UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Doença Inflamatória Intestinal induzida experimentalmente

Patrícia Reis de Souza

Ribeirão Preto
2015

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Doença Inflamatória Intestinal induzida experimentalmente

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientada: Patrícia Reis de Souza

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]: Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Ribeirão Preto – SP

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Patrícia Reis.
Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Doença Inflamatória Intestinal induzida experimentalmente. Ribeirão Preto, 2015.
125 p.: il.; 30cm.
Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Cardoso, Cristina Ribeiro de Barros.
1. Doença inflamatória intestinal. Camundongos. 2. Colite. 3. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. 4. Glicocorticoides. 5. Adrenalectomia.

Patrícia Reis de Souza

Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na Doença Inflamatória Intestinal induzida experimentalmente.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais (Sirlene e Renivaldo) e a minha irmã (Keila), por sempre apoiarem minhas decisões e por serem meu porto seguro!

Agradecimentos

*Primeiramente agradeço a **Deus** pelo dom dessa vida, por sempre guiar meu caminho e me ajudar a superar com dignidade todos os obstáculos.*

*A minha **Orientadora** Prof[a] Dr[a] Cristina de Barros Cardoso, por confiar seu projeto JP aos meus cuidados, pelos ensinamentos transmitidos, pela dedicação, enfim por tudo que contribuiu para o meu crescimento profissional e também pessoal.*

*Aos **Professores** colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. Javier Lazo Chica e Prof. Auro Nomizo, pela troca de conhecimentos e pelo incentivo no desenvolvimento deste estudo.*

*Aos **colaboradores** desse projeto: Helioswilton, Paulo Basso, Viviani Nardini, Vanessa Alves, que além de colaborar na realização dos longos experimentos foram grandes companheiros de jornada. Sem vocês não seria possível a realização deste trabalho...*

*Ao **Henrique e Rosana**, secretários da pós-graduação pelo carinho e dedicação de sempre nos serviços burocráticos.*

*A **todos os professores** da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia que ajudaram e acompanharam meu crescimento durante este percurso.*

*A **todos os funcionários** do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR – USP/RP) pelo excelente trabalho desenvolvido, em especial a **Viviani** pela dedicação e ajuda na conferência dos resultados e a **Lelis** pela dedicação e pelos conselhos dados nas horas mais difíceis. Obrigada pelo carinho.*

*A **todos os funcionários** do Biotério da Faculdade de Farmácia (USP/RP) pelo cuidado com os camundongos, em especial o **Reinaldo** por toda ajuda e companheirismo durante este período.*

*As **minhas queridas amigas** da Universidade de São Paulo (USP/RP): Francielle Rodrigues, Letícia Magalhães, Manuela Sales, Marcela Davoli, Camila Sayuri, Fernanda Cardoso, Franciele Przygodda e Natália Caçador, que sempre me escutaram nos momentos mais difíceis e por me mostrarem que os laços de família extrapolam os laços consanguíneos. Vocês são minhas irmãs de coração...*

A FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Processo N° 2012/00984-8) e por todo apoio financeiro (Processo N° 2010/20162-7), que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

*A minha **mãe**, Sirlene, por ter me ensinado com seu exemplo todos os valores e princípios que conduzem meus passos.*

*Ao meu **pai,** Renivaldo, por sempre me escutar e estar ao meu lado, me apoiando em minhas decisões e me dando força em todos os momentos.*

*A minha **irmã**, Keila, pela amizade e carinho de sempre. És sem dúvida a maior prova de amor de Deus pra mim nessa vida.*

*Ao meu querido e amado noivo, **Evandro**, pelo apoio, força, dedicação e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida e por estar sempre ao meu lado.*

*As minhas **queridas amigas**, Ana Rosa, Grazielle e Thaís, por se fazerem presentes nos momentos mais importantes da minha vida mesmo longe.*

*A todos **familiares e amigos** por apoiarem minhas escolhas e por compreenderem meus momentos de ausência.*

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

O que leio me informa;
O que faço me reforma!
Spartaco Ghilardi

RESUMO

SOUZA, P.R. **Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente.** 2015. 125f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são causadas por desequilíbrio entre as respostas imunes efetoras e reguladoras na mucosa intestinal e podem ser moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) por meio de interações neuroimunoendócrinas e secreção de cortisol. Embora os glicocorticóides (GC) sejam utilizados para tratar a DII, o cortisol produzido pelas glândulas supra-renais também está envolvido na resposta ao estresse, que pode levar a doenças inflamatórias descontroladas. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a participação do eixo HPA na modulação da resposta imune de mucosa intestinal. Para tal, camundongos C57BL/6 foram submetidos à remoção das glândulas adrenais seguida por indução de colite pela administração de água contendo 3% de dextran sulfato de sódio (DSS). Os resultados demonstraram que a ausência das adrenais levou à maior suscetibilidade à doença e mortalidade precoce, fenômeno que não foi prevenido pela reposição de GC. Os animais adrenalectomizados com colite apresentaram níveis significativamente menores de LPS, concomitantemente ao aumento de IL-6 no soro quando comparados aos camundongos não adrenalectomizados. Além disso, os animais adrenalectomizados apresentaram menor celularidade na lâmina própria (LP), menos áreas de erosão e menor escore histopatológico associado ao aumento de IFN-γ e FasL, no intestino, sem produção local compensatória de corticosterona. Houve aumento na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N- acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) no intestino dos animais expostos ao DSS quando comparados ao grupo de camundongos controles saudáveis, independentemente da presença do eixo HPA intacto e o tratamento com GC nos animais adrenalectomizados levou à redução significativa da atividade de MPO. Também foi observado na LP dos camundongos adrenalectomizados aumento significativo na frequência de células dendríticas tolerogênicas $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{+}$, T auxiliares ($CD3^{+}CD4^{+}$), T citolíticas ($CD3^{+}CD8^{+}$) e NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), além de redução significativa da população de células dendríticas pró-inflamatórias $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{-}$, leucócitos $CD11b^{+}$ e linfócitos intra-epiteliais, de maneira dependente de GC. A ausência do eixo HPA intacto levou à diminuição de leucócitos totais no baço quando comparados ao grupo com colite, relacionada principalmente à redução significativa na frequência de células NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), as quais foram restauradas nos camundongos tratados com GC exógenos. Durante a exposição ao DSS houve aumento de células Th2 e Th1 no baço dos camundongos não adrenalectomizados, enquanto que a remoção das adrenais levou a notável redução na população de células T CD4 produtoras de IL-4**,** IL-10**,** IFN-γ ou IL-17, com aumento de células Th17 e diminuição significativa de células Th1 no baço dos camundongos adrenalectomizados e tratados com GC. De forma interessante, houve menor acúmulo de células T reguladoras juntamente à redução na intensidade média de fluorescência (MFI) de FOXP3 em células T $CD4^{+}CD25^{+}$ do baço dos camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS, de maneira geral dependente de GC. Por fim, esta diminuição de mecanismos reguladores foi acompanhada de menor índice de proliferação e aumento de IL-10 no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos com o eixo HPA não

funcional, indicando que a ausência de GC endógenos pode alterar significativamente a homeostase do sistema imunológico. Juntos, nossos resultados demonstram que o eixo HPA é importante na modulação da resposta imunológica durante a colite induzida experimentalmente.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal. Camundongos. Colite. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Glicocorticoides. Adrenalectomia.

ABSTRACT

SOUZA, P.R. **Participation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in experimentally induced inflammatory bowel disease**. 2015. 125f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Inflammatory bowel diseases (IBD) are caused by imbalance between regulatory and effector immune responses in the intestinal mucosa and can be modulated by the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis via neuroimmune endocrine interactions and secretion of cortisol. Although glucocorticoids (GC) are used to treat IBD, cortisol produced by the adrenals glands is also involved in the stress response, which can lead to uncontrolled inflammatory diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the HPA axis in the modulation of the immune response of intestinal mucosa. C57BL/6 mice were subjected to removal of the adrenal glands followed by induction of colitis by administration of water containing 3% dextran sulfate sodium (DSS). The results showed that the absence of adrenals led to increased susceptibility to disease and early mortality, a phenomenon that was not prevented by GC replacement. Adrenalectomized animals exposed to DSS had significantly lower levels of LPS, concomitantly to increased IL-6 in the serum when compared to non-adrenalectomized mice. In addition, adrenalectomized animals had lower cellularity in the lamina propria (LP), less erosion areas and less histopathologic score associated with increased IFN-γ and FasL in the intestine, without compensatory local production of corticosterone. There was an increase in the activity of the myeloperoxidase (MPO) enzyme, N- acetilglicosaminidase (NAG) and eosinophil-peroxidase (EPO) in the intestines of DSS-exposed animals when compared to the healthy control group of mice, regardless of the presence of intact HPA axis, while treatment with GC led to significantly reduced MPO activity. It was also observed in the LP of adrenalectomized mice significant increase in the frequency of tolerogenic dendritic cells $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{+}$, helper T ($CD3^{+}$ $CD4^{+}$), cytolytic T ($CD3^{+}$ $CD8^{+}$) and NKT ($CD3^{+}$ $CD49b^{+}$) besides significant reduction in the population of pro-inflammatory dendritic cells $CD11c^{+}$ $CD11b^{+}$ $CD103^{-}$, leukocyte $CD11b^{+}$ and intraepithelial lymphocytes, GC-dependent manner. The absence HPA intact carried decrease in total leukocytes in spleen when compared to the group with colitis, related mainly to significant reduction in the frequency of NKT cells ($CD3^{+}CD49b^{+}$), which were restored in the GC treated mice. During exposure to DSS there was increased Th2 and Th1 cells in the spleen of non-adrenalectomized mice, while the removal of the adrenals was associated to a marked reduction in the population of CD4 T cells producing IL-4, IL-10, IFN-γ or IL-17 with increased Th17 cells and significant decrease in Th1 cells in the spleen of adrenalectomized mice treated with GC. Interestingly there was less accumulation of regulatory T cells together to a reduction in mean fluorescence intensity (MFI) of FOXP3 in $CD4^{+}CD25^{+}$ T cells in the spleen of mice exposed to DSS after adrenalectomy, most dependent on GC. Finally, the decline of regulatory mechanisms was accompanied by lower rates of proliferation and increased IL-10 in the supernatant culture of splenocytes of mice with disrupted HPA axis, indicating that the absence of endogenous GC altered significantly the homeostasis of the immune system. Together, our results demonstrate that the HPA axis is important in modulating the immune response during experimentally induced colitis.

Keywords: Inflammatory bowel disease. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. Hypothalamic-pituitary-adrenal. Glucocorticoids. Adrenalectomy.

RESUMEN

SOUZA, P.R. **Participación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal en la enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente** 2015. 125f. Tesis (Doctorado) Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son causadas por desequilibrio entre las respuestas inmunes efectoras y reguladoras en la mucosa intestinal y pueden ser moduladas por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) por medio de interacciones neuroimunoendócrino y secreción de cortisol. Aunque los glucocorticoides (GC) sean utilizados para tratar la EII, el cortisol producido por las glándulas supra-renales también está involucrado en la respuesta al estrés, que puede llevar a enfermedades inflamatorias descontroladas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación del eje HPA en la modulación de la respuesta inmune de mucosa intestinal. Para tanto, ratones C57BL/6 fueron sometidos a remoción de las glándulas adrenales seguida por inducción de colitis por administración de agua conteniendo 3% de dextran sulfato de sodio (DSS). Los resultados demostraron que la ausencia de las adrenales llevó à mayor susceptibilidad a la enfermedad y mortalidad precoces, fenómeno que no fue prevenido por la reposición de GC. Los animales adrenalectomizados con colitis presentaron niveles significativamente menores de LPS, concomitantemente al aumento de IL-6 en el suero cuando comparados a los ratones no adrenalectomizados. Además, los animales adrenalectomizados presentaron menor celularidad en la lámina propia (LP), menos áreas de erosión y menor escore histopatológico asociado al aumento de IFN-γ y FasL, en el intestino, sin producción local compensatoria de corticosterona. Hubo aumento en la actividad de las enzimas mieloperoxidasas (MPO), N- acetilglicosaminidasas (NAG) y eosinófilo-peroxidasas (EPO) en el intestino de los animales expuestos al DSS cuando comparados al grupo de ratones controles sanos, independientemente de la presencia del eje HPA intacto y el tratamiento con GC en los animales adrenalectomizados llevó a reducción significativa de la actividad de MPO. También se observó en la LP de los ratones adrenalectomizados aumento significativo en la frecuencia de células dendríticas tolerogénicas $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{+}$, T auxiliares ($CD3^{+}CD4^{+}$), T citolíticas ($CD3^{+}CD8^{+}$) y NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), además de reducción significativa de la población de células dendríticas pro-inflamatorias $CD11b^{+}CD11c^{+}CD103^{-}$, leucocitos $CD11b^{+}$ y linfocitos intraepiteliales, de manera dependiente de GC. La ausencia del eje HPA intacto llevó a disminución de leucocitos totales en esplénico cuando comparados al grupo con colitis, relacionada principalmente a reducción significativa en la frecuencia de células NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), las cuales fueron restauradas en los ratones tratados con, GC exógenos. Durante la exposición al DSS hubo aumento de células Th2 y Th1 en el esplénico de los ratones no adrenalectomizados, en cuanto que la remoción de las adrenales llevó a una notable reducción en la población de células T CD4 productoras de IL-4**,** IL-10**,** IFN-γ ou IL-17, con aumento de células Th17 e disminución significativa de células Th1 en el esplénico de los ratones adrenalectomizados y tratados con GC. De forma interesante hubo menor acúmulo de células T reguladoras juntamente a reducción en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de FOXP3 en células T $CD4^{+}CD25^{+}$ del esplénico de los ratones adrenalectomizados expuestos al DSS, de manera general dependiente de GC. Por fin, esta disminución de mecanismos reguladores fue acompañada de menor índice

de proliferación y aumento de IL-10 en el sobrenadante de cultura de esplenocitos de ratones con el eje HPA no funcional, indicando que la ausencia de GC endógenos pode alterar significativamente a homeostasis del sistema inmunológico. Juntos, nuestros resultados demuestran que el eje HPA es importante en la modulación de la respuesta inmunológica durante la colitis inducida experimentalmente.

Palabras-llave: Enfermedad inflamatoria intestinal. Ratones. Colitis. Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Glucocorticoides. Adrenalectomía.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema das etapas realizadas na cirurgia de remoção das glândulas adrenais (adrenalectomia) e avaliação pós-operatória dos camundongos C57BL/6.

Figura 2: Esquema de indução de colite, avaliação clínica e eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos C57BL/6, durante 6 dias de indução da inflamação intestinal.

Figura 3: Esquema de cirurgia de remoção das glândulas adrenais (adrenalectomia), administração de anti-inflamatório não esteroide, indução de colite, administração de dexametasona, avaliação clínica e eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos C57BL/6.

Figura 4. Imagem representativa dos fragmentos de cólon de camundongos C57BL/6 destinados às diferentes análises.

Figura 5. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD49b^+$, $CD49b^+$, $CD11b^+CD11c^+$ e $CD11b^+$.

Figura 6. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células T γδ do compartimento de linfócitos intra-epiteliais (IEL e células $CD11b^+$ $CD11c^+$ e $CD11b^+$ da lamina própria (LP).

Figura 7. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células Th1, Th2, Th17 e T produtora de IL-10 do baço e linfonodos mesentéricos.

Figura 8. Fórmulas para cálculo de Índice de Proliferação Resistente a Tregs.

Figura 9. Sobrevida dos animais adrenalectomizados.

Figura 10. Variação de peso dos camundongos adrenalectomizados após a remoção das glândulas adrenais.

Figura 11. Avaliação da susceptibilidade à colite em camundongos adrenalectomizados e submetidos à indução de inflamação intestinal.

Figura 12. Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) durante a colite e aumento da susceptibilidade à doença nos camundongos adrenalectomizados e submetidos à inflamação intestinal.

Figura 13: Quantificação de leucócitos circulantes após adrenalectomia e indução de inflamação intestinal.

Figura 14: Sobrevida e níveis de AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase) no soro dos camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides.

Figura 15: Análise histopatológica do cólon de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides.

Figura 16: Produção de citocinas no cólon de camundongos adrenalectomizados com colite e/ou tratados com glicocorticoides.

Figura 17: Dosagem de FasL corticosterona produzida no cólon de camundongos adrenalectomizados com colite e/ou tratados com glicocorticoides.

Figura 18: Avaliação do infiltrado inflamatório no cólon de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides.

Figura 19: Imunofenotipagem das células presentes no baço e linfonodos mesentéricos (LNMs) de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação

intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides, através de citometria de fluxo.

Figura 20: Avaliação de células T produtoras de IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ no baço de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides.

Figura 21: Expressão de marcadores de células T reguladoras nas populações de células T $CD4^{+}CD25^{+}$ e $CD4^{+}CD25^{-}$ do baço e linfonodos mesentéricos (LNM) de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides.

Figura 22: Índice de proliferação e níveis de IL-10 de esplenócitos de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides (GC).

Figura 23: Resistência de esplenócitos provenientes de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides à supressão mediada por células T reguladoras.

Lista de Tabelas

Tabela I: Descrição da análise histopatológica do cólon dos camundongos adrenalectomizados ou não, expostos ou não ao dextran sulfato de sódio, e submetidos ou não a reposição de glicocorticoides;

Tabela II: Descrição dos anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com fluorocromos usados para caracterização imunofenotípica de leucócitos na inflamação intestinal experimental.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH: *hormônio adrenocorticotrópico*

AP-1: proteína ativadora-1

APC: allophycocyanin

BrdU: bromodeoxiuridina

CBG: *cortisol binding globulin*

CD: *cluster of differentiation*

DC: *dendritic cells*

CFSE: *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*

CO_2: dióxido de carbono

Con-A: concanavalina-A

CRH: hormônio liberador de corticotropina

CRH-R1: receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina

CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

UC: *ulcerative colitis*

CD: *crohn's disease*

DII: doença inflamatória intestinal

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSS: dextran sulfato de sódio

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

EM: eminência mediana

EPO: eosinófilo-peroxidase

FITC: isoticianato de fluresceina

FOXP3: *forkhead box P3*

FR4: receptor de folato 4

GALT – tecido linfóide associado ao intestino

GC: glicocorticoides

GFP: proteína verde fluorescente

GITR: *glucocorticoid-induced TNFR-related receptor*

GR: receptor de glicocorticoide

GRE: elementos de resposta ao glicocorticoide

HBSS: hanks balanced salt solution without Ca^{++}/Mg^{++}

HE: hematoxilina e eosina

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

HSPs: *heat shock proteins*

H-TAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio

IFN-γ: *interferon* γ

IL: interleucina

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LIEs: linfócitos intra-epiteliais

LNM: linfonodos mesentéricos

LP: lâmina própria

MC2-R: *receptor da melanocortina tipo 2*

mm: milímetros

MPO: mieloperoxidase

NaCl: cloreto de sódio

NAG: n-acetilglicosaminidase

NFAT: fator nuclear de células T ativadas

NF-κB: fator nuclear κB

NK: *natural killers*

NOS: óxido nítrico sintase

NPV: núcleo paraventricular

OPD: *o-phenilenodiamine Dihidrochloride*

PBS: *phosfate buffer solution*

PE: phycoerythrin

PeCy5: phycoerythrin with cyanine dye 5

PECY7: phycoerythrin with cyanine dye 7

PERCP: peridinin chlorophyll protein

pg: picogramas

PMA: forbol-miristato-acetato

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

rpm: rotações por minuto

PRR: receptores de reconhecimento padrão

SFB: soro fetal bovino

StAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TGF-β: *transforming growth factor* β

TGI: trato gastrointestinal

Th0: T *helper* 0

Th1: T *helper* 1

Th17: T *helper* 17

Th2: T *helper* 2

Th9: T *helper* 9

TMB: tetrametilbenzidina

TNBS: ácido trinitrobenzeno sulfônico

TNF-α: *tumoral necrose factor* α

Tr1: T reguladora 1

Tregs: T reguladoras

µl: microlitros

µm: micrômetros

Lista de Símbolos

α: alfa

β: beta

γ: gama

μ: mi

Sumário

Resumo.....**i**

Abstract.....**iii**

Resumen.....**iv**

Lista de Figuras.....**vii**

Lista de Tabelas.....**x**

Lista de Abreviaturas e Siglas.....**xi**

Lista de Símbolos.....**xiv**

1. INTRODUÇÃO **2**

1.1. Etiopatogenia da Doença Inflamatória Intestinal 2

1.2. Resposta Imunológica na Doença Inflamatória Intestinal 3

1.3. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e Doença Inflamatória Intestinal 7

1.4. Justificativa.....12

2. OBJETIVOS **14**

2.1. Objetivo Principal 14

2.2. Objetivos Específicos.....14

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....**16**

3.1. Animais 16

3.2. Remoção das glândulas adrenais 16

3.3. Indução de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS).....17

3.4. Reposição de Glicocorticódes.....18

3.5. Escore clínico da colite e análise macroscópica do cólon.....19

3.6. Eutanásia e obtenção das amostras 19

3.7. Análise histopatológica.....20

3.8. Detecção da síntese de corticosterona em culturas de intestino 22

3.9. Quantificação de corticosterona plasmática 23

3.10. Citometria de Fluxo 23

3.10.1. Isolamento de células do baço, linfonodos mesentéricos, linfócitos intra-epiteliais e leucócitos da lâmina própria 23

3.10.2. Imunofenotipagem de células do baço, linfonodos mesentéricos, linfócitos intra-epiteliais e leucócitos da lâmina própria 25

3.10.3. Cultura celular para detecção de citocinas intracelulares 26

3.10.4. Leitura e análise por citometria de fluxo 27

3.11. Homogeneização dos tecidos e quantificação de citocinas 31

3.12. Ensaio de mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) 32

3.13. Obtenção do soro, contagem total e diferencial de células do sangue periférico 33

3.14. Ensaio de co-cultivo de esplenócitos com T reguladoras 34

3.15. Ensaio de proliferação de linfócitos 36

3.16. Dosagem de AST e ALT no soro 37

3.17. Dosagem de LPS no soro 37

3.18. Análise Estatística 38

4. RESULTADOS 40

4.1. Padronização dos experimentos 40

4.2. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) desempenha papel importante no controle da colite experimental 43

4.3. Glicocorticoides não são suficientes para reverter a susceptibilidade à colite experimental 47

4.4. Modulação da Resposta Inflamatória Intestinal pelo eixo HPA 48

4.5. Modulação da Resposta Imunológica no Baço e Linfonodos Mesentéricos pelo eixo HPA 56

4.6. Modulação de células T reguladoras pelo eixo HPA durante a inflamação intestinal experimental 60

4.7. Participação do eixo HPA no controle da capacidade proliferativa de esplenócitos e de sua resistência à supressão por células T reguladoras naturais 62

5. DISCUSSÃO 67

6. CONCLUSÕES 79

7. REFERÊNCIAS 81

8. ANEXOS.....98

ANEXO I.....98

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiopatogenia da Doença Inflamatória Intestinal

A Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU) são doenças inflamatórias do trato digestivo, geralmente conhecidas como Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). Ambas são caracterizadas por seu curso crônico e episódios alternados de atividade de doença e períodos de remissão clínica [1, 2].

A Doença de Crohn pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal (TGI), mas frequentemente localiza-se no íleo terminal e/ou cólon. Caracteriza-se por inflamação transmural e descontínua além da ocorrência de granulomas não-caseosos [3, 4]. As manifestações clínicas ocorrem de acordo com a localização, extensão da doença e presença de complicações. De modo geral, os pacientes apresentam diarreia, sangramento intestinal, dor abdominal, febre, perda de peso, fraqueza e desnutrição [3]. Em contraste, a colite ulcerativa é uma doença exclusiva do cólon, na qual a inflamação é restrita à mucosa e submucosa. Afeta inicialmente o reto, mas pode se estender de maneira continua e difusa através do cólon [4]. A apresentação clínica é caracterizada por diarreia com sangue, urgência fecal, dor abdominal difusa e sintomas gerais como febre e perda de peso [3].

Acredita-se que as DII são desordens multifatoriais e heterogêneas [4], que envolvem fatores ambientais (microbiológicos, comportamentais) [2, 5], genéticos (hereditariedade) [4] e desbalanço da resposta imunológica [4] que interagem para produzir a doença. Assim, defeitos na população de células T efetoras que reagem contra antígenos microbianos normais no intestino, diminuição na população de células T reguladoras (Tregs) que não modulam adequadamente células T efetoras e, finalmente, uma disbiose intestinal [6] podem ser alterações responsáveis pela quebra da tolerância na mucosa que ocorre na DII [7].

A etiologia da DII é ainda desconhecida, mas considerando-se dados epidemiológicos, genéticos e imunológicos conclui-se que Colite Ulcerativa e Doença de Crohn são desordens heterogêneas multifatoriais [4] em que fatores ambientais (microbiológicos, comportamentais) [1, 5], a hereditariedade (genética), e imunológicos [4] se interagem para produzir a doença.

Sabe-se que aproximadamente 100 milhões de bactérias residem no intestino dos mamíferos e desempenham funções metabólicas de suma importância para a sua sobrevivência e para a proteção de seus hospedeiros. As bactérias comensais além de regular o desenvolvimento do tecido linfoide associado ao intestino (GALT – *gut associated lymphoid tissue*), interagem com as células presentes no ambiente local, estimulando o desenvolvimento das células imunes efetoras (Th1, Th2, Th17) e reguladoras (Tregs) promovendo a homeostasia local entre os microrganismos comensais e sistema imunológico do hospedeiro. Desta forma, o homem e a microbiota intestinal coexistem numa relação de benefício mútuo, o que contribui para o metabolismo microbiano e do hospedeiro, bem como a maturação do sistema imunológico intestinal [8-11].

Acredita-se que a Doença de Crohn resulte de reação imune inapropriada à microbiota normal do intestino [4, 5, 12]. Além disso, na DII pode haver quebra na tolerância imunológica normal do trato gastrointestinal [7] por defeitos na população de células T efetoras que reagem contra antígenos microbianos habituais no intestino, diminuição da população de células T reguladoras (Tregs) que não modulam adequadamente as células T efetoras e, finalmente, uma alteração no número ou no tipo de microrganismos que compõem a microbiota intestinal, resultando em patógenos capazes de desencadear resposta imune excessiva [6]. Normalmente, a inflamação termina com o reparo tecidual, no entanto, nas DII o reparo não acontece ou é incompleto, as lesões precoces não cicatrizam e levam à inflamação crônica e recidivante.

1.2. Resposta Imunológica na Doença Inflamatória Intestinal

O processo inflamatório crônico da mucosa intestinal na DII é mediado pelas respostas imunes, inata e adaptativa, que juntas desempenham um papel importante na patogênese da doença [13, 14].

O sistema imune inato ou natural é a primeira linha de defesa contra as infecções e tem como principal objetivo impedir, controlar ou eliminar microrganismos patogênicos do hospedeiro. A resposta imune inata é composta por barreiras epiteliais (camada de células epiteliais e linfócitos intra-epiteliais - LIEs), peptídeos antimicrobianos (defensinas e catelecidinas), células circulantes e

teciduais (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killers* - NK), citocinas e proteínas plasmáticas (complemento, colectinas e proteína C-reativa) [15].

Durante a DII, a alteração de algum dos componentes do sistema imune pode promover a quebra da tolerância imunológica local e consequentemente levar ao reconhecimento da microbiota intestinal, ativando a resposta inflamatória. Neste contexto, quando os componentes da barreira epitelial não conseguem conter a invasão bacteriana, estes microrganismos chegam à lâmina própria (LP), onde as células dendríticas (CDs) reconhecem os antígenos bacterianos através dos receptores de reconhecimento padrão (RRP), capturam os microrganismos, migram para os linfonodos mesentéricos (LNM) e apresentam os antígenos para as células T *naives* (virgens/Th0), ativando assim o sistema imune adaptativo (adquirido) [16, 17].

A apresentação de antígeno na presença de citocinas como IL-12 e IFN-γ promove a diferenciação das células Th0 em linfócitos Th1. IFN-γ se liga ao receptor de IFN- γ (IFN- γR) expresso constitutivamente na superfície de células T $CD4^+$ *naive* que resulta na fosforilação do fator de transcrição STAT1 (pSTAT1) e sua translocação para o núcleo. pSTAT1 contribui para a transcrição de outro fator de transcrição, o T-bet, que por sua vez promove a transcrição de STAT1, gerando um ciclo de *feedback* positivo entre estes dois fatores de transcrição. Juntos, pSTAT1 e T-bet induzem a expressão de IL-12R na superfície da célula T. IL-12 no microambiente liga-se ao IL-12R, resultando na fosforilação STAT4, translocação e de ligação ao promotor de IFN-γ levando à produção de IFN-γ [18].

A produção de IFN-γ (citocina pró-inflamatória) pelas células Th1 promove a ativação dos macrófagos aumentando sua atividade microbicida e ajudando a restaurar a integridade da mucosa intestinal [19]. Além disso, as células Th1 também produzem TNF-α o qual desencadeia o processo inflamatório através do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local de infecção [20].

A apresentação de antígeno na presença de citocinas como IL-6 e TGF-β levam a polarização das células Th0 a células do perfil Th17. A diferenciação de células Th17 também requer a IL-21 para a amplificação de precursores Th17, e IL-23 para a manutenção desta população de células. Fatores de transcrição como STAT3 e RORγT são essenciais para a diferenciação de células Th17 [21-24].

As células Th17 secretam IL-17 e IL-23 na mucosa inflamada [25, 26], contribuindo para a patogênese da DII. Além de indução de inflamação, a IL-17 promove o recrutamento de células mononucleares e neutrófilos para tecidos periféricos [27, 28], o que amplifica ainda mais a inflamação local e o combate a bactérias extracelulares. A IL-17 também estimula fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem múltiplos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF-α, ativa a óxido nítrico sintase (NOS) 2, metaloproteinases e quimiocinas, resultando na indução de inflamação [29, 30]. Além de IL-17, as células Th17 são caracterizadas pela produção de IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-26 [31, 32] e expressão do fator de transcrição nuclear RORγt [33, 34]. O receptor de IL-17, solúvel ou de membrana, é expresso em vários órgãos e tecidos. A IL-23, produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos ativados, é também crucial para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas [35-38] por favorecer a manutenção da subpopulação de células T $CD4^+$ caracterizada pela produção de IL-17, IL-17F, IL-6 e TNF-α, mas não IFN-γ ou IL-4 [39, 40].

Nos últimos anos vários grupos detectaram IL-17 em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, como esclerose múltipla, asma, artrite reumatoide e DII, o que sugere sua participação na indução ou desenvolvimento de tais doenças [25, 30, 41-45]. Outro aspecto importante que emerge a partir da descoberta das células Th17, além de seu estreito envolvimento com o desenvolvimento de uma série de doenças, inclusive inflamatórias intestinais, é sua relação com células T reguladoras (Tregs) $CD4^+CD25^+$, visto que estas podem se diferenciar ou induzir a diferenciação de células Th17, por meio da produção de TGF-β [18, 46, 47].

As subpopulações de células T com propriedades reguladoras apresentam papel crítico no controle de respostas autoimunes e/ou exageradas. Dentre os diversos subtipos de células com funções supressoras ou reguladoras, uma pequena população de células T $CD4^+$ (~10%), que co-expressam constitutivamente a cadeia α (CD25) do receptor de IL-2 (IL-2R) foi inicialmente descrita em 1970 como fundamental para a supressão de respostas autoimunes [48]. As células $CD4^+CD25^+$, derivadas do timo, foram inicialmente reconhecidas pela sua habilidade em inibir a proliferação de células autorreativas [49, 50]. Além disso, diversos estudos têm demonstrado o papel das Tregs $CD4^+CD25^+$ na supressão e regulação da resposta imune em condições de inflamação e infecção, prevenindo ou atenuando efeitos deletérios de respostas exageradas, como dano tecidual ou até

mesmo a morte. De fato, na ausência de Tregs $CD4^+CD25^+$, se verifica o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, bem como se acentua a resposta a aloantígenos e tumores [51]. Além da expressão constitutiva de CD25, tais células são caracterizadas por apresentarem o seguinte fenótipo: $CD5^{high}$, $GITR^+$, $CD38^+$, $CD45Rb^{low}$, PD-1 e $CD127^{low}$ [51-55]. A expressão do fator de transcrição Foxp3 é característica única das Tregs $CD4^+CD25^+$, sendo indispensável para seu desenvolvimento [56, 57]. Uma vez ativadas, sua função supressora é antígeno inespecífica, levando à supressão da proliferação de outras células T, ou ainda bloqueando ou diminuindo a produção de mediadores inflamatórios por tais células [51, 52, 58, 59]. Além disso, as Tregs podem exercer suas funções de maneira dependente do contato célula-célula através da molécula inibidora CTLA-4, ou através da produção de citocinas, como TGF-β e IL-10 [51-53, 59]. Tais características colocam as células T $CD4^+CD25^+$ como potenciais reguladoras da resposta imune-inflamatória nas DII. De fato, estudos mostram que a regulação do desenvolvimento da inflamação intestinal é dependente da presença e função de Tregs no intestino, que podem agir inibindo respostas inflamatórias excessivas, como Th1 e Th17 [60]. As Tregs estão presentes no cólon e tecido linfóide de pacientes com DII [60, 61] e sua frequência local varia com a atividade da doença, sendo que durante a fase ativa não há associação a defeitos funcionais, mas à contração do *pool* de Treg no sangue periférico e expansão moderada nas lesões intestinais [62]. Além disso, enquanto a melhora clínica de pacientes com DII está associada à redução do número de células $Foxp3^+$ na mucosa intestinal após tratamento específico [63], resultados do nosso grupo demonstraram que pacientes com DII em remissão da doença apresentam aumento da frequência da população reguladora no sangue periférico (manuscrito em preparação).

Sabe-se que na Doença de Crohn pode haver a polarização para as respostas Th1 e Th17, enquanto a colite ulcerativa pode apresentar respostas Th17 e Th2, além da produção de TNF-α [64, 65]. Neste contexto, é provável que, além dos fatores genéticos e microbiológicos, o balanço entre a produção de mediadores pró-inflamatórios, como IFN-γ e IL-17, e a modulação desta resposta por mecanismos reguladores determine a progressão ou controle da DII.

Diante de processos inflamatórios, como na DII, os sistemas imunológico e neuroendócrino interagem diretamente para tentar manter a homeostase do organismo [66]. Neste contexto, o sistema endócrino desempenha papel importante

no controle da inflamação intestinal, uma vez que ativação do eixo HPA por citocinas pró-inflamatórias, podem estimular a produção de mediadores anti-inflamatórios como os hormônios glicocorticoides [67].

1.3. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e Doença Inflamatória Intestinal

A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) ocorre inicialmente pelo aumento do hormônio liberador de corticotropina (CRH). Neurônios produtores de CRH originam-se na divisão parvocelular do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo e terminam na camada externa da eminência mediana (EM), liberando CRH na circulação porta-hipofisária. Na pituitária anterior (adenohipófise), após se ligarem aos receptores CRH-R1, o CRH estimula os corticotrofos (células adenohipofisárias) a produzirem ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) que é liberado na circulação periférica. O principal alvo do ACTH é o MC2-R (receptor da melanocortina tipo 2) no córtex adrenal, onde estimula a síntese de glicocorticoides (cortisol em seres humanos e primatas não-humanos; corticosterona em roedores) [67, 68]. Os glicocorticoides por sua vez controlam a ativação do eixo HPA por retroalimentação negativa. Estes hormônios inibem a produção de CRH no hipotálamo e de ACTH na adenohipófise, após sua ligação com o receptor de glicocorticoide (GR) [68].

Em humanos, o ACTH e cortisol são secretados em um padrão pulsátil com ritmo circadiano (a cada 24 horas), de modo que os níveis mais altos de cortisol são encontrados ao acordar e declinam ao longo do dia. Já em roedores a produção de corticosterona declina de manhã (período de sono dos roedores) e tem seu pico de produção ao entardecer que é o período de maior atividade dos roedores. Além disso, estes hormônios (cortisol/corticosterona) podem ter sua produção aumentada em resposta ao estresse [69].

A síntese dos glicocorticoides ocorre no córtex das glândulas suprarrenais, mais especificamente nas células da zona fasciculada, através de um processo conhecido como esteroidogênese. O colesterol é o precursor da esteroidogênese suprarrenal e, derivado da circulação, encontra-se ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL). Receptores de LDL presentes no tecido das glândulas adrenais

captam a LDL ligada ao colesterol e faz sua internalização via endocitose. As vesículas resultantes se fundem com lisossomas e colesterol livre é produzido por hidrólise. Deste modo, o colesterol é transportado para mitocôndria para posterior conversão em pregnenolona pelo citocromo P450scc. Um passo importante neste processo se dá após a ligação do ACTH ao seu receptor, esta ligação estimula a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), que tem como principal função promover o transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna. Após a captação do colesterol pela mitocôndria, ele é clivado pela enzima P450 para formar pregnenolona, a qual no citoplasma é convertida em progesterona pela isoenzima tipo II da 3β-hidroxiesteroide desidrogenase. A progesterona é hidroxilada à 17OH-progesterona através da atividade de CYP 17α-hidroxilase. Esta fase da esteroidogênese é crucial para a síntese de glicocorticoides, pois a 21-hidroxilação da 17OH-progesterona realizada pela CYP21A2 (21-hidroxilase) promove a produção de 11-desoxicortisol, que é convertido em cortisol pela enzima CYP11B1 (11β-hidroxilase) [70-72].

Os glicocorticoides produzidos pelas adrenais são liberados para a circulação sanguínea, onde se encontram ligados predominantemente à globulina ligadora de cortisol (CBG – *cortisol binding globulin*) e então agem nos tecidos-alvo via ligação com receptor de glicocorticoide (GR – *glucocorticoid receptor*). Os GRs encontram-se distribuídos por vários tipos de células do corpo humano, como: pele, músculo, tecido conjuntivo, osteoblastos, células do sistema imunológico (ex.: linfócitos T e B), cérebro e trato gastrointestinal. Ao contrário dos receptores dos hormônios proteicos, que estão localizados na membrana celular, os GRs estão localizados no citoplasma ligados às proteínas do choque térmico (HSPs – *heat shock proteins*) (HSP90 e HSP 70) formando um complexo protéico citoplasmático. Em resposta ao acoplamento ao GC, os GRs sofrem mudanças conformacionais que resultam na dissociação das HSPs e translocam-se para o núcleo, onde regulam a expressão de certos genes por meio da ligação a elementos de resposta ao glicocorticoide (GRE), em suas regiões reguladoras [73-77].

Os GRs também podem se localizar na membrana plasmática e a sua interação com os GC promovem uma cascata de sinalização intracelular não clássica, também conhecida como via de sinalização não genômica. A ligação de GC ao GR associado à membrana plasmática promove uma rápida ativação celular que não requer alterações na expressão gênica, como ocorre na via de sinalização

clássica pela ligação de GC-GR citoplasmático citada anteriormente [73]. A expressão do GR de membrana ocorre principalmente em células musculares, pâncreas, coração, tecido adiposo, sistema imunológico e cérebro. Deste modo, a via de sinalização não genômica está envolvida, por exemplo, na inibição da contração muscular da traqueia, na rápida inibição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, na liberação de óxido nítrico no tecido cardíaco, na ação anti-inflamatória e na comunicação entre células nervosas pela regulação das junções do tipo gap [78, 79].

Os glicocorticoides (GCs) produzidos em resposta a diversos estímulos como o estresse emocional, físico e/ou imunológico, apresentam grande potencial anti-inflamatório [80]. Durante alterações da homeostase como em processos infecciosos, as citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células do sistema imunológico estimulam a liberação sistêmica de GCs, que exercem papel benéfico limitando as respostas inflamatórias. Neste contexto, a remoção das glândulas adrenais ou a inibição farmacológica da síntese sistêmica de GCs pode resultar em choque ou morte após indução de forte resposta imunológica [81]. Por outro lado, a hiporresponsividade do eixo HPA ao estresse tem sido relacionada ao desenvolvimento e perpetuação da inflamação [82, 83]. Neste sentido, embora fatores psicológicos não sejam causa direta da colite ulcerativa ou doença de Crohn, o estresse pode afetar a atividade inflamatória em parte dos pacientes acometidos pelas DII.

Nos últimos anos, vários trabalhos evidenciaram que a produção de GCs bioativos não é restrita apenas às glândulas adrenais, estendendo-se a outras fontes como timo, cérebro, pele e endotélio vascular [84]. A mucosa intestinal é também uma importante fonte extra-adrenal de produção de GCs, que contribuem para a manutenção da homeostase local, controlando a ativação de linfócitos T intestinais [85]. As principais células produtoras de GCs no intestino parecem ser as células epiteliais indiferenciadas e em proliferação das criptas [85, 86]. Ainda, o controle molecular da síntese de GCs pelas adrenais e pelo intestino é também fundamentalmente diferente, embora a função da produção extra-adrenal de GCs seja ainda pouco conhecida. Durante a inflamação intestinal induzida experimentalmente (colite) há aumento da expressão de enzimas esteroidogênicas e da produção de GC intestinal, sendo que a citocina TNF-α exerce papel fundamental na regulação desta síntese [87]. Conforme descrito anteriormente, a produção de

GC é regulada pela expressão de P450scc, enzima codificada pelo gene CYP11A1, que converte colesterol em pregnenolona e por 11β-hidroxilase (P450C11), codificada pelo gene CYP11B1, o qual converte 11-deoxicorticosterona em corticosterona ativa. A indução de colite por dextran sulfato de sódio (DSS) resulta em aumento significativo da expressão de CYP11A1 e CYP11B1, sugerindo que a colite experimental gera síntese de GC intestinal como forma de contrabalancear a inflamação no cólon. O receptor nuclear/fator de transcrição LRH-1 foi também identificado como um regulador crítico da produção intestinal de GCs [88, 89]. Além disso, enquanto a síntese intestinal de GCs é supostamente um importante mecanismo de regulação negativa para o controle das respostas imunes intestinais e inflamação, o sistema nervoso central pode também amplificar ou modular a inflamação intestinal por meio da estimulação do eixo HPA [90, 91].

Várias desordens inflamatórias são atualmente tratadas com GCs. Estes são considerados terapia efetiva para doenças autoimunes, alérgicas e DII, além de serem considerados a primeira droga de escolha para tratamento de colite ulcerativa aguda [92]. Entretanto, embora os mecanismos de ação dos GCs ainda não tenham sido completamente elucidados, assim como as razões dos seus diferentes efeitos nos pacientes em diversas situações clínicas, sabe-se que as ações anti-inflamatórias exercidas pelos mesmos ocorrem por vários mecanismos, como o bloqueio da produção de citocinas. Estes hormônios esteroides podem agir sobre fatores de transcrição como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear κB (NF-κB) [93]. Ainda, a inibição da sinalização via Jak-STAT induzida por IL-2 e outras citocinas relacionadas [94], sugere que a inibição da sinalização por citocinas contribui para a eficácia clínica destes fármacos. No entanto, como uma parcela de pacientes é refratária ao tratamento, esta se torna ainda uma importante questão a ser elucidada, principalmente no que concerne aos mecanismos endócrino-imunológicos relacionados a não responsividade à terapia com GC. Foi demonstrado que o tratamento com GCs promove ou inicia a diferenciação de células T reguladoras, dependente de Foxp3 [95] e amplifica a frequência de células T $CD4^+$ $Foxp3^+$ in vitro [96]. Além disso, tem se descrito cada vez mais o papel dos GCs sobre a função de células T reguladoras $Foxp3^+$ e $IL\text{-}10^+$. Pacientes adultos asmáticos que receberam tratamento com GC sistêmico ou inalado apresentaram aumento de expressão de RNAm para Foxp3 e IL-10 nas células T CD4 do sangue periférico, quando comparados a pacientes asmáticos não

tratados [95]. Adicionalmente, células T $CD4^+$ estimuladas na presença de GCs, como dexametasona, demonstraram indução de IL-10 dose-dependente aliada à atividade reguladora ou inibidora [97-99]. Esta indução é aumentada pela presença adicional de mediadores como β2 agonistas [100] ou 1,25-dihidroxivitamina D3 (calcitriol) [101]. A terapêutica com GCs (dexametasona) é também capaz de amplificar a expansão seletiva de células T reguladoras, mediada por IL-2 *in vivo* [102] e consequentemente inibir o desenvolvimento de encefalite autoimune experimental.

O eixo HPA exerce papel importante na modulação das respostas imunes nas DII. Na colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) há ativação do eixo HPA e redução da sensibilidade da mucosa inflamada a GCs circulantes, enquanto a adrenalectomia visivelmente exacerba a inflamação intestinal. Este efeito foi associado a alterações na razão periférica de CD4/CD8 e diferenciação Th1, sugerindo que os hormônios adrenocorticais possuem a capacidade de regular o sistema imunológico na DII experimental [103]. Por outro lado, o pré-tratamento com dexametasona não previne o desenvolvimento de colite aguda por DSS, observado pelo agravamento microscópico e histológico da inflamação intestinal nos animais experimentais [104]. Além da eficácia variável dos GC no tratamento das DII, pouco se sabe sobre seu efeito na modulação da inflamação intestinal IL17-dependente, assim como sua relação com a população de Tregs na doença. Estudos recentes demonstraram que o tratamento da inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) com calcitriol está associado a alterações no padrão de resposta imune Th1/Th17 para Th2 ou regulador, especialmente quando em associação a dexametasona [105]. Por outro lado, pacientes com esclerose múltipla apresentam redução do padrão de resposta Th17 e melhora clínica da doença após tratamento com metilprednisolona [106]. Dessa forma, faz-se necessária a identificação do papel da ativação do eixo HPA e de hormônios como GC na modulação da resposta imuno-inflamatória nas DII, em especial na regulação das respostas imunes efetoras e reguladoras, proporcionando, assim, bases científicas para o desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas mais eficientes para a colite ulcerativa e/ou doença de Crohn.

1.4. Justificativa

As DIIs afetam milhares de pessoas em todo o mundo, causando sintomas como dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso, febre e fadiga, além de obstrução intestinal e fístulas. A inflamação grave pode causar danos prolongados e irreversíveis na função e estrutura gastrintestinal, além de desencadear o desenvolvimento de outras doenças como câncer cólon-retal. O eixo HPA parece exercer papel importante na modulação das respostas imunes nas DII, que podem ser causadas, dentre outros fatores, pelo estresse, reação inflamatória descontrolada e desbalanço entre as populações de células Treg e efetoras na mucosa intestinal. Por outro lado, a produção de GC e a terapia com corticosteroides são supostamente capazes de controlar respostas inflamatórias exacerbadas como nas DII. No entanto, vários pacientes são resistentes à terapia com GC, por razões ainda desconhecidas. Sendo assim, é necessário o entendimento da ação dos glicocorticoides e do eixo imuno-endócrino neste processo inflamatório, para o estabelecimento de bases científicas e desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, de custo acessível ou a correção de falhas terapêuticas na DII.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Avaliar a participação do eixo HPA na modulação da resposta imune na inflamação intestinal experimental

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar o efeito do eixo HPA nos parâmetros clínicos do desenvolvimento da inflamação intestinal;

2.2.2. Avaliar a ativação do eixo HPA durante a inflamação intestinal experimental, por meio da quantificação da produção plasmática e intestinal de glicocorticoides;

2.2.3. Verificar a resposta inflamatória, infiltrado celular e lesões intestinais de camundongos submetidos à inflamação intestinal experimental, na ausência das glândulas adrenais;

2.2.4. Avaliar a capacidade imunomoduladora do sistema endócrino na DII por meio da quantificação de citocinas e imunofenotipagem de células T CD4 produtoras de IFN-γ (Th1), IL-4 (Th2), IL-17 (Th17), IL-10 e reguladoras na presença ou ausência de adrenais durante a inflamação intestinal;

2.2.5. Verificar a participação do eixo HPA na responsividade das células efetoras frente às células T reguladoras de camundongos adrenalectomizados ou não e submetidos à inflamação intestinal experimental.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, selvagens, de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 25g, mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com água e ração oferecidas *ad libitum*. Durante todo o experimento, estes ficaram em mini-isoladores de racks ventilados, com renovação constante de ar, à temperatura de 22 a 26°C e umidade entre 45 e 55%. A água e a maravalha passaram pelo processo de esterilização antes de serem oferecidas aos animais. Os camundongos foram divididos nos grupos: **controle** (n = 5), animais saudáveis (sem indução de DII); **DSS** (n = 5), animais submetidos à DII induzida por DSS 3%; **ADX** (n = 5), camundongos adrenalectomizados sem DII; **ADX + DSS** (n = 5), animais adrenalectomizados e submetidos à indução de DII; **ADX + DSS + GC** (n = 5), animais adrenalectomizados, submetidos à indução de DII e tratados com glicocorticoides; **sham** (n = 5), animais sham-operados, sem qualquer outra intervenção. Como os resultados dos grupos controle, ADX e sham não diferiram um do outro significativamente na análise estatística, utilizamos os dados do grupo **controle** para comparação em todas as figuras. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA e certificados pelo Protocolo n°: 11.1.522.53.0 (Anexo I) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/USP/RP).

3.2. Remoção das glândulas adrenais

Para remoção cirúrgica das glândulas adrenais (adrenalectomia), os camundongos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) para em seguida realizar-se incisões laterais na pele do dorso, nas regiões próximas aos rins. As adrenais foram removidas bilateralmente e as bordas das incisões foram aproximadas e suturadas utilizando-

se fio de sutura absorvível (Chrome Catgut Absorbable, 5-0, Bioline Fios Cirúrgicos Ltda – GO – Brazil) como demonstrado na Figura 1. Após a cirurgia, os camundongos receberam 100 µl de solução salina 0,9% (via oral - gavagem) por dia até o momento da eutanásia para compensar perdas de mineralocorticóides pós-adrenalectomia, como descrito anteriormente [107]. Nas primeiras 48 horas de pós-operatório (p.o.) os camundongos também receberam meglumina de fluxinina (Banamine®, Schering-Plough Animal Health, NJ, USA) um anti-inflamatório não-esteroidal na dose de 1 mg/kg a cada 12 horas, via subcutânea.

Figura 1: Esquema das etapas realizadas na cirurgia de remoção das glândulas adrenais (adrenalectomia) e avaliação pós-operatória dos camundongos C57BL/6.

3.3. Indução de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)

A inflamação intestinal foi induzida com um único ciclo de administração exclusiva de água contendo 3% dextran sulfato de sódio (DSS – MP Biomedicals, Illkirch, France. Peso molecular: 36,000-50,000 kDa), disponibilizada aos

camundongos durante 6 dias consecutivos (Figura 2), seguido de eutanásia e coleta das amostras para análises posteriores. Para os experimentos de sobrevida a colite foi induzida pela administração contínua de água contendo 3% DSS. Os animais foram pesados diariamente para acompanhamento da perda de peso, além da observação de sinais clínicos da doença.

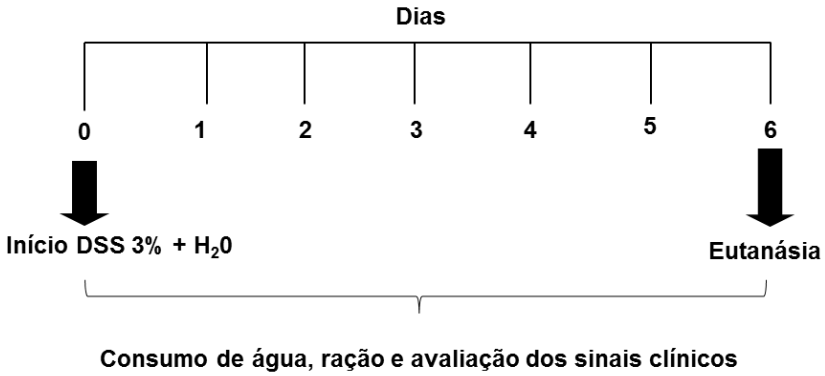

Figura 2: Esquema de indução de colite, avaliação clínica e eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos C57BL/6, durante 6 dias de indução da inflamação intestinal.

Nos grupos adrenalectomizados e submetidos à indução de inflamação intestinal, o início da exposição ao DSS ocorreu após 15 dias da cirurgia de remoção das adrenais, tempo necessário para cicatrização do sítio cirúrgico, conforme Figura 3.

3.4. Reposição de Glicocorticódes

Para reposição de glicocorticóides nos camundongos adrenalectomizados a dexametasona (Azium® Solução, Coopers Saúde Animal, RJ, Brazil) foi dissolvida em salina e administrada via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1 mg/kg/dia, de acordo com experimentos prévios de dose-resposta realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados) e com base em estudos anteriores [108]. Visando a coleta de amostras, o tratamento com dexametasona foi realizado do 3º ao 5º dia de colite, tendo como parâmetro inicial o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença, conforme Figura 3. Nos experimentos de sobrevida, o tratamento com dexametasona foi realizado do 3º até o dia da morte dos camundongos.

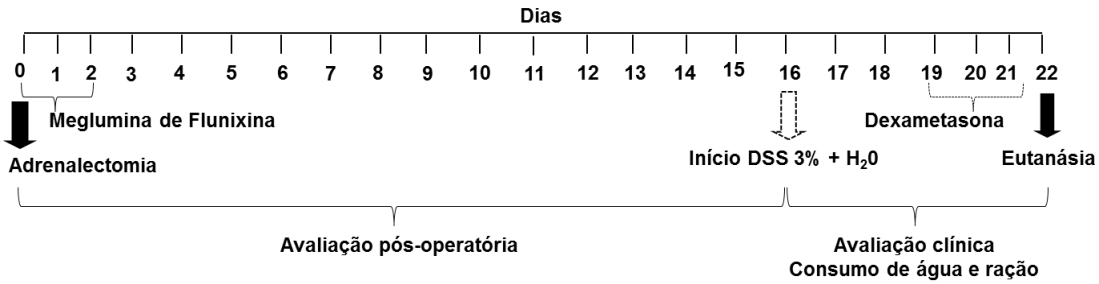

Figura 3: Esquema de cirurgia de remoção das glândulas adrenais (adrenalectomia), administração de anti-inflamatório não esteroide, indução de colite, administração de dexametasona, avaliação clínica e eutanásia para a coleta das amostras dos camundongos C57BL/6.

3.5. Escore clínico da colite e análise macroscópica do cólon

Em todos os experimentos os animais foram avaliados diariamente quanto à perda de peso, consumo de água, ração e a presença de sinais clínicos da colite para formação de um escore clínico da doença. Cada sinal apresentado pelo camundongo correspondeu a 01 (um) ponto e a soma dos pontos de cada animal gerou um escore clínico diário determinado pelos seguintes critérios: perda de peso entre 5% e 10% por dia (1 ponto), perda de peso maior que 10% por dia (2 pontos), ânus molhado (1 ponto), diarreia (1 ponto), presença de sangramento nas fezes ou região perianal (1 ponto), piloereção (1 ponto) e hipoatividade (1 ponto). Na ausência de cada um desses sinais a pontuação correspondia a 0 (zero). O escore clínico geral foi realizado através da somatória do escore clínico diário de cada animal.

A análise macroscópica do cólon no dia da eutanásia foi realizada com o objetivo de quantificar o “escore pós-morte”, considerando os seguintes critérios: diarreia local (1 ponto), diarreia difusa (2 pontos), sangramento local (1 ponto), sangramento difuso (2 pontos) e presença de estenose (2 pontos). A soma dos pontos de cada camundongo gerou o escore pós-morte.

3.6. Eutanásia e obtenção das amostras

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2 no 6° dia de colite e tiveram o sangue, cólon, baço e linfonodos mesentéricos (LNM) coletados para as análises posteriores. As amostras obtidas (em especial cólon) foram divididas em fragmentos menores, sendo que um destes fragmentos foi imerso em

PBS/formaldeído 10% para inclusão em parafina e análise histopatológica. Os outros fragmentos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido para ensaios de MPO/NAG/EPO/ELISA conforme Figura 4. Em experimentos independentes, amostras do cólon, baço e linfonodos mesentéricos foram imersos em meio de cultura RPMI 1640 completo contendo 5% de soro bovino fetal para cultura ou citometria de fluxo.

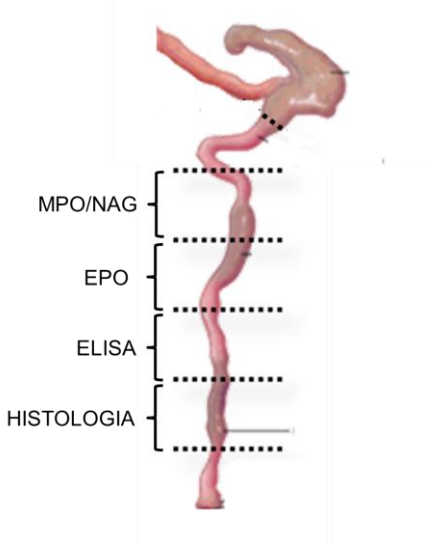

Figura 4. Imagem representativa dos fragmentos de cólon de camundongos C57BL/6 destinados às diferentes análises. MPO: mieloperoxidase; NAG: n-acetilglicosaminidase; EPO: eosinófilo-peroxidase; ELISA: imunoensaio enzimático. Figura adaptada de Treuting & Dintzis [109].

3.7. Análise histopatológica

As amostras de intestino grosso foram conservadas em PBS/formaldeído 10% durante 24 horas e depois armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, foram submetidas aos processos de desidratação em uma série crescente de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina para microtomia. A inclusão do fragmento tecidual foi feita de forma perpendicular ao plano de microtomia e os blocos de parafina com os fragmentos de cólon foram cortados em micrótomo rotativo, obtendo-se cortes com 5 micrômetros (µm) de espessura. A avaliação da inflamação tecidual foi realizada após coloração com hematoxilina e eosina (HE) e análise microscópica. Os critérios para o diagnostico de doença inflamatória intestinal foram adaptados das diretrizes da Sociedade Britânica de

Gastroenterologia (JENKINS et al, 1997). Os parâmetros usados para pontuar e estabelecer o escore histopatológico estão listados na Tabela I:

Tabela I: Descrição da análise histopatológica do cólon dos camundongos adrenalectomizados ou não, expostos ou não ao dextran sulfato de sódio, e submetidos ou não a reposição de glicocorticoides.

Parâmetro observado	**Pontuação**
Mucosa preservada dentro da normalidade;	0
Mucosa com celularidade da LP dentro da normalidade e depleção de mucina nas glândulas tubulares;	1
Mucosa preservada com discreto aumento da celularidade da LP;	2
Mucosa com discreto aumento da celularidade da LP e discreto infiltrado misto na submucosa;	3
Mucosa com discreto aumento da celularidade da LP e depleção de mucina nas glândulas tubulares;	4
Mucosa com depleção de mucina nas glândulas tubulares e discreto aumento da celularidade da LP (predomínio de mononucleares) e infiltrado misto na submucosa;	5
Mucosa com depleção de mucina nas glândulas tubulares e moderado aumento da celularidade da LP (predomínio de mononucleares) e infiltrado misto na submucosa;	6
Mucosa com pequenas áreas de erosão nas bordas da lesão; com depleção de mucina nas glândulas tubulares e discreto aumento da celularidade da LP (predomínio de mononucleares) e infiltrado misto na submucosa;	7
Mucosa com áreas de erosão de tamanho variado nas bordas da lesão, com depleção de mucina nas glândulas tubulares e moderado aumento da celularidade da LP (predomínio de mononucleares) e infiltrado misto na submucosa de moderado a acentuado;	8
Somatória/número de amostras.	**Total**

3.8. Detecção da síntese de corticosterona em culturas de intestino

Em experimentos específicos, o cólon foi removido e processado para quantificação tecidual de corticosterona como descrito por Noti e colaboradores [87, 110]. Para tal, o intestino grosso foi aberto longitudinalmente e cortado em fragmentos menores de 5 mm de extensão, lavado com PBS/2% SBF (soro bovino fetal), e incubado por 10 min a 4°C em PBS contendo 2% de SBF livre de esteroides contendo 1 mM de 1,4-ditiotreitol para remover o excesso de muco. Após lavagem adicional, foram distribuídos 4 fragmentos de intestino por poço em placa de cultura de 24 poços e cultivados em IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) 10% na presença ou ausência de 100 µg/ml do inibidor da síntese de GC, metirapona (Sigma-Aldrich) por 4 horas à 37° C. Como controle positivo para a síntese de GCs, as glândulas adrenais foram cortadas ao meio e cultivadas como descrito acima. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e a concentração de corticosterona determinada por ELISA de competição conforme instruções do fabricante (Corticosterone EIA Kit –, Cayman Chemical Company; USA, Ann Arbor MI). Os resultados foram expressos como picogramas de corticosterona por mililitros por grama de tecido, considerando-se a diferença das amostras cultivadas na ausência e na presença de metirapona, para correção de supostas contaminações com GC sérico.

3.8.1. Preparo de SBF livre de esteroides

Para retirar moléculas apolares, principalmente lipídios e hormônios que podem interferir no resultado de dosagem de corticosterona, foi necessário preparar SBF livre de esteroides através do tratamento do soro com carvão ativado para adsorção das moléculas apolares, conforme protocolo: SBF foi incubado à 4°C, sob agitação contínua, *overnight* com carvão ativado 0,25%, dextran 64-70k, 0,25M de glicose, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 10 mM de Hepes, seguido por centrifugação à 500g por 10 minutos, adição de volume igual de soro e repetida incubação sob agitação contínua, *overnight*. Após nova centrifugação (500g/10 minutos), o sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore (membrana de 0,45µm) e armazenado à -20°C.

3.9. Quantificação de corticosterona plasmática

Em experimentos específicos, no 6° dia de colite os camundongos foram rapidamente eutanasiados e o sangue coletado em tubos com EDTA, em gelo. Após centrifugação, o plasma foi coletado e armazenado a -80°C. A concentração plasmática de corticosterona foi determinada por ELISA de competição de acordo com as instruções do fabricante (Corticosterone EIA Kit – Cayman Chemical Company; USA, Ann Arbor, MI). Os resultados foram expressos em picogramas de corticosterona por mililitro (pg/mL). Resumidamente, este ensaio baseia-se na competição entre a corticosterona presente na amostra e a corticosterona conjugada a acetilcolinesterase (AChE) para um número limitado de anticorpos específicos para corticosterona. Deste modo, a placa é pré-coberta com anticorpo específico para corticosterona, incubada com a amostra e corticosterona conjugada a AChE. A placa é lavada para remover qualquer reagente não ligado e, em seguida, o Reagente de Ellman (que contém o substrato para a AChE) é adicionado. O produto desta reação enzimática tem uma cor amarela distinta e a leitura foi realizada em espectofotômetro a 412 nm. A intensidade da absorbância é proporcional à quantidade de AChE-corticosterona ligada ao anticorpo específico, que é inversamente proporcional à quantidade de corticosterona livre presente na amostra.

3.10. Citometria de Fluxo

3.10.1. Isolamento de células do baço, linfonodos mesentéricos, linfócitos intra-epiteliais e leucócitos da lâmina própria

A fenotipagem e quantificação das células do infiltrado inflamatório de camundongos controles e com indução de colite ocorreram após coleta do baço, linfonodos mesentéricos e cólon. Para extração de células do baço, o mesmo foi coletado, armazenado em placas de Petri contendo meio RPMI 1640 enriquecido com 5% de soro bovino fetal (SBF) e suplementado com aminoácidos não essenciais (MEM *non-essential amino acid solution* - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO,

EUA), 23,8mM de $NaHCO_3$, 10,9mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 500µM de β-mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina (ambos fornecidos por Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), pH7,2-7,4 (para fins de simplificação será simplesmente mencionado como "RPMI completo" ao longo do texto, a não ser quando as respectivas modificações forem especificadas). O baço foi macerado com auxílio de pinças e em seguida, procedeu-se centrifugação, lise de hemácias e lavagem das células em RPMI completo. O *pellet* restante foi ressuspenso em 1 mL de RPMI completo. Para extração de células dos linfonodos mesentéricos, os mesmos foram coletados, armazenados em tubos de 15 mL contendo RPMI completo gelado e macerados em peneiras estéreis ("*cell strainer*" 70 µm – BD Biosciences) com auxílio do êmbolo de uma seringa de 20 mL, seguida de centrifugação. O *pellet* restante foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo. O cólon foi removido, colocado em placa de Petri contendo tampão HBSS ("*Hanks balanced salt solution without* Ca^{++}/Mg^{++}") gelado, foi retirada toda gordura visível, aberto longitudinalmente, lavado com tampão HBSS gelado e cortado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm. Em seguida, estes fragmentos foram armazenados em tubos de 15 mL contendo meio RPMI enriquecido com 2% de SBF e incubados com agitação (470 g/minuto) por 30 minutos a 37°C. Após a incubação os tubos foram agitados vigorosamente para desprendimento dos linfócitos intra-epiteliais (IEL) do tecido e procedeu-se à filtração em peneiras de 70 µm estéreis. O filtrado dessa solução apresentava a maior fração de IEL e o tecido remanescente foi então processado para obtenção de leucócitos da lâmina própria (LP). Para tal, o tecido foi incubado em liberase 50 µg/mL (ROCHE, Mannheim, Germany) diluída em meio RPMI incompleto (sem SBF) por 60 minutos, em movimento, a 37^{o}C. Após este período, o homogenato de tecido foi macerado na peneira de 70 µm estéril com auxílio do êmbolo de uma seringa de 20 mL e foi acrescentado RPMI 2% SBF para inativar a liberase. As suspensões de IEL e de leucócitos da LP foram centrifugadas a 470 x g 20 minutos à 4^{o}C, ressuspensas em 4 mL de RPMI enriquecido com 2% de SBF e filtradas novamente em peneira de 70 µm estéril. Foi adicionado igual volume de Ficoll Hypaque^{TM} (d= 1,077, Amersham Biosciences, EUA) e foi realizada centrifugação por 25 min, a 25^{o}C, 434 x g. As células presentes na interface plasma-Ficoll foram cuidadosamente coletadas, lavadas com RPMI enriquecido com 2% de SBF, o sobrenadante foi desprezado e o

pellet restante foi ressuspenso em RPMI enriquecido com 2% de SBF remanescente no tubo. No final do processo, todas as células obtidas pelo gradiente de centrifugação foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade pelo corante Azul de Tripan a 0,2%, em câmara de Neubauer e, em seguida, utilizadas nos experimentos de cultura e/ou imunofenotipagem.

3.10.2. Imunofenotipagem de células do baço, linfonodos mesentéricos, linfócitos intra-epiteliais e leucócitos da lâmina própria

Para caracterização fenotípica da população de macrófagos, células dendríticas, T CD4 e T CD8 de baço e linfonodos mesentéricos dos animais controles e com colite induzida, foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD11b, CD11c, CD3, CD4 e CD8. Para caracterização das células T reguladoras foram usados os anticorpos contra os antígenos de superfície ou intracelulares CD4, CD25, FOXP3, PD-1, CD73, FR4 e CTLA-4. Na caracterização fenotípica dos linfócitos intra-epiteliais foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD3, CD4 e CD8. Na fenotipagem de células da lâmina própria foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c e CD103. Os anticorpos usados eram conjugados a um dos fluorocromos FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), PE (*Phycoerythrin*) ou PeCy5 (*Phycoerythrin-Cy5*) (BD Pharmigen TM, San Diego, USA), conforme Tabela 2, incluindo os respectivos isotipos controles IgG1 FITC, IgG1 PE e IgG1 PeCy-5 (BD Pharmigen TM, San Diego, USA).

Para a imunomarcação de superfície, as células mononucleares foram divididas em tubos específicos e incubadas com 100 µl de PBS molico 1%, por 20 minutos à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas, seguido pela adição dos anticorpos fluorescentes de superfície, com incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, procedeu-se a lavagem das células com PBS, fixação com PBS/formaldeído 1% e posterior leitura em citômetro de fluxo.

Para caracterização de células T reguladoras $FOXP3^+$ e $CTLA\text{-}4^+$, as células foram imunomarcadas, fixadas e permeabilizadas através do uso de BD

Pharmingen^{TM} Mouse Foxp3 buffer (San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Todos os anticorpos foram obtidos da BD Pharmingen^{TM}, San Diego, USA.

3.10.3. Cultura celular para detecção de citocinas intracelulares

Células isoladas do baço e LNMs foram cultivadas em meio RPMI enriquecido com 5% de SBF suplementado com aminoácidos não essenciais (MEM *non-essential amino acid solution* - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA), 23,8mM de $NaHCO_3$, 10,9mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 500µM de β-mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina (ambos fornecidos por Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), pH7,2-7,4. 5 x 10^5 células/poço em placa de 96 poços foram estimuladas *in vitro* com forbol-miristato-acetato (PMA) a 100ng/mL e ionomicina a 2µg/mL (ambos da Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), na presença de brefeldina A (BD GolgiPlug, San Diego, USA) por 4 horas, a 37° C em 5% de CO_2. Após as células foram marcadas com anticorpos de superfície, fixadas, permeabilizadas e marcadas para detecção de citocinas intracelulares utilizando *Staining Buffer* (PBS contendo SBF 5% e azida de sódio 0.09%), *Fixation Buffer* (PBS/4% formaldeído) e *Permeabilization Buffer* (PBS contendo SBF 1%, azida de sódio 0,1% e saponina 0,2%) antes da aquisição no citômetro de fluxo.

Nestes experimentos foram realizados controles de detecção intracelular de IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-17 com células não estimuladas, além das marcações de superfície e intracelulares com anticorpos de isotipos controles para as fluorescências AlexaFlúor 488, PE e PeCy5, conforme descrito na Tabela II.

Tabela II: Descrição dos anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com fluorocromos usados para caracterização imunofenotípica de leucócitos na inflamação intestinal experimental.

Caracterização Fenotípica			
Tipo de Célula	**Anticorpos monoclonais –mAb (µg)**		
1. Linfócitos T CD4	CD3 PE (0.1)	CD4 PERCP (0.1)	-----
2. Linfócitos T CD8	CD3 PE (0.1)	CD8 PECY7 (0.1)	-----
3. Linfócitos Intra-epiteliais	CD3 PE (0.1)	T γδ FITC (0.25)	-----
4. Monócitos	CD11b PE (0.1)	-----	-----
5. Células Dendríticas	CD11b PE (0.1)	CD11c PECY7 (0.1)	CD103 FITC (0.1)
6. Células NK	-----	-----	CD49b FITC (0.25)
7. Células NKT	CD3 PE (0.1)	-----	CD49b FITC (0.25)
8. Células T reguladoras	FOXP3 ALEXA 647 (0.2)	CD25 PECY7 (0.1)	CD4 PERCP (0.1)
11. Células T reguladoras	CTLA-4 PE (0.2)	CD25 PECY7 (0.1)	CD4 PERCP (0.1)
12. Células T reguladoras	PD1 PE (0.1)	CD25 PECY7 (0.1)	CD4 PERCP (0.1)
13. Células T reguladoras	CD73 PE (0.1)	CD25 PECY7 (0.1)	CD4 PERCP (0.1)
14. Células T reguladoras	FR4 PE (0.1)	CD25 PECY7 (0.1)	CD4 PERCP (0.1)
15. Células T produtoras de IL-10	CD3 APC (0.1)	CD4 PERCP (0.1)	IL-10 PE (0.2)
16. Linfócitos Th1	CD3 APC (0.1)	CD4 PERCP (0.1)	IFN-γ FITC (0.5)
17. Linfócitos Th2	CD3 APC (0.1)	CD4 PERCP (0.1)	IL-4 FITC (0.2)
18. Linfócitos Th17	CD3 APC (0.1)	CD4 PERCP (0.1)	IL-17 PE (0.2)

(PE – Phycoerythrin; FITC - Fluorescein isothiocyanate; APC – Allophycocyanin; PERCP - Peridinin chlorophyll protein; PECY7 – PE with cyanine dye 7).

3.10.4. Leitura e análise por citometria de fluxo

As células foram adquiridas em Citômetro de Fluxo DIVA (BD – Biosciences, San Jose, CA) e os dados obtidos da citometria de fluxo foram analisados pelo programa FlowJo, versão 7.6.3 (TreeStar, San Carlos, CA).

Para obtenção dos percentuais das populações celulares marcadas analisou-se em gráficos de pontos (*Dot-plot*) as propriedades de tamanho e granulosidade (FSC e SSC) das células, marcando-se regiões *(gates)* específicas de linfócitos ou monócitos, das quais foram extraídos os dados de fluorescência. Os resultados foram obtidos subtraindo-se o valor encontrado para as células marcadas com

anticorpos específicos do valor encontrado para as células marcadas com os respectivos isotipos controles. Os fluorocromos utilizados para cada anticorpo encontram-se na Tabela II. Para quantificação de linfócitos T, realizou-se uma análise nos parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis com linfócitos, seguida por um *dot plot* para população correspondente às células $CD3^+$ x $CD4^+$ e $CD3^+$ x $CD8^+$ (Figura 5A-B) e a região compatível com linfócitos duplo positivos foi então delineada. Para quantificação de células NK ou NKT, realizou-se uma análise nos parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis com linfócitos, seguida por um *dot plot* para população correspondente às células $CD3^+$ x $CD49b^+$ e a região compatível com células $CD49b^+$ ou $CD3^+CD49b^+$ foi então delineada (Figura 5A-B). Para análise de monócitos e células dendríticas do baço e linfonodos mesentéricos utilizamos os parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis a macrófagos e DCs, seguida por um *dot plot* para população correspondente às células $CD11b^+$ x $CD11c^+$. O quadrante compatível com células duplo positivas foi então delineada para DCs e o quadrante compatível apenas para $CD11b^+$ foi delineada para a população de macrófagos (Figura 5C-D).

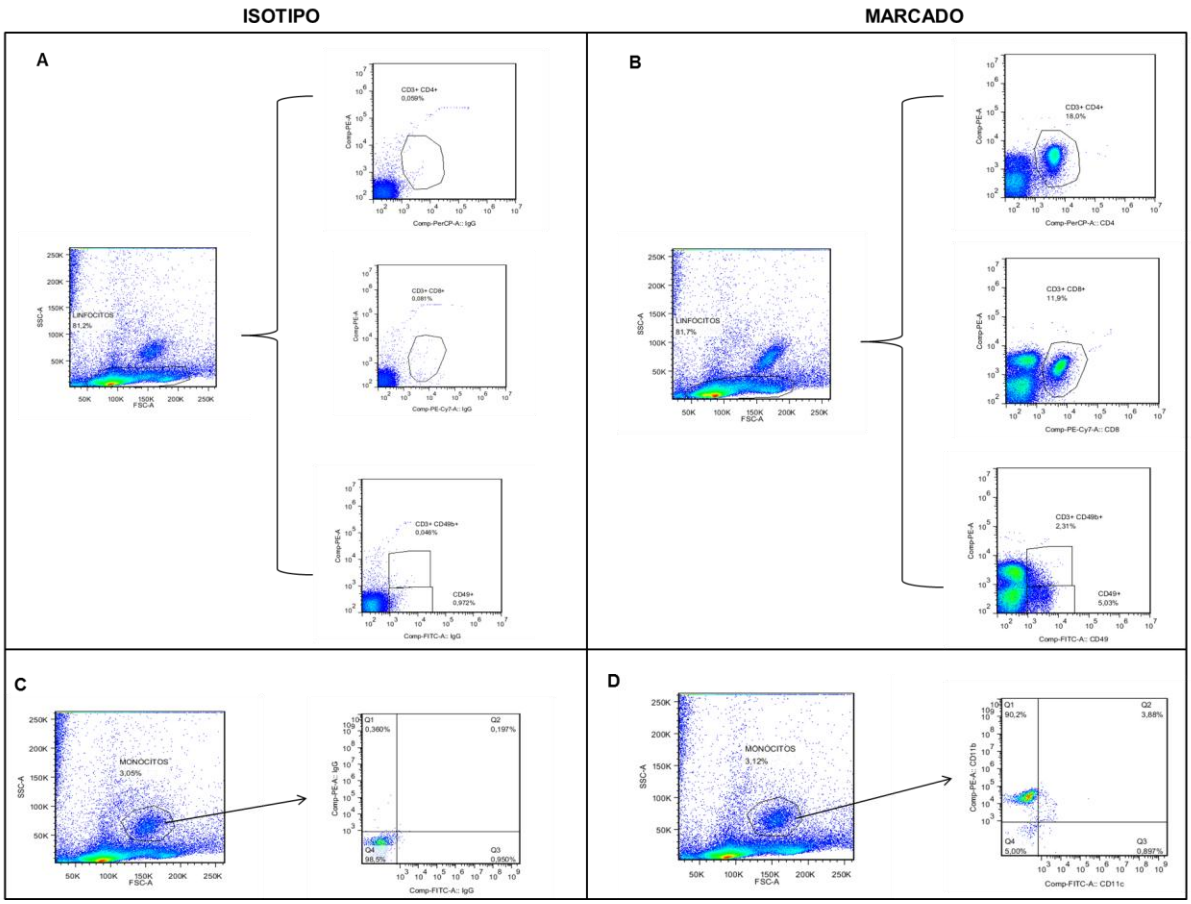

Figura 5. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD49b^+$, $CD49b^+$, $CD11b^+CD11c^+$ e $CD11b^+$. Em (A) delineamento da população de linfócitos nos tubos com anticorpos isotipos controles (IgG1 PE, IgG1 PeCy-5 e IgG1 PeCy-7) correspondentes aos tubos com anticorpos marcados. Em (B) análise nos parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis com linfócitos, seguida por um *dot plot* e delineamento de regiões para população correspondente às células $CD3^+$ x $CD4^+$, $CD3^+$ x $CD8^+$ ou $CD3^+$ x $CD49b^+$. Em (C) delineamento da população de células nos tubos com anticorpos isotipos controles (IgG1 FITC, IgG1 PE) correspondentes aos tubos com anticorpos marcados. Em (D) análise nos parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis a macrófagose DCs, seguida por um *dot plot* e delineamento de quadrantes para população correspondente às células $CD11b^+$ x $CD11c^+$.

Já para as populações de linfócitos T do compartimento IEL analisamos os parâmetros SSC x $CD3^+$, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis com linfócitos $CD3^+$, seguido de histograma para TCR γδ (Figura 6A-B). Para análise de células dendríticas da LP utilizamos os parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis a DCs, seguida por um *dot plot* e delimitação de quadrantes para população correspondente às células $CD11b^+$ x $CD11c^+$ (Figura 6C-D). O quadrante compatível com células duplo positivas foi então delineado para

DCs, seguido de histograma para CD103 para obtenção da porcentagem de DCs tolerogênicas ou pró-inflamatórias (Figura 6C-D).

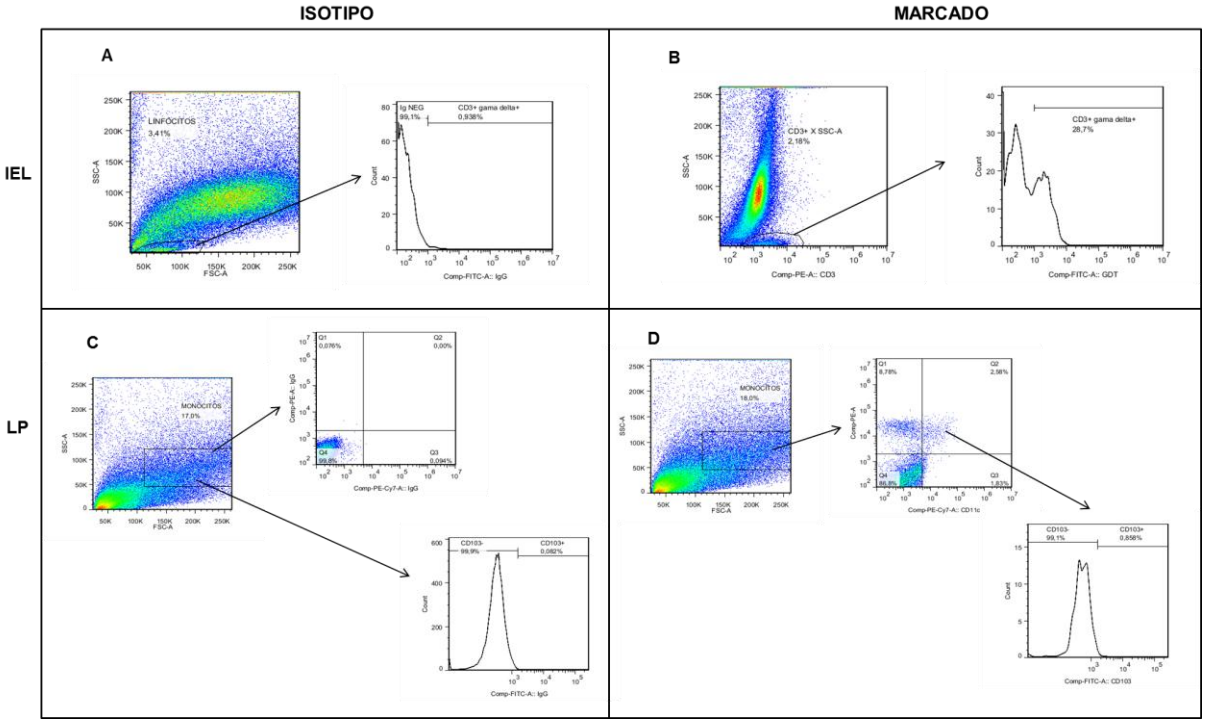

Figura 6. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células T γδ do compartimento de linfócitos intra-epiteliais (IEL e células CD11b$^+$ CD11c$^+$ e CD11b$^+$ da lamina própria (LP). Em (A) delineamento da população de linfócitos intra-epiteliais nos tubos com anticorpos isotipos controles (IgG1 PE e IgG1 FITC) correspondentes aos tubos com anticorpos marcados. Em (B) análise nos parâmetros SSC x CD3 do compartimento IEL, seguido de histograma para TCR γδ. Em (C) delineamento da população de células nos tubos com anticorpos isotipos controles (IgG1 FITC, IgG1 PE) correspondentes aos tubos com anticorpos marcados. Em (D) análise nos parâmetros SSC x FSC, com delineamento da população correspondente ao tamanho e granulosidade compatíveis a macrófagos e DCs, seguida por um *dot plot* e delineamento de quadrantes para população correspondente às células CD11b$^+$ x CD11c$^+$ e histograma para CD103 correspondente ao quadrante de células dendríticas CD11b$^+$CD11c$^+$.

Para obtenção dos percentuais das células T reguladoras a primeira *gate* foi delineada inicialmente na região de linfócitos em SSC x FSC, seguida por *gate* nas regiões duplamente positivas para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 (Figura 21). Em seguida, foram obtidos histogramas para verificação das marcações para CTLA-4, CD73, CD103, FOXP3, FR4 e PD-1. O mesmo foi realizado para as populações CD4$^+$CD25$^-$. Para obtenção dos percentuais de células CD4$^+$ produtoras de IFN-γ, IL-4, IL-10 ou IL-17, foi realizado o delineamento de linfócitos em SSC X FSC, seguida por *gate* nas regiões duplamente positivas para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD4. A partir da população de células T CD3$^+$CD4$^+$ foram feitos *dot plots* para

análise da porcentagem de células marcadas para IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17 (Figura 7 A-B).

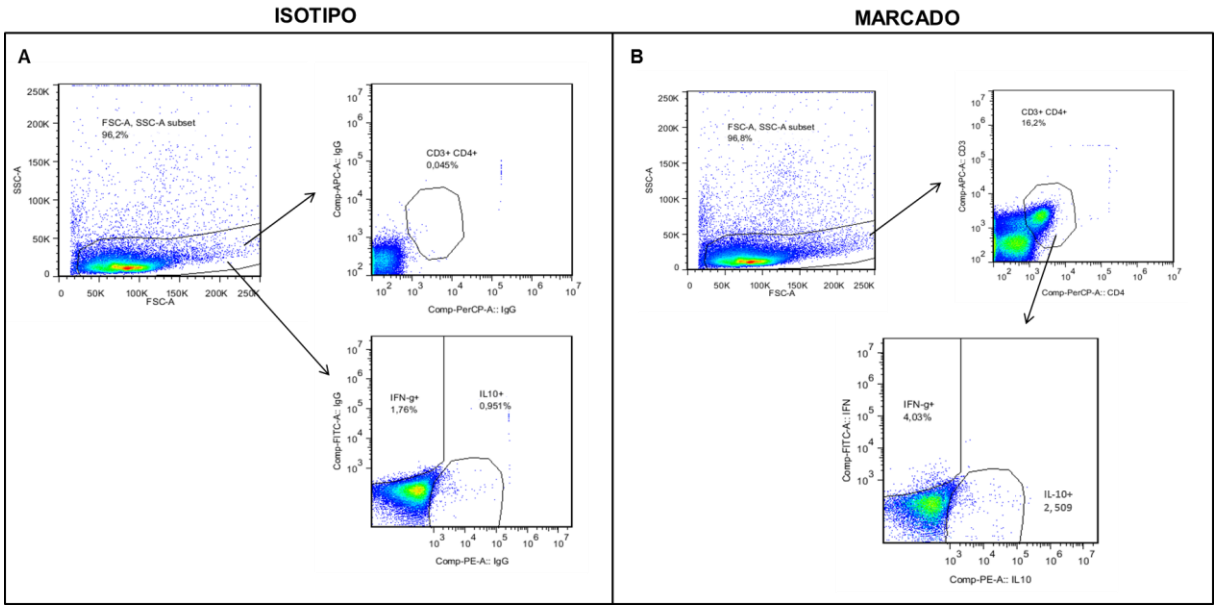

Figura 7. Representação gráfica da análise de citometria de fluxo e das estratégias de *gate* para delineamento das populações de células Th1, Th2, Th17 e T produtora de IL-10 do baço e linfonodos mesentéricos. Em (A) delineamento da população de linfócitos nos tubos com anticorpos isotipos controles (IgG1 PE, IgG1 PERCP, IgG1 APC, e IgG1 FITC) correspondentes aos tubos com anticorpos marcados. Em (B) análise nos parâmetros SSC X FSC, seguida por *gate* nas regiões duplamente positivas para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD4. A partir da população de células T $CD3^{+}CD4^{+}$ foram feitos *dot plots* para análise da porcentagem de células marcadas em regiões específicas para IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17.

3.11. Homogeneização dos tecidos e quantificação de citocinas

Para quantificação das citocinas do intestino, foram coletadas amostras do cólon de camundongos controles e com inflamação intestinal, adrenalectomizados ou não. Para tal, os tecidos foram removidos, pesados, ressuspensos em tampão com inibidor de protease (Complete ® - Roche, Pharmaceuticals, Mannheim, Germany) e então homogeneizados. Os homogenatos foram centrifugados a 1950 x g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as reações de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BD PharmigenTM, San Diego, USA). Foram utilizadas placas com 96 poços, onde 50 µl da amostra foram incubadas com os anticorpos de captura e de detecção para TNF-α, IL-1β, IL-17, IL-22, IL-12, IFN-γ, IL-4 e IL-10 de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences - San Jose, CA, USA). As reações foram reveladas pela adição de TMB e interrompidas pela adição

de H_2SO_4 2N, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a Lm1 450 nm - Lm2 570nm. O ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BD PharmigenTM, San Diego, USA) também foi utilizado para quantificação de IL-6 presente em amostras de soro sanguíneo. Para a dosagem de FasL no cólon foi utilizado o kit de ELISA (R&D Systems, Inc - Quantikine® ELISA - Mouse Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay - USA & Canada) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12. Ensaio de mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO)

Fragmentos do cólon foram cortados em pequenos pedaços, pesados e processados para quantificação de MPO, EPO e NAG como descrito previamente [111, 112].

Em resumo, para o ensaio da MPO, os fragmentos foram homogeneizados em tampão contendo fosfato de sódio e EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguido de lise de hemácias em NaCl a 0,2%. O sedimento obtido após centrifugação foi ressuspenso em solução de fosfato de sódio e H-TAB (hexadeciltrimetilamônio brometo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguido por três etapas de congelamento e descongelamento. Após centrifugação, o sobrenadante foi colocado em placas de 96 poços e a reação foi revelada pela adição de substrato TMB (tetrametilbenzidina - OptEIATM BD, San Diego, CA) a 37 ° C. A reação foi parada pela adição de 4M de H_2SO_4 e as leituras foram realizadas num espectrofotômetro a 450 nm.

O sobrenadante final do ensaio de MPO também foi utilizado para quantificação de macrófagos no cólon dos animais, através da avaliação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) no tecido. Para isto, foram utilizados 25 µL deste sobrenadante que foram colocados em placas de 96 poços. Nesses poços foram adicionados 25 µl de solução 2,24 mM de NAG (p-nitrophenyl-2-acetamida-β-D-glucopiranosideo) (Sigma-Aldrich) e 100 µl de tampão citrato (50 mM, pH 4,5). A seguir, foram incubadas a 37º C durante 60 minutos. Por último, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina (200 mM, pH 10.4), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

Para quantificação de eosinófilos, foi avaliada a atividade da enzima EPO no cólon dos animais. Fragmentos do intestino grosso foram cortados em pequenos pedaços, pesados e ressuspensos em tampão Hanks sem vermelho de fenol, contendo 10 mM de Hepes (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e então homogeneizados. Esta suspensão resultante foi novamente centrifugada a 1950 g por 10 min e o *pellet* ressuspenso em tampão Hanks contendo 0,5% de H-TAB. Foi realizado choque térmico das amostras seguido por centrifugação, sendo o sobrenadante utilizado para as reações. As amostras foram incubadas, em placas de 96 poços, com OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina - Dihidrochloride Tablet Define, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em tampão Tris/HCl 0,05 mM e H_2O_2 durante 30 minutos à 37°C. A reação foi interrompida com H_2SO_4 4M e a absorbância determinada em 492 nm.

Os fragmentos do cólon destinados aos ensaios de MPO, NAG e EPO foram pesados previamente e os resultados foram expressos por grama de tecido.

3.13. Obtenção do soro, contagem total e diferencial de células do sangue periférico

Após a eutanásia dos animais, o sangue periférico foi coletado para obtenção do soro, para a contagem global de células em hemocitômetro (câmara de Neubauer) com solução de Turk e para o esfregaço sanguíneo. O soro foi obtido pela centrifugação do sangue total a 2000x*g*, por 10 minutos, após um período de descanso de 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a formação do coágulo. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e armazenado a -70°C para as análises posteriores.

A contagem global de células foi realizada pela diluição de sangue total em solução de Turk na proporção 1:10; todas as células coradas localizadas nos quatro quadrantes externos do retículo do hemocitômetro foram contadas e a concentração foi expressa por mL de sangue. Já a extensão ou esfregaço sanguíneo foi corado com Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), que se utiliza do princípio de coloração hematológica de Romanowsky, e examinado em microscópio (DM750, Leica, Wetzlar, Alemanha) com objetiva de imersão em óleo. O exame foi realizado na parte mais fina da extensão contando-se 50 leucócitos no centro e 50 leucócitos

na borda da extensão, totalizando-se assim 100 células. A contagem foi feita anotando-se separadamente cada tipo de leucócito identificado (linfócitos, monócitos e neutrófilos). O número relativo de leucócitos foi determinado de acordo com a frequência (%) encontrada das respectivas populações celulares. Já a quantidade absoluta foi calculada multiplicando-se a frequência relativa dos leucócitos pelo número total de células obtido na contagem em hemocitômetro; o produto resultante foi dividido por 100 e expresso como número de células por mm^3 de sangue.

3.14. Ensaio de co-cultivo de esplenócitos com T reguladoras

Para avaliar o papel do eixo HPA e a suscetibilidade dos diferentes grupos experimentais à supressão mediada por Tregs naturais, foi realizado ensaio de supressão com células de camundongos C57BL/6 transgênicos cedidos pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (FMRP/USP) que expressam proteína fluorescente verde (GFP - g*reen fluorescent protein*) sob controle do promotor FoxP3 (FoxP3-GFP^+). Para tal, a proliferação celular foi avaliada por ensaio de bromodeoxiuridina (BrdU) (Anti- bromodeoxyuridine-POD, Fab Fragments ® - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A BrdU é um nucleosídeo sintético análogo à timidina e é incorporado às novas fitas de DNA sintetizado de células em processo de replicação, substituindo a timidina. Desse modo, o aumento da incorporação de BrdU indica aumento da síntese de DNA e maior atividade proliferativa das células.

Para separação (*"sorting"*) de células T $CD4^+$ $FOXP3^+$ GFP^+, camundongos C57BL/6 FoxP3-GFP^+ *knock in*, fêmeas, foram devidamente eutanasiados e tiveram o baço e linfonodos (submandibulares, poplíteos, axilares e inguinais) assepticamente removidos e mantidos em RPMI com SBF 10%. Este meio de cultura foi suplementado com aminoácidos não essenciais (MEM *non-essential amino acid solution* - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA), 23,8mM de $NaHCO_3$, 10,9mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 500µM de β-mercaptoetanol, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina (ambos fornecidos por Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), pH7,2-7,4. Após, os órgãos foram cuidadosamente macerados e filtrados em peneira de 70µm para a obtenção de células. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300x*g* por 10 minutos e 4°C e, posteriormente, submetidas à separação por gradiente em Ficoll-

Paque™ PLUS para obtenção de células mononucleares. As células vivas obtidas foram quantificadas em hemocitômetro e azul de tripan 0,4% e, então, ressuspensas em RPMI com SFB 10% na concentração de $2x10^7$ células/mL. Subsequentemente, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 acoplados ao fluorocromo PERCP (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) por 30 minutos e 4ºC, lavadas e novamente ressuspensas em mesmo volume de RPMI com SFB 10%. Finalmente, elas foram levadas para separação de células (*cell sorting*) $CD4^+FoxP3^+$, supostamente reguladoras, em aparelho BD FACSAria™ III (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA).

Para realização do ensaio de supressão as células do baço de camundongos com inflamação intestinal ou controles, adrenalectomizados e/ou tratados com glicocorticoides foram coletadas e co-cultivadas na presença de células T $CD4^+$ $FOXP3^+$ GFP^+ de camundongos *knock in*, fêmeas, previamente separadas por citometria de fluxo. A proporção de T reguladoras para esplenócitos foi de 1:10 e 1:5. Estas células foram estimuladas com concanavalina-A (Con-A) (3µg/mL) e incubadas a 37°C/5%CO_2 por 72 horas. Nas últimas 15 horas de cultura foi adicionado BrdU (10 uM) às culturas. Após este período as células foram fixadas na superfície da placa e cuidadosamente lavadas para posterior incubação de 30 minutos com o anticorpo anti-BrdU. Os poços foram novamente lavados com PBS 1x, incubados por 30 minutos com TMB (substrato da peroxidase) e a reação foi interrompida com a adição de H_2SO_4 1M. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 450nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO), que é diretamente proporcional à proliferação celular. Os valores de DO provenientes dos poços contendo células estimuladas com ConA na ausência de células Treg foram divididos pelos valores de DO de células não estimuladas (meio), com o objetivo de se obter um "índice de estimulação". Ainda, os valores de DO obtidos por células estimuladas com ConA na presença de células Treg foram também divididos pelos valores de DO de células não estimuladas (meio), com o objetivo de se obter um "índice de Treg". Em seguida, o "índice de Treg" foi dividido pelo "índice de estimulação" e o resultado desta análise foi chamado de "proliferação resistente a Tregs", que demonstra o quanto esplenócitos provenientes das diferentes condições experimentais foram capazes de se proliferar na presença de supressão mediada por células Treg (Figura 8).

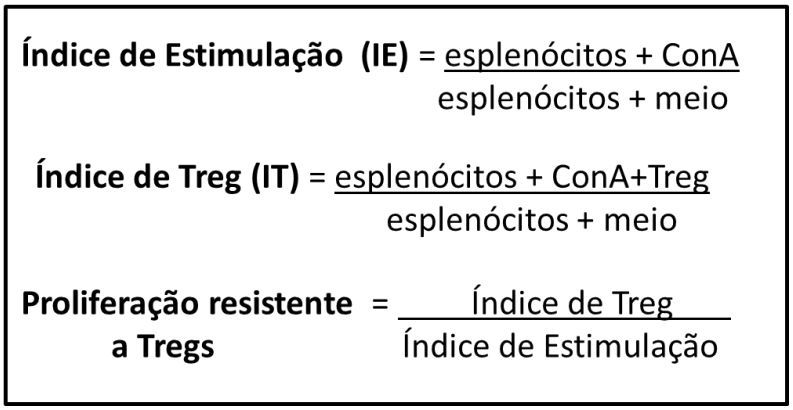

Figura 8. Fórmulas para cálculo de Índice de Proliferação Resistente a Tregs. Células do baço de camundongos com inflamação intestinal ou controles, adrenalectomizados e/ou tratados com glicocorticoides foram co-cultivadas na presença de células T $CD4^+$ $FOXP3^+$ GFP^+ de camundongos *knock in*, fêmeas, previamente separadas por citometria de fluxo. A proporção de T reguladoras para esplenócitos foi de 1:5 e 1:10. Estas células foram estimuladas com Concanavalina-A (Con-A) (3µg/mL) e incubadas com BrdU (10 uM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO), que é diretamente proporcional à proliferação celular. Os resultados dos cálculos demonstrados na figura foram chamados de "Proliferação resistente a Tregs".

3.15. Ensaio de proliferação de linfócitos

Para avaliar o papel do eixo HPA e a consequente participação de glicocorticoides endógenos na proliferação de células T convencionais, foi realizado ensaio de proliferação por citometria de fluxo utilizando o método de marcação com CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Resumidamente, $1x10^7$ células do baço de camundongos submetidos à inflamação intestinal ou controles, adrenalectomizados e/ou tratados com glicocorticoides, foram coletadas e incubadas por 10 minutos com CFSE (5 µM), ao abrigo da luz, à 37°C. Após a incubação foram adicionados 200 µL de SFB para interromper a marcação e foi realizada lavagem com PBS. $5x10^5$ células (180µL) foram estimuladas com 20µL de concanavalina-A (Con-A) (3µg/mL) e incubadas em estufa 37ºC/5% CO_2 por 72 horas. Após este período, o sobrenadante desta cultura foi coletado e utilizado para dosagem de IL-10 por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BD PharmigenTM, San Diego, USA). A seguir as células foram lavadas e fixadas em PBS Formol 1% estéril. A proliferação das células marcadas com CFSE foi quantificada através de leitura realizada em Citômetro de Fluxo DIVA (BD – Biosciences, San Jose, CA) e os dados obtidos da citometria de fluxo foram analisados pelo programa FlowJo, versão 7.6.3 (TreeStar,

San Carlos, CA), determinando o número de divisões celulares correspondentes aos picos de fluorescência e índice de proliferação celular observados na análise.

3.16. Dosagem de AST e ALT no soro

A quantificação no soro de AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase) foi realizada utilizando os kits comerciais AST/GOT Liquiform (®Labtest Diagnóstica AS – Brasil) e ALT/GPT Liquiform (®Labtest Diagnóstica AS – Brasil), respectivamente, de acordo com as recomendações do fabricante. O método baseia-se no princípio de que a AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase, enquanto que a coenzima NADH é oxidada à NAD^+. Do mesmo modo a ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+. A redução da absorbância em 340 nm, consequente à oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade de AST ou ALT na amostra.

3.17. Dosagem de LPS no soro

A quantificação no soro de endotoxina (LPS) de bactérias gram-negativas foi realizada pelo ensaio cromogênico de ponto final utilizando lisado de amebócitos do Limulus (LAL). O LAL é um extrato aquoso de amebócitos do caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*, que possui uma enzima (Fator C) a qual é ativada na presença de endotoxina. Quando o substrato cromogênico é adicionado, ocorre a clivagem da protease que resulta na cor amarela que pode ser quantificada através da absorbância. Resumidamente, as amostras foram misturadas com o LAL e incubadas a 37˚C (±1°C) por 10 minutos. Em seguida, o substrato foi adicionado e uma nova incubação de seis minutos utilizando a mesma temperatura foi realizada. Após essa incubação, a reação foi interrompida utilizando ácido acético glacial 25% v/v e a formação de coloração amarela, indicou a presença de endotoxina. A leitura

foi feita em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda entre 405-410 nm. A concentração de LPS em Unidade de Endotoxina/mililitros (EU/mL) é diretamente proporcional à absorbância das amostras.

3.18. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Graphpad Prism* (San Diego, CA). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foram utilizados testes paramétricos ANOVA - *One way* seguido por teste de comparação múltipla de *Tukey*. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana foram utilizados os testes não paramétricos *Kruskal-Wallis* e teste de comparação múltipla de *Dunn*. A análise estatística dos gráficos de sobrevida foi feita através do Teste *Log-rank* (Teste de Mantel-Cox) que compara a distribuição da sobrevida entre os grupos e verifica se o risco de morte é o mesmo em todos os momentos da curva. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Padronização dos experimentos

Inicialmente foram realizadas cirurgias para padronização da técnica de adrenalectomia (remoção das glândulas supra-renais). Foram realizados 4 experimentos independentes, com 5 animais por grupo e nas primeiras 48 horas pós-cirúrgicas (p.c.) foi administrado o anti-inflamatório não esteroide (meglumina de fluxinina), na dose 1 mg/kg de 12/12 horas, por via subcutânea. Além disso, com o intuito de prevenir a perda de mineralocorticoides nos animais adrenalectomizados, foram administrados, diariamente, por via oral (gavagem), 100 μL de solução salina 0,9%. Foi realizada avaliação pós-operatória quanto à recuperação e sinais clínicos de infecção no sítio cirúrgico, tais como eritema, edema, calor, rubor, deiscência, abscesso e drenagem purulenta pela cicatriz, além da sobrevida.

O primeiro grupo submetido à cirurgia de adrenalectomia apresentou alto índice de mortalidade nas primeiras 24h p.c., sendo que apenas 20% dos camundongos sobreviveram até o 15° dia p.c., quando seria iniciada a indução de colite (Figura 9A). Esta sobrevida foi aumentada para 40% no segundo grupo de camundongos operados (Figura 9B) e para 60% na terceira vez em que foram realizadas as adrenalectomias (Figura 9C). Já no quarto grupo de animais operados foi possível manter 80% de sobrevida 15 dias p.c. (Figura 9D), demonstrando a melhora na técnica e nas condições de adrenalectomia. Além disso, com o objetivo de prevenir o estresse e consequente morte dos animais adrenalectomizados, tentamos ao máximo minimizar fatores estressantes ambientais, como ruídos na sala de experimentação, movimentação brusca das caixas dos camundongos e manipulação dos mesmos pelo mesmo experimentador.

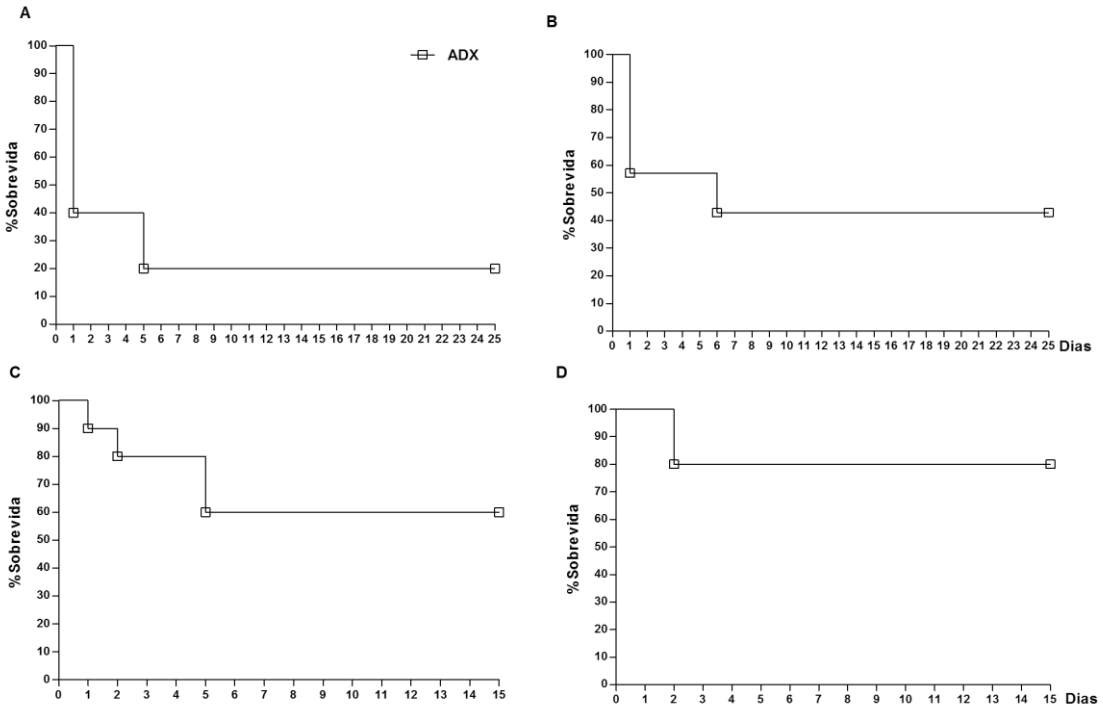

Figura 9. Sobrevida dos animais adrenalectomizados. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e tiveram as glândulas supra-renais removidas bilateralmente, em 4 experimentos diferentes. A sobrevida nos primeiros 15 dias pós-cirurgia é mostrada em (A-D). ADX: camundongos adrenalectomizados sem inflamação intestinal.

Em relação às alterações clínicas p.c., no primeiro grupo de camundongos operados e sobreviventes, observou-se que houve perda de aproximadamente 15% do peso corporal até o quarto dia pós-cirúrgico, o que foi recuperado posteriormente (Figura 10A). Esta perda inicial de 15% foi reduzida para cerca de 10% e não foi progressiva após o terceiro dia p.c. no segundo conjunto de camundongos operados, mostrando novamente a melhora na técnica de adrenalectomia (Figura 10B). Em um terceiro momento, os animais operados perderam apenas 5% de peso até o dia 3 p.c. (Figura 10C), sendo que na quarta vez que realizamos as cirurgias esta perda de aproximadamente 5% de peso foi mantida, porém não se estendeu para além do segundo dia p.c. (Figura 10D). Durante o processo de recuperação p.c. não foram observados sinais de infecção no sítio cirúrgico como eritema, edema, calor, rubor, deiscência, abscesso e drenagem purulenta pela cicatriz.

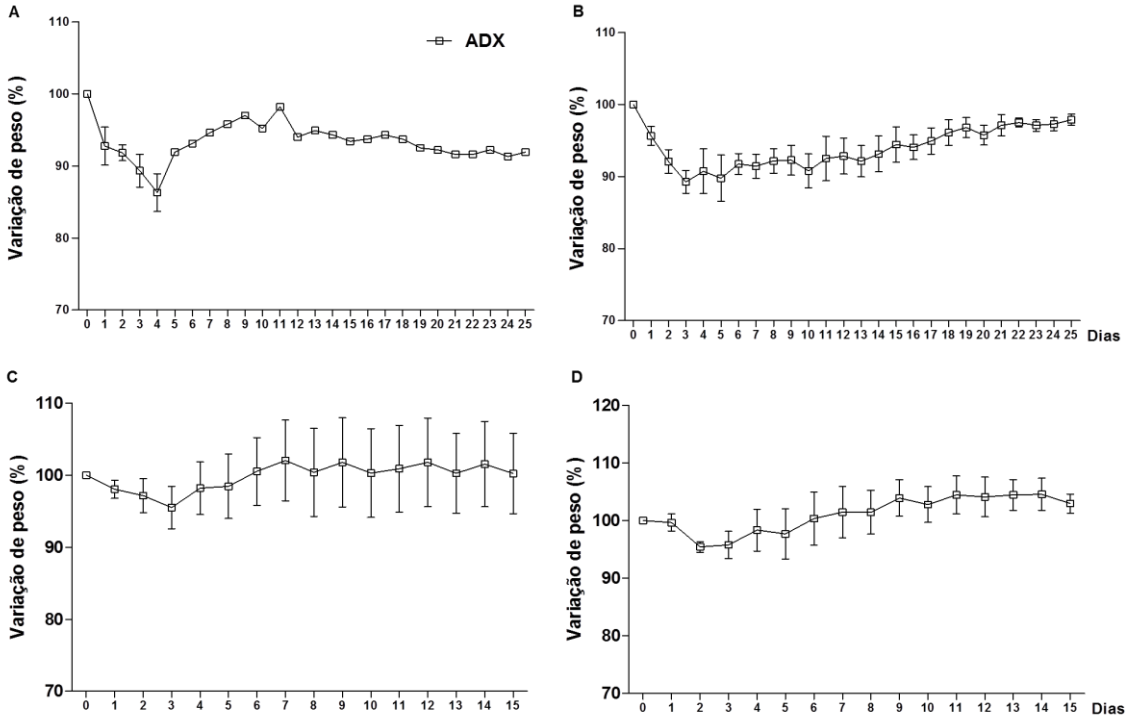

Figura 10. Variação de peso dos camundongos adrenalectomizados após a remoção das glândulas adrenais. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e tiveram as glândulas supra-renais removidas bilateralmente, em 4 experimentos diferentes. A variação de peso em relação ao peso inicial nos primeiros 15 dias pós-cirurgia é mostrada em (A-D). ADX: camundongos adrenalectomizados sem inflamação intestinal.

Após a padronização da cirurgia de adrenalectomia foram realizados experimentos para avaliação da susceptibilidade ou resistência à inflamação intestinal, na presença ou ausência dessas glândulas. Para tal, os camundongos adrenalectomizados foram submetidos à ingestão de água contendo 3% de DSS, ininterruptamente, para indução de colite. Os resultados mostraram que os camundongos adrenalectomizados foram susceptíveis à inflamação intestinal induzida por DSS, com início de mortalidade no dia 7 após indução da colite e perda de peso desde o início da indução da colite experimental (Figura 11A-B). Logo, em vista destes resultados preliminares e, sabendo que em experimentos futuros seria necessário realizar a coleta das amostras para posteriores análises antes da mortalidade induzida pela colite, optamos por eutanasiar e coletar as amostras no 6° dia de colite, conforme descrito nos *Materiais e Métodos*. Além disso, ao investigar se a mortalidade precoce e perda de peso dos animais adrenalectomizados estavam relacionadas ao volume de água consumido contendo DSS e quantidade de ração, observamos que os animais adrenalectomizados com colite apresentaram grande variação no consumo de água contendo DSS ao longo do período de indução da

doença (Figura 11C). Em relação ao consumo de ração, apesar dos camundongos adrenalectomizados com colite apresentarem mais de 10% de perda de peso durante a colite, estes animais mantiveram o consumo de ração ao longo do período experimental (Figura 11D). Estes dados sugerem que a mortalidade precoce e maior variação na perda de peso observada nos camundongos adrenalectomizados não foram decorrentes do aumento de consumo de água contendo DSS, nem da diminuição do consumo de ração, respectivamente.

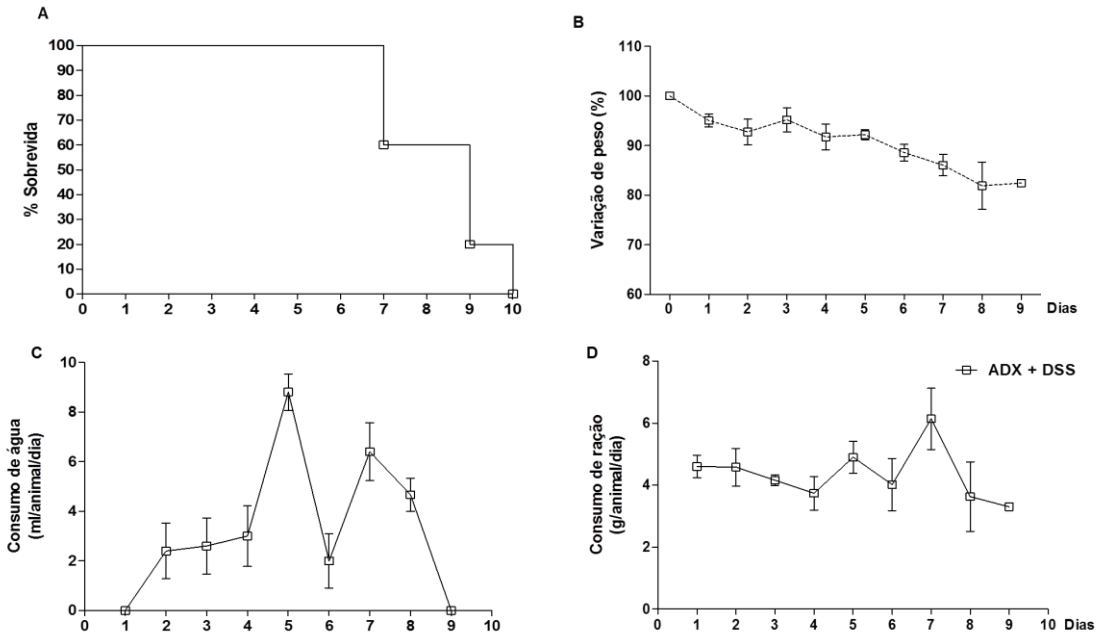

Figura 11. Avaliação da susceptibilidade à colite em camundongos adrenalectomizados e submetidos à indução de inflamação intestinal. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e tiveram as glândulas supra-renais removidas bilateralmente e foram expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS). Em (A) porcentagem de sobrevida dos animais adrenalectomizados e submetidos à inflamação intestinal. Em (B) variação de peso em relação ao peso inicial dos animais adrenalectomizados e submetidos à inflamação intestinal. Em (C) consumo de água contendo DSS durante a indução da inflamação intestinal. Em (D) consumo de ração durante a indução da inflamação intestinal. ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados e expostos ao DSS.

4.2. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) desempenha papel importante no controle da colite experimental

Inicialmente, para induzir a colite experimental, os camundongos foram expostos ao DSS 3% na água de beber. Observou-se que no dia 6 de colite havia grande perda de peso, simultaneamente ao aumento do escore clínico da doença (Figura 12A). Posteriormente, buscamos avaliar se a colite induzida por DSS era

capaz de ativar o eixo HPA, através da dosagem dos níveis de corticosterona plasmática. Estes resultados mostraram que os camundongos expostos ao DSS apresentaram aumento nos níveis de corticosterona (Figura 12B), que provavelmente resultou da ativação do eixo HPA simultaneamente ao desenvolvimento da inflamação intestinal. Portanto, para compreender o papel do eixo HPA na modulação da doença, os camundongos foram adrenalectomizados e expostos ao DSS. Como esperado, houve redução da corticosterona na circulação dos animais adrenalectomizados (Figura 12B). Além disso, a ausência das glândulas adrenais foi relacionada ao aumento do escore clínico geral, escore pós-morte e à mortalidade precoce dos camundongos com colite (Figuras 12C-E, respectivamente). Diante disso, sabendo que a indução da colite por DSS promove a quebra da barreira epitelial intestinal, avaliamos se alterações sistêmicas poderiam estar relacionadas à translocação bacteriana do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Os resultados mostraram que no grupo exposto ao DSS houve aumento significativo dos níveis de LPS e diminuição de IL-6 no soro dos camundongos C57BL/6 (Figura 12F-G). Além disso, foi observado que os animais adrenalectomizados e desafiados com DSS apresentaram níveis significativamente menores de LPS concomitantemente ao aumento de IL-6 no soro (Figura 12F-G). Estes dados indicam que na ausência das adrenais os camundongos expostos ao DSS possivelmente desenvolvem um processo inflamatório sistêmico na tentativa de controlar a translocação de bactérias intestinais para a corrente sanguínea, o que consequentemente pode ter agravado o quadro clínico da doença, supostamente promovendo a mortalidade precoce nestes animais.

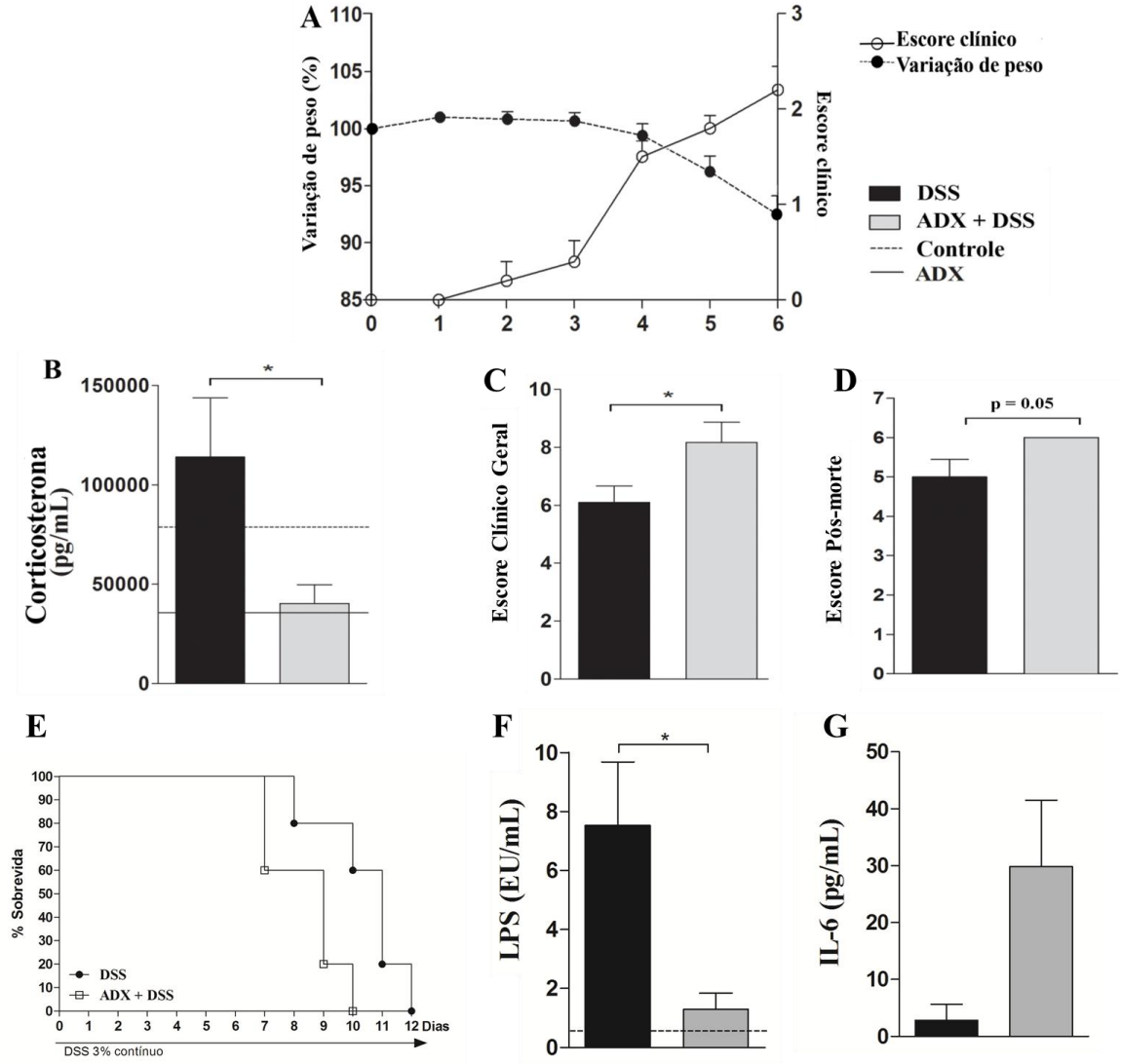

Figura 12. Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) durante a colite e aumento da susceptibilidade à doença nos camundongos adrenalectomizados e submetidos à inflamação intestinal. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados, tiveram as glândulas supra-renais removidas bilateralmente e foram expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS). No dia 6 foi realizada a eutanásia para obtenção de amostras de soro ou foi administrado DSS continuamente desde o dia zero para avaliação da sobrevida. Em (A), validação do modelo experimental mostrando variação do peso e escore clínico diário de camundongos não adrenalectomizados expostos ao DSS por 6 dias consecutivos. Em (B), níveis de corticosterona plasmática; em (C), escore clínico geral da doença; em (D), escore pós-morte; em (E) porcentagem de sobrevida; em (F) dosagem de LPS no soro e em (G) IL-6 no soro. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS. As linhas tracejadas correspondem ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite e a linha contínua (em B) corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados sem colite. EU/mL= Unidade de Endotoxina/mililitros. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

Visto que na ausência das adrenais houve alterações imuno-inflamatórias sistêmicas, em seguida investigamos se isso teria reflexo na população de leucócitos circulantes no sangue. Ao avaliar o esfregaço de sangue periférico,

verificamos que a frequência e o número absoluto de leucócitos circulantes não foram significativamente alterados entre os grupos estudados (Figura 13A-G).

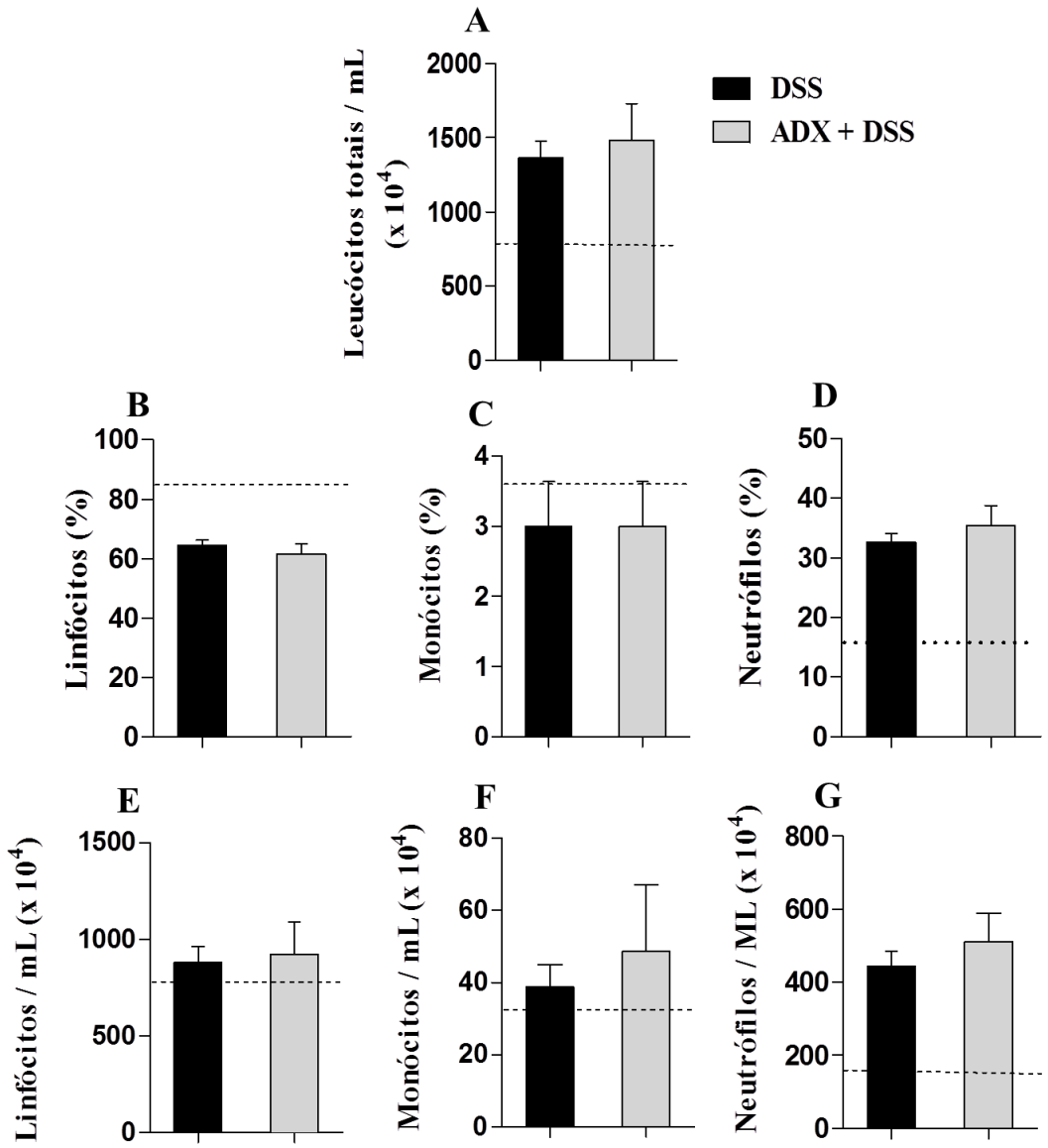

Figura 13: Quantificação de leucócitos circulantes após adrenalectomia e indução de inflamação intestinal. Os camundongos foram adrenalectomizados e expostos continuamente à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) a 3%. A eutanásia foi realizada no dia 6 para confecção de esfregaço sanguíneo corado por Panótico. Em (A) leucócitos totais por mililitro (mL), (B) frequência de linfócitos, (C) frequência de monócitos e (D) frequência de neutrófilos, (E) número de linfócitos por mililitro (mL), (F) número de monócitos por mililitro (mL) e (G) número de neutrófilos por mililitro (mL). DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS para indução de inflamação intestinal; ADX + DSS: camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS. A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

Juntos, estes resultados indicam que o eixo HPA é importante na modulação da resposta inflamatória sistêmica durante a doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente por DSS.

4.3. Glicocorticoides não são suficientes para reverter a susceptibilidade à colite experimental

Visto que os camundongos adrenalectomizados apresentaram alteração da resposta inflamatória sistêmica e maior suscetibilidade à colite experimental, buscamos investigar se a reposição deste hormônio poderia proteger os camundongos da mortalidade precoce. Nossos resultados mostraram que os camundongos adrenalectomizados com colite e tratados com GC exógeno também sucumbiram à doença mais precocemente (Figura 14A). Estes dados indicam que o eixo HPA desempenha um papel de suma importância na susceptibilidade à DII experimental e que, além disso, apenas a reposição de GC não é capaz de prevenir a mortalidade precoce nestes animais.

Diante disso, investigamos se a administração de dexametasona nos camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS poderia levar ao desenvolvimento de lesões hepáticas. O tratamento com dexametasona não foi capaz, aparentemente, de promover alterações significativas nos níveis de AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase) no soro dos camundongos avaliados (Figura 14B-C). Assim, observamos que a mortalidade encontrada nesse grupo não ocorre pela indução de lesões hepáticas após administração da dexametasona. Deste modo, sugerimos que outros mediadores derivados das adrenais podem ser importantes na proteção contra a mortalidade precoce, que por sua vez também pode ter sido influenciada pelo excesso de imunossupressão dos hospedeiros, por alterações metabólicas ou outras reações adversas causadas pela administração de GC.

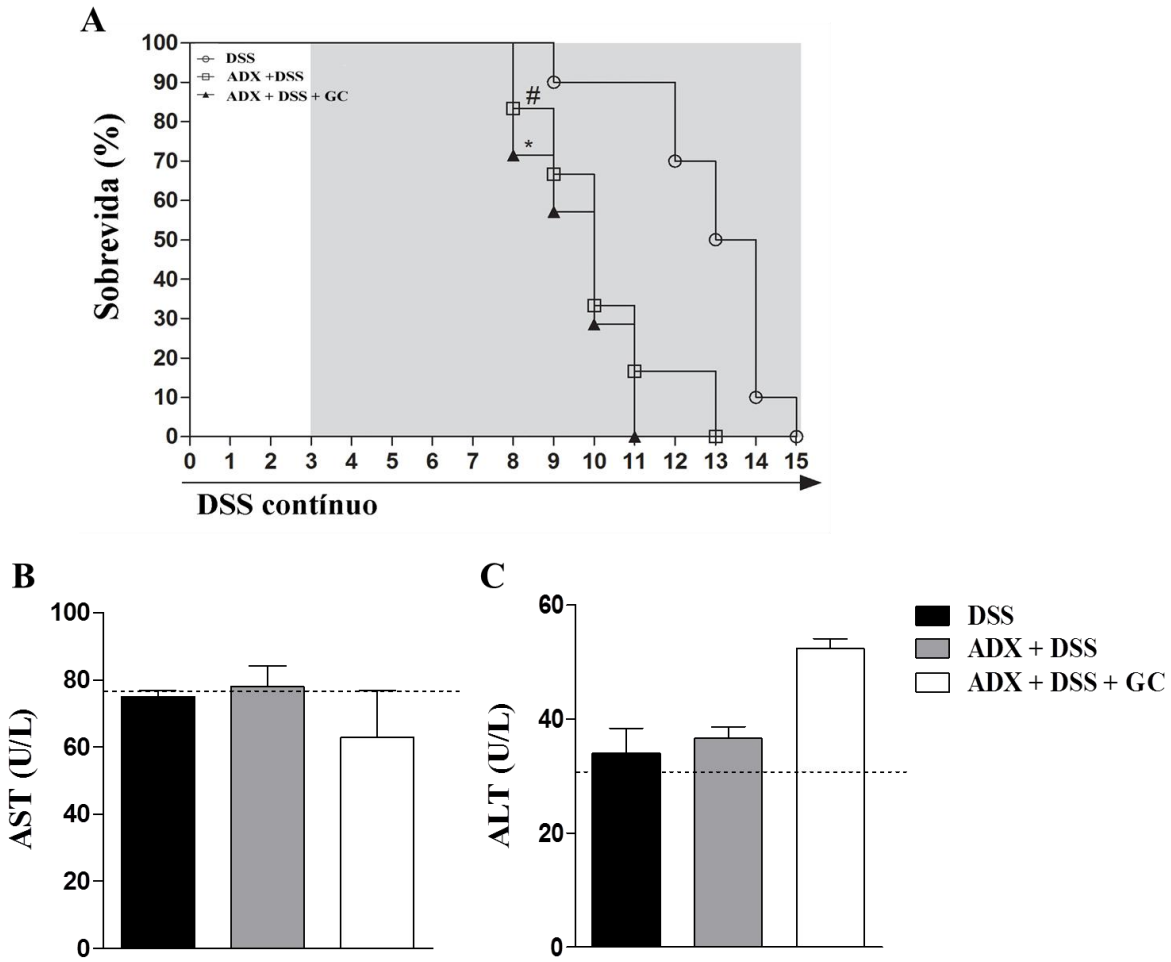

Figura 14: Sobrevida e níveis de AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase) no soro dos camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados, adrenalectomizados e expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) a 3% continuamente para avaliação da sobrevida ou durante 6 dias para coleta de amostras do soro. A reposição de GC foi realizada através da administração de dexametasona a 1 mg/Kg/dia a partir do 3° dia de colite. Em (A) porcentagem de sobrevida, em (B) quantificação AST e em (C) quantificação de ALT no soro. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS. A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

4.4. Modulação da Resposta Inflamatória Intestinal pelo eixo HPA

Uma vez que o eixo HPA foi capaz de modular os parâmetros clínicos e a resposta inflamatória sistêmica na colite induzida por DSS, buscamos investigar se a maior susceptibilidade dos camundongos adrenalectomizados à colite poderia ter ocorrido devido a alterações locais dos componentes celulares e microscópicos da mucosa intestinal. A análise histopatológica demonstrou que independentemente da

presença das glândulas adrenais, os camundongos com colite apresentaram áreas de erosão de tamanhos variados no cólon, com lesão de superfície epitelial e criptas, simultaneamente à perda de mucina e presença de células epiteliais cuboides nas bordas das lesões. Houve predominância de células mononucleares na lâmina própria de ambos os grupos expostos ao DSS. No entanto, na presença de glândulas supra-renais os camundongos apresentaram infiltrado misto de intensidade moderada a grave na submucosa em contraste com o infiltrado celular de intensidade média a moderada, na ausência de glândulas supra-renais (Figura 15A). Desta forma, para investigar se a diminuição da celularidade no cólon dos animais adrenalectomizados expostos ao DSS foi devido à ausência de glicocorticoides, foi realizada a reposição deste hormônio através da administração de dexametasona. De fato, a mucosa dos camundongos adrenalectomizados com colite tratados com GC apresentou pequeno aumento da celularidade na LP comparando com os animais controles, sendo este infiltrado composto principalmente por células mononucleares, além do infiltrado misto na submucosa (Figura 15A).

Ao avaliar a frequência de camundongos com áreas de erosão foi observada maior porcentagem de camundongos com áreas de erosão no grupo de animais adrenalectomizados com DSS tratados com GC do que o observado no grupo de camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS e não tratados (Figura 15B), resultando, assim, em um escore histopatológico mais alto no grupo ADX + DSS + GC (Figura 15C). Por outro lado, surpreendentemente, a ausência de glândulas supra-renais levou à redução das áreas de erosão e do escore histopatológico nos camundongos expostos ao DSS, apesar da susceptibilidade aumentada às características clínicas da doença (Figuras 15B-C).

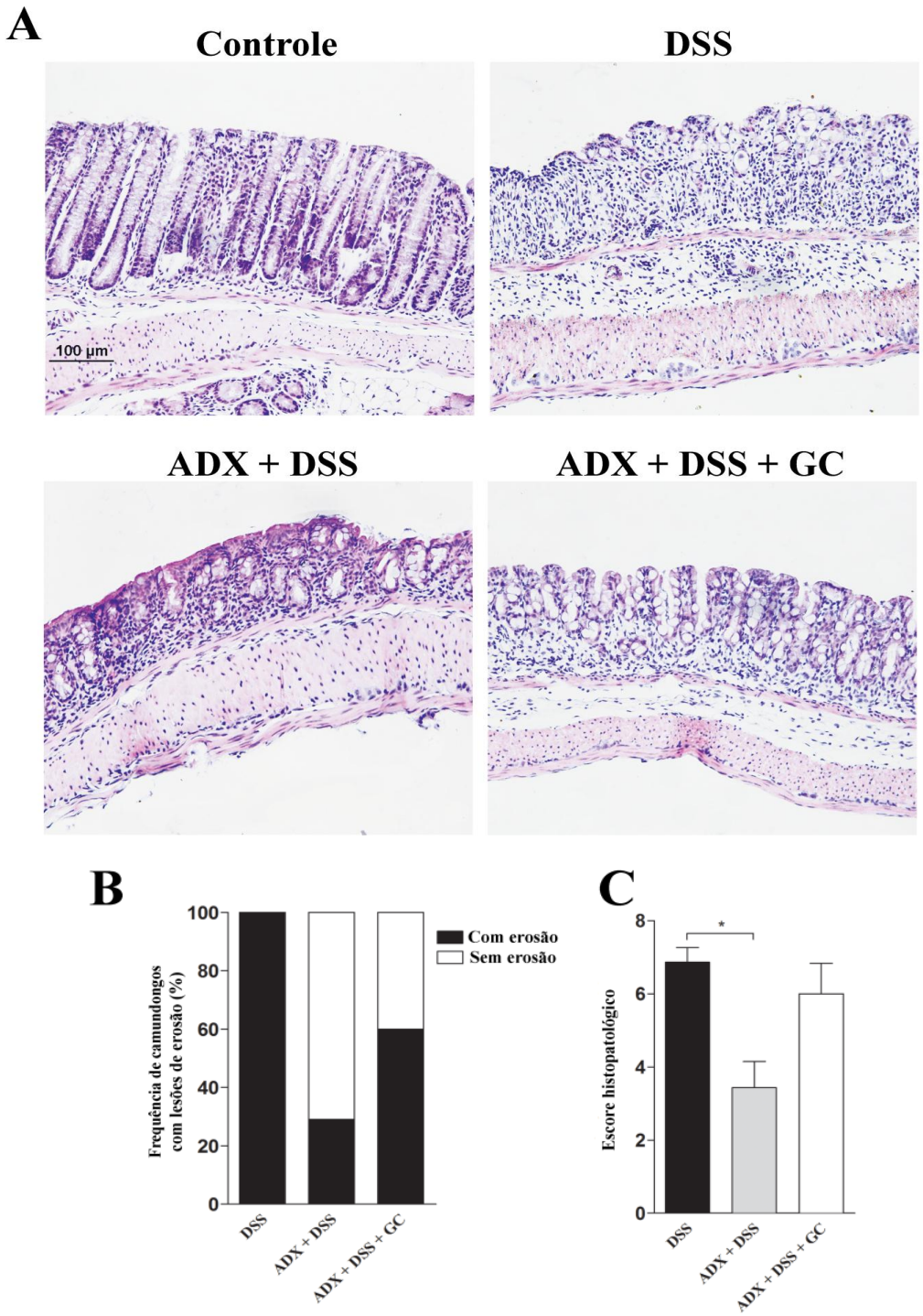

Figura 15: Análise histopatológica do cólon de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e adrenalectomizados. Aos 15 dias de pós-operatório a colite foi induzida por administração de água contendo 3% de dextran sulfato de sódio (DSS) por 6 dias consecutivos, quando foi realizada a eutanásia para obtenção de amostras. CONTROLE: grupo de camundongos C57BL/6 saudáveis; DSS: grupo de camundongos C57BL/6 com colite; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados com colite; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados com colite e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). Em (A), fotomicrografias do cólon de camundongos na presença ou ausência de glândulas supra-renais, submetidos ou não ao DSS e tratamento com glicocorticóides. Em (B) frequência dos camundongos com áreas de erosão. Em (C) escore histopatológico. Estes resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$. Barra = 100µm.

Ao averiguar a produção de citocinas no cólon inflamado, observou-se notável aumento de IFN-γ naqueles camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS, seguido pela restauração a níveis basais após a reposição de GC (Figura 16E). Estes resultados sugerem que a diminuição da translocação de bactérias intestinais (LPS) para a corrente sanguínea vista nos animais adrenalectomizados expostos ao DSS pode estar associada ao aumento de IFN-γ na lâmina própria intestinal, de maneira dependente de GC. As citocinas IL-1β, TNF-α, IL-12, IL-17, IL-10, IL-4 e IL-22 não foram significativamente alteradas entre os grupos estudados (Figura 16A-H).

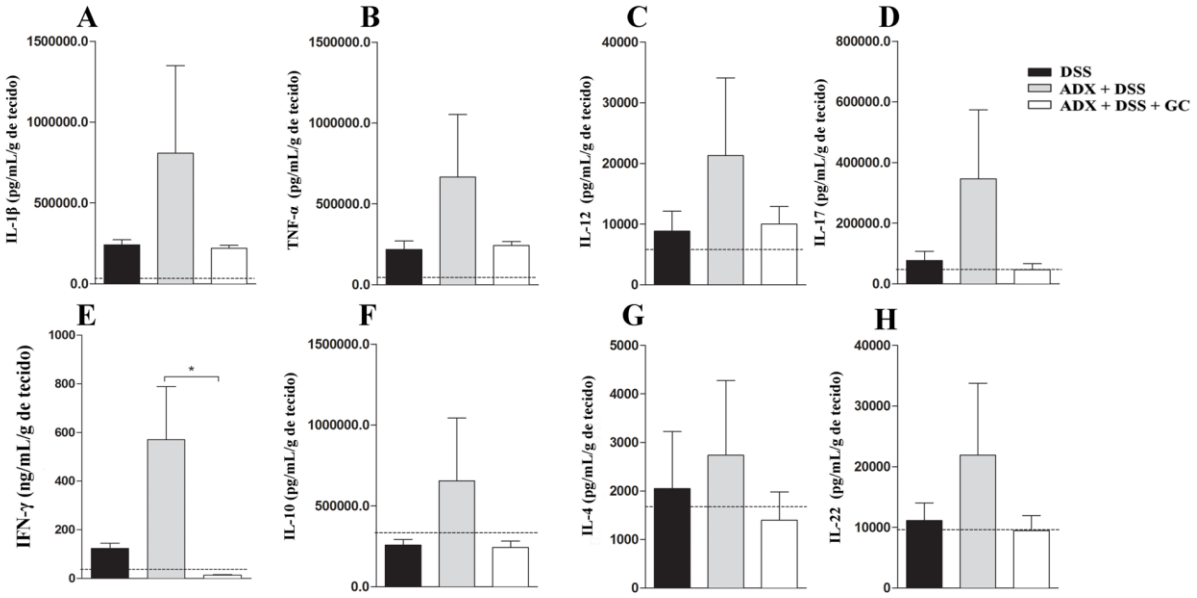

Figura 16: Produção de citocinas no cólon de camundongos adrenalectomizados com colite e/ou tratados com glicocorticoides. Os camundongos foram adrenalectomizados e expostos continuamente à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) a 3% e/ou foram tratados com dexametasona a 1 mg/Kg/dia entre os dias 3-5 de colite. A eutanásia foi realizada no dia 6 para coleta dos segmentos intestinais e dosagem de citocinas por ELISA. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS para indução de inflamação intestinal; ADX + DSS: camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) por peso do tecido em gramas (g). A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Juntos, nossos dados mostraram até o momento que apesar dos animais adrenalectomizados expostos ao DSS apresentarem alterações clínicas e sinais da doença mais graves, eles também apresentaram menor infiltrado de células na LP e aumento significativo de IFN-γ. Deste modo, buscamos avaliar se a menor celularidade no cólon destes animais estava relacionada à apoptose celular induzida

por FasL. De fato, os níveis de FasL foram maiores no intestino dos camundongos adrenalectomizados submetidos ao DSS quando comparados àqueles apenas expostos a esta droga. Ainda, a reposição com GC diminuiu significativamente FasL no cólon destes animais (Figura 17A), a níveis comparáveis àqueles encontrados no grupo DSS. Em conjunto, estes resultados indicam que a diminuição da celularidade na mucosa dos animais adrenalectomizados expostos ao DSS pode estar associada à apoptose local mediada por FasL e ao aumento de IFN-γ, de maneira dependente de GC. Assim, sugerimos que os GC provenientes das adrenais são importantes no controle da apoptose de células presentes no cólon durante a quebra da homeostase local.

Sabendo que a mucosa intestinal é também uma importante fonte extra-adrenal de produção de GCs [85] e visto que os camundongos adrenalectomizados apresentaram menor escore histopatológico e menos áreas de erosão, buscamos avaliar se isso poderia estar ocorrendo também devido ao aumento compensatório de produção de GC local. Como citado na metodologia, os resultados da dosagem de corticosterona intestinal são expressos considerando-se a diferença entre as amostras cultivadas na ausência e na presença de metirapona, para correção de supostas contaminações com GC sérico. Desta forma, os resultados mostraram que o aumento da produção de corticosterona no intestino ocorreu apenas nos animais com colite não adrenalectomizados. Além disso, a reposição com dexametasona não foi capaz de levar ao aumento de corticosterona intestinal nos camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS (Figura 17B). Sendo assim, estes resultados indicam que a modulação da inflamação local pós-adrenalectomia e DSS não parece ser devida a um aumento compensatório de GC intestinal.

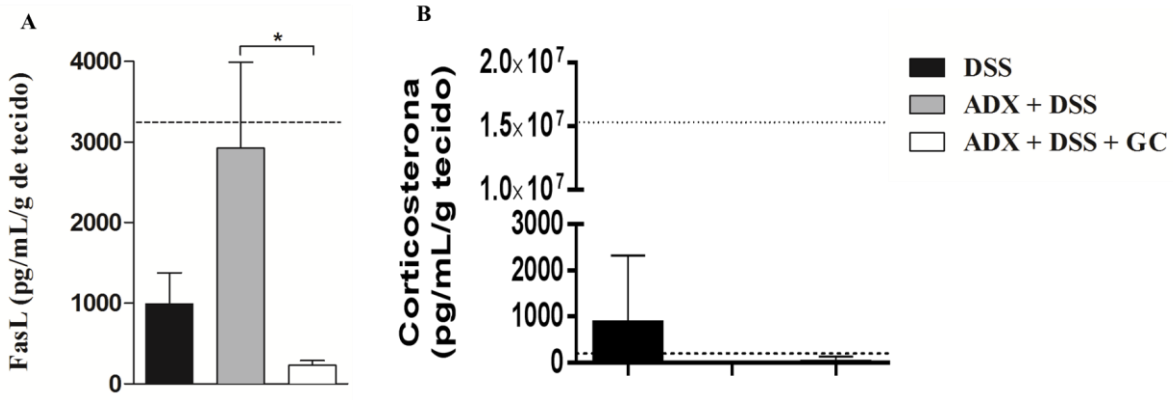

Figura 17: Dosagem de FasL corticosterona produzida no cólon de camundongos adrenalectomizados com colite e/ou tratados com glicocorticoides. Os camundongos foram adrenalectomizados e expostos continuamente à água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) a 3% e/ou foram tratados com dexametasona a 1 mg/Kg/dia entre os dias 3-5 de colite. A eutanásia foi realizada no dia 6 para coleta dos segmentos intestinais e dosagem de FasL por ELISA. Em experimento independente segmentos do intestino foram coletados no dia 6 e cultivados na presença ou na ausência de metirapona (inibidor da síntese de corticosterona a 100 µg/mL). Como controle positivo para a síntese de GCs, as glândulas adrenais foram cortadas ao meio e cultivadas como descrito acima (dados representados graficamente pela linha pontilhada). A concentração de corticosterona foi determinada por ELISA nos sobrenadantes de cultura. Os resultados foram expressos como picogramas de corticosterona por mililitros, normalizados pelo peso dos tecidos em gramas (g). DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS. A linha tracejada representa ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

Em seguida, visto que o eixo HPA parece ser fundamental na modulação do infiltrado celular na mucosa intestinal durante a colite, quantificamos os diferentes tipos celulares presentes no cólon dos camundongos submetidos à DII experimental.

Os ensaios enzimáticos mostraram que houve aumento na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) no intestino dos animais expostos ao DSS quando comparados ao grupo de camundongos controles saudáveis, independentemente da presença do eixo HPA intacto (Figura 18A). Embora o tratamento com GC tenha levado à redução significativa da atividade de MPO (Figura 18A), estes camundongos apresentaram mais áreas de erosão e maior escore histopatológico, como mostrado na Figura 15. Logo, estes resultados indicam que a atividade de MPO, EPO e NAG na mucosa inflamada não estava diretamente relacionada às alterações dependentes dos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais.

Considerando outros subtipos celulares e corroborando os dados histopatológicos, houve notável redução na quantidade de leucócitos totais na LP na ausência do eixo HPA funcional (adrenalectomia) e o tratamento com GC não foi

apenas capaz de restaurar, como também de aumentar significativamente a celularidade deste compartimento do cólon (Figura 18B). Esta baixa celularidade na LP estava relacionada principalmente à redução significativa na frequência de leucócitos $CD11b^+$, que são provavelmente macrófagos ou neutrófilos, considerando os parâmetros de delineamento das populações celulares usados na análise de citometria de fluxo (Figura 18B). O acúmulo dessas células na LP foi dependente de GC, uma vez que a reposição com dexametasona restaurou a frequência das mesmas a níveis comparáveis aos dos camundongos com colite não adrenalectomizados (Figura 18B). Ao avaliar a população de células dendríticas ($CD11b^+CD11c^+$), observamos que ocorreu aumento significativo na frequência de células dendríticas tolerogênicas $CD11b^+CD11c^+CD103^+$ (Figura 18B) em contraste à redução significativa da população de células supostamente pró-inflamatórias $CD11b^+CD11c^+CD103^-$ [113, 114] na LP dos animais adrenalectomizados expostos ao DSS (Figura 18B). Mais uma vez, este fenômeno pareceu ser dependente de GC derivados das adrenais, pois o tratamento com dexametasona restaurou a frequência de células dendríticas tolerogênicas e pró-inflamatórias a níveis comparáveis aos camundongos com colite não adrenalectomizados (Figura 18B). Em conjunto, estes resultados apontam para um possível papel das células apresentadoras de antígenos na interação entre os sistemas imunológico e endócrino na modulação da colite experimental.

Ademais, além da notável redução no número de células, ocorreu aumento da frequência de células T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), T citolíticas ($CD3^+CD8^+$) e NKT ($CD3^+CD49b^+$) nos camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS, de forma dependente de GC (Figuras 18C). Ainda, foi observada diminuição do número de linfócitos intra-epiteliais (LIE) após a quebra da barreira epitelial nos camundongos com colite na presença e na ausência das adrenais e este número de células foi significativamente aumentado após a administração de GC (Figura 18D), sugerindo que este hormônio pode estar envolvido no reparo da barreira epitelial intestinal. Além disso, a análise imunofenotípica dos LIE mostrou que os GC podem ser responsáveis pela regulação de linfócitos T auxiliares e células NK neste compartimento (Figuras 18D). Estes resultados sugerem que os hormônios derivados das adrenais, especialmente GC, são capazes de interferir no acúmulo das células envolvidas na resposta imune local durante a colite experimental.

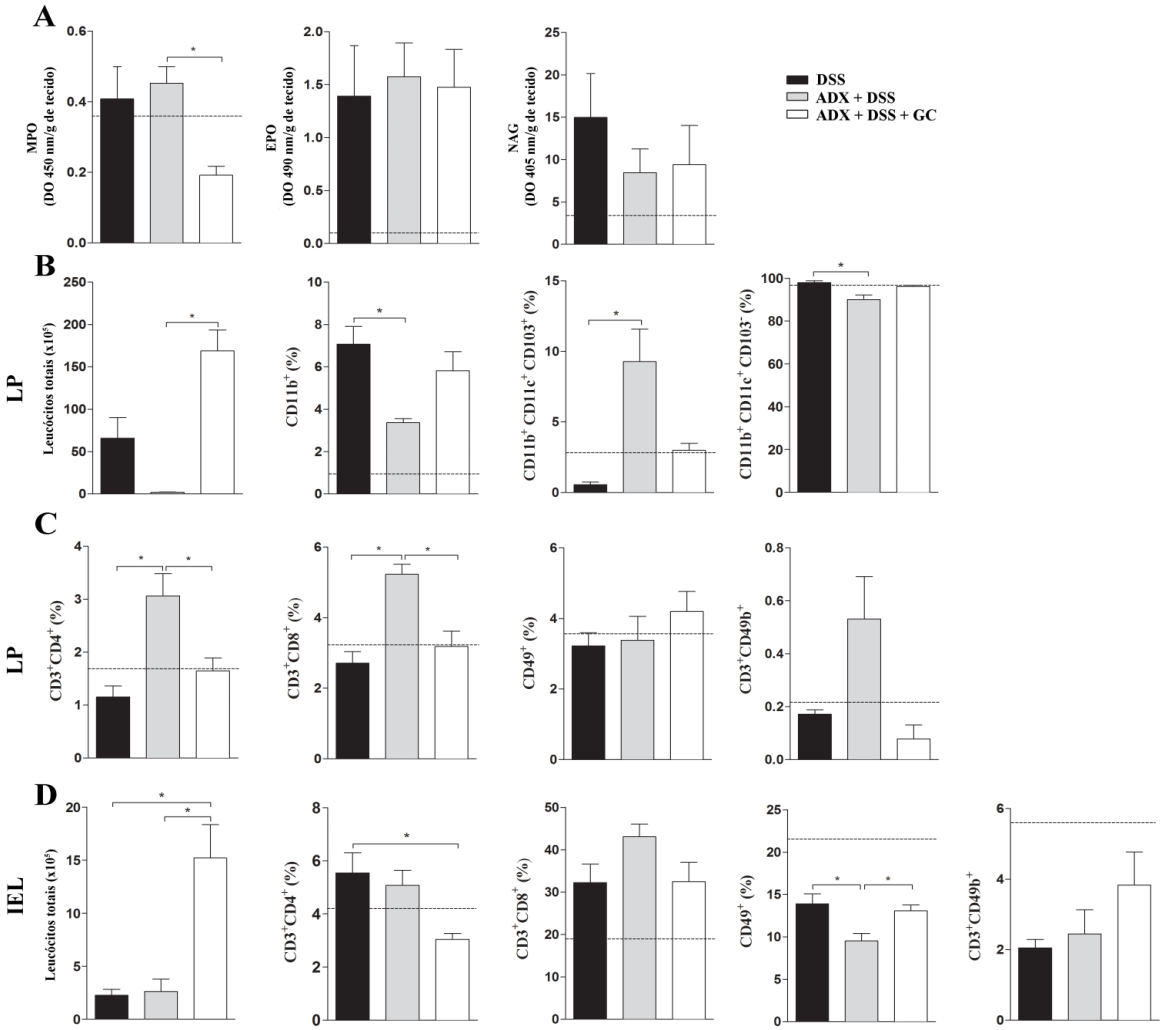

Figura 18: Avaliação do infiltrado inflamatório no cólon de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides. Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e adrenalectomizados. Aos 15 dias de pós-operatório a colite foi induzida por administração de água contendo 3% de dextran sulfato de sódio (DSS) por 6 dias consecutivos, quando foi realizada a eutanásia para obtenção de amostras do intestino e realização de ensaios enzimáticos e citometria de fluxo. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide); A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controle sem colite. Em (A) atividade enzimática de eosinófilo-peroxidase (EPO), mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG). Em (B) contagem total de leucócitos, porcentagem de macrófagos (células $CD11b^+$), células dendríticas tolerogênicas ($CD11b^+CD11c^+CD103^+$) e células dendríticas pró-inflamatórias ($CD11b^+CD11c^+CD103^-$) da lâmina própria (LP). Em (C) porcentagem de células T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), T citolíticas ($CD3^+CD8^+$), NK ($CD49b^+$) e NKT ($CD3^+CD49b^+$) da LP. Em (D) contagem total de leucócitos, porcentagem de células T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), T citolíticas ($CD3^+CD8^+$), NK ($CD49b^+$) e NKT ($CD3^+CD49b^+$) do compartimento intra-epitelial (IEL) do intestino. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *$p < 0,05$.

4.5. Modulação da Resposta Imunológica no Baço e Linfonodos Mesentéricos pelo eixo HPA

Como nossos resultados mostraram que as células residentes e inflamatórias do intestino foram reguladas pelos hormônios derivados das glândulas supra-renais, buscamos avaliar se a população de leucócitos nos órgãos linfoides secundários, baço e LNMs, também estavam sujeitas a tal modulação.

Os dados mostraram que a ausência do eixo HPA intacto levou à aparente diminuição de leucócitos totais no baço quando comparados com o grupo colite (DSS), sendo que o tratamento com dexametasona não foi capaz de restaurar o número de células neste órgão (Figura 19A). Esta redução estava relacionada principalmente à diminuição significativa na frequência de células NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), as quais foram restauradas nos camundongos tratados com GC exógenos (Figura 19A) indicando que esta população celular está sujeita à modulação da corticosterona derivada das glândulas adrenais. Não foi encontrada nenhuma alteração significativa nas diferentes populações celulares avaliadas nos LNM (Figura 19B).

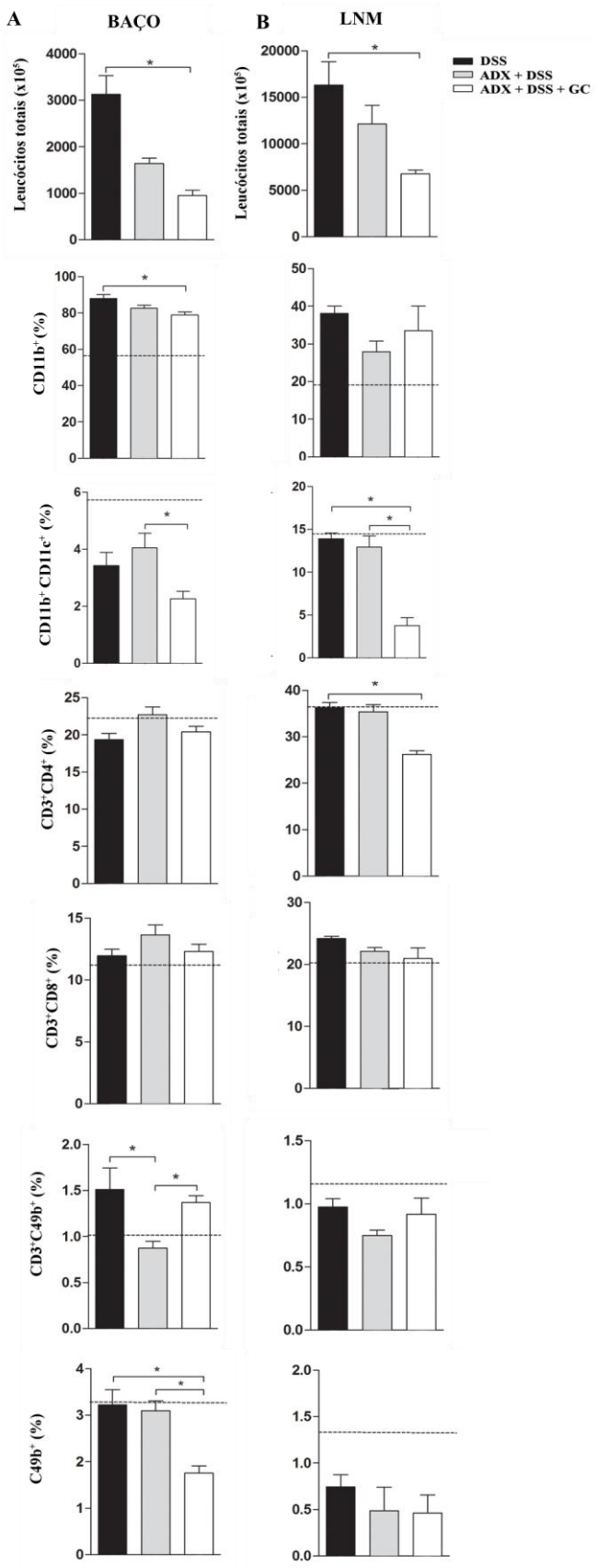

Figura 19: Imunofenotipagem das células presentes no baço e linfonodos mesentéricos (LNMs) de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides, através de citometria de fluxo. O baço e LNM, foram removidos e processados para extração dos leucócitos, que foram marcados com anticorpos

específicos para as moléculas CD11b (PE), CD11c (PECY7), CD3 (PE), CD4 (PERCP), CD8 (PeCy7) e CD49b (FITC). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células foi analisada pelo software FlowJo. A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). PE – Phycoerythrin; FITC - Fluorescein isothiocyanate; APC – Allophycocyanin; PERCP - Peridinin chlorophyll protein; PECY7 – PE with cyanine dye 7. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

Diante disso, com o objetivo de investigar se as interações imune-endócrinas intestinais poderiam estar relacionadas ao perfil funcional de células T envolvidas na patogênese da colite, buscamos avaliar as populações de células T auxiliares $CD4^+$, no baço e LNMs.

De fato, durante a colite, houve aumento da frequência de linfócitos produtores de IL-4 e IFN-γ no baço dos camundongos não adrenalectomizados. No entanto, apesar da adrenalectomia ter sido relacionada à frequência aumentada de células T CD4 na lâmina própria dos camundongos expostos ao DSS, a remoção das adrenais levou a uma notável redução na população de células T CD4 do baço produtoras das citocinas IL-4**,** IL-10**,** IFN-γ e IL-17 (Figura 20). Além disso, enquanto as células supostamente Th17 foram significativamente aumentadas pelo tratamento com dexametasona, a frequência de células possivelmente Th1 não foi restaurada e, ao contrário, foi significativamente menor no baço dos camundongos adrenalectomizados e tratados com GC. Ademais, foi observada tendência ao aumento na frequência de linfócitos T $CD4^+IL\text{-}10^+$ nos animais adrenalectomizados expostos ao DSS e tratados com dexametasona (Figura 20B). Resultados semelhantes aos do baço foram encontrados na cultura de células dos LNM (dados não mostrados).

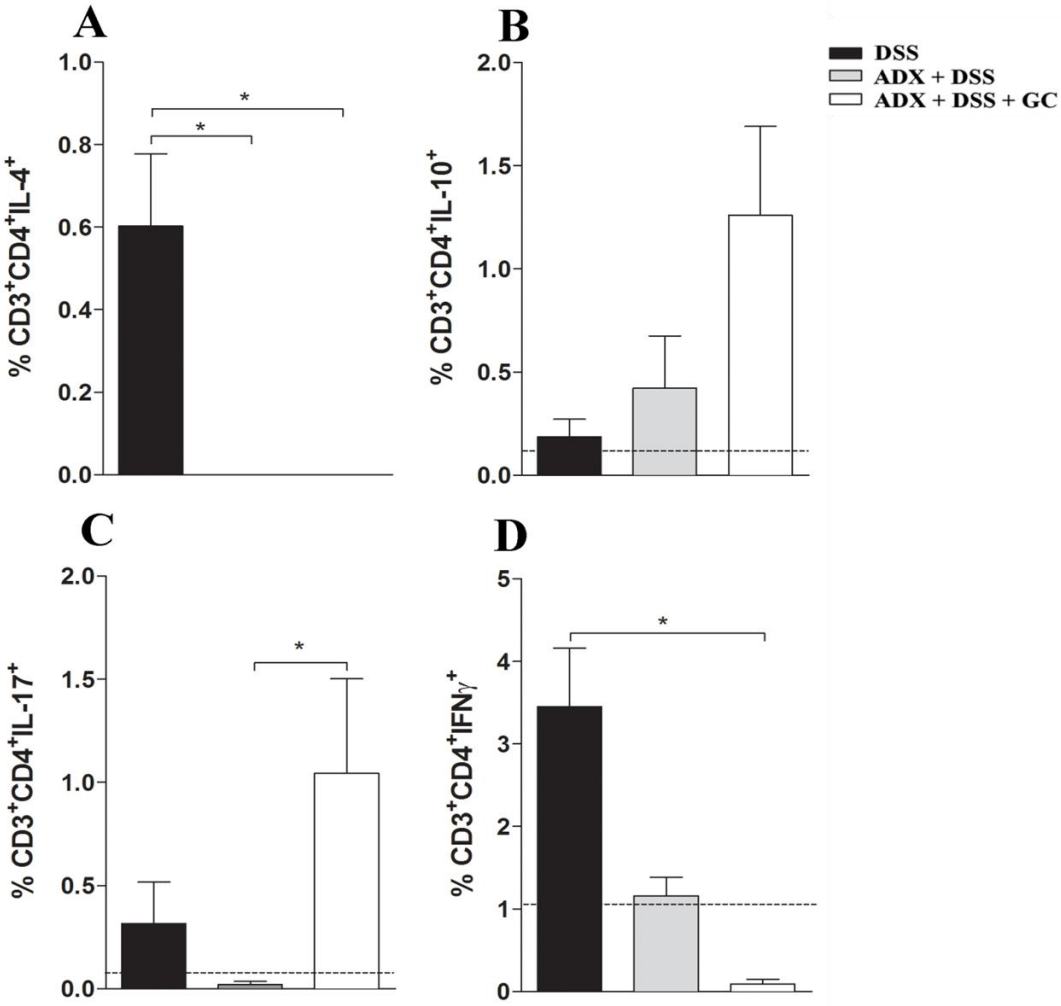

Figura 20: Avaliação de células T produtoras de IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ no baço de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides. Os baços dos camundongos controles, com colite e/ou adrenalectomizados foram removidos e macerados para extração dos leucócitos, que foram cultivados por 4h na presença de forbol-miristato-acetato (PMA), ionomicina e brefeldina A. As células foram coletadas, marcadas com anticorpos específicos para CD3 (APC), CD4 (PERCP), IL-4 (FITC), IL-10 (PE), IL-17 (PE) ou IFN-γ (FITC), para detecção dos linfócitos Th2 (A), células T produtoras de IL-10 (B), linfócitos Th17 (C) e linfócitos Th1 (D) respectivamente, por citometria de fluxo. Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células foi analisada pelo software FlowJo. As linhas pontilhadas representam a média dos dados dos animais controles. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). PE – Phycoerythrin; FITC - Fluorescein isothiocyanate; APC – Allophycocyanin; PERCP - Peridinin chlorophyll protein. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *p < 0,05.

Portanto, sugerimos que durante a colite experimental o perfil de resposta imunológica, nos órgãos linfoides secundários, também é regulado pelos hormônios derivados das adrenais.

4.6. Modulação de células T reguladoras pelo eixo HPA durante a inflamação intestinal experimental

Como o balanço entre as células T efetoras e reguladoras é fundamental para resolução da colite e pelo fato dos GC estarem envolvidos na função de linfócitos T auxiliares [102], analisamos a presença de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+$) e quantificamos a expressão de moléculas reguladoras nesta população durante a inflamação intestinal induzida por DSS.

Os dados mostraram que a expressão das moléculas PD-1, CD73 e FR4 foi dependente de GC derivados da adrenal em ambas as populações de células, $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^-$, do baço e MLN. A dexametasona foi capaz de restaurar a frequência dos leucócitos expressando tais marcadores reguladores no grupo adrenalectomizado com colite para os mesmos níveis que os encontrados nos animais com colite não adrenalectomizados (exceto para células $CD4^+CD25^+CD73^+$ dos LNM) (Figuras 21C-E). Por outro lado, houve um aumento global na frequência de ambas as células T $CD4^+CD25^+$CTLA-4^+ e $CD4^+CD25^-$CTLA-4^+ no baço e MLN dos camundongos com colite adrenalectomizados e tratados com GC, apontando para o papel deste hormônio na modulação específica desta molécula reguladora durante a colite experimental (Figura 21F).

Surpreendentemente, embora tenhamos observado que o eixo HPA foi capaz de controlar a expressão de diversas moléculas reguladoras em linfócitos T, a frequência de linfócitos expressando a principal molécula de assinatura das células T reguladoras naturais, Foxp3, não foi influenciada pela adrenalectomia seguida ou não pela administração de dexametasona (Figura 21G). No entanto, quando avaliamos a intensidade média de fluorescência (MFI) de FOXP3 em células $CD4^+CD25^+$, observamos redução significativa em linfócitos do baço dos camundongos DSS adrenalectomizados (Figura 21H). Houve tendência à restauração do MFI de Foxp3 em células $CD4^+CD25^+$ do baço de camundongos do grupo ADX + DSS + GC, para os níveis dos camundongos apenas expostos ao DSS.

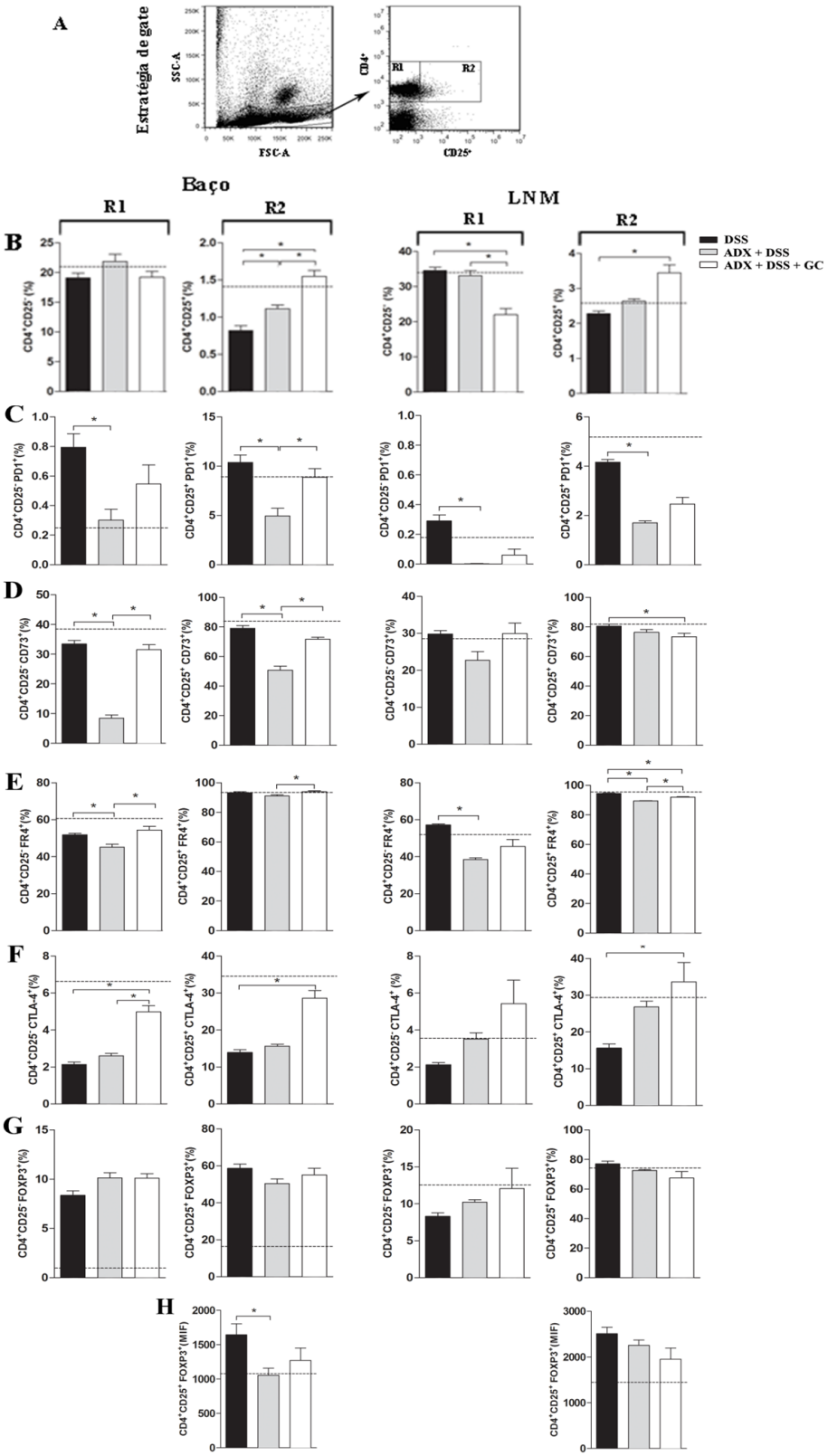

Figura 21: Expressão de marcadores de células T reguladoras nas populações de células T CD4$^+$CD25$^+$ e CD4$^+$CD25$^-$ do baço e linfonodos mesentéricos (LNM) de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides. O baço e LNM dos camundongos foram removidos e macerados para extração dos leucócitos, que foram incubados com anticorpos específicos para marcadores de regulação: CD4 (PERCP), CD25 (PECY7), PD-1 (PE), CD73 (PE), FR4 (PE) e CTLA-4 (PE) e FOXP3 (ALEXA 647). Após aquisição das amostras em citômetro de fluxo, a porcentagem de células foi analisada pelo

software FlowJo. Em (A) estratégia de gate e delimitação da população de células T $CD4^+CD25^-$ e $CD4^+CD25^+$. Em (B) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-$ e $CD4^+CD25^+$ do baço e LNM. Em (C) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-PD1^+$ e $CD4^+CD25^+PD1^+$ do baço e LNM. Em (D) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-CD73^+$ e $CD4^+CD25^+CD73^+$ do baço e LNM. Em (E) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-FR4^+$ e $CD4^+CD25^+FR4^+$ do baço e LNM. Em (F) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-$ CTLA-4^+ e $CD4^+CD25^+$CTLA-4^+ do baço e LNM. Em (G) porcentagem de células T $CD4^+CD25^-$ $FOXP3^+$ e $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ do baço e LNM. Em (H) intensidade média de fluorescência (MIF) de células T $CD4^+CD25^-FOXP3^+$ e $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ do baço e LNM. A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). PE – Phycoerythrin; FITC - Fluorescein isothiocyanate; APC – Allophycocyanin; PERCP - Peridinin chlorophyll protein; PECY7 – PE with cyanine dye 7. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *$p < 0,05$.

Baseado nisso, sugerimos que a maior susceptibilidade à colite vista nos camundongos adrenalectomizados pode estar associada à diminuição de células T reguladoras no baço destes animais.

4.7. Participação do eixo HPA no controle da capacidade proliferativa de esplenócitos e de sua resistência à supressão por células T reguladoras naturais

Uma vez que a diminuição de células T reguladoras no baço dos animais adrenalectomizados pode estar associada à piora no quadro clínico e mortalidade precoce destes animais, buscamos avaliar a funcionalidade dos esplenócitos provenientes de camundongos adrenalectomizados ou não e expostos ao DSS, por ensaios de proliferação CFSE.

Na ausência das adrenais os esplenócitos dos camundongos submetidos à colite apresentaram menor índice de proliferação quando comparados às células do grupo de animais submetidos à colite, não adrenalectomizados, estimuladas com ConA (Figura 22A). Concomitantemente a isso, observamos níveis significativamente mais altos de IL-10 no sobrenadante desta cultura (Figura 22B), sugerindo que na ausência de GC as células do baço dos animais adrenalectomizados provavelmente desenvolvem mecanismos compensadores de regulação na tentativa de diminuir a proliferação de linfócitos efetores e consequentemente controlar a inflamação. Além disso, a proliferação dos esplenócitos e a produção de IL-10 foram dependentes de GC, uma vez que o

tratamento com dexametasona promoveu o aumento no índice de proliferação e diminuição dos níveis de IL-10 (Figura 22A-B).

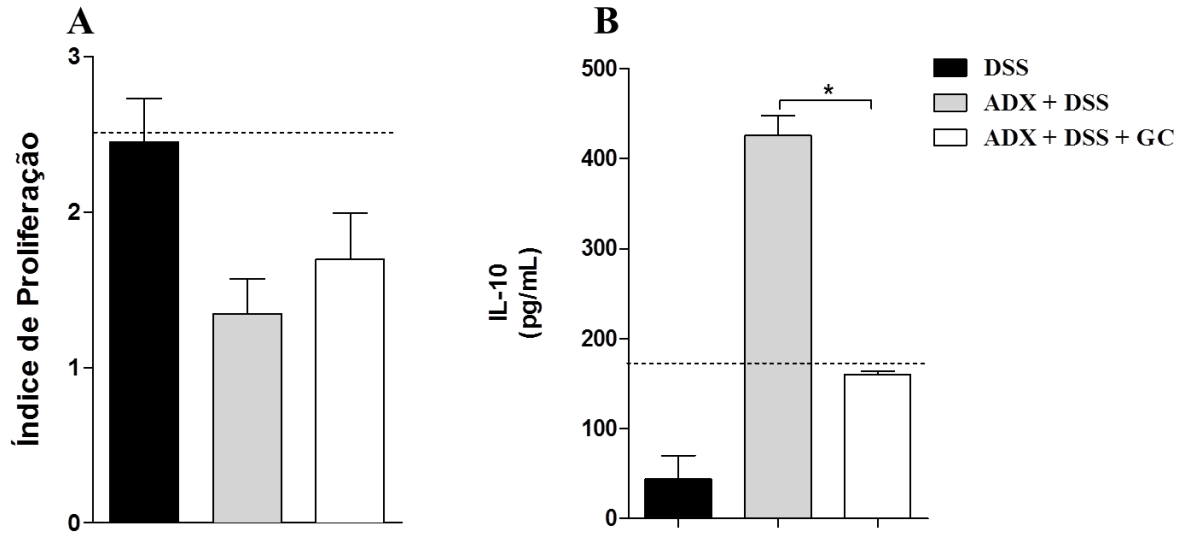

Figura 22: Índice de proliferação e níveis de IL-10 de esplenócitos de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides (GC). Esplenócitos de camundongos adrenalectomizados ou não e expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) e/ou tratados com GC, foram coletados, incubadas com CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) e estimulados com Concanavalina-A (Con-A) por 72 horas. O sobrenadante desta cultura foi utilizado para dosagem de IL-10 por ELISA (B). A proliferação das células marcadas com CFSE foi quantificada através de leitura realizada em Citômetro de Fluxo DIVA (BD – Biosciences, San Jose, CA). Os resultados foram obtidos através do índice de proliferação celular observados na análise de citometria (A). A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *$p < 0,05$.

Visto que o eixo HPA está envolvido na modulação da capacidade proliferativa de esplenócitos, buscamos investigar se estas células também apresentavam maior susceptibilidade ou resistência à supressão mediada por células T reguladoras naturais. Inicialmente os dados obtidos com ensaio de BrdU confirmaram os resultados anteriores de baixa proliferação das células provenientes do grupo ADX + DSS (Figura 23A). Adicionalmente, na ausência das adrenais os esplenócitos dos camundongos expostos ao DSS foram tão responsivos à ação de células Tregs $Foxp3^+$ quanto aqueles provenientes dos animais não adrenalectomizados (Figura 23B-D). Estes dados sugerem que, embora tenhamos observado altos níveis de IL-10 nos ensaios de proliferação, o eixo HPA não interfere diretamente na capacidade das células T funcionais responderem à

supressão mediada por células T reguladoras naturais. Logo, as falhas observadas no controle da inflamação sistêmica podem ser decorrentes da redução da frequência de Tregs durante a exposição de camundongos adrenalectomizados ao DSS ou causadas por deficiências de outros mecanismos reguladores dependentes dos GC adrenais.

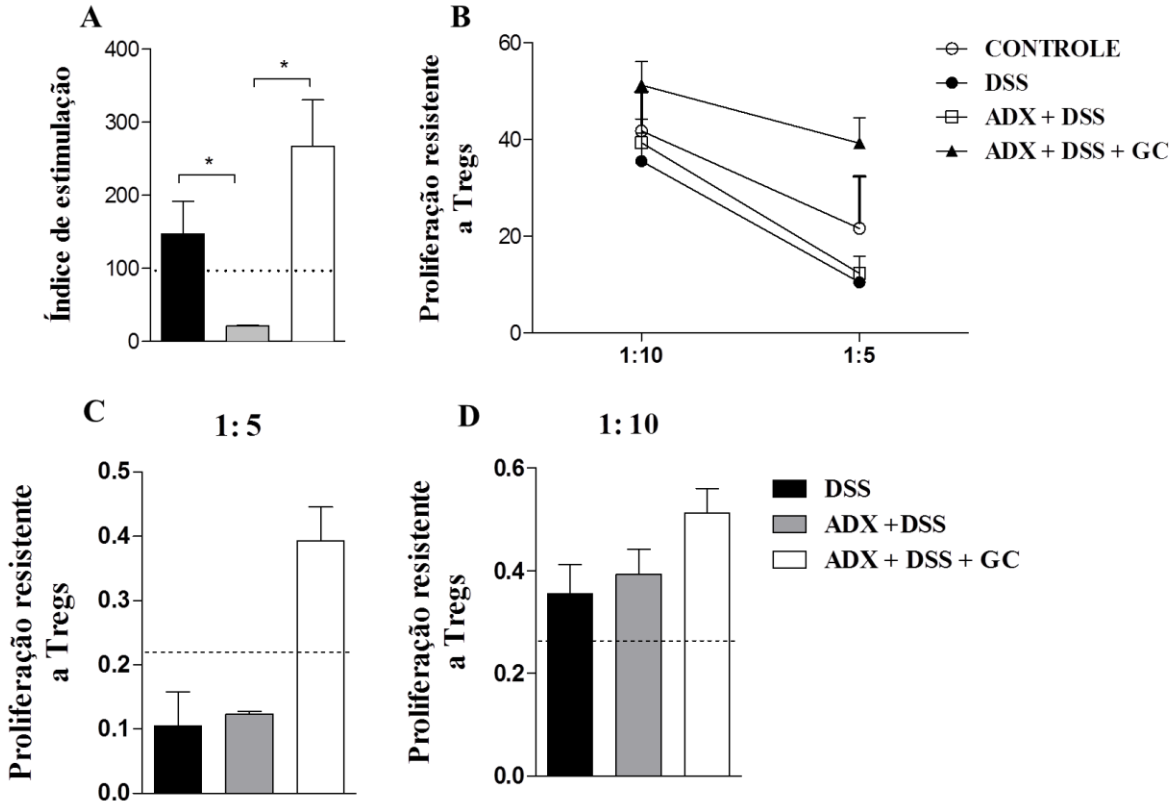

Figura 23: Resistência de esplenócitos provenientes de camundongos adrenalectomizados ou não, com inflamação intestinal e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides à supressão mediada por células T reguladoras. Esplenócitos provenientes de camundongos que foram adrenalectomizados ou não, expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) e/ou submetidos à reposição de glicocorticoides *in vivo*, foram coletados e co-cultivados na presença de células T $CD4^+$ $FOXP3^+$ GFP^+ provenientes de animais saudáveis, previamente separadas por citometria de fluxo. A proporção de T reguladoras para esplenócitos foi de 1:5 e 1:10. Estas células foram estimuladas com Concanavalina-A (Con-A) por 72 horas. Nas últimas 15 horas de cultura foi adicionado bromodeoxiuridina (BrdU). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO). Em (A) índice de estimulação de esplenócitos na ausência de Treg. Em (B) índice de proliferação dos esplenócitos na presença de Treg, na proporção Treg:esplenócito = 1:5 e 1:10. Em (C) índice de proliferação dos esplenócitos na presença de Treg, na proporção Treg:esplenócito = 1:5. Em (D) índice de proliferação dos esplenócitos na presença de Treg, na proporção Treg:esplenócito = 1:10. A linha pontilhada corresponde ao grupo de camundongos C57BL/6 controles sem colite. DSS: grupo de camundongos C57BL/6 expostos ao DSS; ADX + DSS: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS; ADX + DSS + GC: grupo de camundongos C57BL/6 adrenalectomizados expostos ao DSS e submetidos à reposição com GC (glicocorticoide). Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes. *$p < 0,05$.

Juntos estes resultados indicam que o eixo HPA e os GCs exercem papel importante no controle da resposta inflamatória durante a colite experimental induzida por DSS.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostraram que o eixo HPA desempenha um papel importante na modulação da resposta imunológica sistêmica e local durante a inflamação intestinal. A principal influência deste eixo na colite experimental parece estar relacionada com a atividade sistêmica dos GC, uma vez que, na ausência de glândulas adrenais, houve redução de algumas características sistêmicas de regulação, concomitantemente à inflamação sistêmica e mortalidade precoce, desencadeadas pela colite.

Inicialmente, os efeitos do DSS na quebra da imunidade intestinal foram evidenciados pelo aumento da perda de peso e escore clínico de inflamação nos primeiros seis dias de indução da colite nos camundongos C57BL/6. Nossos experimentos preliminares validaram este modelo de doença, no qual há danos epiteliais no cólon e muitas características similares à DII humana [115]. Além disso, como em outros trabalhos [103, 116-118], mostramos que a inflamação intestinal levou à ativação do eixo HPA, com um consequente aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, possivelmente na tentativa de conter a resposta inflamatória exacerbada.

Os camundongos adrenalectomizados com colite apresentaram níveis significativamente menores de LPS em contrapartida ao aumento de IL-6 no soro, sugerindo que o aumento de IL-6 poderia estar ocorrendo na tentativa de controlar a bacteremia resultante da translocação de bactérias do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, linfócitos T e fibroblastos em resposta à infecção bacteriana. Esta citocina está envolvida na estimulação da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e sua produção encontra-se aumentada durante a sepse humana [119-121]. Um estudo realizado com 19 pacientes com choque séptico, onde 16 deles evoluíram para óbito, demonstrou que os níveis de IL-6 estavam sempre aumentados durante a fase aguda da doença. Além disso, o aumento significativo de IL-6 no soro destes pacientes foi correlacionado com a alta taxa de mortalidade dos mesmos [120]. Outro estudo observou que em pacientes sépticos, o nível de IL-6 no soro é significativamente correlacionado com a gravidade da sepse e lesão cerebral

[122]. Ainda, ao investigar a correlação dos níveis de citocinas pro-inflamatórias no soro com a sobrevida de 97 pacientes sépticos, Casey e colaboradores observaram que 80% dos pacientes apresentaram aumento de IL-6 e 89% tiveram aumento de LPS no soro. Além disso, os níveis de IL-6 foram significativamente maiores nos pacientes que evoluíram a óbito quando comparados aos pacientes que sobreviveram [123]. Juntos, os dados mostraram que o aumento de IL-6 e LPS no soro desempenha um papel importante na patogênese da infecção bacteriana sistêmica e a combinação dos diferentes mediadores elevados na corrente sanguínea pode ser determinante na taxa de sobrevida dos pacientes. Assim, sugerimos que a mortalidade precoce vista nos camundongos adrenalectomizados submetidos à colite pode estar correlacionada ao aumento de IL-6 circulante.

Corroborando nossos resultados foi demonstrado em um modelo murino de colite experimental induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), que camundongos C57BL/6 deficientes de CRH (CRH KO - *knock out*) apresentam diminuição significativa das respostas inflamatórias locais, apesar de apresentarem baixos níveis de glicocorticóides. Estes efeitos foram demonstrados pela diminuição do escore histopatológico (diminuição de áreas de erosão e edema submucoso) e pela diminuição da atividade de neutrófilos (MPO). Ademais, a deficiência de CRH foi associada com maiores níveis de IL-6 no sangue [124].

Surpreendentemente, apesar de apresentarem mortalidade precoce, nossos camundongos adrenalectomizados também tiveram redução de lesões intestinais, o que pode ser devido ao desenvolvimento de mecanismos reguladores locais para conter a inflamação induzida por DSS. Isto foi evidenciado pelo aumento de células dendríticas (DC) $CD11c^{+}CD11b^{+}CD103^{+}$, que têm perfil potencialmente tolerogênico [113], em contraste à redução significativa de células dendríticas pró-inflamatórias $CD11c^{+}CD11b^{+}CD103^{-}$ [114]. Neste contexto, sabe-se que as células dendríticas tolerogênicas $CD103^{+}$ tem papel importante na manutenção da tolerância imunológica intestinal, pois as mesmas podem apresentar auto antígenos ou antígenos ambientais inócuos para manter a tolerância imune periférica por geração de células T reguladoras ($FOXP3^{+}$) protetoras [125, 126].

Também foi possível observar que apenas os camundongos não adrenalectomizados tiveram aumento da síntese de GC no intestino durante a indução da inflamação intestinal. Neste contexto, Noti e colaboradores [110] mostraram que a síntese de GC intestinal é induzida por LPS de maneira

dependente de TNF-α. Além disso, estes pesquisadores mostraram que apesar de ser uma citocina pró-inflamatória, o TNF-α foi capaz de suprimir a inflamação intestinal aguda por promover a esteroidogênese local [87]. Corroborando estes resultados, embora não tenhamos observado aumento significativo de TNF-α no intestino dos camundongos não adrenalectomizados com colite, houve maior produção de corticosterona intestinal e aumento de LPS no soro destes animais. Neste contexto, estes dados indicam que de fato o aumento de GC intestinal está associado ao aumento de LPS, no entanto, esse fenômeno não parece ser exclusivamente dependente de GC derivado das adrenais, pois observamos que apenas a reposição com GC não é suficiente para estimular a produção de corticosterona no intestino. Assim, sugerimos que talvez seja necessária a presença de outros mediadores produzidos pelas adrenais ou mecanismos extra-adrenais para que tal modulação ocorra.

Em relação às alterações locais durante o desenvolvimento da inflamação intestinal, também observamos aumento do acúmulo de neutrófilos no cólon inflamado, independentemente da presença de glândulas adrenais, indicando que estes granulócitos não estavam diretamente envolvidos na morbidade da doença nos camundongos adrenalectomizados. No entanto, o tratamento com GC foi capaz de promover a redução da atividade dos neutrófilos (MPO) no intestino dos camundongos adrenalectomizados com colite, de forma semelhante aos resultados obtidos em um modelo de enterite mediada por *Clostridium difficile* em ratos. Neste estudo, os animais adrenalectomizados ou aqueles tratados com antagonista de receptores de glicocorticoides (RU-486) submetidos à enterite tinham níveis mais elevados de atividade de MPO, quando comparado com ratos com adrenais funcionais. Além disso, após a reposição de glicocorticoides houve supressão da estimulação gênica da expressão da proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP2/CXCL2), que é uma quimiocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos [118]. Por outro lado, a contribuição de neutrófilos para a patogênese da DII também foi relatada em um estudo que mostrou melhora da colite induzida por DSS em ratos após administração de anticorpos monoclonais (RP-3), capazes de depletar neutrófilos seletivamente [127].

As glândulas adrenais também parecem influenciar no acúmulo ou migração de células supostamente NKT ($CD3^{+}CD49b^{+}$), uma vez que a baixa frequência destes leucócitos foi observada no baço, simultaneamente ao acúmulo dessas

células na LP dos camundongos adrenalectomizados com colite. As células NKT poderiam migrar a partir do baço para a LP em uma tentativa de modular a resposta imunológica exacerbada no intestino. Estas células são importantes para o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, pela produção de IL-4 e IL-10. Ademais, células NKT produtoras de IL-9 estão envolvidas na proteção contra a colite induzida por DSS através da inibição da produção de IL-17 e IFN-γ [128]. Assim, sugere-se que o aumento de células NKT ocorre provavelmente na tentativa de reduzir os altos níveis de IFN-γ encontrados no cólon dos camundongos adrenalectomizados expostos a DSS.

A redução da frequência de células T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) foi observada nos LNM, LP e compartimento de LIE, nos camundongos adrenalectomizados com colite e tratados com dexametasona. Ao analisar mais especificamente o tipo de linfócitos T que seriam regulados por GC, observou-se que os animais tratados com dexametasona tiveram uma significativa diminuição da percentagem de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ (células Th1) no baço. Além disso, estes dados confirmam a redução significativa dos níveis de IFN-γ no intestino, após a reposição com GC, que também pode estar associada com a diminuição de células T CD8 na LP, uma vez que estas células são fontes de IFN-γ [129]. Ademais, a diminuição da frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ (células Th1) no baço dos camundongos adrenalectomizados tratados com GC foi acompanhada pela redução das células NK neste órgão e estas células também são fontes de IFN-γ [130].

Observou-se também que na ausência das glândulas adrenais os camundongos expostos ao DSS apresentaram aumento significativo na frequência de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ na LP, sendo que a reposição de GC resultou na diminuição da frequência destas células no cólon. Deste modo, estes resultados sugerem que o controle da frequência de linfócitos T auxiliares e T citolíticos durante colite é dependente de GC produzidos pelas glândulas supra-renais.

A gravidade da inflamação intestinal está associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias [131]. Nossos dados mostraram que a ausência de glândulas supra-renais induziu níveis de IFN-γ ainda mais elevados do que os observados nos camundongos com colite e glândulas adrenais intactas, apesar da diminuição do infiltrado inflamatório no cólon. Em adição, estes níveis elevados de IFN-γ retornaram à normalidade após tratamento com dexametasona, o que indica que a regulação da produção desta molécula inflamatória no intestino é dependente

das glândulas adrenais. Concordando com os nossos dados, Shibolet e colegas [103] demonstraram que camundongos adrenalectomizados submetidos à colite induzida por TNBS apresentaram aumento acentuado nos níveis de IFN-γ e IL-10 no soro. Deste modo, nossos resultados confirmam que o aumento na produção de IFN-γ está envolvido na imunopatogênese da DII e que o eixo HPA desempenha papel importante no controle desta citocina pró-inflamatória.

Concomitantemente ao aumento de IFN-γ no intestino dos camundongos adrenalectomizados, foi observada diminuição de LPS no soro e da frequência de linfócitos T produtores de IFN-γ no baço. Sendo assim, sugerimos que as células Th1 podem estar migrando a partir do baço para a mucosa inflamada na tentativa de proteger os camundongos contra os agentes patogênicos que poderiam se translocar do lúmen intestinal para a mucosa após a quebra da barreira epitelial promovida pela ingestão de DSS. IFN-γ é o principal ativador fisiológico de macrófagos os quais, quando ativados, produzem citocinas como IL-1, TNF-α e IL-6, que contribuem para a inflamação [132]. IFN-γ também é capaz de induzir a expressão da molécula de MHC-II em células epiteliais intestinais (CEI), permitindo a apresentação de antígenos microbianos para células imunocompetentes. Além disso, este aumento na expressão de MHC-II em resposta ao IFN-γ pode ser significativamente inibido pela dexametasona [133]. Em conjunto, estes dados sugerem que GC derivados das adrenais podem de fato podem interferir no infiltrado de leucócitos intestinais e regular a produção de IFN-γ na mucosa durante a inflamação induzida por DSS.

Nossos resultados também demonstraram que a diminuição de células na mucosa intestinal dos animais adrenalectomizados com colite está associada à apoptose mediada por FasL paralelamente ao aumento de IFN-γ, de maneira dependente de GC. Neste contexto, sabe-se que Fas ligante (FasL ou CD95L) é uma proteína transmembrana de tipo-II, que pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF). A sua ligação com o seu receptor (FasR ou CD95) induz a apoptose em células sensíveis [134]. A apoptose induzida por Fas desempenha um papel fundamental na manutenção da tolerância imunológica e está envolvida na atividade citotóxica de células T [135] e de células NK [136]. Além disso, após a eliminação de patógenos invasores, a apoptose controla as respostas imunológicas, inata e adaptativa, para que retornem a níveis apropriados de modo a evitar danos teciduais

do hospedeiro causados pela excessiva ativação das células do sistema imune [137, 138].

Estudos anteriores mostraram que o IFN-γ desempenha papel importante na indução de apoptose ou diminuição de células T $CD4^+$ durante doenças infecciosas [139, 140], na resposta contra tumores [141] e na encefalomielite autoimune experimental [142]. Xu e colaboradores [143] observaram que células esplênicas estromais estimulam células dendríticas reguladoras a expressarem altos níveis de FasL que por sua vez induz apoptose de células T $CD4^+$ ativadas de maneira dependente de IFN-γ e óxido nítrico. Ainda, outro estudo demonstrou que IFN-γ promove a apoptose de células T $CD4^+$ durante a infecção por BCG (*bacillus Calmette-Guérin*), através da sensibilização de células T $CD4^+$ a apoptose através da indução de caspase 9, de moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bim, Bid e Apaf-1) e através da indução de sinais extracelulares de apoptose (TRAIL, receptor de morte 5 (DR5), TNF-α, TNFR1) [140]. Deste modo, sugerimos que na ausência de GC, a alta produção de IFN-γ poderia estimular a expressão de FasL com consequente aumento de apoptose e diminuição da celularidade na LP, na tentativa de controlar a excessiva ativação das células do sistema imune intestinal.

Em relação às outras populações de células envolvidas na patogênese da DII, observou-se aumento da frequência de células $CD3^+CD4^+IL\text{-}17^+$ e $CD3^+CD4^+IL\text{-}10^+$ no baço dos camundongos tratados com GC, o que indica que este hormônio pode facilitar o acúmulo sistêmico de linfócitos Th17 e células T reguladoras. Por outro lado, as células T $CD4^+$ produtoras de IL-4 foram detectadas apenas em culturas de baço dos camundongos com colite não adrenalectomizados, o que sugere que os mediadores derivados desta glândula podem ser de importância crítica no equilíbrio da resposta imune sistêmica, através da indução de um perfil Th2. No entanto, a ausência dessa regulação não foi revertida pelo tratamento com GC, indicando que outros mediadores também podem ser responsáveis pela homeostase imune durante a colite. Sabe-se que a IL-4 é a citocina efetora produzida pelas células Th2. Esta citocina também promove a diferenciação de células T auxiliares virgens (*naives*) em células Th2 e são cruciais para a contra regulação de respostas inflamatórias mediadas por células Th1, principalmente através da inibição da produção de IFN-γ. Células Th2 estão envolvidas na resposta imune humoral, proteção contra helmintos intestinais e alergias [144-146]. Estudos recentes têm demonstrado que a indução de Th2 promove a melhora da colite induzida por TNBS

em ratos, pelo aumento na produção de IL-4 e IL-10 e diminuição de IFN-γ [147, 148].

Os esplenócitos dos camundongos adrenalectomizados com colite produziram níveis significativamente mais altos de IL-10 quando ativados *in vitro*, o que possivelmente pode ter promovido a inibição da proliferação destas células. Mishima e colaboradores [149] mostraram que células B ativadas por bactérias intestinais secretam IL-10 e melhoram a colite mediada por células T por contribuírem para a homeostase intestinal através da supressão das células T efetoras e indução células Tr-1 (células T produtoras de IL-10 $Foxp3^-$) via sinalização de IL-27. Liu e colaboradores [150] observaram que as APCs ($CD11b^+$) são capazes de regular as respostas das células Th1 e Th17 para bactérias comensais e suprimir a colite murina, através da produção de IL-10. Diante disso, sugerimos que outras células presentes no baço dos camundongos adrenalectomizados com colite podem ser responsáveis pelo aumento de IL-10, na tentativa de diminuir a proliferação de linfócitos efetores e consequentemente controlar a inflamação, uma vez que houve redução de Tregs naturais neste mesmo compartimento imunológico.

Conforme mencionado, observou-se que na ausência de glândulas supra-renais, houve diminuição da expressão de vários marcadores relacionados a Tregs, tais como PD1, CD73 e FR4, de maneira dependente de GC adrenal, além da MFI de FOXP3. Sabe-se que as células T reguladoras são conhecidas pela sua capacidade de modular a patogênese de muitas doenças imunomediadas [151]. Os mecanismos de supressão podem envolver as moléculas de superfície, tais como CTLA-4 e PD-1, que são receptores que atuam em sinergia e regulam negativamente a ativação de células T [152]. Além disso, o CD73 é expresso na superfície dos linfócitos T e converte 5-AMP extracelular em adenosina. Assim, a adenosina inibe a proliferação e secreção de citocinas de células efetoras, Th1 e Th2 [153]. Os linfócitos T reguladores são também caracterizados pela expressão do receptor de folato 4 (FR4). Células T reguladoras naturais ou induzidas por TGF-β expressam altos níveis de FR4 e o bloqueio deste receptor promove a depleção de T reguladoras [154, 155].

Interessantemente, foi observado que no baço dos animais adrenalectomizados expostos ao DSS houve diminuição significativa na frequência de células $CD4^+CD25^+PD1^+$ e $CD4^+CD25^-PD1^+$, de maneira dependente de GC. Concomitantemente a isso, observamos no ensaio de proliferação com CFSE que os

linfócitos do baço destes animais apresentaram inibição da proliferação possivelmente pelo aumento de IL-10. Sabe-se que PD-1 (receptor de morte celular programada do tipo 1) é um receptor da superfície celular da superfamília CD28 que desencadeia vias inibitórias com o objetivo de atenuar as respostas e promover a tolerância da célula T [156]. Além disso, um estudo mostrou que a dexametasona aumenta a expressão de PD1 de maneira dose dependente e estes efeitos foram completamente inibidos pelo antagonista do receptor de glicocorticoide (mifepristona - RU486), o que indica que o efeito dos GC na expressão de PD1 é mediado pelo receptor de glicocorticoide. Os resultados deste estudo também mostraram que a dexametasona suprimiu as funções das células T através da inibição da produção de citocinas tais como IL-2, IFN-γ, TNF-α e indução da apoptose de células T [157]. Diante do exposto, sugerimos que, na ausência de GC, as células do baço dos camundongos submetidos à colite perdem a capacidade de inibir a resposta de células T ativadas através do PD1 e provavelmente por meio também das outras moléculas descritas acima relacionadas a Tregs. Estes animais provavelmente desenvolvem outras formas de regulação com o intuito de atenuar as respostas imunes e promover a tolerância, como por exemplo, aumentando a produção de IL-10 no baço sob estímulo *in vitro*. Todavia, é possível que estes mecanismos contra-reguladores não tenham sido suficientes para conter a inflamação sistêmica mediada por IL-6 e suas consequências. Adicionalmente, o fator de transcrição FOXP3 é um dos principais marcadores das Tregs naturais e sua expressão nestas células ocorre no timo [151]. Com base nisso, sugerimos que o aumento da susceptibilidade à colite na ausência de glândulas adrenais pode ser uma consequência da falha na regulação de respostas efetoras, devido à redução de linfócitos T reguladores nos órgãos linfoides secundários.

A resposta resultante da reação imunológica em condições fisiopatológicas em geral depende do balanço entre células efetoras produzindo inflamação e sua regulação por mecanismos moduladores. No presente trabalho, paralelamente à diminuição da frequência de células Treg vimos que na ausência das adrenais os esplenócitos dos camundongos expostos ao DSS não foram mais resistentes à ação de Tregs $Foxp3^+$ que aqueles dos animais não adrenalectomizados com colite. Apesar de se saber que as células T reguladoras $Foxp3^+$ são capazes de suprimir as células T efetoras [158], nossos resultados sugerem que o eixo HPA não interfere na capacidade dos esplenócitos funcionais de serem susceptíveis à supressão por

células T reguladoras durante a colite, ou seja, não são mais resistentes à supressão. Portanto, as falhas observadas no controle da inflamação podem ser devido à redução da frequência de Tregs durante a exposição de camundongos adrenalectomizados, ao DSS, ou por deficiências de outros mecanismos reguladores dependentes das adrenais.

Por outro lado, os efeitos imunossupressores dos GCs podem estar associados a um elevado risco de infecções oportunistas. Na verdade, os pacientes tratados com corticosteroides estão em maior risco de desenvolver esofagite infecciosa mediada por citomegalovírus (CMV) e outras infecções [159, 160]. Em relação aos modelos experimentais, o tratamento de sepse murina com dexametasona suprimiu IL-22 e gerou falhas na defesa contra bactérias intestinais [161]. Além disso, os camundongos submetidos à colite induzida por estresse psicossocial crônico, também conhecida como colite induzida por CSC (*Chronic Subordinate Colony Housing*) exibiram supressão da resposta imune intestinal mediada por GC, o que prejudicou a função de barreira epitelial intestinal, com subsequente translocação bacteriana da microbiota intestinal [162]. Neste modelo os camundongos são colocados para coabitar com ratos maiores nas mesmas gaiolas. Com o estresse psicossocial crônico, eles apresentam redução no ganho de peso corporal, redução do timo e aumento de peso adrenal, comportamento de ansiedade de longa duração, e colite espontânea. Considerando estes resultados, sugerimos que a falha do tratamento com dexametasona em evitar a mortalidade precoce em camundongos adrenalectomizados com colite poderia estar associada aos potenciais efeitos imunossupressores do tratamento com GC a longo prazo e ao comprometimento das defesas do hospedeiro.

Em contrapartida, sabe-se que a taxa de mortalidade de pacientes com insuficiência adrenal primária (doença de Addison) é consideravelmente elevada. Em 1950, antes da utilização de glicocorticoides, a taxa era de aproximadamente 20% [163]. Assim como na doença de Addison, disfunções da pituitária, como o hipopituitarismo, resultam na deficiência da produção de GC (insuficiência adrenal secundária), que está associada com a resistência ao estresse prejudicada, hipertrofia do tecido linfoide, perda de peso e hipoglicemia [164, 165], consequentes da diminuição ou ausência da produção de ACTH e estimulação prejudicada das glândulas adrenais para a produção de cortisol [166]. Após a introdução da terapia de reposição de glicocorticoides nos casos de pacientes com insuficiência adrenal

(primária ou secundária), a mortalidade foi reduzida significativamente e a expectativa de vida foi considerada normal [167]. No entanto, os pacientes com doença de Addison em terapia de reposição apresentam fadiga, cansaço e tolerância ao estresse diminuída [168], além de risco aumentado de doença cardiovascular e metabólica óssea [169]. A incapacidade das terapias atuais em fornecerem a substituição fisiológica adequada de cortisol é um problema enfrentado por médicos e pacientes, sendo necessária a monitorização contínua do tratamento, através da avaliação clínica e parâmetros bioquímicos. Uma das maiores dificuldades da terapia de reposição de GC é a dificuldade de manter os níveis de cortisol mais próximo do normal e atingir os níveis distintos de cortisol de acordo com o ritmo circadiano, que diminuem ao longo do dia até o entardecer, aumentam durante o sono e atingem o pico ao amanhecer [163, 169]. Logo, esta dificuldade de mimetização das condições fisiológicas normais após reposição de GC também pode estar relacionada à maior mortalidade em nosso estudo.

Vale ressaltar que, além de suprimir a resposta inflamatória, os GC também são responsáveis pelo aumento da concentração sanguínea de glicose com seus efeitos no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Por isso, estão envolvidos no controle da homeostase de energia, particularmente sob condições de disfunções metabólicas como na resistência à insulina, obesidade e diabetes tipo II [163, 169-172]. Com base nisso, sugerimos que alterações metabólicas também podem estar envolvidas na piora dos camundongos tratados a longo prazo com dexametasona.

Em resumo, nossos resultados mostraram que o eixo HPA desempenha papel fundamental no controle da inflamação induzida experimentalmente no modelo de colite. Particularmente, em relação à resposta imune sistêmica, os camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS apresentaram mortalidade precoce associada à diminuição de LPS na corrente sanguínea e aumento da reação inflamatória sistêmica com altos níveis de IL-6 no soro. Este desbalanço provavelmente está associado às alterações observadas na mucosa intestinal, uma vez que os GC endógenos parecem controlar a produção local de IFN-γ e interferir em vias de apoptose na LP. Adicionalmente, as adrenais são fundamentais para a produção ou manutenção do conjunto de células T reguladoras (especialmente as naturais), embora não interfiram na susceptibilidade de esplenócitos a tais mecanismos reguladores. Por fim, na ausência de GC endógenos e com baixa frequência de

Tregs, os camundongos adrenalectomizados desenvolveram mecanismos contra-reguladores, como a alta produção de IL-10 frente à ativação celular. No entanto, embora esta resposta seja capaz de controlar a proliferação de células provenientes do órgão linfoide secundário, não é suficiente para impedir o excesso de inflamação sistêmica e morte após quebra da barreira intestinal.

Finalmente, este estudo abre novas perspectivas para o melhor entendimento da relação entre os sistemas imune e neuroendócrino, propiciando bases para futuras terapias para pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ✓ O eixo HPA e os glicocorticoides endógenos desempenham papel importante na modulação da resposta imune na inflamação intestinal experimental;
- ✓ A inflamação intestinal induzida por dextran sulfato de sódio ativa o eixo HPA, com consequente aumento de corticosterona plasmática;
- ✓ As glândulas adrenais e/ou seus mediadores são fundamentais para a resistência à inflamação intestinal experimental e no controle da resposta inflamatória sistêmica induzida pela doença inflamatória intestinal experimental;
- ✓ As glândulas adrenais são importantes no controle do dano tecidual e infiltrado de inflamatório na lâmina própria, causados pela indução da inflamação intestinal experimental;
- ✓ As glândulas adrenais exercem papel importante no desenvolvimento de mecanismos reguladores frente à resposta imune efetora exacerbada causada pela doença inflamatória intestinal experimental.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.

2. Rodriguez-Moranta, F., A. Soriano-Izquierdo, and J. Guardiola, *[Current status of treatment of inflammatory bowel disease].* Cir Esp, 2007. **82**(5): p. 254-9.

3. Martins, N.B. and M.A. Peppercorn, *Inflammatory bowel disease.* Am J Manag Care, 2004. **10**(8): p. 544-52.

4. Sepulveda, S.E., et al., *[Inflammatory bowel diseases: an immunological approach].* Rev Med Chil, 2008. **136**(3): p. 367-75.

5. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.

6. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 514-21.

7. Duchmann, R., et al., *Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD).* Clin Exp Immunol, 1995. **102**(3): p. 448-55.

8. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.* Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.

9. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 281-6.

10. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.* Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.

11. Hisamatsu, T., et al., *Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Pharmacol Ther, 2013. **137**(3): p. 283-97.

12. Lappalainen, M., et al., *Novel CARD15/NOD2 mutations in Finnish patients with Crohn's disease and their relation to phenotypic variation in vitro and in vivo.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(2): p. 176-85.

13. Geremia, A., et al., *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease.* Autoimmun Rev, 2014. **13**(1): p. 3-10.

14. Siegmund, B. and M. Zeitz, *Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2011. **17**(27): p. 3178-83.

15. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity.* J Allergy Clin Immunol. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.

16. Varol, C., et al., *Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions.* Immunity, 2009. **31**(3): p. 502-12.

17. Varol, C., E. Zigmond, and S. Jung, *Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 415-26.

18. Lovett-Racke, A.E., Y. Yang, and M.K. Racke, *Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis?* Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 246-51.

19. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice.* J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1281-90.

20. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.

21. Quintana, F.J. and H.L. Weiner, *Environmental control of Th17 differentiation.* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 655-7.

22. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.

23. McGeachy, M.J., et al., *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo.* Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 314-24.

24. Mills, K.H., *Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells.* Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2636-49.

25. Monteleone, I., F. Pallone, and G. Monteleone, *Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation.* BMC Med. **9**: p. 122.

26. Iwakura, Y. and H. Ishigame, *The IL-23/IL-17 axis in inflammation.* J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1218-22.

27. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors.* Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.

28. Witowski, J., K. Ksiazek, and A. Jorres, *Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(5): p. 567-79.

29. Koenders, M.I., et al., *Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(10): p. 3239-47.

30. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses.* Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.

31. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.

32. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.

33. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.* Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.

34. Yang, Y., et al., *Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens.* Nature, 2014. **510**(7503): p. 152-6.

35. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.* Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.

36. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.

37. Touil, T., et al., *Pathophysiology of interleukin-23 in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Drug News Perspect, 2006. **19**(2): p. 77-83.

38. Geem, D., et al., *Specific microbiota-induced intestinal Th17 differentiation requires MHC class II but not GALT and mesenteric lymph nodes.* J Immunol, 2014. **193**(1): p. 431-8.

39. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.

40. Jimeno, R., et al., *Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect.* J Leukoc Biol, 2015.

41. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.* J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.

42. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.* Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.

43. Klotz, L., et al., *The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity.* J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2079-89.

44. Yang, L., et al., *Elevated autoantibodies against interleukin-17F correlate with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis.* Int J Rheum Dis, 2015.

45. Ricciardolo, F.L., et al., *Th17 polarization and upper airways: new insights.* Clin Exp Allergy, 2015.

46. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6725-9.

47. Kononova, T.E., et al., *Factors of Th17 and Treg Lymphocyte Differentiation in Pulmonary Tuberculosis.* Bull Exp Biol Med, 2015.

48. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.* Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.

49. Singh, B., et al., *Control of intestinal inflammation by regulatory T cells.* Immunol Rev, 2001. **182**: p. 190-200.

50. Suri-Payer, E., et al., *CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.* J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1212-8.

51. McGuirk, P. and K.H. Mills, *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases.* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 450-5.

52. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells.* Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 89-98.

53. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *Molecular aspects of regulatory T cell development.* Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 73-80.

54. Sharma, S., et al., *CD4+CD25+CD127(low) Regulatory T Cells Play Predominant Anti-Tumor Suppressive Role in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 49.

55. Dunham, R.M., et al., *CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection.* J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5582-92.

56. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.* J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.

57. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.* Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.

58. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy.* J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.

59. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.

60. Wang, Y., et al., *Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease.* J Dig Dis. **12**(4): p. 286-94.

61. Kelsen, J., et al., *FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease.* Clin Exp Immunol, 2005. **141**(3): p. 549-57.

62. Maul, J., et al., *Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2005. **128**(7): p. 1868-78.

63. Muratov, V., et al., *Decreased numbers of FoxP3-positive and TLR-2-positive cells in intestinal mucosa are associated with improvement in patients with active inflammatory bowel disease following selective leukocyte apheresis.* J Gastroenterol, 2008. **43**(4): p. 277-82.

64. Dharmani, P. and K. Chadee, *Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key.* Curr Mol Pharmacol, 2008. **1**(3): p. 195-212.

65. Verdier, J., et al., *Compartmentalized expression of Th1 and Th17 cytokines in pediatric inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(7): p. 1260-6.

66. Robertson, D.A., et al., *Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease.* Gut, 1989. **30**(5): p. 623-6.

67. Silverman, M.N., et al., *Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection.* Viral Immunol, 2005. **18**(1): p. 41-78.

68. Smith, S.M. and W.W. Vale, *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.* Dialogues Clin Neurosci, 2006. **8**(4): p. 383-95.

69. Harbuz, M.S., A.J. Chover-Gonzalez, and D.S. Jessop, *Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **992**: p. 99-106.

70. Miller, W.L. and R.J. Auchus, *The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders.* Endocr Rev, 2011. **32**(1): p. 81-151.

71. Miller, W.L. and H.S. Bose, *Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking.* J Lipid Res, 2011. **52**(12): p. 2111-35.

72. Jacobson, L., *Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2005. **34**(2): p. 271-92, vii.

73. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(5): p. 1033-44.

74. Nicolaides, N.C., et al., *The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function.* Steroids, 2010. **75**(1): p. 1-12.

75. Hubner, S., et al., *The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough.* Biol Chem, 2015.

76. Magomedova, L. and C.L. Cummins, *Glucocorticoids and Metabolic Control.* Handb Exp Pharmacol, 2015.

77. Kino, T., *Glucocorticoid Receptor*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).

78. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors.* Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5549-56.

79. Samarasinghe, R.A., et al., *Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(40): p. 16657-62.

80. Riccardi, C., S. Bruscoli, and G. Migliorati, *Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids.* Pharmacol Res, 2002. **45**(5): p. 361-8.

81. Gonzalo, J.A., et al., *Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo.* J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1239-46.

82. Sternberg, E.M., et al., *A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4771-5.

83. Swain, M.G. and M. Maric, *Prevention of immune-mediated arthritis in cholestatic rats: involvement of endogenous glucocorticoids.* Gastroenterology, 1994. **107**(5): p. 1469-74.

84. Davies, E. and S.M. MacKenzie, *Extra-adrenal production of corticosteroids.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(7): p. 437-45.

85. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation.* J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1635-46.

86. Atanasov, A.G., et al., *Cell cycle-dependent regulation of extra-adrenal glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial cells.* FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4117-25.

87. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis.* J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.

88. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines.* Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1445-53.

89. Mueller, M., et al., *The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2057-62.

90. Anton, P.A. and F. Shanahan, *Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"?* Ann N Y Acad Sci, 1998. **840**: p. 723-34.

91. McCafferty, D.M., J.L. Wallace, and K.A. Sharkey, *Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat.* Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): p. G272-80.

92. Braus, N.A. and D.E. Elliott, *Advances in the pathogenesis and treatment of IBD.* Clin Immunol, 2009. **132**(1): p. 1-9.

93. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13504-9.

94. Bianchi, M., C. Meng, and L.B. Ivashkiv, *Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9573-8.

95. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1425-33.

96. Wang, W., et al., *Dexamethasone suppresses allergic rhinitis and amplifies CD4 Foxp3 regulatory T cells in vitro.* Int Forum Allergy Rhinol, 2015.

97. Richards, D.F., et al., *Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production.* Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2344-54.

98. Brinkmann, V. and C. Kristofic, *Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets.* J Immunol, 1995. **155**(7): p. 3322-8.

99. John, M., et al., *Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 256-62.

100. Peek, E.J., et al., *Interleukin-10-secreting "regulatory" T cells induced by glucocorticoids and beta2-agonists.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(1): p. 105-11.

101. Barrat, F.J., et al., *In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines.* J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 603-16.

102. Chen, X., et al., *Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE.* Eur J Immunol, 2006. **36**(8): p. 2139-49.

103. Shibolet, O., et al., *Regulatory role of the pituitary-adrenal axis in experimental colitis: effect of adrenalectomy on the clinical course and the TH1/TH2 immune profile.* Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(12): p. 1053-9.

104. van Meeteren, M.E., M.A. Meijssen, and F.J. Zijlstra, *The effect of dexamethasone treatment on murine colitis.* Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(5): p. 517-21.

105. Daniel, C., et al., *Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile.* J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(1): p. 23-33.

106. Liu, M., et al., *Effect of high-dose methylprednisolone treatment on Th17 cells in patients with multiple sclerosis in relapse.* Acta Neurol Scand, 2009. **120**(4): p. 235-41.

107. Reber, S.O., et al., *Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms.* Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 670-82.

108. Melon, A., et al., *Infection with Hymenolepis diminuta is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice.* J Biomed Biotechnol. **2010**: p. 384523.

109. Treuting, P.M. and S.M. Dintzis, *12 - Lower Gastrointestinal Tract*, in *Comparative Anatomy and Histology*, P.M.T.M. Dintzis, Editor. 2012, Academic Press: San Diego. p. 177-192.

110. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner.* FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1340-6.

111. Gomes, A.S., et al., *Lipopolysaccharide from Escherichia coli prevents indomethacin-induced gastric damage in rats: role of non-protein sulfhydryl groups and leukocyte adherence.* Inflamm Res, 2009. **58**(10): p. 717-23.

112. Forbes, E., et al., *Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase.* J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5664-75.

113. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine.* Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.

114. Cerovic, V., et al., *Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells.* Mucosal Immunol, 2013. **6**(1): p. 104-13.

115. Kerr, T.A., et al., *Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: A poly-A purification solution.* Inflamm Bowel Dis, 2011.

116. Kojima, K., et al., *HPA-axis responses during experimental colitis in the rat.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(5): p. R1348-55.

117. Franchimont, D., et al., *Adrenal cortical activation in murine colitis.* Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1560-8.

118. Castagliuolo, I., et al., *Endogenous corticosteroids modulate Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G539-45.

119. Bhardwaj, N., et al., *Depressed Monocytic Activity may be a Predictor for Sepsis.* J Lab Physicians, 2015. **7**(1): p. 26-31.

120. Damas, P., et al., *Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity.* Ann Surg, 1992. **215**(4): p. 356-62.

121. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview.* Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.

122. Liu, Z., et al., *[Correlation analysis between serum interleukin-6 and central nervous injury in septic patients].* Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012. **32**(10): p. 1451-3.

123. Casey, L.C., R.A. Balk, and R.C. Bone, *Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome.* Ann Intern Med, 1993. **119**(8): p. 771-8.

124. Gay, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis.* Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3403-9.

125. Rutella, S. and F. Locatelli, *Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* World J Gastroenterol, 2011. **17**(33): p. 3761-75.

126. Scott, C.L., A.M. Aumeunier, and A.M. Mowat, *Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?* Trends Immunol, 2011. **32**(9): p. 412-9.

127. Natsui, M., et al., *Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats.* J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(12): p. 801-8.

128. Kim, H.S. and D.H. Chung, *IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner.* Mucosal Immunol, 2013. **6**(2): p. 347-57.

129. Teixeira, L.K., et al., *IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation.* J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5931-9.

130. Arase, H., N. Arase, and T. Saito, *Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking.* J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2391-6.

131. Kim, J.J., et al., *Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD.* J Vis Exp, 2012(60).

132. Yamamoto, M., et al., *IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis.* J Immunol, 2011. **164**(9): p. 4878-82.

133. Ruemmele, F.M., et al., *Dexamethasone inhibits IFNgamma-induced MHC class II expression of intestinal epithelial cells independently of the TGF-beta1 regulatory pathway.* Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(5): p. 595-601.

134. Bien, K., et al., *Fas/FasL pathway participates in regulation of antiviral and inflammatory response during mousepox infection of lungs.* Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 281613.

135. Henkart, P.A., et al., *Do CTL kill target cells by inducing apoptosis?* Semin Immunol, 1997. **9**(2): p. 135-44.

136. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.

137. Ferguson, T.A. and T.S. Griffith, *A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later.* Immunol Rev, 2006. **213**: p. 228-38.

138. Ramaswamy, M., et al., *Many checkpoints on the road to cell death: regulation of Fas-FasL interactions and Fas signaling in peripheral immune responses.* Results Probl Cell Differ, 2009. **49**: p. 17-47.

139. Dalton, D.K., et al., *Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells.* J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 117-22.

140. Li, X., et al., *IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals.* J Immunol, 2007. **179**(2): p. 939-49.

141. Berner, V., et al., *IFN-gamma mediates CD4+ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy.* Nat Med, 2007. **13**(3): p. 354-60.

142. Chu, C.Q., S. Wittmer, and D.K. Dalton, *Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 123-8.

143. Xu, X., et al., *Splenic stroma-educated regulatory dendritic cells induce apoptosis of activated CD4 T cells via Fas ligand-enhanced IFN-gamma and nitric oxide.* J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1168-77.

144. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors.* J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3796-806.

145. Li-Weber, M. and P.H. Krammer, *Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 534-43.

146. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 225-35.

147. Zhou, Y., et al., *Lactosucrose attenuates intestinal inflammation by promoting Th2 cytokine production and enhancing CD86 expression in colitic rats.* Biosci Biotechnol Biochem, 2014: p. 1-9.

148. Zhou, Y., et al., *A diet with lactosucrose supplementation ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats.* Food Funct, 2015. **6**(1): p. 161-71.

149. Mishima, Y., et al., *Resident bacteria-stimulated IL-10-secreting B cells ameliorate T cell-mediated colitis by inducing Tr-1 cells that require IL-27-signaling.* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015. **1**(3): p. 295-310.

150. Liu, B., S.L. Tonkonogy, and R.B. Sartor, *Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice.* Gastroenterology, 2011. **141**(2): p. 653-62, 662 e1-4.

151. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?* Int Immunol, 2009. **21**(10): p. 1105-11.

152. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.

153. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine.* J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.

154. Walker, L.S., *Regulatory T cells: Folate receptor 4: a new handle on regulation and memory?* Immunol Cell Biol, 2007. **85**(7): p. 506-7.

155. Yamaguchi, T., et al., *Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor.* Immunity, 2007. **27**(1): p. 145-59.

156. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 309-14.

157. Xing, K., et al., *Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy.* BMC Immunol, 2015. **16**(1): p. 39.

158. Murai, M., et al., *Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis.* Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1178-84.

159. Akin, S., et al., *Cytomegalovirus esophagitis precipitated with immunosuppression in elderly giant cell arteritis patients.* Aging Clin Exp Res, 2013. **25**(2): p. 215-8.

160. Toruner, M., et al., *Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2008. **134**(4): p. 929-36.

161. Ziesche, E., et al., *Dexamethasone suppresses interleukin-22 associated with bacterial infection in vitro and in vivo.* Clin Exp Immunol, 2009. **157**(3): p. 370-6.

162. Reber, S.O., et al., *Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis.* Brain Behav Immun, 2011. **25**(6): p. 1153-61.

163. Bergthorsdottir, R., et al., *Premature mortality in patients with Addison's disease: a population-based study.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(12): p. 4849-53.

164. Nieman, L.K. and M.L. Chanco Turner, *Addison's disease.* Clin Dermatol, 2006. **24**(4): p. 276-80.

165. Vegiopoulos, A. and S. Herzig, *Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases.* Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 43-61.

166. Weiss, R.E., *Hypopituitarism: Emergencies*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).

167. Mason, A.S., et al., *Epidemiological and clinical picture of Addison's disease.* Lancet, 1968. **2**(7571): p. 744-7.

168. Lovas, K. and E.S. Husebye, *Replacement therapy in Addison's disease.* Expert Opin Pharmacother, 2003. **4**(12): p. 2145-9.

169. Debono, M., R.J. Ross, and J. Newell-Price, *Inadequacies of glucocorticoid replacement and improvements by physiological circadian therapy.* Eur J Endocrinol, 2009. **160**(5): p. 719-29.

170. Rose, A.J. and S. Herzig, *Metabolic control through glucocorticoid hormones: an update.* Mol Cell Endocrinol, 2013. **380**(1-2): p. 65-78.

171. Erichsen, M.M., et al., *Normal overall mortality rate in Addison's disease, but young patients are at risk of premature death.* Eur J Endocrinol, 2009. **160**(2): p. 233-7.

172. Ranta, F., et al., *Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4.* Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1380-90.

Anexos

8. ANEXOS

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.522.53.0), intitulado "Papel do Eixo Hipotálamo-Pituitária Adrenal (HPA) e Glicocorticóides Exógenos na Modulação da Resposta Imune na Doença Inflamatória Intestinal", de autoria de **Cristina Ribeiro de Barros Cardoso,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.522.53.0), entitled: "Papel do Eixo Hipotálamo-Pituitária Adrenal (HPA) e Glicocorticóides Exógenos na Modulação da Resposta Imune na Doença Inflamatória Intestinal", by **Cristina Ribeiro de Barros Cardoso,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SCIENTIA VINCES