

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da melatonina no controle da colite experimental,
via modulação da microbiota intestinal**

Lia Vezenfard Barbosa

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos da melatonina no controle da colite experimental,
via modulação da microbiota intestinal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Lia Vezenfard Barbosa

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

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.

Vezenfard-Barbosa, Lia

Efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal. Ribeirão Preto, 2020.
85 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP – Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

1. Doença Inflamatória Intestinal. 2. Melatonina. 3. Microbiota Intestinal.

Folha de Aprovação

Nome: Vezenfard-Barbosa, Lia

Título: Efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

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: _____

Dedico esta dissertação de mestrado em memória do
meu pai, Antonio e minha avó, Nair

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram direta ou indiretamente para que fosse possível a realização deste trabalho. E mais especificamente,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

Agradeço imensamente à Prof^a Dr^a Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, pela oportunidade e orientação durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pelas discussões científicas sempre muito calorosas e enriquecedoras e, pelas conversas fora do âmbito acadêmico.

Ao Prof. José Clóvis do Prado Júnior por ter concedido o hormônio melatonina, a qual utilizamos para o desenvolvimento do projeto.

À Dr^a Vânia Brazão Muniz pelos auxílios em experimentos e ideias esclarecedoras para o desenvolvimento destes.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR) Jefferson, Camila, Viviani, Djúlio, Cássia, Iris, Larissa e Murillo, que estiveram presentes durante o mestrado. Em especial, gostaria de agradecer ao Jefferson, Viviani e Camila pela amizade, companheirismo, apoio emocional, além de científico, ao longo dessa caminhada.

Aos colegas pós-graduandos pelo companheirismo, pelas conversas científicas e banais. Obrigada por tornarem os momentos de intervalos na copa sempre mais leves.

Aos colaboradores da FCFRP-USP por tornarem possível a concretização deste trabalho. Em especial à Fabiana, pelo auxílio com os experimentos de citometria.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, por toda presteza e paciência ao longo desses anos.

Aos meus pais, Roseli e Antonio, por nunca duvidarem do meu potencial e sempre serem local de apoio e fortalecimento. Sem vocês, essa jornada não teria sido completa.

Ao meu irmão, Gabriel, por ser fonte de alegria e amor, tornando meus dias cansados, mais leves e divertidos.

Aos meus queridos avós, Nair e Osvaldo, por todo amor incondicional e por toda confiança que depositaram em mim.

Aos meus amigos que estiveram presentes no decorrer do desenvolvimento do projeto e durante a escrita científica. Obrigada pelos momentos de descontração que me fortaleceram a cada dia.

A Deus, pela fonte de apoio espiritual ao longo dessa jornada de construção e busca pelo conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece”

Benjamin Disraeli

RESUMO

VEZENFARD-BARBOSA, Lia. **Efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal.** 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As Doenças Inflamatórias Intestinais resultam de resposta imune desregulada, com o envolvimento da microbiota intestinal, susceptibilidade genética e fatores ambientais, promovendo inflamação crônica e ampla destruição tecidual. Estudos recentes descrevem efeitos do hormônio melatonina (MLT) em doenças inflamatórias, controlando as respostas imunes. Além da ação da MLT sobre o ritmo circadiano de humanos, a molécula pode também modular o ciclo de bactérias intestinais e exercer ação imunomoduladora. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do tratamento com MLT na colite experimental, tanto na fase aguda de indução da inflamação, quanto no período de remissão e reparo tecidual. Além disso, buscamos verificar se a presença da microbiota intestinal modifica a resposta inflamatória frente ao tratamento com o hormônio. Para isso, camundongos machos C57BL/6 foram expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) e tratados com MLT. Em animais avaliados durante a fase aguda, a MLT promoveu aumento do escore clínico, maior número de leucócitos, especificamente, células mononucleares e neutrófilos, no sangue periférico. No cólon, foi observado aumento de fator de necrose tumoral (TNF), em contraste à redução de interleucina 17 (IL-17). Em camundongos avaliados durante a fase de reparo da colite, a MLT levou à maior perda de peso corporal, elevado escore clínico, maior número de células mononucleares e neutrófilos circulantes. Houve maior recrutamento de neutrófilos e macrófagos no cólon, quantificada indiretamente pelos ensaios de mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente. O hormônio promoveu também expressivo aumento de TNF, maior frequência de linfócitos T CD4 ou CD8 de memória efetores e redução da população de células T reguladoras FoxP3⁺ no baço, além de aumento de linfócitos T CD4 de memória residente nos linfonodos mesentéricos (MLN), na fase de remissão da inflamação. Para averiguar se os efeitos da MLT ocorriam via microbiota intestinal, os camundongos foram submetidos à antibioticoterapia previamente à indução da colite. De fato, os resultados mostraram que os animais tratados com o hormônio, na ausência da microbiota intestinal, apresentaram reversão do fenótipo clínico da doença, em comparação com a fase aguda e remissão da colite. O tratamento com MLT induziu menor perda de peso e escore clínico, além de redução do número de células mononucleares no sangue periférico. No cólon, houve redução de TNF e NAG, enquanto que nos linfonodos mesentéricos, foi observado aumento de células produtoras das citocinas IL-4 e IL-10, em contraste à redução de CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ na ausência de antibioticoterapia. As populações de linfócitos de memória não foram mais alteradas em animais com depleção da microbiota. Em ensaios *ex vivo*, linfócitos do baço e MLN de camundongos sem depleção da microbiota apresentaram maior proliferação celular em relação à frequência proliferativa após a antibioticoterapia. Esses resultados corroboram com os efeitos do hormônio via microbiota intestinal. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a MLT agrava a colite experimental, tanto na fase aguda quanto na remissão da inflamação, sendo seus principais efeitos dependentes da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Doenças Inflamatórias Intestinais. Melatonina. Microbiota Intestinal.

ABSTRACT

VEZENFARD-BARBOSA, Lia. **Effects of melatonin in the control of experimental colitis, via modulation of the intestinal microbiota.** 2020. 85p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Inflammatory Bowel Diseases result from an unregulated immune response, with the involvement of intestinal microbiota, genetic susceptibility and environmental factors, which together promote chronic inflammation and extensive tissue destruction. Recent studies described the effects of the hormone melatonin (MLT) in inflammatory diseases, controlling immune responses. In addition to the action of MLT on the circadian rhythm of humans, this molecule can also modulate the cycle of intestinal bacteria and exert an immunomodulatory action. In this regard, the aim of this study was to evaluate the influence of MLT treatment on experimental colitis, in the acute phase of inflammation as well as during disease remission and tissue repair. In addition, we investigated the role of the intestinal microbiota in the MLT's modulation of the gut inflammatory response. For that, male C57BL/6 mice were exposed to dextran sulfate sodium (DSS) and treated with melatonin (MLT). In animals evaluated during the acute phase, MLT promoted increased clinical score, besides augmented number of mononuclear cells and neutrophils in the peripheral blood. We also detected a high concentration of tumor necrosis factor (TNF) and reduced interleukin 17 (IL-17) in the colon. During the remission of inflammation, MLT induced greater loss of body weight, increased clinical score and elevated number of leukocytes in the bloodstream, represented by mononuclear cells and neutrophils. Furthermore, there was augmented activity of neutrophils and macrophages in the colon, as detected by myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglycosaminidase (NAG) assays, respectively. The hormone also promoted a significant increase in TNF and in the frequency of effector memory T lymphocytes, along with reduced FoxP3⁺ regulatory T cells in the spleen. In addition, there was an increase in resident memory T CD4 lymphocytes in the mesenteric lymph nodes (MLN), during remission phase. However, in the absence of intestinal microbiota, the inflammatory effects of MLT were milder and mice had a reversal of the disease phenotype. The treatment reduced body weight loss and clinical score. Also, MLT after antibiotic therapy led to a decrease in the number of mononuclear cells in the peripheral blood and to reduced TNF and NAG in the colon. In the mesenteric lymph nodes we observed an increase in cells producing IL-4 and IL-10 cytokines, in contrast to the reduction in CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ lymphocytes in mice with colitis and in the absence of antibiotic therapy. The memory lymphocyte populations were no longer altered in animals with microbiota depletion. *Ex vivo* assays with lymphocytes from spleen and MLN of colitis mice treated with MLT showed augmented cell proliferation in contrast to the proliferative frequency after antibiotic therapy. These results corroborate the effects of the hormone via intestinal microbiota. In conclusion, our results showed that MLT aggravates experimental colitis, both in the acute phase and in the remission of inflammation and its main effects depend on the intestinal microbiota.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Melatonin. Intestinal Microbiota.

LISTA DE FIGURA

Figura 1.	Delineamento do experimento piloto.....	20
Figura 2.	Caracterização do modelo e estudo preliminar dos efeitos da melatonina na colite experimental.	21
Figura 3.	Desenho experimental durante a fase de indução da inflamação intestinal.....	22
Figura 4.	Avaliação do peso e escore durante a fase de indução da inflamação intestinal.....	22
Figura 5.	Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico durante a fase de indução da inflamação intestinal.....	23
Figura 6.	Proliferação celular durante a fase de indução da inflamação intestinal.....	23
Figura 7.	Efeito da melatonina na produção de citocinas no cólon durante a fase de indução da inflamação intestinal.	24
Figura 8.	Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação microbiana durante a fase de indução da inflamação intestinal.	25
Figura 9.	Desenho experimental do protocolo de indução de colite e fase de reparo da inflamação intestinal.....	25
Figura 10.	Avaliação do peso e escore de camundongos na fase de reparo da colite experimental.....	26
Figura 11.	Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	27
Figura 12.	Avaliação funcional ex vivo de células do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	27
Figura 13.	Avaliação das citocinas produzidas no baço durante a fase de reparo da inflamação intestinal, frente ao tratamento com melatonina.....	28
Figura 14.	Imunofenotipagem dos linfócitos do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	29
Figura 15.	Imunofenotipagem de T reguladoras do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	30

Figura 16.	Cultura ex vivo de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	31
Figura 17.	Citocinas intracelulares de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	32
Figura 18.	Imunofenotipagem dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	32
Figura 19.	Imunofenotipagem de células T reguladoras dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	33
Figura 20.	Avaliação do infiltrado intestinal de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	34
Figura 21.	Efeito da melatonina na produção de citocinas intestinais durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	34
Figura 22.	Avaliação da permeabilidade intestinal de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.....	35
Figura 23.	Desenho experimental do protocolo de depleção da microbiota, indução de colite e reparo da inflamação intestinal.....	36
Figura 24.	Avaliação do peso e escore de camundongos submetidos à colite experimental pós depleção da microbiota intestinal.....	36
Figura 25.	Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota e tratamento com melatonina.....	37
Figura 26.	Proliferação de células do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção de microbiota.....	38
Figura 27.	Citocinas intracelulares de células do baço durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	38
Figura 28.	Imunofenotipagem dos linfócitos do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	39
Figura 29.	Imunofenotipagem de T reguladoras do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	41
Figura 30.	Proliferação de células dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção de microbiota.....	42

Figura 31.	Citocinas intracelulares de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	42
Figura 32.	Imunofenotipagem dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	43
Figura 33.	Imunofenotipagem de T reguladoras dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	44
Figura 34.	Avaliação do infiltrado intestinal durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	45
Figura 35.	Efeito da melatonina na produção de citocinas intestinais durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância simples
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBA	Do inglês “ <i>Cytometric Bead Array</i> ”
CD	Doença de Crohn, do inglês “ <i>Crohn’s disease</i> ”
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, do inglês “ <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> ”
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNBS	Ácido dinitrobenzeno sulfônico, do inglês “ <i>Dinitrobenzene Sulfonic Acid</i> ”
DO	Densidade Óptica
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês “ <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> ”
EPO	Eosinófilo-peroxidase (enzima)
FACS	Separação de células ativada por fluorescência, do inglês “ <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> ”.
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês “ <i>fluorescein isothiocyanate</i> ”
FoxP3	Do inglês “ <i>Forkhead box P3</i> ”
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
g	Gramma
GITR	Membro da superfamília do receptor de TNF induzido por glicocorticoides, do inglês “ <i>glucocorticoid-induced TNF receptors Family</i> ”
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
L	Litro

LIR	Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação
Kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal, do inglês “ <i>major histocompatibility complex</i> ”
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MLN	Linfonodos Mesentéricos, do inglês “ <i>mesenteric lymph nodes</i> ”
MLT	Melatonina
MPO	Mieloperoxidase (enzima)
n	Número
nm	Nanômetros
NAG	N-acetilglicosaminidase (enzima)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NK	Exterminadora natural (célula), do inglês “ <i>natural killer</i> ”
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
pg	Picograma
pM	Picomolar
PMA	Forbol Miristato Acetato, do inglês “ <i>Phorbol myristate acetate</i> ”
LPS	Lipopolissacarídeo
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa, do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
SBF	Soro Fetal Bovino, do inglês
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TCM	Linfócitos T de memória central
TEM	Linfócitos T de memória efetora
TRM	Linfócitos T de memória residente
Th	Linfócito T auxiliar, do inglês “ <i>helper</i> ”

TMB	Tetrametilbenzidina
TNBS	Ácido Trinitro-Benzensulfônico, do inglês “ <i>Trinitrobenzenesulfonic Acid</i> ”
TNF	Fator de Necrose Tumoral, do inglês “ <i>tumor necrosis factor</i> ”
Treg(s)	Linfócito(s) T regulador(es)
UC	Colite Ulcerativa, do inglês “ulcerative colitis”
USP	Universidade de São Paulo
VPD	Do inglês “ <i>Violet Proliferation Dye</i> ”
WT	Camundongos do tipo selvagem, do inglês “ <i>wild type</i> ”.

LISTA DE SÍMBOLOS

γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
<	Menor
μ	Micro
%	Porcentagem
tm	Do inglês “ <i>trade mark</i> ”

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURA	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais.....	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Indução de colite experimental	2
1.4. Resposta imune na doença inflamatória intestinal e o envolvimento da microbiota	3
1.5. Tratamentos para Doenças Inflamatórias Intestinais.....	4
1.6. Melatonina	5
1.7. Melatonina em Doenças Inflamatórias Intestinais	6
1.8. Justificativa.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais	11
3.2. Indução de inflamação intestinal experimental.....	12
3.3. Tratamentos controle e com melatonina.....	12
3.4. Depleção da microbiota intestinal	12
3.5. Avaliação dos escores clínico e pós-morte.....	12
3.6. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras	13
3.7. Contagem total e diferencial de leucócitos e separação do soro	13
3.8. Quantificação indireta de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos	14
3.9. Ensaio de permeabilidade intestinal por FITC-Dextran e dosagem de LPS no soro	14
3.10. Proliferação com <i>Violet Proliferation Dye 450</i>	15
3.11. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas por ELISA	15
3.12. Dosagem de citocinas por CBA.....	16
3.13. Imunofenotipagem de células de baço e linfonodos mesentéricos	16
3.14. Análise estatística	17
4. RESULTADOS.....	20

4.1 Avaliação clínica dos efeitos da melatonina em camundongos submetidos à colite experimental: ensaio piloto.....	20
4.2. Avaliação clínica dos efeitos da melatonina em camundongos submetidos à colite experimental em ensaios de indução da inflamação – fase aguda.....	21
4.3. Quantificação de leucócitos circulantes e proliferação de células do baço	22
4.4. Influência da melatonina na produção de citocinas no cólon.....	24
4.5. Efeito da melatonina na permeabilidade intestinal e translocação microbiana	25
4.6. Efeito do tratamento prolongado com melatonina na fase de reparo intestinal.....	25
4.7. Efeito do tratamento prolongado com melatonina nos leucócitos do sangue periférico, durante a fase de reparo intestinal	26
4.8. Proliferação celular e imunofenotipagem dos leucócitos do baço.....	27
4.9. Proliferação celular e imunofenotipagem dos leucócitos dos linfonodos mesentéricos.....	31
4.10. Influência da melatonina no infiltrado inflamatório e na produção de citocinas no cólon .	33
4.11. Efeito do tratamento prolongado com melatonina na avaliação da permeabilidade intestinal durante o reparo da inflamação intestinal	35
4.12. Participação da microbiota intestinal nos efeitos moduladores da melatonina durante a colite experimental	35
4.13. Efeito do tratamento prolongado com melatonina nos leucócitos do sangue periférico durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	37
4.14. Avaliação do efeito da melatonina nas células do baço durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota	37
4.15. Avaliação do efeito da melatonina nas células dos linfonodos mesentéricos durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.....	41
4.16. Influência da melatonina no infiltrado inflamatório e na produção de citocinas no cólon de camundongos durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	64

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais

Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são caracterizadas por desordens que cursam com inflamação crônica no trato gastrointestinal e perturbação em seu funcionamento normal. A Doença de Crohn (CD) e Colite Ulcerativa (UC) são as principais formas definidas, denominadas DII (1). Os sinais clínicos são variáveis e dependentes da extensão e gravidade das lesões. Ambas apresentam sintomas como dores abdominais, diarreia recorrente, presença de sangue nas fezes, perda de peso, febre e fadiga, além do aumento do risco de câncer de cólon (2). As DII foram associadas também ao aumento da mortalidade devido às complicações da própria doença ou por patologias extra intestinais, como doenças cardiovasculares e pulmonares (3) além de câncer cólon-retal e do trato biliar (4, 5).

Cada doença possui também características específicas. Pacientes acometidos pela UC podem apresentar manifestações como irritação perianal, fissuras, hemorroidas, fistulas e abscessos (6). A UC cursa com inflamação contínua na região do cólon e reto, geralmente afetando apenas a camada mucosa da parede intestinal (7). Diferentemente, a CD pode levar à resposta inflamatória em qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus. Entretanto, afeta predominantemente a região do íleo (porção terminal do intestino delgado) e cólon (intestino grosso). A inflamação pode ocorrer de forma descontínua, sendo comum a presença de regiões saudáveis entre regiões acometidas pela doença. Além disso, pode afetar todas as camadas da parede do intestino. É frequentemente associada a complicações como estenoses, obstrução e fístulas entre segmentos intestinais ou com outros órgãos não conectados ao intestino (2, 8).

As DII acometem principalmente jovens-adultos e não possuem cura. Embora a maioria de novos diagnósticos sejam realizadas nessa faixa etária, estas enfermidades podem afetar indivíduos em qualquer idade, desde a infância até a idade senil (9, 10). O diagnóstico é estabelecido por uma combinação de fatores ao abordar diferentes aspectos da inflamação. Inicialmente são descartadas causas infecciosas. Para a identificação dessas doenças é analisado o histórico médico, realizada avaliação clínica, além de exames endoscópicos, histopatológicos e radiológicos (1).

A etiologia das DII não foi ainda esclarecida completamente; no entanto, evidências sugerem que são doenças de origem multifatorial. Sabe-se que ocorre a interação entre a desregulação das respostas imunes, susceptibilidade genética (11, 12), influência da microbiota intestinal, além do envolvimento de fatores ambientais (13), para o surgimento das doenças.

Em indivíduos saudáveis, a associação balanceada entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico promove a manutenção da tolerância imunológica, permitindo equilíbrio entre a indução de respostas efetoras a agentes patogênicos e tolerância a antígenos inócuos (14).

1.2. Epidemiologia

A ocorrência dessas desordens pode variar conforme a região geográfica, sendo que a maioria dos casos relatados são em países industrializados. Entretanto, durante as últimas décadas a incidência e a prevalência destas doenças aumentaram globalmente (10, 15). Estimativas futuras indicam aumento exponencial no número de casos em países desenvolvidos e recém-industrializados até 2025, demonstrando acometimento em pessoas de diversas regiões do mundo (10).

A exemplo do Brasil, no estado de São Paulo, a prevalência é de 52,6 casos para cada 100.000 indivíduos (16) e no Espírito Santo é de 38,2 casos/100.000 pessoas (17), enquanto que no estado do Piauí a prevalência é de 12,8 casos/100.000 indivíduos (18). Estes estudos populacionais indicam, além do aumento na incidência e prevalência das DII ao longo do tempo, um maior número de casos em regiões mais desenvolvidas do Brasil (19), o que corrobora os estudos mundiais.

1.3. Indução de colite experimental

Ainda que os modelos experimentais não reproduzam toda a complexidade das DII em humanos, são ferramentas de grande importância para investigação das mesmas. Diferentes modelos animais têm sido utilizados para a indução de colite experimental e proporcionar o estudo das alterações imunológicas em DII. Os modelos podem ser classificados em 4 categorias: modelos químicos, modelos geneticamente modificados, modelos de transferência de células e modelos congênitos (20).

Os modelos químicos de indução de colite intestinal em murinos são os mais utilizados devido ao possível controle do início, duração e intensidade da colite. Os modelos de indução por dextran sulfato de sódio (DSS), ácido trinitrobenzeno (TNBS) e oxazolona são bem estabelecidos e amplamente utilizados (21). Dentre estes, a colite induzida por DSS apresenta algumas vantagens devido à sua facilidade, controlabilidade e reprodutibilidade. Dependendo do objetivo do estudo, o desenvolvimento de colite aguda, crônica ou recidiva, pode ser controlada por meio da mudança de concentração e frequência de administração do DSS (22, 23).

O DSS é um polissacarídeo sulfatado solúvel em água. Possui peso molecular variável, de 5 a 1400 kDa, e para a indução de inflamação intestinal em camundongos, estes devem ser expostos a 40-50 kDa de DSS. A colite ocasionada por esse agente colitogênico é semelhante morfológica e sintomaticamente aos danos epiteliais encontrados na colite em humanos; no entanto, o DSS não induz diretamente a inflamação intestinal. O mecanismo pelo qual atua é através de sua toxicidade química ao atingir o cólon, o que resulta em lesão tecidual. Nesse sentido, há ruptura da monocamada de células epiteliais do intestino, favorecendo maior translocação bacteriana e antígenos associados à mucosa, promovendo uma resposta pró-inflamatória (23).

1.4. Resposta imune na doença inflamatória intestinal e o envolvimento da microbiota

Células do sistema inato existentes na mucosa intestinal expressam receptores que reconhecem e respondem rapidamente a antígenos microbianos presentes na parede celular bacteriana. A exposição contínua a esses antígenos promove a regulação da resposta imunológica, mantendo um equilíbrio entre tolerância e defesa do organismo. A ativação do sistema imune inato induz, em sequência, as respostas adaptativas. Há a regulação de subgrupos de linfócitos T (Th1, Th2, Th17 e Treg) para manutenção do equilíbrio. Falhas na homeostase intestinal, como a expansão e hiperatividade de células efectoras em contraste com deficiência de mecanismos reguladores levam à inflamação intestinal. A inflamação é caracterizada por reações exacerbadas direcionadas a antígenos próprios, derivados da microbiota e ambientais (14).

A microbiota intestinal de mamíferos é composta por uma comunidade que inclui bactérias, fungos, vírus e protozoários. Desses organismos, a maior parte são bactérias. No intestino de adultos saudáveis há mais bactérias que células no corpo humano, sendo aproximadamente 100 trilhões (24). Em camundongos, a maioria das bactérias intestinais pertence a 4 filos principais: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria (25), enquanto em humanos os 2 filos principais são Bacteroidetes e Firmicutes (24).

A microbiota desempenha papel fundamental na indução, treinamento e função do sistema imunológico do hospedeiro, assim como no desenvolvimento de enfermidades. Pacientes acometidos por DII apresentam disbiose intestinal, ou seja, variações nas populações de bactérias, fungos e vírus presentes no intestino. Esta disbiose está relacionada ao desequilíbrio de microrganismos comensais e patogênicos no intestino (14). No trato gastrointestinal, as infecções de mucosa agudas são caracterizadas por disbiose. As bactérias comensais atuam na regulação do sistema imunológico, enquanto bactérias patogênicas causam

disfunções na imunidade por possuírem propriedades invasivas e inflamatórias. Dessa forma, a quebra da normobiose pode propiciar inflamação exacerbada e desenvolvimento de doenças.

Em decorrência da quebra da tolerância imunológica, as inflamações podem tornar-se crônicas, caracterizadas por exacerbado infiltrado de células imunes no tecido intestinal. Várias populações leucocitárias, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e linfócitos, participam da patogênese dessas doenças (2, 26). O acúmulo de células nos locais de inflamação contribui para o agravamento da lesão tecidual através da produção de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 23 (IL-23), interferon γ (IFN- γ) e citocinas da via IL-23/Th17, Th1, dentre outras (2). A produção de quimiocinas resulta no recrutamento de leucócitos adicionais, propiciando um ciclo de inflamação. Na doença de Crohn, a imunidade é mediada pelo perfil de resposta Th1, com aumento da produção de interleucina 12 (IL-12), IFN- γ e TNF. Em contraste, na colite ulcerativa, o perfil de resposta inflamatória é mediado por células Th2, com aumento na interleucina-13 (IL-13) e interleucina-4 (IL-4). Em ambas, há infiltrado inflamatório com padrão de resposta Th17, caracterizado pela produção de interleucinas 17A, 17F e 22 (27, 28).

1.5. Tratamentos para Doenças Inflamatórias Intestinais

No que concerne aos tratamentos, há um crescente aumento na quantidade e variedade de medicamentos que visam o controle e redução dos processos inflamatórios exacerbados presentes nestas doenças e, para a escolha da melhor abordagem terapêutica, é analisado o tipo de doença, as características individuais de cada paciente e os locais afetados (29). Embora os tratamentos para DII possam apresentar resultados promissores, estes medicamentos têm eficácia limitada e respostas variáveis, podendo culminar em resultados imprevisíveis. A terapia ideal deve reduzir a inflamação, induzir remissão clínica a longo prazo, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, além de não levar à imunossupressão exacerbada (30).

Geralmente, a escolha dos medicamentos ocorre por etapas (29) e podem incluir ácido aminosalicílico, corticosteroides, antibióticos, agentes imunossupressores e imunorreguladores, como os imunobiológicos (31-33). No entanto, pode haver efeitos colaterais significativos ou não responsividade pelos pacientes e, por essas razões, é importante identificar novas abordagens terapêuticas a fim de reduzir a inflamação crônica presente nestas doenças, sem prejudicar a resposta inflamatória fisiológica.

1.6. Melatonina

Pesquisas recentes vêm destacando o efeito do tratamento em conjunto com o hormônio melatonina (MLT) na modulação da resposta nas DII. Em 1958, a MLT foi isolada da glândula pineal bovina. Inicialmente foi identificada como um hormônio produzido exclusivamente pela glândula pineal e posteriormente foi descrita sua produção em órgãos não endócrinos, como nos olhos, pele, timo, medula óssea e trato gastrointestinal (34, 35). A MLT sintetizada pela glândula pineal é dependente da estimulação hipotalâmica e sua secreção diária é controlada pelo ritmo circadiano sincronizado ao ciclo claro/escuro, característico do dia e da noite. A secreção de MLT proveniente da pineal ocorre predominantemente no período noturno e sua síntese é inibida pela luz. Em contrapartida, a secreção de MLT por fontes extra pineais parece não estar relacionada ao fotoperíodo (36, 37).

É uma molécula presente em animais vertebrados e invertebrados, além de bactérias, algas, plantas e fungos (38-43). Por muito tempo, a MLT foi considerada apenas pela sua função no controle do ritmo circadiano dos organismos. Porém, ademais das funções cronobiológicas, estudos recentes ressaltam os importantes efeitos da MLT como anti-inflamatória, antioxidante, oncostática e imunomoduladora (44-47). Sua síntese ocorre a partir do triptofano e para sua produção é necessária a ação de algumas enzimas. Altas concentrações de MLT e a maquinaria enzimática essencial para sua catálise foi descrita em linfócitos humanos (48) e células da medula óssea de humanos e camundongos (49), além de ser encontrada em mastócitos (50), células NK, eosinófilos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e no timo (34, 51).

No trato gastrointestinal há altas concentrações de MLT oriunda de outras partes do organismo, além da síntese feita pelas células enterocromafins presentes no tecido intestinal (52-54). É interessante destacar que, no intestino, a quantidade de MTL encontrada é maior que os níveis em qualquer outro órgão, inclusive na glândula pineal, sugerindo efeitos fundamentais dessa molécula no trato gastrointestinal (36, 37).

A MLT tem capacidade de modular a resposta imune através de mecanismo diretos, por meio de sua interação com radicais livres, ou ação dependente de receptores. Há três tipos de receptores do hormônio, sendo os receptores de membrana, o receptor citosólico e os receptores nucleares. Os receptores de membrana, denominados MT1 e MT2, são acoplados à proteína G. Há um terceiro receptor de membrana para a MLT, o MT3, que não apresenta alta afinidade de ligação e a ação da MLT ocorre através da interação com a enzima quinona redutase (55). Os receptores nucleares para a MLT pertencem à família do receptor órfão do ácido retinoico (ROR) e receptor Z retinoico (RZR) (34). As células do sistema imune podem

responder à MLT por via indireta ou dependente de receptores de membrana e nucleares, regulando assim, respostas celulares e humorais (51, 55).

1.7. Melatonina em Doenças Inflamatórias Intestinais

Em referência às DII, há estudos controversos sobre o impacto do hormônio frente a inflamação intestinal. Resultados obtidos em modelos animais apontaram para o efeito benéfico da MLT, devido à redução dos sintomas e gravidade da doença (56-58). Nessa perspectiva, em um relato de caso foi destacado a menor recorrência de sintomas clínicos após uso do hormônio (3 mg/dia) em um paciente acometido por UC. No entanto, o mesmo efeito não foi observado em casos reportados por pacientes durante a remissão clínica da DC (59) e UC (60), quando houve recidiva da doença ativa após a autoadministração de cápsulas de MLT (3 mg/dia). Em ambos os casos, após o a suspensão do uso do hormônio, houve remissão completa dos sintomas. Ainda em uma investigação em ratos, a utilização da MLT resultou em efeitos benéficos no tratamento agudo, enquanto o tratamento crônico agravou a colite (61).

Além dos efeitos que a MLT pode exercer sobre as células do sistema imune na melhora ou piora da colite, estudos recentes sugerem que o microbioma intestinal também é influenciado pela ação de MLT. Foi relatado que pelo menos uma espécie de bactéria intestinal, a *Enterobacter aerogenes*, responde à MLT apresentando ritmo circadiano (62). O ciclo circadiano em vertebrados resulta da expressão rítmica de “*clock genes*” e o sistema gastrointestinal também apresenta a expressão desses genes em um padrão circadiano (63). É apontado ainda, que o relógio circadiano presente na microbiota intestinal é coordenado pelo relógio do hospedeiro, com envolvimento da MLT (62, 63).

1.8. Justificativa

As DII afetam milhares de pessoas em todo o mundo, são caracterizadas por inflamação crônica e ampla destruição tecidual. Essas desordens resultam de resposta imune desregulada, envolvendo fatores como susceptibilidade genética, microbiota intestinal e influências ambientais. Estudos controversos demonstraram os efeitos da MLT nas DII, com resultados benéficos e melhora da doença ou relatos de piora da inflamação. Portanto, a literatura atual é inconclusiva. A MLT está presente em diversos tecidos e órgãos, inclusive no trato gastrointestinal, podendo atuar modulando a inflamação. Ademais, estudos recentes, apontam para a ação do hormônio em bactérias intestinais de camundongos e humanos. Sabe-se também que alterações na microbiota intestinal desempenham importante papel na etiologia dessas afecções; entretanto, não é conhecido o efeito da MLT nas disbiose em modelos de colite

experimental. Portanto, é de extrema relevância estudos que visem avaliar os efeitos desse hormônio nas DII. Neste contexto, o presente trabalho visou esclarecer os efeitos da MLT durante a indução da colite e no momento de reparo da inflamação, após a retirada do agente colitogênico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do uso da melatonina na fase aguda da colite experimental.

Avaliar os efeitos da melatonina durante a remissão do processo inflamatório, em modelo de colite experimental.

Avaliar os efeitos da melatonina no reparo da inflamação, pós depleção da microbiota, em modelo de colite experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos *wild type* C57BL/6, machos, entre 6-8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunoendocrinologia e Regulação (LIR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em ambiente limpo, silencioso, condições normais de umidade e temperatura e, com ciclo claro e escuro de 12h. Os camundongos foram mantidos com água e comida *ad libitum* durante todo o experimento. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de ética em pesquisa animal, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFRP/USP [Protocolo 17.1.1073.60.3 (Anexos A e B)].

Para avaliação do potencial efeito da MLT no modelo de colite, os animais foram avaliados em diferentes tempos e condições. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais: grupo 0: utilizado para padronização do experimento, sendo animais expostos ao dextran sulfato de sódio (DSS) durante 10 dias e tratados diariamente com solução veículo (n=5) ou melatonina (n=5), a partir do terceiro dia de indução de colite até o 15º dia. Os animais foram analisados até o 36º dia, quando foram eutanasiados. Grupo I (n=5): animais controles naïve sem nenhuma intervenção experimental. Os grupos experimentais II e III foram avaliados no momento de indução da colite. Ambos os grupos são constituídos por animais expostos ao DSS durante 7 dias e eutanasiados nesse dia. O grupo II (n=15) foi tratado diariamente com solução veículo a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 6º dia. O grupo III (n=15) foi tratado diariamente com melatonina a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 6º dia. Os grupos IV e V foram avaliados durante o reparo da colite, após a retirada do DSS. Inicialmente foram expostos ao DSS durante 7 dias e, eutanasiados no dia 13. Animais do grupo IV (n=15) foram tratados diariamente com solução veículo a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 12º dia. Animais do grupo V (n=15) foram tratados diariamente com solução de melatonina a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 12º dia. Em contrapartida, para análise da ação da melatonina sem a presença da microbiota intestinal, grupos VI e VII, os camundongos tiveram a microbiota depletada através da antibioticoterapia realizada durante 10 dias. Logo após esse período, os animais foram submetidos à indução de colite durante 7 dias. A avaliação destes grupos, que foram submetidos à depleção da microbiota, também ocorreu na fase de reparo da colite, sendo realizada a eutanásia no 13º dia após início da indução da inflamação. O Grupo VI (n=15) foi tratado com solução veículo a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 12º dia. O grupo VII

(n=15) foi tratado diariamente com solução de melatonina a partir do 3º dia de indução de inflamação intestinal até o 12º dia.

3.2. Indução de inflamação intestinal experimental

A colite foi induzida com um único ciclo de administração exclusiva de água contendo DSS 3%, disponibilizada aos camundongos pelo período de 10 dias para o experimento de padronização e 7 dias para os outros experimentos.

3.3. Tratamentos controle e com melatonina

A MLT foi administrada aos camundongos por via oral (gavagem), na concentração de 10 mg/kg (64). A diluição foi realizada diariamente em 1% de etanol e solução salina isotônica a 0,9% (65). Para os animais controles dos experimentos, solução salina isotônica a 0,9%, acrescida de 1% de etanol (denominada solução veículo), foi administrada por gavagem.

3.4. Depleção da microbiota intestinal

Para a depleção da microbiota intestinal, os camundongos foram tratados com a associação de 5 antibióticos diluídos em água estéril: ampicilina sódica (Nova Farma Indústria Farmacêutica, Anápolis, Goiás, Brasil – 1 g/L), sulfato de neomicina (Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil – 1 g/L), metronidazol (Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil – 1 g/L), sulfato de gentamicina (Pharmanostra, Rio de Janeiro, Brasil – 1 g/L) e cloridrato de vancomicina (Nova Farma Indústria Farmacêutica, Anápolis, Goiás, Brasil - 0,5 g/L). Esses antibióticos foram administrados diariamente por gavagem, pelo período de 10 dias, previamente às intervenções.

3.5. Avaliação dos escores clínico e pós-morte

Os camundongos foram avaliados diariamente para análise dos sinais clínicos da colite. Cada sinal apresentado pelo camundongo correspondeu a um ponto e a soma dos pontos de cada animal gerou um escore clínico diário. Os parâmetros avaliados foram perda de peso, região perianal umedecida, presença de diarreia, pus, sangue nas fezes, hipoatividade e/ou piloereção. Para a perda de peso, animais que apresentaram perda diária entre 5% e 10% obtinham 1 ponto atribuído ao escore diário, e aqueles com perda diária maior que 10% receberam 2 pontos. Para os outros parâmetros analisados, os animais obtinham 1 ponto no escore diário. Na ausência de cada um desses sinais a pontuação correspondia a zero. O escore clínico geral foi realizado através da somatória do escore clínico diário de cada animal. A soma

do escore clínico diário de todos os animais, durante todo o protocolo experimental, foi avaliada através do índice denominado escore acumulado.

3.6. Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Ao término dos protocolos experimentais os camundongos foram eutanasiados por deslocamento de cervical, após serem anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg). O cólon foi dividido em fragmentos para avaliações imunológicas e de inflamação tecidual. Destes fragmentos, um foi imerso em PBS/formaldeído 10% para inclusão em parafina e análise histopatológica. Os outros fragmentos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido para os ensaios de qPCR, ELISA, MPO/NAG e EPO. Houve também coleta do baço e linfonodos mesentéricos (MLN) para dosagem de citocinas e ensaios celulares. O sangue foi coletado para contagem de células totais e específicas e obtenção de soro.

3.7. Contagem total e diferencial de leucócitos e separação do soro

A contagem global de células foi realizada pela diluição de sangue total em solução de Turk na proporção 1:20. As células localizadas nos quatro quadrantes externos ao retículo do hemocítmetro/câmara de Neubauer foram contadas e a concentração foi expressa por mL de sangue. O esfregaço sanguíneo foi corado com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), que se utiliza do princípio de coloração hematológica de Romanowsky. As células foram quantificadas em microscópio (DM750, Leica, Wetzlar, Alemanha) com objetiva de imersão em óleo. O exame foi realizado na parte mais fina da extensão contando-se um total de 100 células. A contagem foi feita anotando-se separadamente cada tipo de leucócito identificado (neutrófilos, células mononucleares, eosinófilos e basófilos). A quantidade absoluta de células foi calculada multiplicando-se a frequência relativa dos leucócitos pelo número total de células obtido na contagem no hemocítmetro; o produto resultante foi dividido por 100 e expresso como número de células por mL de sangue.

O soro foi obtido pela centrifugação do sangue total a 5000 g, por 20 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.

3.8. Quantificação indireta de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos

A quantificação indireta da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em fragmentos do cólon foi realizada pela determinação da atividade de enzimas características dessas populações celulares, como mieloperoxidase (MPO), eosinófilo-peroxidase (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente, como descrito previamente (66). Resumidamente, os fragmentos intestinais foram homogeneizados e as hemácias foram lisadas. As células remanescentes foram lisadas para extração das enzimas, que foram quantificadas no sobrenadante do extrato celular.

Para a dosagem de MPO, o sobrenadante foi incubado com o conjunto de reagentes de substrato TMB (Tetrametilbenzidina - BD Bioscience, San Diego, CA, EUA). A reação foi interrompida e absorvância foi determinada a 450 nm. Para dosagem de NAG, foi utilizado o sobrenadante do ensaio de MPO, e a atividade do NAG foi medida pela adição de p-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glicopiranosídeo e tampão de citrato. Após a incubação, a reação foi interrompida e a absorvância foi determinada a 405 nm. Para a determinação de EPO, o sobrenadante resultante foi colocado em reação com o substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA). A reação foi interrompida e absorvância foi determinada a 492 nm.

As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (BioTek ELx808; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Todos os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) corrigidos pelo peso do tecido em gramas (g).

3.9. Ensaio de permeabilidade intestinal por FITC-Dextran e dosagem de LPS no soro

O ensaio de permeabilidade intestinal foi realizado para avaliar a função da barreira usando o método de quantificação de FITC-Dextran, presente no soro dos animais. Em resumo, ração e água foram retirados 12 horas antes da eutanásia dos animais, seguido da administração oral do marcador de permeabilidade na concentração de 44 mg/100 g peso corporal de Dextran acoplado ao fluoróforo FITC (PM 4000; FD4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). O soro foi coletado 4 horas após a eutanásia e a intensidade de fluorescência foi determinada pela leitura da absorvância das amostras por espectrofotometria (excitação, 483 nm; emissão, 525 nm). As concentrações de FITC-Dextran no soro foram determinadas usando uma curva padrão gerada por diluição em série de FITC-Dextran, variando de 2000 a 0,06 μ g/mL.

A dosagem sérica de LPS foi realizada pelo kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000TM (LONZA, Walkersville, MD, USA), de acordo com as especificações do

fabricante, para aferir prováveis translocações bacterianas e quebra de barreira intestinal durante a inflamação intestinal.

3.10. Proliferação com *Violet Proliferation Dye 450*

Para o ensaio de proliferação, baço e MLN provenientes dos grupos experimentais de indução, reparo e antibioticoterapia foram imersos em meio de cultura RPMI contendo 5% de soro bovino fetal (SBF). As amostras foram maceradas com auxílio de uma peneira (*Cell Strainer*, 70 µm, BD Biosciences) e mantidas em gelo até o término da coleta. Em seguida, ambos os macerados (de baço e MLN) foram centrifugados (250 g, 10 minutos, 4°C) e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em RPMI com 5% de SBF para contagem em câmara de Neubauer com azul de Tripán (0,2%). Nas amostras de baço, as hemácias foram lisadas com tampão de lise (155 mM de NH₄Cl; 10 mM de NaHCO₃ e 0,1 mM de EDTA).

Posteriormente, 1x10⁶ células do baço ou MLN foram marcadas com *Violet Proliferation Dye 450* [VPD - BD Horizon™ (1 mM/mL)] de acordo com as recomendações do fabricante. Após a marcação com VPD, 5 x 10⁵ células/poço foram estimuladas com o mitógeno Concanavalina A [ConA (3 µg/mL) por poço], melatonina (100 pM/poço) (67) ou com ambos os estímulos juntos. As células foram deixadas em cultura por 72 horas à 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após o tempo de cultura, as células foram distribuídas em tubos FACS, e centrifugados à 250 g por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas com PBS-Formol 1% e posterior leitura em citômetro de fluxo (LSRFortessa - BD Bioscience™, San Diego, CA, EUA) e as análises realizadas pelo *software* FlowJo™ v10.

3.11. Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas por ELISA

Os fragmentos intestinais foram pesados e homogeneizados em 500 µL de tampão contendo inibidor de protease (Complete® - Roche, Pharmaceuticals, Mannheim, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para as reações de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA). Foram utilizadas placas com 96 poços, onde as amostras foram incubadas com os anticorpos de captura e de detecção para IL-9, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF, de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences™ - San Jose, CA, EUA). As reações foram reveladas pela adição de TMB e interrompidas pela adição de H₂SO₄ 4 M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. O resultado final da concentração foi normalizado pelo peso do fragmento do intestino utilizado para o ensaio e mostrado como pg/mL/g de tecido.

3.12. Dosagem de citocinas por CBA

Os fragmentos intestinais e baços foram pesados e homogeneizados em 500 μ L de tampão contendo inibidor de protease (Complete [®] - Roche, Pharmaceuticals, Mannheim, Alemanha). As amostras foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos e o sobrenadante coletado. Foram quantificadas as citocinas IL-6, IL-2, IL-12p70, IFN- γ e TNF pelo teste BD[™] Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), seguindo as especificações do fabricante. As beads foram levadas para leitura em citômetro de fluxo (LSRFortessa - BD Bioscience[™], San Diego, CA, EUA) e as análises foram realizadas no software FCAP Array 3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.13. Imunofenotipagem de células de baço e linfonodos mesentéricos

Para caracterização fenotípica da população de células ativadas e de memória do baço e MLN utilizamos os anticorpos contra CD3, CD4, CD8, CD28, CD62L, CD69 e CD44. Para caracterização das células T reguladoras foram marcados os antígenos de superfície ou intracelulares CD3, CD4, CD25, GITR, PD-1, FoxP3 e CTLA-4. Para quantificar a produção de citocinas por linfócitos T, utilizamos os anticorpos contra CD3, CD4, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17. Os anticorpos usados para marcação eram conjugados aos fluorocromos FITC, PE, PeCy-7, BV510, BV421, APC, ALEXA 647 ou PERCP (BD Pharmingen[™], San Diego, CA, EUA), incluindo os respectivos isotipos controles (BD Pharmingen[™], San Diego, CA, EUA), conforme tabela 1. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (LSRFortessa - BD Bioscience[™], San Diego, CA, EUA) e as análises realizadas pelo *software* FlowJo[™] v10.

Para a imunomarcação de superfície, as células foram divididas em tubos específicos e incubadas com 50 μ l de PBS/molico 1%, por 30 minutos à 4°C, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, foi realizada incubação com os anticorpos específicos aos marcadores de superfície (CD3, CD28, CD4, CD8, CD62L, CD44 ou CD69), por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, procedeu-se à lavagem das células com PBS, fixação com PBS/formol 1% e posterior leitura em citômetro de fluxo.

Para caracterização de células T reguladoras (FoxP3⁺, CTLA-4⁺, GITR⁺ e PD-1⁺), as amostras foram imunomarcadas, fixadas e permeabilizadas através do uso de BD Pharmingen[™] Mouse FoxP3 Buffer Set (BD Pharmingen[™], San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , IL-17, IL-10 e IL-4) os leucócitos foram restimulados *in vitro* por 4 horas com 50 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA - Sigma- Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA) e 500 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich, Saint-

Louis, MO, EUA), na presença de 1 μ L/mL de brefeldina (Golgi stop, BD Bioscience™, San Diego, CA, EUA), a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram imunomarcadas, fixadas e permeabilizadas através do uso de BD Pharmingen™ Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen™, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1- Relação de anticorpos conjugados a fluoróforos utilizados para imunofenotipagem no estudo da inflamação intestinal

Marcadores	Fluoróforos
CD3	FITC
CD4	PERCP
CD8	PeCy-7
CD25	BV510
CD28	PE
CD62L	APC
CD44	BV510
CD69	BV421
GITR	PeCy-7
PD-1	BV421
IFN- γ	PE
IL-4	PeCy7
IL-10	BV510
IL-17	BV421
FoxP3	ALEXA 647
CTLA-4	PE

Fonte: autora

3.14. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizados com auxílio do *software* Graphpad Prism® 6 (versão 6.0). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foi utilizado teste paramétrico ANOVA com pós-teste de Tukey para três ou mais grupos ou teste T de Student para 2 grupos. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana utilizou-se teste

não paramétrico ANOVA Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn no caso de três ou mais grupos ou teste Mann-Whitney para 2 grupos. Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

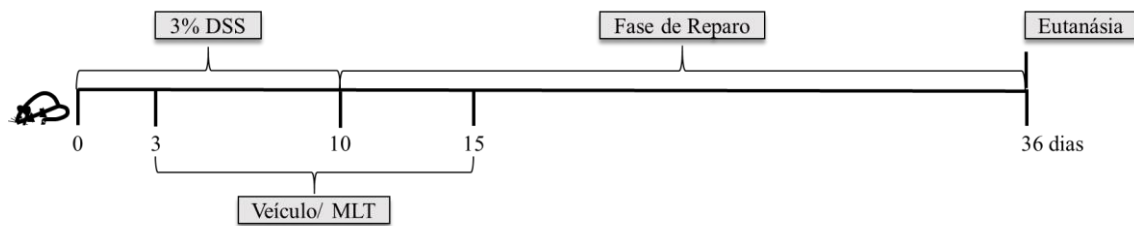
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica dos efeitos da melatonina em camundongos submetidos à colite experimental: ensaio piloto

Inicialmente foi realizado um experimento piloto para a padronização do nosso modelo experimental e tratamento. Para a indução da colite, os camundongos foram submetidos à administração de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias. Os animais foram avaliados durante todo o protocolo, desde a indução da colite até a fase de reparo da inflamação. Esse experimento contou com dois grupos, um deles foi tratado com solução contendo MLT (10 mg/mL), diluída em 1% de etanol e solução salina isotônica a 0,9%. O outro grupo foi tratado com solução salina isotônica a 0,9%, acrescida de 1% de etanol, denominada solução veículo. O esquema do delineamento experimental foi representado na figura 1 abaixo.

Figura 1. Delineamento do experimento piloto.



Fonte: autora

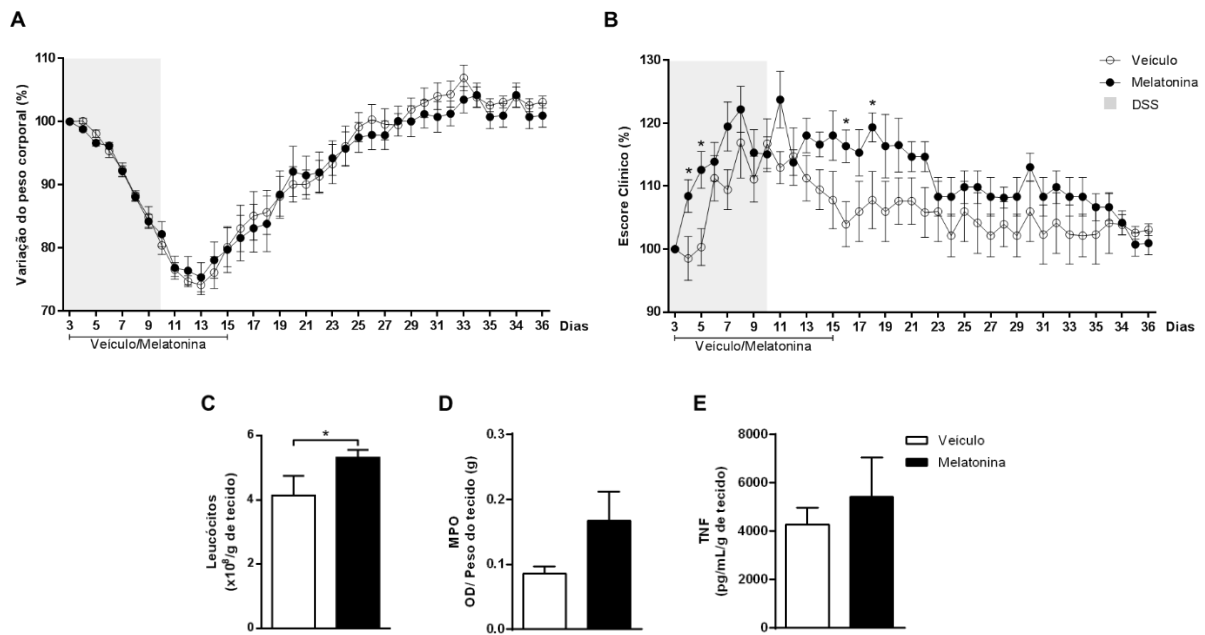
A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 15, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 36º dia.

Cada animal, de ambos os grupos, tiveram os dados relativos ao peso corporal e escore clínico (do dia 4 ao dia 36) normalizados em relação ao dia 3, quando foi iniciado o tratamento, devido ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença. Em relação ao peso corpóreo, não houve diferença entre os grupos (Figura 2A). Entretanto, os camundongos tratados com MLT apresentaram maior escore clínico quando comparados aos animais tratados apenas com solução veículo (Figura 2B). Durante o período de indução da colite, os camundongos do grupo melatonina apresentaram escore superior especificamente nos dias 4 e 5; enquanto que na fase de reparo, destacaram-se os dias 16 e 18.

Para avaliarmos os efeitos imunomoduladores da MLT nesse modelo, foi realizada a quantificação de leucócitos nos linfonodos mesentéricos (MLN) que drenam o intestino, sendo detectado aumento da celularidade naqueles provenientes dos camundongos expostos ao hormônio (Figura 2C). Ainda, a quantificação indireta de neutrófilos mostrou aparente aumento

na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos tratados (Figura 2D), embora estes resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Não foi observada diferença nos níveis da citocina TNF no cólon entre os grupos experimentais (Figura 2E).

Figura 2. Caracterização do modelo e estudo preliminar dos efeitos da melatonina na colite experimental.



Fonte: autora

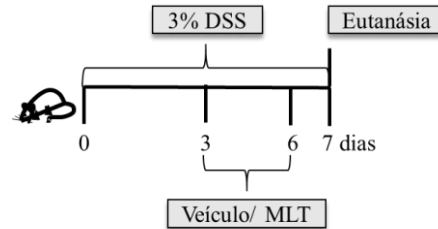
A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 10 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 15, quando o tratamento foi interrompido. Retângulos cinza destacam o período de indução da colite. Os camundongos foram acompanhados até o dia 36, em relação à variação de peso (A) e escore clínico da doença (B). **C**- Contagem total de leucócitos dos linfonodos mesentéricos (MLN), expressa em número de células por peso do tecido em gramas. **D**- Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no cólon dos animais. Os resultados são mostrados em densidade ótica (DO) e normalizados pelo peso do tecido, em gramas. **E**- Quantificação da citocina TNF no cólon por ensaio de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Valores expressos em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0,05$.

4.2. Avaliação clínica dos efeitos da melatonina em camundongos submetidos à colite experimental em ensaios de indução da inflamação – fase aguda

Como a MLT mostrou efeitos moduladores na evolução da colite durante o experimento piloto, novos ensaios foram realizados, considerando-se dois tempos diferentes de avaliação; ou seja, fase de indução da inflamação intestinal e fase de reparo, após a retirada do agente colitogênico, DSS. No entanto, algumas alterações foram realizadas no delineamento dos experimentos. Devido à perda excessiva de peso corporal dos animais durante a indução da doença, e conseqüente aumento do risco de mortalidade, o tempo de indução da colite foi

reduzido de 10 para 7 dias. Neste novo delineamento, os animais foram expostos ao DSS para indução da colite e eutanasiados em seguida para análise das amostras coletadas no momento de indução da doença, que representou a fase aguda do processo inflamatório (Figura 3).

Figura 3. Desenho experimental durante a fase de indução da inflamação intestinal.

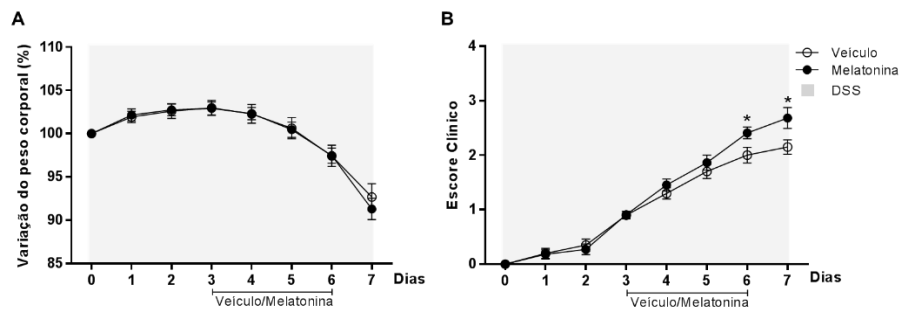


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 7º dia.

Confirmando o observado no experimento piloto, os dados referentes ao peso corpóreo não apresentaram variação entre os grupos (Figura 4A); porém, os animais tratados com MLT apresentaram escore clínico mais alto, especialmente nos dias 6 e 7 após início do DSS (Figura 4B).

Figura 4. Avaliação do peso e escore clínico durante a fase de indução da inflamação intestinal.



Fonte: autora

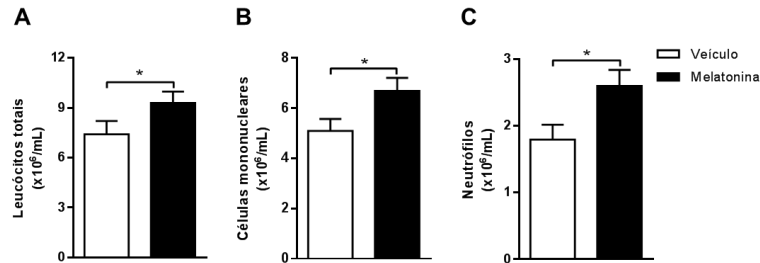
A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. Retângulos cinza destacam o período de indução da colite. Os animais foram acompanhados diariamente até 7º dia, em relação à variação de peso (A) e escore clínico da doença (B). Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.3. Quantificação de leucócitos circulantes e proliferação de células do baço

O efeito da MLT foi avaliado em populações celulares do sangue periférico. Os camundongos tratados apresentaram aumento significativo de leucócitos circulantes totais

(Figura 5A), incluindo células mononucleares e neutrófilos, em comparação ao grupo veículo (Figuras 5B e C, respectivamente).

Figura 5. Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico durante a fase de indução da inflamação intestinal.

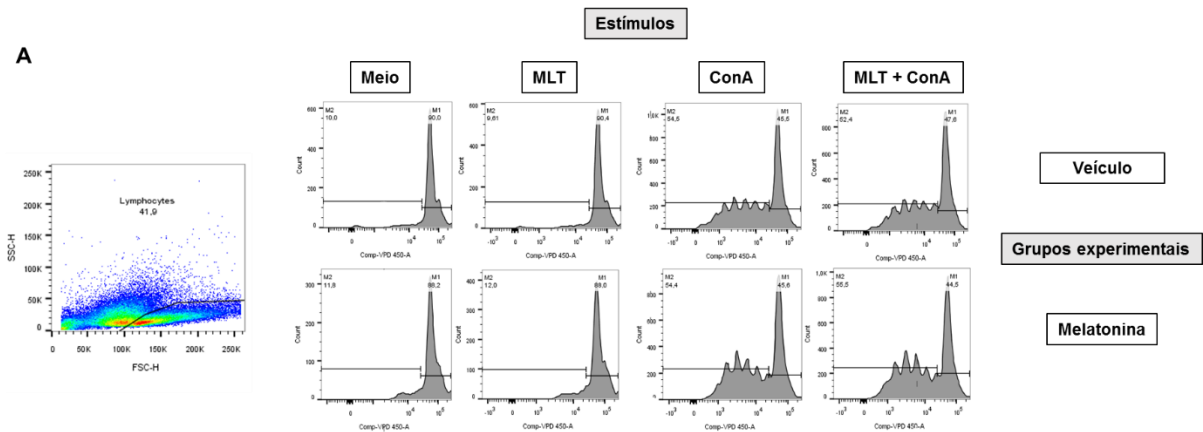


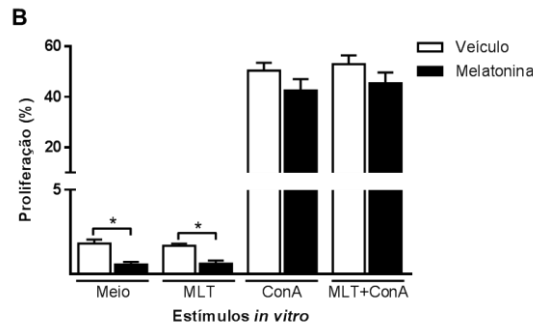
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 7º dia. O sangue foi coletado para a quantificação de células em câmara de Neubauer e no esfregaço sanguíneo, corado com Panótico. **A-** Número total de leucócitos do sangue periférico. **B-** Células mononucleares. **C-** Neutrófilos. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Em seguida, avaliamos o efeito sistêmico da MLT por meio de ensaio de proliferação com células do baço provenientes de camundongos com colite, tratados *in vivo* com o hormônio. Para isso, os leucócitos foram estimulados *in vitro* com MLT, Concanalina A (ConA), ou MLT + ConA. Os dados foram analisados segundo a estratégia de *gating* demonstrada na figura 6A. Os resultados mostraram que as células provenientes dos animais tratados *in vivo* com MLT tiveram redução significativa na frequência de proliferação quando colocadas em cultura sem estímulo proliferativo (Figura 6B). Em contrapartida, o estímulo *in vitro* com ConA induziu a proliferação igualmente em leucócitos provenientes de ambos os grupos (Figura 6B).

Figura 6. Proliferação celular durante a fase de indução da inflamação intestinal.





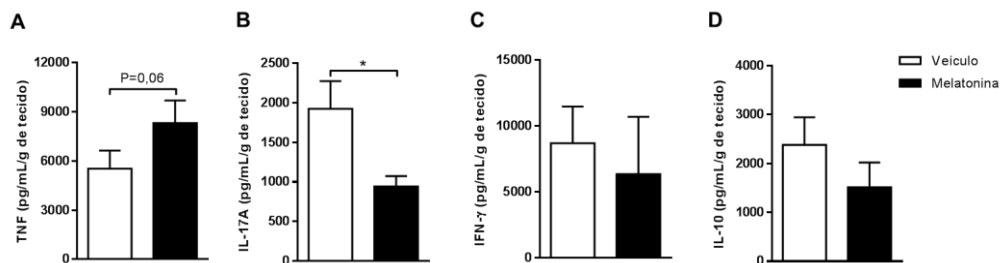
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 7º dia. O baço foi coletado e os leucócitos foram marcados com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD), seguido por restimulação *in vitro* com Concanavalina A (ConA), MLT (10^{-10} M) ou ambos por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. **A**- Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. **B**- O resultado indica frequência (porcentagem) de proliferação de células. Os resultados são representativos de 1 experimento.

4.4. Influência da melatonina na produção de citocinas no cólon

No contexto inflamatório, o perfil da resposta é influenciado pelas células e citocinas presentes no local da lesão. Neste trabalho, houve tendência à redução da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG), que é característica de macrófagos, no intestino dos camundongos tratados com MLT (dados não mostrados). Em relação às citocinas presentes no cólon, os resultados mostraram aumento de TNF e redução de IL-17A nos camundongos tratados com MLT (Figuras 7A e B, respectivamente). Em contrapartida, não foi observada diferença entre os grupos nas citocinas IL-10 e IFN- γ (Figuras 7C e D, respectivamente).

Figura 7. Efeito da melatonina na produção de citocinas no cólon durante a fase de indução da inflamação intestinal.



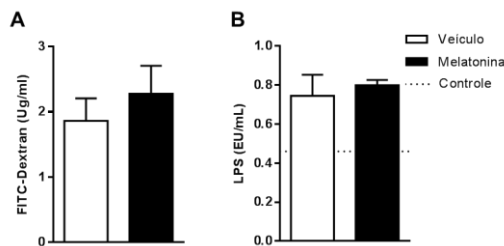
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 7º dia e o cólon foi coletado para avaliação das citocinas no sobrenadante do homogenato intestinal por ensaio de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). **A**- TNF. **B**- IL-17A. **C**- IFN- γ . **D**- IL-10. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Os resultados obtidos foram mostrados em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas. * $p < 0.05$.

4.5. Efeito da melatonina na permeabilidade intestinal e translocação microbiana

Em seguida, buscamos avaliar se o tratamento com MLT interferia na integridade intestinal, por meio da análise da permeabilidade e translocação bacteriana do intestino para o sangue. Os dados mostram que a terapia hormonal não exerceu influência nestes parâmetros (Figuras 8A e B, respectivamente).

Figura 8. Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação microbiana durante a fase de indução da inflamação intestinal.



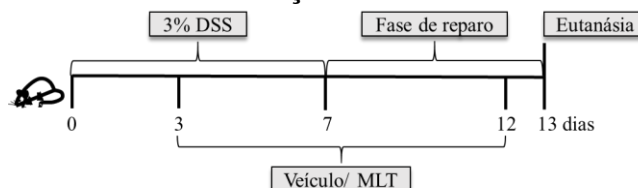
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 6, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 7º dia e sangue foi coletado. **A-** Quantificação do marcador FITC-Dextran no soro dos animais. Dados representativos de 2 experimentos independentes. **B-** Quantificação de lipopolissacarídeo (LPS) no soro dos animais. Os resultados foram expressos em unidade de endotoxina por mililitro (EU/mL) e são representativos de 1 experimento. Linha pontilhada: controle saudável, sem indução de colite.

4.6. Efeito do tratamento prolongado com melatonina na fase de reparo intestinal

No protocolo experimental de indução de colite, os animais foram eutanasiados juntamente com a retirada do DSS, durante a fase inflamatória. Numa segunda análise, os camundongos foram avaliados no período de reparo da inflamação, para verificarmos se o tratamento com o hormônio interferiria na resolução da inflamação e recuperação dos animais. Para isso, houve a indução da inflamação por 7 dias e, após a retirada do DSS, os camundongos foram acompanhados até o 13º dia, quando foram eutanasiados. O tratamento com solução veículo ou MLT ocorreu do 3º ao 12º dia (Figura 9).

Figura 9. Desenho experimental do protocolo de indução de colite e fase de reparo da inflamação intestinal.

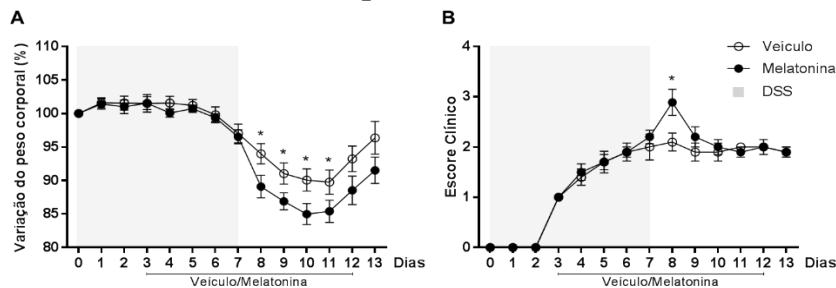


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia.

Os camundongos foram acompanhados diariamente e os dados referentes à variação do peso corpóreo e escore clínico da doença foram representados nas figuras 10A e B, respectivamente. Não houve diferença na perda de peso entre os grupos experimentais até o dia 7. No entanto, após a retirada do DSS foi observado que os animais tratados com MLT tiveram maior dificuldade na recuperação do peso corpóreo perdido durante a indução da inflamação. Em corroboração, houve um pico no escore clínico no 8º dia e, de forma geral, os animais apresentaram agravamento da condição e dificuldade de remissão da doença frente ao tratamento com MLT.

Figura 10. Avaliação do peso e escore de camundongos na fase de reparo da colite experimental.



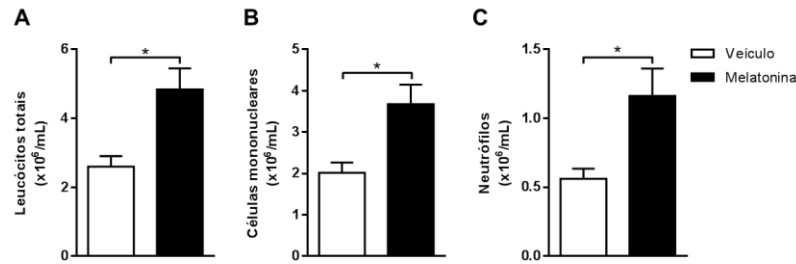
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. Retângulos cinza destacam o período de indução da colite. Os camundongos foram acompanhados diariamente até 13º dia, em relação à variação de peso (A) e escore clínico da doença (B). Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$

4.7. Efeito do tratamento prolongado com melatonina nos leucócitos do sangue periférico, durante a fase de reparo intestinal

Em sequência, analisamos se o tratamento interferiu na quantidade das células sanguíneas circulantes. De fato, a MLT elevou o número de leucócitos circulantes, especificamente células mononucleares e neutrófilos, como observado nas figuras 11A, B e C, respectivamente.

Figura 11. Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.



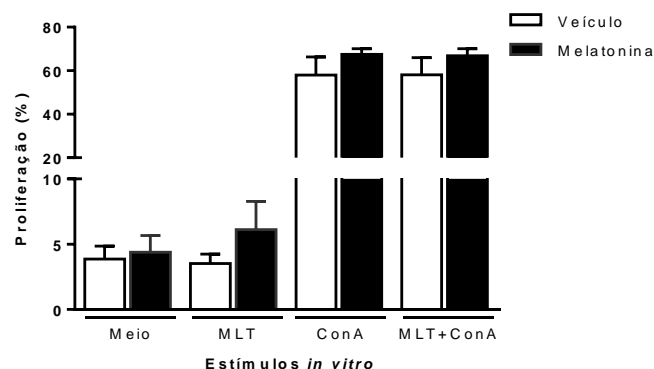
Fonte: autora.

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O sangue foi coletado para a quantificação de células em câmara de Neubauer e no esfregaço sanguíneo, corado com Panótico. **A-** Número total de leucócitos do sangue periférico. **B-** Células mononucleares **C-** Neutrófilos. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.8. Proliferação celular e imunofenotipagem dos leucócitos do baço

Posteriormente, avaliamos o efeito da MLT nos leucócitos do baço em ensaio de proliferação. Para isso, as células foram restimuladas *in vitro* com MLT, ConA, ou MLT + ConA e analisadas conforme a estratégia de *gating* previamente apresentada na figura 6A. Os tratamentos *in vivo* e estímulos proliferativos *in vitro* não promoveram diferenças entre os grupos (Figura 12).

Figura 12. Avaliação funcional *ex vivo* de células do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

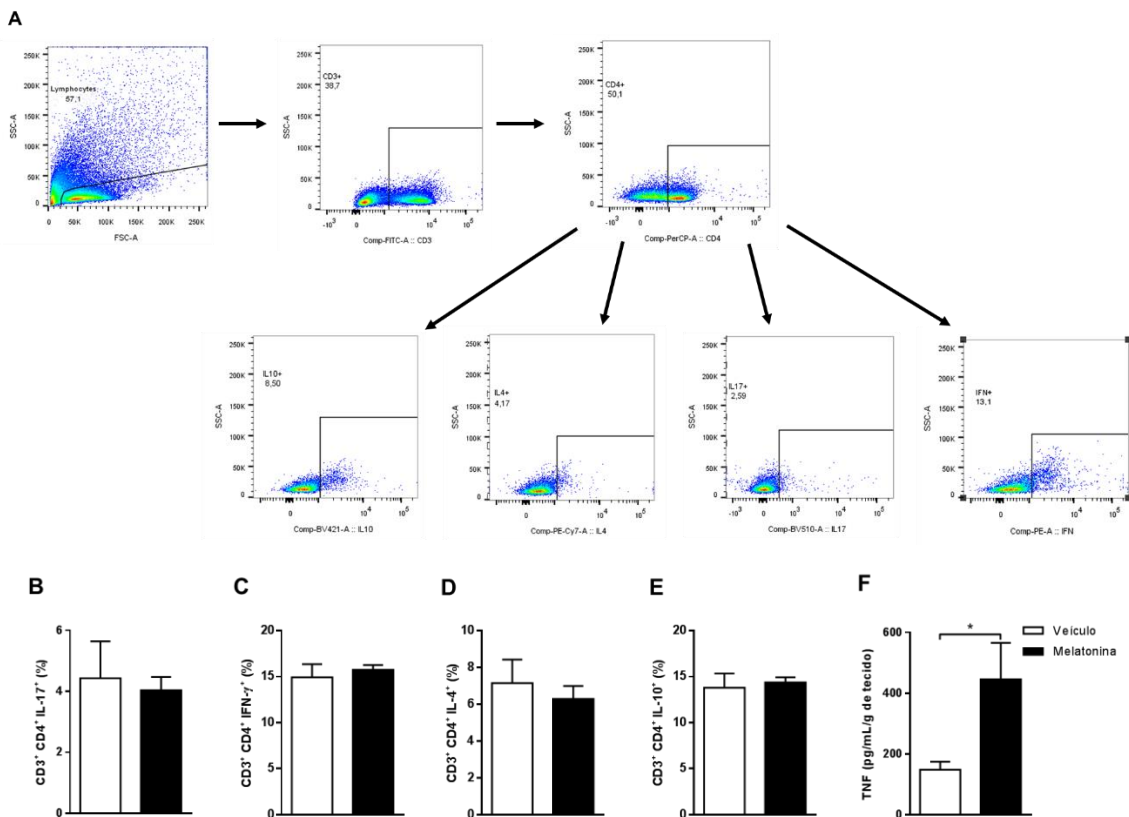


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O baço foi coletado e os leucócitos marcados com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD), seguido por restimulação *in vitro* com Concanavalina A (ConA), MLT (10^{-10} M) ou ambos por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. O resultado indica frequência (porcentagem) de proliferação de células. Os resultados são representativos de 1 experimento.

Para a análise da produção de citocinas por células T CD4 do baço, os leucócitos foram restimulados *in vitro*, com forbol-miristato-acetato (PMA) e ionomicina, conforme descrito em *Material e Métodos*. A análise foi realizada conforme a estratégia de *gating* demonstrada na figura 13A, sendo avaliadas as citocinas IL-17, IFN- γ , IL-4 e IL-10 (Figuras 13B-E, respectivamente). Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos. Entretanto, ao analisamos a produção total de TNF no homogenato do baço, observamos aumento notável desta citocina em camundongos tratados *in vivo* com MLT (Figura 13F).

Figura 13. Avaliação das citocinas produzidas no baço durante a fase de reparo da inflamação intestinal, frente ao tratamento com melatonina.



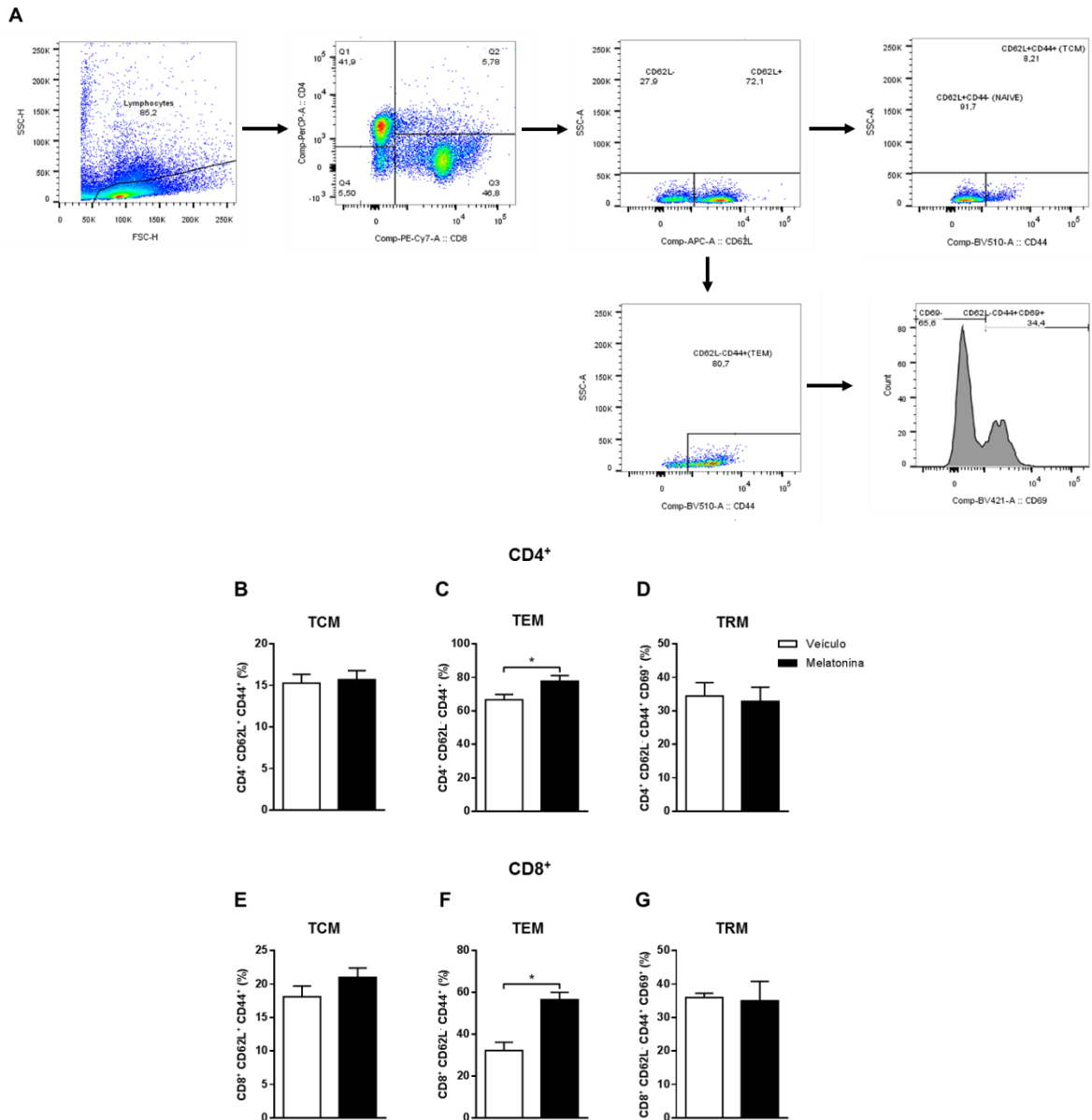
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O baço foi coletado e as células foram restimuladas com forbol-miristato-acetato [PMA (50 ng/mL)] e Ionomicina (500 ng/mL), na presença de brefeldina, para quantificação das citocinas intracelulares. **A**- Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. **B**- CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (%). **C**- CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (%). **D**- CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ (%). **E**- CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ (%). **F**- Dosagem de TNF no sobrenadante do homogenato do baço, por ensaio de *Cytometric Bead Array* (CBA). Os resultados obtidos foram mostrados em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

Posteriormente, avaliou-se o efeito da MLT sobre diferentes populações de linfócitos do baço. A análise das células foi realizada conforme a estratégia de *gating* demonstrada na figura 14A. Para ambas as populações de células, CD4⁺ ou CD8⁺, foi observado aumento na

porcentagem de linfócitos T de memória efetora (TEM) nos animais tratados com MLT (Figuras 14C e F, respectivamente). Entretanto, não houve diferença entre os grupos na frequência de linfócitos T de memória central (TCM) e T de memória residente (TRM) tanto para células CD4⁺, quanto para CD8⁺ (Figuras 14B, D, E e G, respectivamente).

Figura 14. Imunofenotipagem dos linfócitos do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

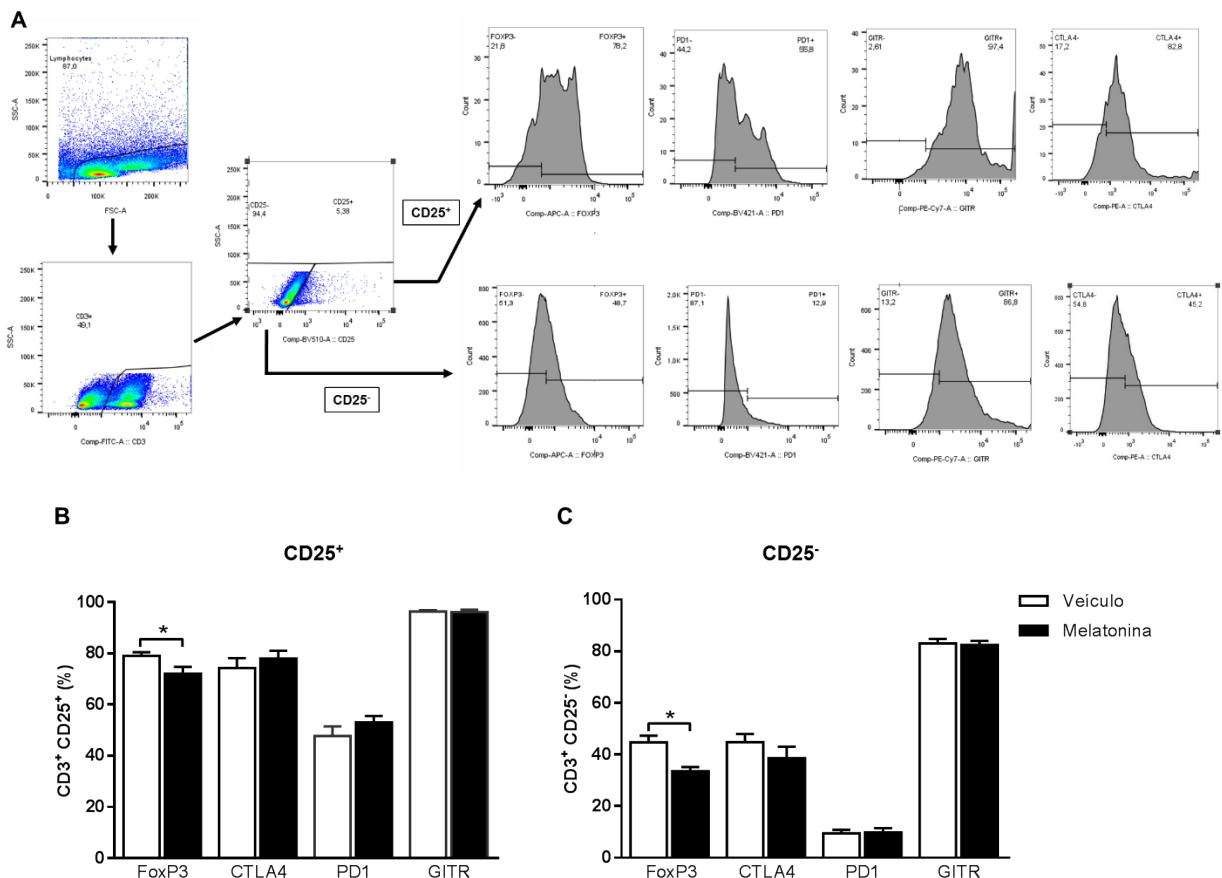


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O baço foi coletado e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A**- Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. **B**- Frequência de células T CD4 de memória central (TCM). **C**- Frequência de células T CD4 de memória efetora (TEM). **D**- Frequência de células TCD4 de memória residente (TRM). **E**- Frequência de células TCD8 TCM. **F**- Frequência de células TCD8 TEM. **G**- Frequência de células TCD8 TRM. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

Foi avaliado ainda o perfil de células T reguladoras (Treg) nas populações de células CD25⁺ ou CD25⁻, conforme estratégia a estratégia de *gating* demonstrada na figura 15A. Nas populações de células CD3⁺CD25⁺ e CD3⁺CD25⁻, o tratamento com MLT reduziu a frequência de linfócitos expressando FoxP3 (Figura 15B e C, respectivamente). Entretanto, para ambas as populações de linfócitos, não foi observada diferença entre os grupos na frequência de expressão de CTLA-4, PD-1 ou GITR⁺ (Figura 15B e C, respectivamente).

Figura 15. Imunofenotipagem de T reguladoras do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.



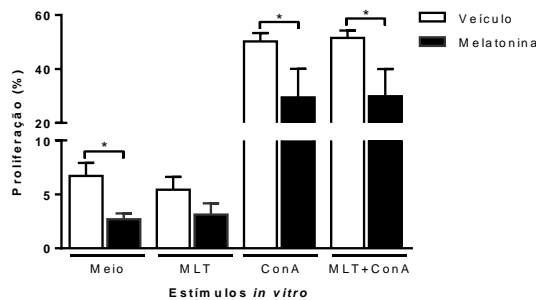
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O baço foi coletado e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A-** Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. **B-** Frequência (%) de células CD3⁺CD25⁺ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. **C-** Frequência (%) de células CD3⁺CD25⁻ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. Os resultados são representativos de 1 experimento. * p < 0.05.

4.9. Proliferação celular e imunofenotipagem dos leucócitos dos linfonodos mesentéricos

Os leucócitos provenientes dos MLN foram analisados de modo semelhante aos do baço. Inicialmente, as células foram colocadas em cultura na presença apenas de meio, MLT, ConA, ou MLT + ConA. A proliferação das células foi analisada conforme a estratégia de *gating* apresentada na figura 6A. Leucócitos provenientes dos animais tratados *in vivo* com MLT, quando cultivados na presença apenas de meio, apresentaram redução na frequência de proliferação em comparação às células de camundongos tratados com veículo. O mesmo efeito foi observado em leucócitos estimulados com ConA ou MLT + ConA (Figura 16).

Figura 16. Cultura *ex vivo* de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

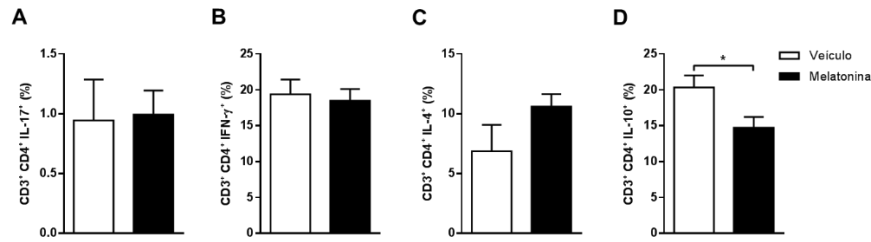


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os leucócitos marcados com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD), seguido por restimulação, *in vitro*, com Concanavalina A (ConA), MLT (10^{-10} M) ou ambos por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. O resultado indica frequência (porcentagem) de proliferação de células. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

Para verificação do perfil fenotípico dos linfócitos provenientes dos MLN, realizamos os mesmos ensaios de imunofenotipagem efetuados com as células provenientes do baço. As células foram também restimuladas *in vitro* para avaliação das citocinas intracelulares. A análise foi realizada conforme a estratégia de *gating* já demonstrada na figura 13A. Não houve alteração entre os grupos quando avaliamos as citocinas IL-17, IFN- γ ou IL-4 (Figuras 17A-C, respectivamente). Porém, houve redução significativa da frequência de linfócitos CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ nos animais tratados com MLT (Figura 17D).

Figura 17. Citocinas intracelulares de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

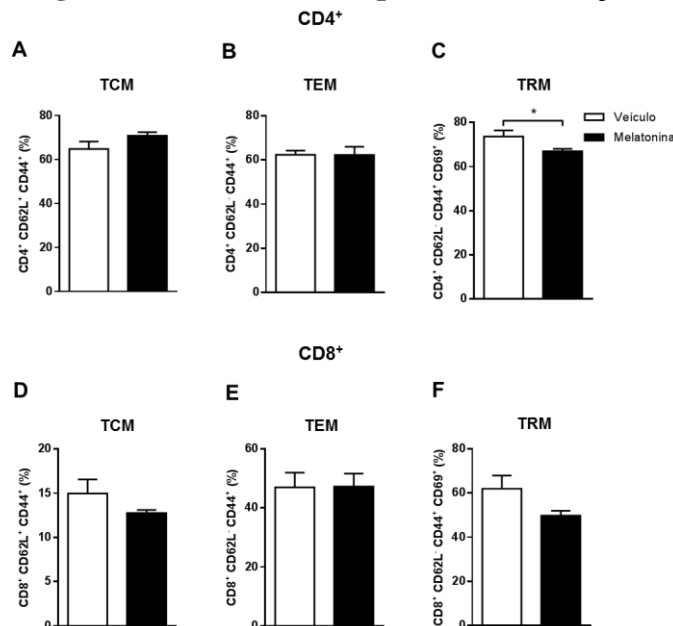


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e as células foram reestimuladas com forbol-miristato-acetato [PMA (50 ng/mL)] e Ionomicina (500 ng/mL), na presença de brefeldina para quantificação das citocinas intracelulares. **A**- CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (%). **B**- CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ (%). **C**- CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ (%). **D**- CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ (%). Os resultados são representativos de 1 experimento. * p < 0,05.

Posteriormente, avaliamos se a MLT interferia nas diferentes populações de linfócitos de memória provenientes dos MLN. A análise das células foi realizada segundo a estratégia de *gating* previamente demonstrada na figura 14A. Na população de linfócitos CD4⁺, foi observada redução na frequência de células T de memória residente (TRM) em camundongos tratados com MLT (Figura 18C). No entanto, não houve diferença entre os grupos na frequência de linfócitos de memória central (TCM) e efetora (TEM) como demonstrado nas figuras 18A e B. Em relação à população de linfócitos CD8⁺, não foi observada diferença entre os grupos analisados (Figuras 18D-F).

Figura 18. Imunofenotipagem dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

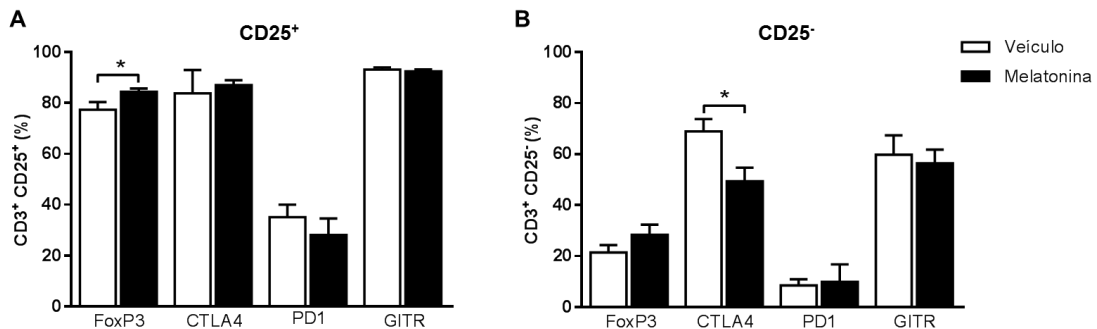


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. Os MLN foram coletados e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A-** Frequência de células T CD4 de memória central (TCM). **B-** Frequência de células T CD4 de memória efetora (TEM). **C-** Frequência de células TCD4 de memória residente (TRM). **D-** Frequência de células TCD8 TCM. **E-** Frequência de células TCD8 TEM. **F-** Frequência de células TCD8 TRM. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

Para a avaliação das células Treg seguimos a estratégia de *gating* demonstrada na figura 15A. Para as células $CD3^+CD25^+$, o tratamento com MLT elevou a frequência de linfócitos $FoxP3^+$ (Figura 19A). Não foi encontrada diferença entre os grupos na frequência de células $CTLA-4^+$, $GITR^+$ e $PD-1^+$ (Figura 19A). Por outro lado, o tratamento dos camundongos com MLT levou à redução das células $CD3^+CD25^-CTLA-4^+$ nos MLN (Figura 19B). Não houve alteração entre os grupos na frequência de células $FoxP3^+$, $GITR^+$ e $PD-1^+$ (Figura 19B).

Figura 19. Imunofenotipagem de células T reguladoras dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

**Fonte: autora**

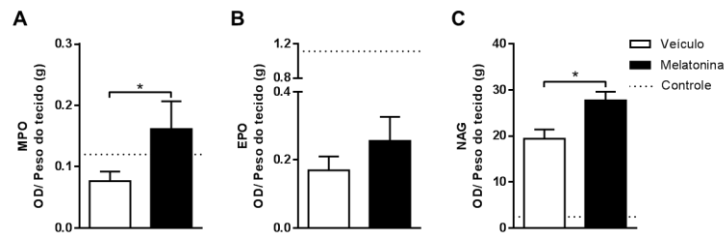
A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A-** Frequência (%) de células $CD3^+CD25^+$ e positivas para os marcadores $FoxP3$, $CTLA-4$, $PD-1$ e $GITR$. **B-** Frequência (%) de células $CD3^+CD25^-$ e positivas para os marcadores $FoxP3$, $CTLA-4$, $PD-1$ e $GITR$. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

4.10. Influência da melatonina no infiltrado inflamatório e na produção de citocinas no cólon*

Em seguida, buscou-se avaliar se o tratamento prolongado com MLT influenciaria no infiltrado inflamatório local. Para isso, a presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos foi analisada indiretamente pela quantificação de MPO, EPO e NAG, respectivamente, no cólon dos animais. Foi observado aumento da atividade enzimática de MPO e NAG, inferindo maior

atividade de neutrófilos e macrófagos no intestino (Figuras 20A e B, respectivamente), frente à administração de MLT. Não houve diferença entre os grupos para a atividade enzimática de EPO, conforme figura 20B.

Figura 20. Avaliação do infiltrado intestinal de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

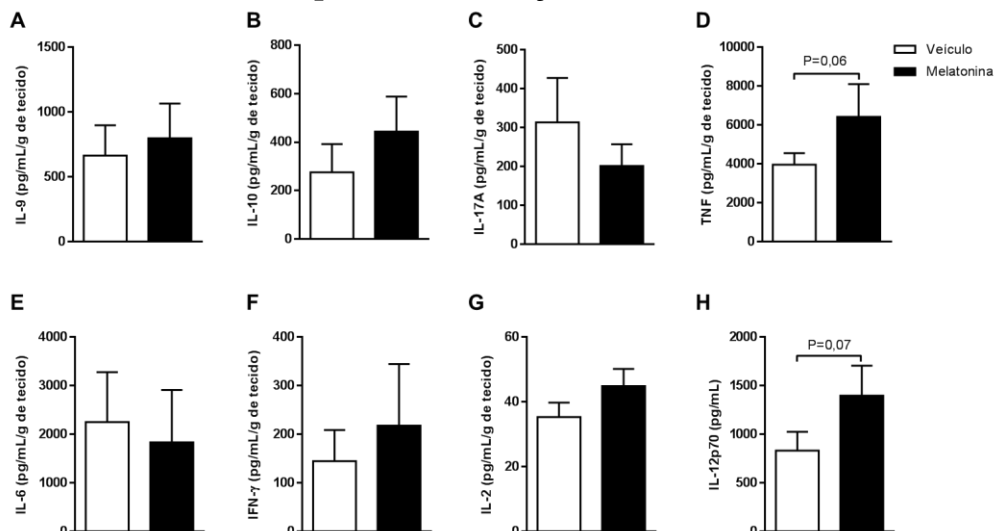


Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. No cólon dos animais foram avaliadas as atividades das enzimas (A) mieloperoxidase (MPO), (B) eosinófilo-peroxidase (EPO) e (C) N-acetilglicosaminidase (NAG). Os resultados foram mostrados em densidade ótica (DO) e normalizados pelo peso do tecido, em gramas. Linha pontilhada: controle saudável, sem indução de colite. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Avaliamos por ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou *Cytometric Bead Array* (CBA) o perfil de algumas citocinas presentes no cólon. Os resultados apresentados na figuras 21A-H mostraram que não houve diferença entre os grupos na produção das citocinas IL-9, IL-10, IL-17A, TNF, IL-6, IFN- γ , IL-2 e IL-12p70. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, houve tendência ao aumento das citocinas TNF e IL-12p70 em camundongos tratados com MLT, em comparação aos tratados com veículo (Figuras D e H, respectivamente).

Figura 21. Efeito da melatonina na produção de citocinas intestinais durante a fase de reparo da inflamação intestinal.



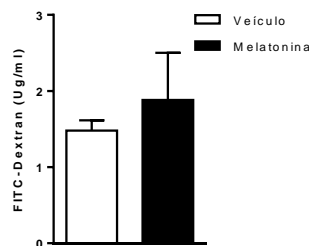
Fonte: autora

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia e o cólon foi coletado para avaliação das citocinas no sobrenadante do homogenato intestinal por ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (A-D) ou *Cytometric Bead Array* (CBA) (E-H). **A-** IL-9, **B-** IL-10, **C-** IL-17A, **D-** TNF, **E-** IL-6, **F-** IFN- γ , **G-** IL-2 e **H-** IL-12p70. Os resultados obtidos foram mostrados em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.11. Efeito do tratamento prolongado com melatonina na avaliação da permeabilidade intestinal durante o reparo da inflamação intestinal

Avaliamos, em seguida, se a dificuldade de remissão da doença frente ao tratamento prolongado com MLT poderia estar relacionado a alterações na permeabilidade intestinal. Para isso, quantificamos o marcador FITC-Dextran no soro dos animais. Porém, os dados mostraram que não houve diferença entre os grupos (Figura 22).

Figura 22. Avaliação da permeabilidade intestinal de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal.

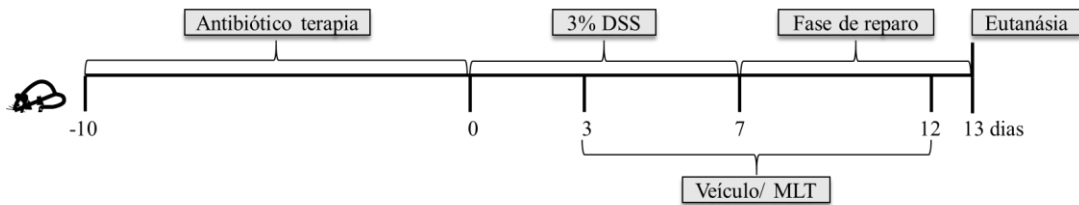
**Fonte: autora**

A inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia. O sangue foi coletado para a quantificação do marcador FITC-Dextran no soro dos animais. Os resultados são representativos de 1 experimento.

4.12. Participação da microbiota intestinal nos efeitos moduladores da melatonina durante a colite experimental

Com base nos resultados apresentados até aqui, estabelecemos um novo delineamento experimental, que teve por objetivo avaliar se a microbiota estaria envolvida nos efeitos da MLT na colite experimental. Para tal, os camundongos foram tratados com um amplo espectro de antibióticos e em seguida, iniciou-se a indução da colite e tratamentos com solução veículo ou de MLT. Os animais foram eutanasiados no 13º dia após início da colite, na fase de reparo da inflamação (Figura 23).

Figura 23. Desenho experimental do protocolo de depleção da microbiota, indução de colite e reparo da inflamação intestinal.

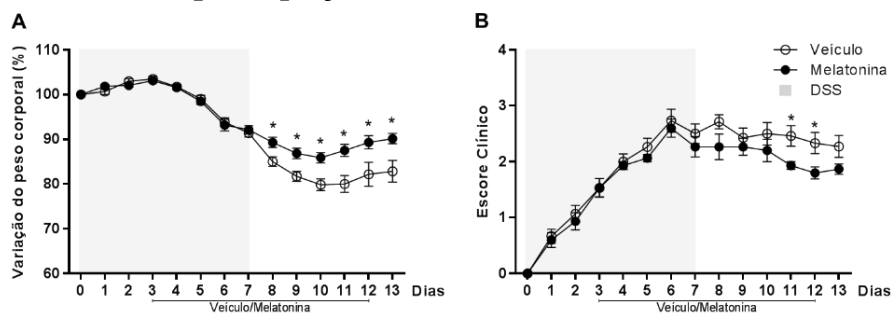


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite.

Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos experimentais até o dia 7. No entanto, após a retirada do DSS foi observado que os camundongos tratados com veículo tiveram maior dificuldade na recuperação do peso corpóreo perdido durante a indução da inflamação (Figura 24A). Além disso, os camundongos tratados com veículo apresentaram escore mais elevado em comparação ao grupo MLT (Figura 24B). De forma geral, em contraste aos resultados obtidos das análises durante a indução e reparo da colite, a depleção da microbiota reverteu os efeitos da MLT na condição clínica da doença.

Figura 24. Avaliação do peso e escore de camundongos submetidos à colite experimental pós depleção da microbiota intestinal.



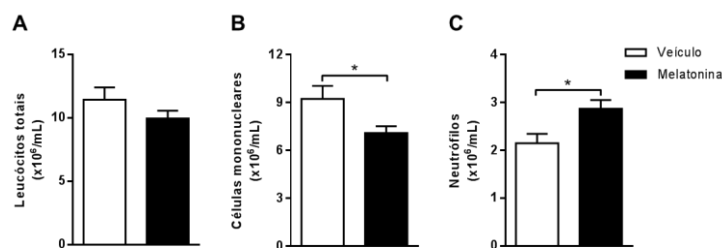
Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. Retângulos cinza destacam o período de indução da colite. Os camundongos foram acompanhados diariamente até 13º dia, em relação à variação de peso (A) e escore clínico da doença (B). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$

4.13. Efeito do tratamento prolongado com melatonina nos leucócitos do sangue periférico durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota

Com o intuito de melhor avaliar os efeitos da MLT via microbiota, quantificamos as populações de leucócitos do sangue periférico. Embora não tenha havido diferença na quantificação de células totais (Figura 25A), continuamos observando aumento significativo da quantidade de neutrófilos circulantes na ausência da microbiota (Figura 25C), o que indica que estas alterações induzidas pela MLT na fase de reparo (Figura 11) não foram dependentes da microbiota intestinal. Entretanto, houve redução na quantidade de células mononucleares do sangue periférico frente ao tratamento com MLT em camundongos submetidos à antibioticoterapia, sugerindo que um dos mecanismos de ação da MLT nesta população pode ser via microbiota (Figura 25B).

Figura 25. Contagem total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota e tratamento com melatonina.



Fonte: autora

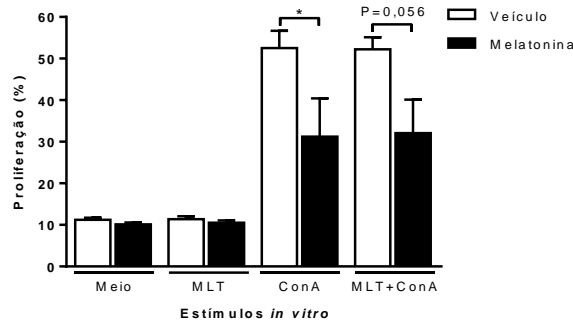
A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O sangue foi coletado para a quantificação de células em câmara de Neubauer e no esfregaço sanguíneo, corado com Panótico. A- Número total de leucócitos do sangue periférico. B- Células mononucleares. C- Neutrófilos. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.14. Avaliação do efeito da melatonina nas células do baço durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota intestinal

Para a avaliação da proliferação dos leucócitos do baço, as células foram analisadas segundo a estratégia de *gating* previamente demonstrada na figura 6A. Em oposição aos resultados encontrados anteriormente, nos quais não houve diferença entre os parâmetros analisados (Figura 12), foi observado que, ao depletarmos a microbiota, houve redução na

frequência de proliferação dos leucócitos de animais tratados com MLT *in vivo*, quando restimulados *in vitro* com ConA ou MLT + ConA (Figura 26).

Figura 26. Proliferação de células do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção de microbiota.

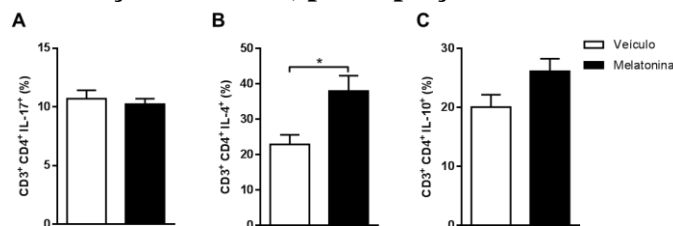


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O baço foi coletado e os leucócitos marcados com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD), seguido por restimulação, *in vitro*, com ConA, MLT (10^{-10} M) ou ambos por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. O resultado indica frequência (porcentagem) de proliferação de células. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

Posteriormente, avaliamos a produção de citocinas por células TCD4 do baço, por meio da restimulação *in vitro*. A análise das citocinas IL-17, IL-4 e IL10 foi realizada conforme estratégia de *gating* previamente demonstrada na figura 13A. Diferentemente dos animais que não tiveram a microbiota depletada, a antibioticoterapia, levou ao aumento significativo de células $CD3^+CD4^+IL-4^+$ (Figura 27B) e tendência ao aumento de células $CD3^+CD4^+IL-10^+$ (Figura 27C) em camundongos tratados com MLT. Nesse sentido, os resultados sugerem que o hormônio pode estar agindo via microbiota, na modulação da resposta esplênica.

Figura 27. Citocinas intracelulares de células do baço durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.



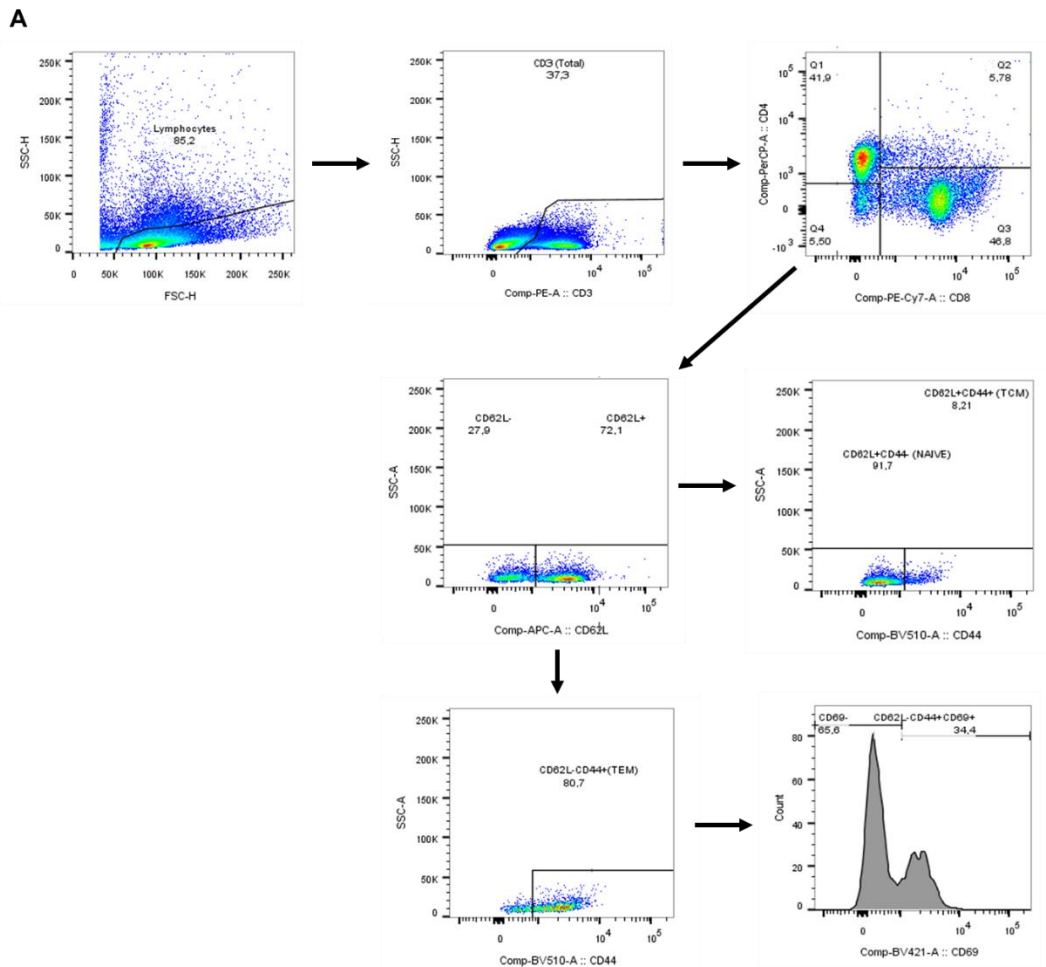
Fonte: autora

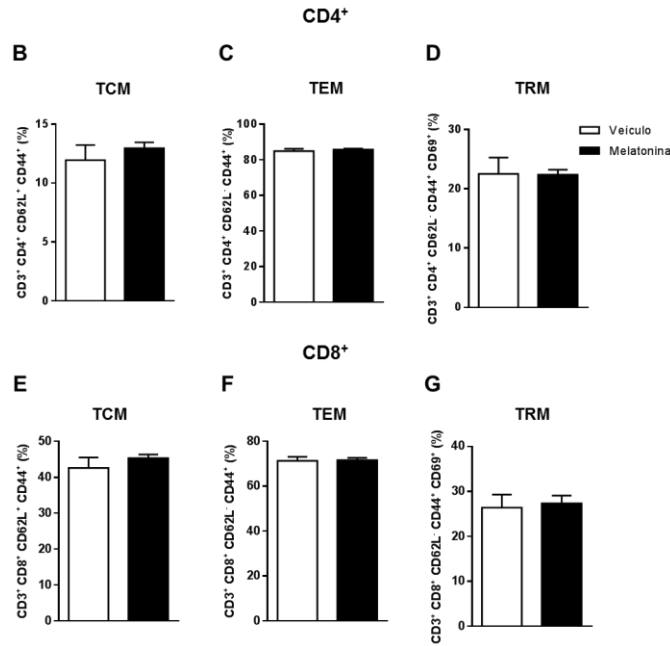
A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais

foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O baço foi coletado e as células foram reestimuladas com forbol-miristato-acetato [PMA (50 ng/mL)] e Ionomicina (500 ng/mL), na presença de brefeldina para quantificação das citocinas intracelulares. **A-** CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (%). **B-** CD3⁺CD4⁺IL-14⁺ (%). **C-** CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ (%). Os resultados são representativos de 1 experimento. * p < 0.05.

Em seguida, avaliamos se o tratamento com MLT interferia nas diferentes populações de linfócitos do baço de camundongos submetidos à depleção de microbiota. Para isso, as células foram analisadas de acordo com a estratégia de *gating* demonstrada na figura 28A. Em oposição aos resultados obtidos em camundongos sem a depleção da microbiota, que apresentaram aumento na porcentagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória efetora (TEM), quando tratados com MLT (Figuras 14C e F, respectivamente), para ambas as populações de células, não houve alteração na frequência dos linfócitos de memória avaliados em animais submetidos à antibioticoterapia (Figuras 28A-G). Os dados indicam que estas alterações induzidas pela MLT na fase de reparo, foram dependentes da microbiota intestinal.

Figura 28. Imunofenotipagem dos linfócitos do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.





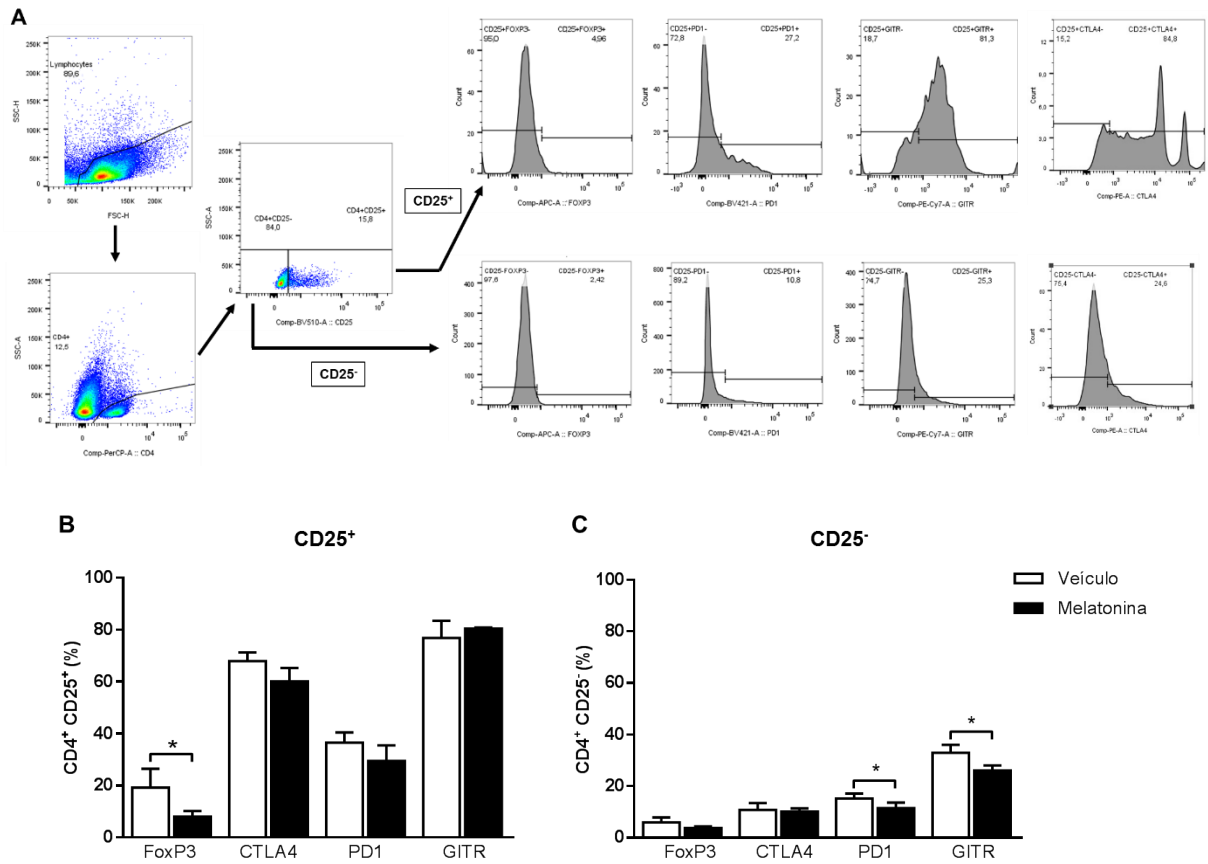
Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O baço foi coletado e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. A- Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. B- Frequência de células T CD4 de memória central (TCM). C- Frequência de células T CD4 de memória efetora (TEM). D- Frequência de células TCD4 de memória residente (TRM). E- Frequência de células TCD8 TCM. F- Frequência de células TCD8 TEM. G- Frequência de células TCD8 TRM. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

O perfil de células Treg nas populações de células CD25⁺ ou CD25⁻, de animais com depleção da microbiota, foi avaliado conforme estratégia de *gating* demonstrada na figura 29A. Em conformidade com os resultados observados em camundongos não submetidos à depleção da microbiota (Figura 15B), houve redução de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no grupo tratado com MLT (Figura 29B). Infere-se então, que esta redução não é influenciada pela ação do hormônio via microbiota intestinal. Não houve diferença entre os grupos na expressão de CTLA-4, PD-1 e GITR em células CD4⁺CD25⁺ (Figura 29B).

Na população de células CD4⁺CD25⁻ de camundongos sem depleção da microbiota, houve redução na frequência de expressão de FoxP3 em animais tratados com MLT (Figura 15C), o que não ocorre após depleção da microbiota. Foi observada também, redução na frequência de células PD-1⁺ e GITR⁺ nos animais tratados com MLT, pós depleção da microbiota (Figura 29C). Sugere-se que essas alterações ocorreram via microbiota intestinal.

Figura 29. Imunofenotipagem de T reguladoras do baço de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.



Fonte: autora

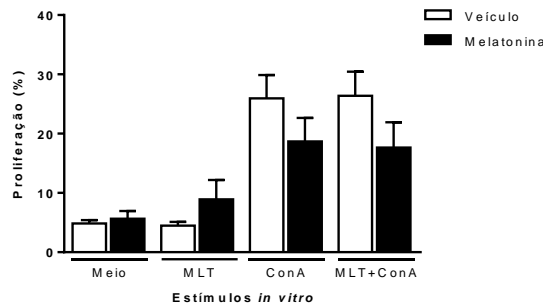
A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O baço foi coletado e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A-** Estratégia de *gating* utilizada no *software* FlowJo para análise das amostras. **B-** Frequência (%) de células CD4⁺CD25⁺ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. **C-** Frequência (%) de células CD4⁺CD25⁻ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. Os resultados são representativos de 1 experimento. * p < 0.05.

4.15. Avaliação do efeito da melatonina nas células dos linfonodos mesentéricos durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota

Para avaliação da proliferação dos leucócitos dos MLN de camundongos com depleção da microbiota intestinal, as células foram analisadas segundo a estratégia de *gating* previamente demonstrada na figura 6A. Em animais não submetidos à depleção da microbiota e tratados com MLT, foi observada redução estatística na frequência de proliferação celular (Figura 16). Efeito semelhante foi observado pós depleção da microbiota. Embora as células provenientes de animais tratados com MLT *in vivo* e reestimuladas *in vitro* com ConA tenham apresentado

redução na frequência de proliferação celular, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 30).

Figura 30. Proliferação de células dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção de microbiota.

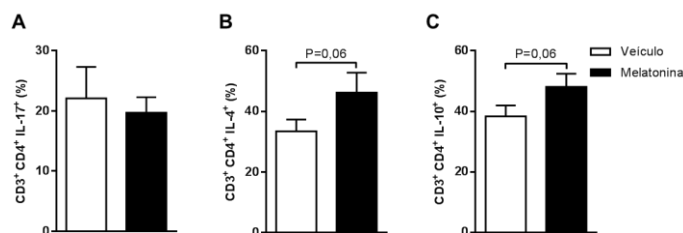


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os leucócitos marcados com *Violet Proliferation Dye 450* (VPD), seguido por restimulação, *in vitro*, com ConA, MLT (10^{-10} M) ou ambos por 72 horas, para posterior leitura em citômetro de fluxo e análise de proliferação. O resultado indica frequência (porcentagem) de proliferação de células. Os resultados são representativos de 1 experimento.

Realizamos, também, a avaliação da produção de citocinas por linfócitos TCD4 dos MLN de camundongos tratados com com antibioticoterapia. A análise das citocinas IL-17, IL-4 e IL10 foi realizada conforme a estratégia de *gating* previamente demonstrada na figura 13A. Dentre as citocinas avaliadas, houve maior porcentagem de IL-4 e IL-10 nos animais tratados com MLT, embora os dados não tenham sido estatisticamente diferentes (Figuras 31B e C respectivamente). Ao contrário, havíamos observado redução da frequência de linfócitos $CD3^+CD4^+IL-10^+$, em camundongos sem depleção de microbiota e tratados com MLT (Figura 17D).

Figura 31. Citocinas intracelulares de células dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.

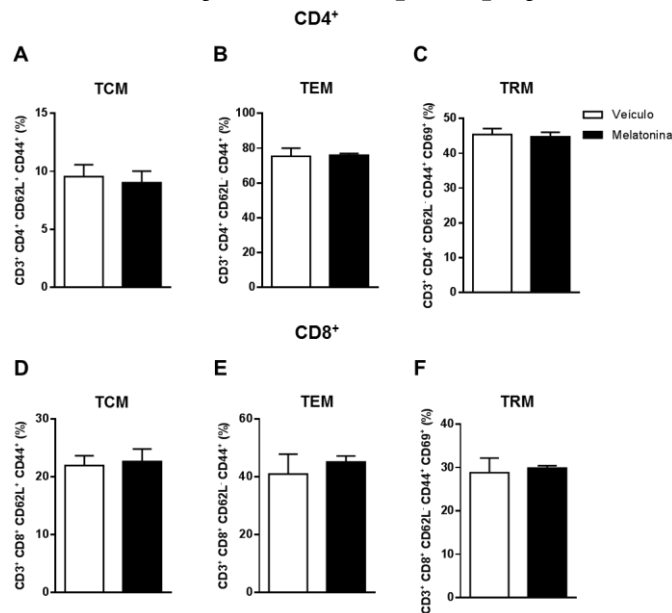


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e as células foram reestimuladas com forbol-miristato-acetato [PMA (50 ng/mL)] e Ionomicina (500 ng/mL), na presença de brefeldina para quantificação das citocinas intracelulares. **A-** CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ (%). **B-** CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ (%). **C-** CD3⁺CD4⁺IL-10⁺ (%). Os resultados são representativos de 1 experimento.

Posteriormente, avaliamos se o tratamento com MLT interferia nas diferentes populações de linfócitos de memória dos MLN de animais submetidos à antibioticoterapia. A análise das células foi realizada conforme a estratégia de *gating* anteriormente demonstrada na figura 28A. Os resultados da figura 32C mostraram que não foi mais observada a redução da frequência de linfócitos T CD4 de memória residentes (TRM) no grupo tratado com MLT conforme visto previamente (Figura 18C), sugerindo que a modulação desta população pelo hormônio é microbiota-dependente.

Figura 32. Imunofenotipagem dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.

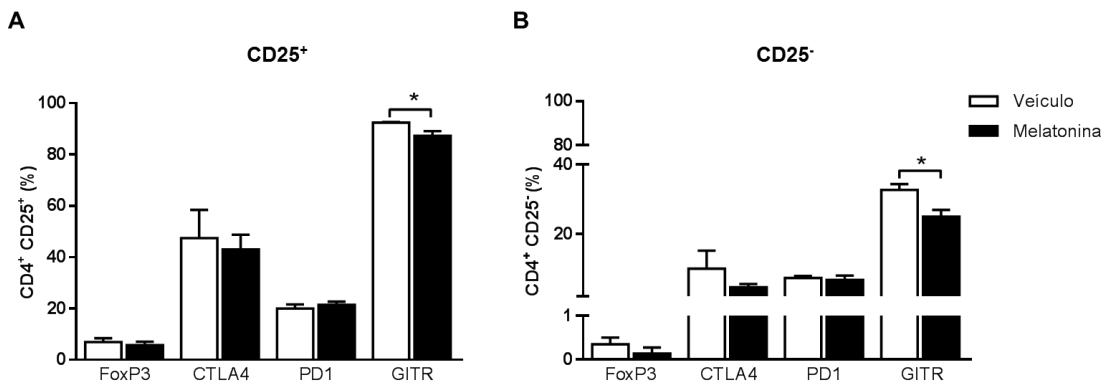


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A-** Frequência de células T CD4 de memória central (TCM). **B-** Frequência de células T CD4 de memória efetora (TEM). **C-** Frequência de células TCD4 de memória residente (TRM). **D-** Frequência de células TCD8 TCM. **E-** Frequência de células TCD8 TEM. **F-** Frequência de células TCD8 TRM. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

Para a avaliação do perfil fenotípico dos linfócitos Treg, analisamos as células de acordo com a estratégia a estratégia de *gating* anteriormente demonstrada na figura 28A. Conforme observado nas figuras 33A e B, houve redução na frequência de células GITR⁺ em ambas as populações de linfócitos, CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻, nos animais tratados com MLT. Não houve diferença entre os grupos para os outros marcadores analisados. Em animais sem antibioticoterapia, o tratamento com MLT proporcionou aumento da expressão de FoxP3 em células CD3⁺CD25⁺ e redução de CTLA4 em células CD3⁺CD25⁻ (Figuras 19A e B).

Figura 33. Imunofenotipagem de T reguladoras dos linfonodos mesentéricos de camundongos durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.



Fonte: autora

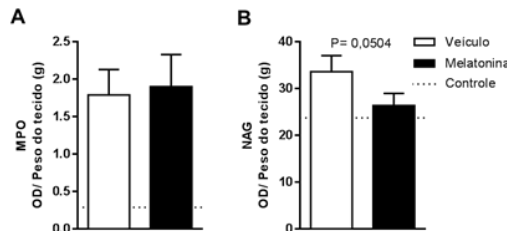
A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. Os linfonodos mesentéricos (MLN) foram coletados e os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos de interesse. **A**-Frequência (%) de células CD4⁺CD25⁺ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. **B**-Frequência (%) de células CD4⁺CD25⁻ e positivas para os marcadores FoxP3, CTLA-4, PD-1 e GITR. Os resultados são representativos de 1 experimento. * p < 0.05.

4.16. Influência da melatonina no infiltrado inflamatório e na produção de citocinas no cólon de camundongos durante o reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota

Em seguida, foi avaliada a influência da MLT no infiltrado inflamatório leucocitário local, através da quantificação das enzimas MPO e NAG no cólon de camundongos submetidos à antibioticoterapia. Ao contrário dos resultados observados na presença da microbiota intestinal (Figura 20A e C), não houve diferença entre os grupos em relação à atividade de neutrófilos (Figura 34A) e houve tendência à redução de NAG frente ao tratamento com o

hormônio, pós-depleção de microbiota (Figura 34B), sugerindo que o efeito pode ser via ação direta ou indireta da MLT nas bactérias intestinais.

Figura 34. Avaliação do infiltrado intestinal durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.

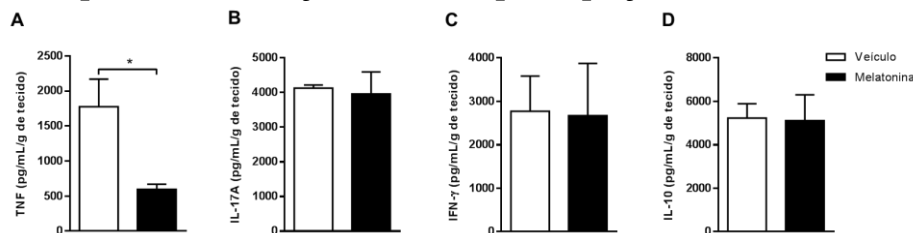


Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. No cólon dos animais foram avaliadas as atividades das enzimas (A) mieloperoxidase (MPO) e (B) N- acetilglicosaminidase (NAG). Os resultados são mostrados em densidade ótica (DO) e normalizados pelo peso do tecido, em gramas. Linha pontilhada: controle saudável, sem indução de colite. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

Para finalizar, foi avaliado por ensaio ELISA o perfil de algumas citocinas no cólon dos animais pós depleção da microbiota. Não foi observada diferença na quantificação de IL-17A, IFN- γ e IL-10 (Figuras B-D). Entretanto, houve notável redução na quantidade de TNF nos animais tratados com MLT (Figura 35A) indicando, novamente, que os efeitos do hormônio na modulação da imunidade intestinal (Figura 21D) podem ocorrer via microbiota.

Figura 35. Efeito da melatonina na produção de citocinas intestinais durante a fase de reparo da inflamação intestinal, pós depleção da microbiota.



Fonte: autora

A depleção da microbiota foi realizada pelo tratamento com antibióticos pelo período de 10 dias, previamente à indução de colite, conforme descrito em *Material e Métodos*. Em seguida, a inflamação intestinal foi induzida por meio da ingestão de água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 3% por 7 dias, a partir do dia zero. Os animais foram tratados com solução veículo ou melatonina (MLT) por gavagem (10 mg/mL), diariamente, do dia 3 ao dia 12, quando o tratamento foi interrompido. A eutanásia ocorreu no 13º dia pós indução de colite. O cólon foi coletado para avaliação das citocinas no sobrenadante do homogenato intestinal por ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). **A-** TNF. **B-** IL-17A. **C-** IFN- γ . **D-** IL-10. Os resultados obtidos foram mostrados em pg/mL e normalizados pelo peso do tecido em gramas. Os resultados são representativos de 1 experimento. * $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As DII são inflamações crônicas que afetam o trato gastrointestinal e resultam de resposta imune desregulada. Diversos estudos investigam novos alvos terapêuticos e tratamentos que visem o controle da resposta inflamatória exacerbada. Tem sido relatado o uso da MLT como agente coadjuvante no tratamento de doenças intestinais; porém, não há um consenso sobre seus efeitos e os mecanismos pelos quais o hormônio atua ainda não estão claros. Em modelos experimentais de colite por DSS (68, 69), ou ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) (56, 57), a utilização da MLT por curto período de tempo ou baixas dosagens foi benéfica na contenção da inflamação. Contudo, em estudos de caso de pacientes acometidos por UC (60), CD (59) e uso crônico da MLT em ratos (61), o tratamento com este hormônio agravou os sintomas da colite.

Atualmente, os dados disponíveis na literatura são inconclusivos; portanto, em nosso projeto, avaliamos se o tratamento com a MLT de fato impactaria na inflamação intestinal, tanto durante a indução da colite quanto no reparo tecidual que mimetizariam, respectivamente, a fase aguda e remissão da doença. Os resultados preliminares mostraram aumento do escore clínico, maior número de leucócitos nos MLN e tendência de aumento de MPO e TNF no cólon de camundongos tratados com MLT, o que nos levou à busca da melhor compreensão acerca dos efeitos deste hormônio na colite e, especialmente, se as variações observadas poderiam ser microbiota-dependentes.

Em nosso modelo experimental, avaliamos a fase aguda da inflamação frente ao tratamento com MLT pelo período de 4 dias. Os sinais clínicos foram acentuados durante a indução da colite e tratamento com o hormônio. Marquez e colaboradores avaliaram o uso da MLT (2 mg/kg) em modelo de colite (61). Nesse estudo, foi avaliada administração intraperitoneal do hormônio em 5 aplicações, sendo 3 delas antes da indução da colite por ácido trinitro-benzensulfônico (TNBS) e 2 após indução da inflamação. Os animais tratados com MLT apresentaram a inflamação atenuada. Entretanto, no mesmo trabalho, a utilização prolongada da MLT por 21 dias promoveu agravamento da colite (61). Nesse sentido, o hormônio pode ter um papel dual na inflamação dependente da duração do tratamento. Além disso, ao compararmos com nossos resultados, em que utilizamos 10 mg/kg de MLT por 4 dias, em comparação com 5 aplicações de 2 mg/kg, podemos sugerir que a dose do hormônio também pode influenciar na resposta inflamatória. Outras divergências podem ser referentes ao momento em que o tratamento foi iniciado e diferentes vias de administração.

Ao analisarmos os resultados do ensaio de proliferação dos esplenócitos durante a fase de aguda, os linfócitos de camundongos tratados *in vivo* com MLT quando não estimulados com mitógeno *in vitro*, apresentaram redução na capacidade proliferativa. Pahlavani e Harris mostraram que diferentes concentrações de MLT em cultura não interferiram na proliferação de linfócitos esplênicos de ratos na presença e ausência de estimulação com mitógeno (70). Aparentemente, em nosso modelo, o tratamento *in vivo* com o hormônio parece ter agido de forma a inibir a proliferação dos linfócitos. No entanto, não sabemos explicar porque a redução não ocorreu em todos os estímulos *in vitro*. Novos ensaios precisariam ser realizados para compreensão desses dados.

A piora clínica dos animais tratados com MLT pode ser parcialmente explicada pelo aumento de TNF. Estudos mostraram aumento da produção de TNF em amostras de cólon de indivíduos com DII ou animais com indução de colite e, o tratamento com inibidores de TNF, auxiliaram no controle da inflamação (71-73).

Complementando as análises de citocinas na fase aguda da colite, surpreendentemente, houve redução significativa de IL-17 no intestino de camundongos tratados com MLT. A IL-17, em conjunto com as citocinas IL-21 e IL-22, estão relacionadas com células do perfil de resposta imune Th17. Em pacientes com CD e UC houve maior expressão dessas citocinas no soro e cólon, juntamente com aumento do número de células Th17 no cólon, em comparação com indivíduos saudáveis (27, 28). As células Th17 e suas citocinas características, desempenham um papel de extrema importância no desenvolvimento de DII, contribuindo para a patogenicidade por favorecer inflamação e danos na mucosa intestinal. Em contrapartida, a IL-17 também possui papel protetor. Quando presente em inflamações, promove o recrutamento de neutrófilos e controle da carga bacteriana (74, 75).

Além das alterações clínicas observadas, o tratamento com MLT levou ao aumento de leucócitos circulantes, especificamente de células mononucleares e neutrófilos. Durante infecções, células do sistema imunológico são recrutadas do sangue periférico para locais inflamados. Para isso, há inicialmente aumento da produção de leucócitos pela medula óssea, que trafegam pela corrente sanguínea até sítios inflamatórios. Mesmo com o aumento de leucócitos circulantes, não foi observada diferença entre os grupos nas dosagens de MPO e NAG (dados não mostrado), que quantificam indiretamente a presença de neutrófilos e macrófagos no cólon. Possivelmente, devido à redução de IL-17 no cólon de animais tratados com MLT, o recrutamento de neutrófilos não foi favorecido nesses camundongos (dados não mostrados).

Referente aos dados de perda de peso corpóreo e escore clínico avaliados durante o reparo da inflamação, estes corroboram com o estudo citado anteriormente, que demonstrou agravamento da colite em camundongos tratados com MLT por 21 dias (61). Em contrapartida, camundongos submetidos à depleção da microbiota antes da indução da colite, apresentaram reversão do fenótipo. Sugerimos então, que o agravamento da inflamação pode ter envolvimento da microbiota intestinal e que a MLT pode agir direta ou indiretamente modulando essas bactérias ou a resposta imune local. Em concordância com os resultados obtidos na fase aguda, durante a remissão da inflamação, o tratamento com MLT também promoveu o aumento de células mononucleares e neutrófilos circulantes. Entretanto, a redução de monócitos após a depleção da microbiota corrobora a menor necessidade de contenção da inflamação intestinal nestes animais.

O ensaio de proliferação de células do baço não mostrou diferença entre os tratamentos durante a remissão da doença; porém, após a antibioticoterapia, linfócitos de animais tratados com MLT *in vivo* e estimuladas *in vitro* com ConA ou MLT + ConA, apresentaram redução da frequência proliferativa. Em relação às células dos MLN, houve redução da proliferação de linfócitos de animais tratados com MLT *in vivo* e estimuladas *in vitro* com meio, ConA e MLT + ConA e, após a depleção da microbiota, não foi observada diferença. Os fatores que induziram diferentes frequências proliferativas entre os órgãos não estão claros e novos ensaios seriam importantes para esclarecer melhor os resultados. Entretanto, de maneira geral, o estímulo com MLT *in vitro* não induziu redução ou aumento da capacidade proliferativa dos linfócitos, o que corrobora com os resultados descritos por Pahlavani e Harris (70). Além disso, podemos verificar que proliferação celular foi reduzida após a antibioticoterapia sob o estímulo de mitógeno, tanto de linfócitos do baço quanto dos MLN. Podemos inferir que nos animais submetidos à depleção da microbiota, a agressão da mucosa foi menor devido à redução da exposição antigênica. Consequentemente, a inflamação tecidual foi menor, o que implicaria também na redução da proliferação linfocitária. Em oposição, aos nossos resultados, um estudo identificou maior capacidade proliferativa de linfócitos murinos na presença de MLT (76). O ensaio de proliferação pode refletir o que acontece *in vivo* nos animais. Em nosso modelo, previamente ao ensaio, os animais estavam em condição inflamatória devido à indução de colite, enquanto no outro estudo os animais estavam saudáveis.

A imunofenotipagem dos linfócitos foi importante para a caracterização de diferentes populações celulares no baço e MLN, que poderiam estar envolvidas no agravamento da colite frente ao tratamento com MLT. Os linfócitos T de memória são células de vida longa que respondem de forma antígeno-específica e coordenam respostas imunes após a reexposição ao

antígeno. Estas células podem ser divididas em subpopulações devido à expressão heterogênea de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas, promovendo distintos padrões de migração (77, 78). São elas, as células T de memória central (TCM), células T de memória efetora (TEM) e células T de memória residentes (TRM). As células TCM expressam os receptores CCR7 e CD62L e trafegam para órgãos linfoides secundários. As células TEM podem perder a expressão desses receptores, migrando para tecidos periféricos inflamados, em estímulo a antígenos patogênicos (77, 78). As células TRM formam um subconjunto não circulante que residem em tecidos periféricos (79).

Curiosamente, em nosso trabalho, foi observado aumento de células TEM no baço de animais tratados com MLT. Normalmente, essas células tendem a migrar para tecidos periféricos inflamados, a exemplo da mucosa intestinal. Especulamos que as células TCM podem ter reduzido a expressão de CD62L sem, entretanto, terem migrado para o cólon, que é o principal foco da inflamação, no momento avaliado. Linfócitos TEM CD4⁺ ou CD8⁺ aumentados na mucosa intestinal promovem maior inflamação. Em oposição, após a depleção da microbiota intestinal, não foi observado o mesmo aumento de células TEM. Dessa forma, sugere-se que o aumento dessa subpopulação seja dependente da interação da MLT com as bactérias presentes no intestino ou resposta imune local, que poderia modular a população microbiana.

Nos MLN, a MLT promoveu redução de linfócitos TRM CD4⁺ durante o reparo. Essa população de células é importante em tecidos periféricos inflamados, onde atuam no controle de patógenos resistentes. Sabe-se que há aumento desses linfócitos em locais com alta carga patogênica. Possivelmente, a diminuição dessa população de linfócitos de memória residentes está relacionada com a sua migração para o cólon, onde poderiam atuar de forma a induzir maior inflamação. O mesmo não foi observado após a antibioticoterapia, indicando que efeito da MLT ocorreu via microbiota.

Células T reguladoras (Treg) desempenham papel essencial na manutenção da homeostase intestinal. Nas DII, essas células atuam restringindo a atividade de outras células, como células T efetoras, linfócitos B, células NK e produção de citocinas pró-inflamatórias com a finalidade de inibir a progressão das doenças (80). Os linfócitos Treg são caracterizados pela expressão de algumas moléculas, como CD25. A expressão da molécula CD25 pode ser induzida em linfócitos CD25⁻, tornando-os capazes de suprimir atividades pró-inflamatórias (81). Outras moléculas característica das populações de linfócitos Treg são FoxP3, CTLA-4 (81), GITR e PD-1 (82).

Em especial, as células Treg ($CD25^+FoxP3^+$) se acumulam no cólon e em órgãos linfoides secundários em condições de saúde, sendo encontradas em maior número durante processos inflamatórios. Para a resolução da colite em camundongos foi relatado o acúmulo de linfócitos $TCD4^+CD25^+FoxP3^+$ no cólon, baço e MLN. Além disso, a remissão da doença foi dependente da presença de IL-10 e células Treg produtoras de IL-10 no cólon (83).

Em nosso estudo, houve redução da frequência de células Treg $CD25^+FoxP3^+$ e $CD25^-FoxP3^+$ no baço de camundongos sem depleção da microbiota e tratados com MLT. Similarmente, após a depleção da microbiota, também houve redução de linfócitos Treg $FoxP3^+$; porém, apenas na população de linfócitos $CD25^+$. Estes resultados indicaram que a ação da MLT reduzindo essa população, não ocorreu por interação direta ou indireta com a microbiota. A diminuição de células reguladoras $CD25^+FoxP3^+$, juntamente com redução de $CD25^-FoxP3^+$, população que pode passar a expressar a molécula CD25, possivelmente resultou no aumento de mecanismos efetores e redução de resposta anti-inflamatórias.

Analisando a produção de citocinas no baço, houve expressivo aumento de TNF induzido pelo tratamento com MLT em animais não submetidos a antibioticoterapia. Nos MLN, o tratamento com o hormônio induziu menor frequência de linfócitos $CD3^+CD4^+IL-10^+$ na presença da microbiota intestinal. Em camundongos submetidos à depleção da microbiota, houve tendência ao aumento na frequência de células $CD3^+CD4^+IL-10^+$ e significativo aumento de células $CD3^+CD4^+IL-4^+$. As citocinas IL-4 e IL-10 aumentadas após a depleção corroboram a melhora da colite, confirmada pela menor perda de peso e escore clínico da doença.

A produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 está relacionada com mecanismos reguladores do organismo para controle das inflamações. A produção de IL-10 por subconjuntos de células Treg promoveram a manutenção da tolerância da mucosa (84). Um estudo demonstrou que o equilíbrio entre respostas Th1 e Th2 são importantes para a regulação da resposta inflamatória, e que o aumento de IL-4 e IL-10 foram essenciais para a melhora da colite (85).

Durante o processo inflamatório, há ação de células residentes e células recém migradas para a mucosa intestinal, o que promove maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Em nosso trabalho, durante a fase de reparo que representaria a remissão clínica, foi observada maior atividade enzimática de MPO e NAG, caracterizando maior infiltração de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, no cólon de animais tratados com MLT. Sabe-se que o recrutamento excessivo de neutrófilos é umas das principais causas da inflamação persistente na DII. Uma vez recrutados para o sítio inflamatório, reconhecem patógenos e em resposta produzem altas quantidades de ROS, peptídeos antimicrobianos, proteases e

mediadores inflamatórios (86, 87). Nesse sentido, o recrutamento e acúmulo exagerado de neutrófilos ativados no cólon pode acarretar em lesão tecidual e condição patológica. Em animais submetidos à depleção da microbiota, a quantificação de MPO já não foi mais diferente entre os grupos, indicando que uma das formas de piora da colite frente à MLT pode ser via acúmulo local de neutrófilos, para responder à disbiose intestinal causada pelo DSS. De fato, os neutrófilos são de crucial importância para o controle da translocação bacteriana.

Em relação aos macrófagos, estes possuem a função de eliminação de células apoptóticas ou senescentes (88), possuem atividade bactericida e produção de citocinas, como IL-10, IL-6 e TNF (89, 90), sendo que a última, em nossos resultados, estava aumentada no cólon e no baço de camundongos tratados com MLT. Em contrapartida, no cólon de camundongos submetidos à depleção da microbiota, foi observada redução de TNF e NAG após tratamento prolongado com MLT. A redução de NAG caracteriza menor atividade de macrófagos no intestino, possivelmente devido à menor necessidade de mecanismos bactericidas após antibioticoterapia. Além disso, seus mecanismos pró-inflamatórios, como produção de TNF, também foram provavelmente reduzidos após a depleção da microbiota.

Shaw e colaboradores descreveram diferentes subconjuntos de macrófagos no intestino e demonstraram a importância da presença de microbiota comensal ativa para estabelecimento das subpopulações dessas células. O número total de monócitos e macrófagos no cólon é menor em camundongos livre de germes (*germfree* - GF) em comparação com camundongos livre de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF) (90). Resultado semelhante foi apresentado por Bain e colaboradores, que verificaram menor quantidade de macrófagos no cólon de camundongos livre de germes ou tratados com antibióticos de amplo espectro, apontando para a influência da microbiota no recrutamento de macrófagos (89). Nesse sentido, correlacionando o importante papel da microbiota nessa população de células, sugerimos que o aumento da atividade de macrófagos poderia ser induzido pela ação da MLT via microbiota intestinal, já que após a antibioticoterapia, o fenótipo é revertido.

Ensaio *in vitro* mostram que a MLT atua na ativação de monócitos humanos e promove a produção de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6 (91). Resultados semelhantes foram observados em camundongos, nos quais a administração do hormônio pode aumentar a resposta inflamatória (92). Macrófagos esplênicos de camundongos tratados *in vivo* com MLT (10 mg/kg) ou com solução salina foram incubados com células do timo. O pré-tratamento com o hormônio proporcionou maior produção das citocinas TNF e IL-1 e elevou a expressão de moléculas de MHC de classe II em comparação com o controle. Além disso, macrófagos e células T foram expostos previamente a um antígeno e, em seguida, foram colocados em cultura

pelo período de 5 dias. Linfócitos T cultivados com os macrófagos de animais tratados com MLT apresentaram maior proliferação celular. Esses resultados, aumento das citocinas e expressão de MHC II, podem em conjunto ter induzido a maior proliferação das células T (92), resultados que corroboram os nossos.

Em nosso trabalho, além do aumento de TNF no cólon de animais, houve tendência ao aumento de IL-12. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, produzida rapidamente durante infecções. Monócitos humanos cultivados na presença de diferentes dosagens de MLT produzem IL-12, de maneira dose-dependente de MLT (93). No sítio inflamatório, a IL-12 pode atuar em células T e NK, induzindo produção de outras citocinas pró-inflamatórias e aumentando respostas citotóxicas. Além disso, a IL-12 está correlacionada com a diferenciação dos subtipos de perfis de células T, direcionando a polarização para linfócitos Th1 (94).

As citocinas do perfil Th1 tem grande influência no desenvolvimento e patogenicidade da CD. O modelo experimental de colite por DSS em camundongos C57BL/6, a resposta inflamatória é polarizada para o perfil Th1, com aumento de TNF e IFN- γ (95). Nesse sentido, em nossos resultados, sugerindo polarização para a resposta Th1 em camundongos tratados com MLT, pode ter influenciado o agravamento da colite nesses animais.

Estudos indicam que a microbiota muda conforme a idade, dieta e doenças (96-99). Essas alterações têm impactos na função do sistema imunológico, tanto localmente no cólon, quanto sistemicamente. Trabalhos recentes demonstraram que bactérias intestinais podem responder ao estímulo com o hormônio MLT (62, 63). Neste contexto, nossos resultados apresentam fortes indícios de que a MLT poderia modular a microbiota intestinal e, conseqüentemente, regular a inflamação no modelo de colite induzida por DSS. Por outro lado, a ação da MLT em diferentes células poderia também estar diretamente relacionada com a piora da inflamação intestinal no grupo tratado com o hormônio, na presença da microbiota. De forma geral, a MLT agravou a colite experimental induzida por DSS durante a indução da colite e reparo da inflamação. A MLT proporcionou maior infiltração de leucócitos, como neutrófilos e macrófagos no cólon, com conseqüente maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF. Além disso, o aumento de linfócitos TEM e redução de células Treg FoxP3⁺ no baço, podem estar associados ao aumento de mecanismos efetores inflamatórios e redução de mecanismos reguladores. Em conjunto, são resultados importantes que podem, contribuir para um ambiente mais pró-inflamatório nesses animais, o que foi microbiota-dependente. Nesse sentido, a MLT atuou de modo a regular a resposta inflamatória, de forma dependente da microbiota local, direta ou indiretamente.

Estudos futuros ainda serão realizados para se averiguar, de forma mais aprofundada, os mecanismos de ação da MLT na regulação da inflamação, via microbiota intestinal. Consideramos a utilização de um antagonista do hormônio, como o luzindole, para bloqueio da ação da MLT, além da caracterização das principais populações de bactérias no cólon dos camundongos nos diferentes grupos estudados.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A melatonina agravou a colite experimental durante a fase aguda da inflamação.
- A melatonina dificultou a remissão do processo inflamatório durante a fase de reparo tecidual.
- A MLT regula a resposta inflamatória via microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7(10):827-51.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2066-78.
3. Olen O, Askling J, Sachs MC, Neovius M, Smedby KE, Ekbohm A, et al. Mortality in adult-onset and elderly-onset IBD: a nationwide register-based cohort study 1964-2014. *Gut*. 2019.
4. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1097-104.
5. Jussila A, Virta LJ, Pukkala E, Farkkila MA. Mortality and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide register study in Finland. *J Crohns Colitis*. 2014;8(9):1088-96.
6. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):247-83.
7. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6(10):965-90.
8. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2010;4(1):7-27.
9. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
10. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720-7.
11. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
12. Moller FT, Andersen V, Wohlfahrt J, Jess T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977-2011. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(4):564-71.
13. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. 2019;157(3):647-59 e4.
14. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.
15. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
16. Gasparini RG, Sasaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in Sao Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018;11:423-9.
17. Lima Martins A, Volpato RA, Zago-Gomes MDP. The prevalence and phenotype in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):87.
18. Parente JM, Coy CS, Campelo V, Parente MP, Costa LA, da Silva RM, et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1197-206.
19. Quaresma AB, Kaplan GG, Kotze PG. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019.
20. Bamias G, Arseneau KO, Cominelli F. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017;33(6):411-6.
21. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):154-70.
22. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2017;12(7):1295-309.

23. Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(33):6016-29.
24. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
25. Chung YW, Gwak HJ, Moon S, Rho M, Ryu JH. Functional dynamics of bacterial species in the mouse gut microbiome revealed by metagenomic and metatranscriptomic analyses. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227886.
26. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
27. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70.
28. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*. 2014;63(11):943-50.
29. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med*. 1991;325(13):928-37.
30. Sales-Campos H, Basso PJ, Alves VB, Fonseca MT, Bonfa G, Nardini V, et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(2):96-107.
31. Breton J, Kastl A, Hoffmann N, Rogers R, Grossman AB, Mamula P, et al. Efficacy of Combination Antibiotic Therapy for Refractory Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(9):1586-93.
32. Gil-Candel M, Gascon-Canovas JJ, Urbietta-Sanz E, Rentero-Redondo L, Onteniente-Candela M, Iniesta-Navalon C. Comparison of drug survival between infliximab and adalimumab in inflammatory bowel disease. *Int J Clin Pharm*. 2020.
33. Long GH, Tatro AR, Oh YS, Reddy SR, Ananthakrishnan AN. Analysis of Safety, Medical Resource Utilization, and Treatment Costs by Drug Class for Management of Inflammatory Bowel Disease in the United States Based on Insurance Claims Data. *Adv Ther*. 2019;36(11):3079-95.
34. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.
35. Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*. 2009;44(5):328-34.
36. Sotak M, Mrnka L, Pacha J. Heterogeneous expression of melatonin receptor MT1 mRNA in the rat intestine under control and fasting conditions. *J Pineal Res*. 2006;41(2):183-8.
37. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol*. 2011;17(34):3888-98.
38. Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*. 1995;18(1):28-31.
39. Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res*. 1995;41(5):391-5.
40. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*. 2003;34(4):233-41.
41. Migliori ML, Romanowski A, Simonetta SH, Valdez D, Guido M, Golombek DA. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res*. 2012;53(1):38-46.
42. Tosches MA, Bucher D, Vopalensky P, Arendt D. Melatonin signaling controls circadian swimming behavior in marine zooplankton. *Cell*. 2014;159(1):46-57.
43. Lee K, Zawadzka A, Czarnocki Z, Reiter RJ, Back K. Molecular cloning of melatonin 3-hydroxylase and its production of cyclic 3-hydroxymelatonin in rice (*Oryza sativa*). *J Pineal Res*. 2016;61(4):470-8.

44. Kleszczynski K, Kim TK, Bilaska B, Sarna M, Mokrzyński K, Stegemann A, et al. Melatonin exerts oncostatic capacity and decreases melanogenesis in human MNT-1 melanoma cells. *J Pineal Res.* 2019;67(4):e12610.
45. Heo JS, Pyo S, Lim JY, Yoon DW, Kim BY, Kim JH, et al. Biological effects of melatonin on human adiposederived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2019;44(6):2234-44.
46. Sanchez AB, Clares B, Rodriguez-Lagunas MJ, Fabrega MJ, Calpena AC. Study of Melatonin as Preventive Agent of Gastrointestinal Damage Induced by Sodium Diclofenac. *Cells.* 2020;9(1).
47. Luo J, Zhang Z, Sun H, Song J, Chen X, Huang J, et al. Effect of melatonin on T/B cell activation and immune regulation in pinealectomy mice. *Life Sci.* 2020;242:117191.
48. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18(3):537-9.
49. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000;28(4):193-202.
50. Maldonado MD, Mora-Santos M, Naji L, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Calvo JR. Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res.* 2010;62(3):282-7.
51. Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res.* 2004;37(1):48-54.
52. Raikhlin NT, Kvetnoy IM. Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem.* 1976;55(1):19-24.
53. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia.* 1993;49(8):665-70.
54. Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res.* 2010;49(1):23-34.
55. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology.* 2001;74(3):178-84.
56. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, et al. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res.* 2001;30(1):1-12.
57. Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Riccardi L, Muia C, Di Bella P, et al. Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis. *J Pineal Res.* 2006;41(4):363-73.
58. Trivedi PP, Jena GB. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: investigation on possible mechanisms. *Dig Dis Sci.* 2013;58(12):3460-74.
59. Calvo JR, Guerrero JM, Osuna C, Molinero P, Carrillo-Vico A. Melatonin triggers Crohn's disease symptoms. *J Pineal Res.* 2002;32(4):277-8.
60. Maldonado MD, Calvo JR. Melatonin usage in ulcerative colitis: a case report. *J Pineal Res.* 2008;45(3):339-40.
61. Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, la de Lastra CA, Motilva V. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res.* 2006;40(1):48-55.
62. Paulose JK, Cassone VM. The melatonin-sensitive circadian clock of the enteric bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Gut Microbes.* 2016;7(5):424-7.
63. Paulose JK, Wright JM, Patel AG, Cassone VM. Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146643.
64. Song TY, Lin HC, Chen CL, Wu JH, Liao JW, Hu ML. Ergothioneine and melatonin attenuate oxidative stress and protect against learning and memory deficits in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Free Radic Res.* 2014;48(9):1049-60.

65. Ersoy OF, Ozkan N, Ozsoy Z, Kayaoglu HA, Yenidogan E, Celik A, et al. Effects of melatonin on cytokine release and healing of colonic anastomoses in an experimental sepsis model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2016;22(4):315-21.
66. Bento AF, Leite DF, Claudino RF, Hara DB, Leal PC, Calixto JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1213-21.
67. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159(2):574-81.
68. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J Pineal Res.* 1995;19(1):31-9.
69. Liu G, Jiang Q, Chen S, Fang J, Ren W, Yin J, et al. Melatonin alters amino acid metabolism and inflammatory responses in colitis mice. *Amino Acids.* 2017;49(12):2065-71.
70. Pahlavani MA, Harris MD. In vitro effects of melatonin on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in young and old rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1997;19(3):327-37.
71. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut.* 1993;34(12):1705-9.
72. Sabel R, Fronza AS, Carrenho LZB, Maes A, Barros ML, Pollo LAE, et al. Anti-inflammatory activity of the sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Ethnopharmacol.* 2019;245:112186.
73. Molander P, Kempainen H, Ilus T, Sipponen T. Long-term deep remission during maintenance therapy with biological agents in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol.* 2020;55(1):34-40.
74. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA, et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol.* 2017;10(3):673-84.
75. Waldschmitt N, Kitamoto S, Secher T, Zacharioudaki V, Boulard O, Floquet E, et al. The regenerating family member 3 beta instigates IL-17A-mediated neutrophil recruitment downstream of NOD1/2 signalling for controlling colonisation resistance independently of microbiota community structure. *Gut.* 2019;68(7):1190-9.
76. Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD, Nelson RJ. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(5):R1476-82.
77. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
78. Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, et al. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature.* 2011;477(7363):216-9.
79. Bishu S, El Zaatari M, Hayashi A, Hou G, Bowers N, Kinnucan J, et al. CD4+ Tissue-resident Memory T Cells Expand and Are a Major Source of Mucosal Tumour Necrosis Factor alpha in Active Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2019;13(7):905-15.
80. Lim SM, Jeong JJ, Choi HS, Chang HB, Kim DH. Mangiferin corrects the imbalance of Th17/Treg cells in mice with TNBS-induced colitis. *Int Immunopharmacol.* 2016;34:220-8.
81. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, 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):1875-86.
82. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H, Azuma M, Kubo M, et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation.* 2007;83(6):774-82.

83. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9):5852-60.
84. Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, Aggarwal P, Jia S, Charbonnier LM, et al. IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. *J Immunol.* 2012;189(12):5638-48.
85. Bing X, Xuelei L, Wanwei D, Linlang L, Keyan C. EGCG Maintains Th1/Th2 Balance and Mitigates Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium through TLR4/MyD88/NF-kappaB Signaling Pathway in Rats. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017;2017:3057268.
86. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012;5(4):354-66.
87. Ahmed AU, Yim HCH, Alorro M, Ernst M, Williams BRG. Integrin-Linked Kinase Expression in Myeloid Cells Promotes Inflammatory Signaling during Experimental Colitis. *J Immunol.* 2017.
88. Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(7):721-31.
89. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol.* 2014;15(10):929-37.
90. Shaw TN, Houston SA, Wemyss K, Bridgeman HM, Barbera TA, Zangerle-Murray T, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J Exp Med.* 2018;215(6):1507-18.
91. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol.* 1998;160(3):1191-7.
92. Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol.* 1993;15(4):463-8.
93. Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999;65(20):2143-50.
94. Thieu VT, Yu Q, Chang HC, Yeh N, Nguyen ET, Sehra S, et al. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity.* 2008;29(5):679-90.
95. Yang F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, et al. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. *J Immunol Res.* 2017;2017:7047201.
96. Ho LKH, Tong VJW, Syn N, Nagarajan N, Tham EH, Tay SK, et al. Gut microbiota changes in children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathog.* 2020;12:6.
97. Eck A, Rutten N, Singendonk MMJ, Rijkers GT, Savelkoul PHM, Meijssen CB, et al. Neonatal microbiota development and the effect of early life antibiotics are determined by two distinct settler types. *PLoS One.* 2020;15(2):e0228133.
98. Johnson BM, Gaudreau MC, Gudi R, Brown R, Gilkeson G, Vasu C. Gut microbiota differently contributes to intestinal immune phenotype and systemic autoimmune progression in female and male lupus-prone mice. *J Autoimmun.* 2020:102420.
99. Wan Y, Tang J, Li J, Li J, Yuan J, Wang F, et al. Contribution of diet to gut microbiota and related host cardiometabolic health: diet-gut interaction in human health. *Gut Microbes.* 2020:1-7.

ANEXOS

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO


Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal", registrada sob nº 17.1.1073.60.3, sob a responsabilidade de Lia Vezanfard Barbosa e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 13/06/2018 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Jefferson Luiz da Silva, Camila Figueiredo Pinzan, Murillo Duarte da Silva e Viviani Nardini.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 05/05/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico C57BL/6
Nº de animais	180
Sexo	Macho
Peso/Idade	20g/ 6 semanas
Origem	Biotério Central da PUSP RP

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2018.


 Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

ANEXO B – Autorização do Adendo da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Estudo dos efeitos da melatonina no controle da colite experimental, via modulação da microbiota intestinal", registrada sob nº 17.1.1073.60.3, sob a responsabilidade de Lia Vezenfard Barbosa e Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião do dia 06/08/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Jefferson Luiz da Silva e Camila Figueiredo Pinzan.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 30/06/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	260
Peso/Idade	20 g/ 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 09 de agosto de 2019.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

