythies, L.E., Shen, R., Bimczok, D., Novak, L., Clements, R.H., Eckhoff, D.E., Bouchard, P., George, M.D., Hu, W.K., Dandekar, S. Smith, P.D. Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation. **J Biol Chem**, v.285, n.25, Jun 18, p.19593-604. 2010.
- Steinhoff, U., Brinkmann, V., Klemm, U., Aichele, P., Seiler, P., Brandt, U., Bland, P.W., Prinz, I., Zugel, U. Kaufmann, S.H. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. **Immunity**, v.11, n.3, Sep, p.349-58. 1999.
- Strober, W., Fuss, I. Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v.117, n.3, Mar, p.514-21. 2007.
- Strober, W. Fuss, I.J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.140, n.6, May, p.1756-67. 2011.
- Strober, W., Fuss, I.J. Blumberg, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.495-549. 2002.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A. Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.1, Jan, p.9-20. 2006.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J.L. Rutgeerts, P. Anti-tumor necrosis factor treatment

restores the gut barrier in Crohn's disease. **Am J Gastroenterol**, v.97, n.8, Aug, p.2000-4. 2002.

Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J. Mizoguchi, A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. **J Clin Invest**, v.118, n.2, Feb, p.534-44. 2008.

Sun, Y.P., Oh, S.F., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E., Colgan, S.P., Petasis, N.A. Serhan, C.N. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. **J Biol Chem**, v.282, n.13, Mar 30, p.9323-34. 2007.

Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M. Lochs, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.122, n.1, Jan, p.44-54. 2002.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R. Pittet, M.J. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. **Science**, v.325, n.5940, Jul 31, p.612-6. 2009.

Takagi, H., Kanai, T., Okazawa, A., Kishi, Y., Sato, T., Takaishi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Hoshino, K., Takeda, K., Akira, S., Watanabe, M., Ishii, H. Hibi, T. Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. **Scand J Gastroenterol**, v.38, n.8, Aug, p.837-44. 2003.

Takahashi, I., Lijima, H., Kishi, D. Kiyono, H. Oligoclonal Th2-biased betabeta T cells induce murine inflammatory bowel disease. **Immunol Res**, v.20, n.3, p.237-42. 1999.

Takano, T., Clish, C.B., Gronert, K., Petasis, N. Serhan, C.N. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. **J Clin Invest**, v.101, n.4, Feb 15, p.819-26. 1998.

Takano, T., Fiore, S., Maddox, J.F., Brady, H.R., Petasis, N.A. Serhan, C.N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. **J Exp Med**, v.185, n.9, May 5, p.1693-704. 1997.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I. Akira, S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. **Immunity**, v.10, n.1, Jan, p.39-49. 1999.



Taylor, C.T., Dzus, A.L. Colgan, S.P. Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. **Gastroenterology**, v.114, n.4, Apr, p.657-68. 1998.

Tjonahen, E., Oh, S.F., Siegelman, J., Elangovan, S., Percarpio, K.B., Hong, S., Arita, M. Serhan, C.N. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. **Chem Biol**, v.13, n.11, Nov, p.1193-202. 2006.

Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.11, Nov, p.799-809. 2009.

Van Der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I.B. Einerhand, A.W. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v.131, n.1, Jul, p.117-29. 2006.

Wallace, J.L. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. **ScientificWorldJournal**, v.6, p.577-88. 2006.

Wallace, J.L., Macnaughton, W.K., Morris, G.P. Beck, P.L. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.96, n.1, Jan, p.29-36. 1989.

Weber, B., Saurer, L. Mueller, C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. **Semin Immunopathol**, v.31, n.2, Jul, p.171-84. 2009.

Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v.320, n.6, Feb 9, p.365-76. 1989.

West, M.A., Wallin, R.P., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.G., Prescott, A.R. Watts, C. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. **Science**, v.305, n.5687, Aug 20, p.1153-7. 2004.

Weylandt, K.H., Kang, J.X., Wiedenmann, B. Baumgart, D.C. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v.13, n.6, Jun, p.797-9. 2007.

Williams, I.R. Parkos, C.A. Colonic neutrophils in inflammatory bowel disease: double-edged swords of the innate immune system with protective and destructive capacity. **Gastroenterology**, v.133, n.6, Dec, p.2049-52. 2007.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. Neurath, M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc**, v.2, n.3, p.541-6. 2007.

Wirtz, S. Neurath, M.F. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. **Int J Colorectal Dis**, v.15, n.3, Jun, p.144-60. 2000.

\_\_\_\_\_. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59, n.11, Sep 30, p.1073-83. 2007.

Xiao, H., Heeringa, P., Liu, Z., Huugen, D., Hu, P., Maeda, N., Falk, R.J. Jennette, J.C. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. **Am J Pathol**, v.167, n.1, Jul, p.39-45. 2005.

Xu, C.T., Meng, S.Y. Pan, B.R. Drug therapy for ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v.10, n.16, Aug 15, p.2311-7. 2004.

Xu, Z.Z., Zhang, L., Liu, T., Park, J.Y., Berta, T., Yang, R., Serhan, C.N. Ji, R.R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nat Med**, v.16, n.5, May, p.592-7, 1p following 597. 2010.

Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., Mcclanahan, T., Mckenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D.J., Kastelein, R.A. Rennick, D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**, v.116, n.5, May, p.1310-6. 2006.