

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Influência do gene *Ahr* no desenvolvimento da Colite Ulcerativa por sulfato
sódico de dextrana em modelo animal de inflamação aguda

Bridilla Luiza Colhado Rodrigues

São Paulo

2019

Bridilla Luiza Colhado Rodrigues

Influência do gene *Ahr* no desenvolvimento da Colite Ulcerativa por sulfato
sódico de dextrana em modelo animal de inflamação aguda

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização
Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos
do Instituto Butantan, sob orientação de Dr. Orlando
Garcia Ribeiro Filho

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Sena, Bridilla Luiza Colhado Rodrigues

Influência do gene Ahr no desenvolvimento da Colite Ulcerativa por sulfato sódico de dextrana em modelo animal de inflamação aguda / Bridilla Luiza Colhado Rodrigues; orientador Orlando Garcia Ribeiro Filho. – São Paulo, 2019.

29 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

1. Assunto. I. Orlando Garcia Ribeiro Filho. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir de modelo desenvolvido pela

Biblioteca do Instituto Butantan

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
"Dr. Antônio Guilherme de Souza"
Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Bridilla Luiza Colhado Rodrigues, aluno(a) do do Curso de Especialização Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

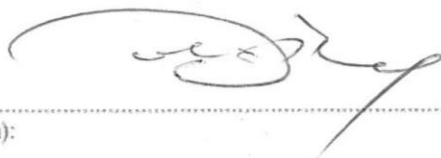
- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 22 de Fevereiro de 2019



.....
aluno(a): Bridilla Luiza Colhado Rodrigues



De acordo:.....
Orientador(a):

RESUMO

A colite ulcerativa (UC) é uma doença inflamatória intestinal caracterizada por um processo crônico que causa lesões na mucosa do cólon e está correlacionada com um risco aumentado de carcinogênese intestinal. O desenvolvimento da UC envolve fatores ambientais e genéticos sendo conhecidos como uma doença multifatorial. Estudos genéticos indicaram uma associação entre variantes do gene *Ahr* (receptor de hidrocarboneto de aromático) e a UC, uma vez que a proteína AHR tem um papel importante na progressão da doença. O modelo experimental mais eficiente de UC é realizado pela ingestão de sulfato sódico de dextrana (DSS) por animais suscetíveis à inflamação. Camundongos geneticamente selecionados para alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) resposta inflamatória aguda (AIR), produzida pela injeção subcutânea de Biogel, foram utilizados como um modelo para estudar o envolvimento do AHR na evolução UC. Durante o processo seletivo para AIR, os alelos *Ahr^d* (baixa afinidade) e *Ahr^{b1}* (alta afinidade) foram fixados em homozigose em camundongos AIRmax e AIRmin, respectivamente. Como o polimorfismo genético está associado à baixa e alta afinidade da AHR, nosso objetivo foi estudar a relação entre a intensidade da UC para o tratamento com DSS e o polimorfismo de *Ahr* em camundongos fenotipicamente selecionados para a AIR. Os animais AIRmax e AIRmin e as linhagens isogênicas Balb/c e C57Bl/6, foram separados em grupos e foram tratados com 0, 2, 2,5 ou 3% DSS (30-50 kDa - MP) diluídos em água destilada por 7 dias consecutivos. Para verificar a modulação da UC, grupos de camundongos AIRmax e AIRmin foram tratados com DSS, um ligante de AHR, além de α -naftoflavona, dissolvido em azeite e administrado por via oral por gavagem durante 7 dias consecutivos. Os parâmetros considerados para caracterização da UC foram perda de peso, diarreia e fezes sanguinolentas, como índice de atividade da doença (IAD), atividade de mieloperoxidase e análise histopatológica do cólon. Nossos dados mostram que a dose de 3% de DSS induz a UC principalmente em camundongos AIRmax, Balb/c e C57Bl/6 caracterizados por IAD. Foram avaliados aos 7 (agudos) e aos 30 (crônicos) dias após o início do tratamento com DSS, o tamanho do cólon, a atividade de MPO e arquitetura histológica, que foram os melhores parâmetros associados ao IAD. Em diferentes graus, foi observado um decréscimo do IAD nos camundongos AIRmin, considerando o AHR como uma importante molécula moduladora da colite ulcerativa.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease characterized by a chronic process that causes lesions in the colon mucosa and is correlated with an increased risk of intestinal carcinogenesis. The development of UC involves environmental and genetic factors being known as a multifactorial disease. Genetic studies have indicated an association between variants of the Ahr (aromatic hydrocarbon receptor) gene and UC disease, since the AHR protein plays an important role in the progression of the disease. The most efficient experimental model of UC was performed by ingestion of sodium dextran sulfate (DSS) by animals susceptible to inflammation. Mice genetically selected for high (AIRmax) or low (AIRmin) acute inflammatory response (AIR) for Biogel subcutaneous injection were used as an experimental model to study the involvement of AHR in UC evolution. During the AIR selection process, the Ahr^d (low affinity) and Ahr^{b1} (high affinity) alleles were fixed in AIRmax and AIRmin mice, respectively. As the *Ahr* genetic polymorphism is associated with the low and high affinity of the AHR, our objective was to study the relationship between the intensity of UC produced by DSS ingestion and the Ahr polymorphism in mice phenotypically selected for AIR. The AIRmax and AIRmin mice and Balb/c and C57Bl/6 isogenic strains were separated into groups and treated with 0, 2, 2.5 or 3% DSS (30-50 kDa - MP) diluted in distilled water for 7 consecutive days. To verify UC modulation, groups of AIRmax and AIRmin mice were treated with DSS associated to α -naphthoflavone an AHR antagonist dissolved in olive oil and orally administered by gavage for 7 consecutive days. The parameters considered for characterization of UC were weight loss, diarrhea and bloody stools as disease activity index (IAD) and myeloperoxidase activity measure and histopathological analysis. Our data show that the 3% dose of DSS induces UC mainly in AIRmax, Balb / c and C57Bl / 6 mice characterized by IAD. Seven days (acute) and 30 (chronic) days after the start of DSS treatment, colon size, MPO activity and histological architecture were the best parameters associated with IAD. In different degrees, a decrease of the IAD in the AIRmin mice was observed. Therefore, AHR is considered an important ulcerative colitis modulator.

1. INTRODUÇÃO

A Colite Ulcerativa (UC – do inglês *Ulcerative Colitis*) é conhecida como uma doença crônica, de etiologia desconhecida, multifatorial e que possui influência ambiental. É dada por uma inflamação difusa na mucosa do cólon, que pode evoluir, contribuindo para uma diminuição das células caliciformes, alteração da morfologia das criptas, provocando ulcerações do epitélio do lúmen, com risco de carcinoma. Os mais comuns sintomas e sinais são: dores abdominais, diarreia e eliminação de muco, sangue ou pus durante as evacuações (1). O tratamento é paliativo, com uso de medicamentos anti-inflamatórios e imunossupressores. Em casos mais graves pode ser indicada a colonectomia total ou parcial (2-4).

Por ser uma doença multifatorial, a UC está associada com a predisposição genética, anormalidades imunológicas, desequilíbrio da microbiota intestinal e fatores ambientais (5). Alguns fatores de risco ligados ao ambiente e as modificações encontradas na microbiota intestinal podem levar a um desajuste da resposta imune, ocasionando um processo inflamatório crônico do cólon (6, 7).

Alguns fatores de risco ligados ao ambiente e modo de vida ocidental moderno tais como dietas ricas em gorduras e carboidratos, uso de medicações como contraceptivos, anti-inflamatórios e antibióticos, carência de vitamina D, estresse, poluentes do ar, combinados ou não com modificações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal que levariam a uma quebra da barreira epitelial e/ou uma desregulação da resposta do sistema imune resultariam em um processo inflamatório do cólon (6, 7).

Além de estudos demonstrando uma mudança na microbiota intestinal de pacientes com UC (6, 8), estudos relatam uma identificação da susceptibilidade por meio de controle genético na colite ulcerativa. A doença foi determinada como sendo poligenicamente regulada por mais de 100 genes rastreados, os quais se associam à doença por meio de *loci* cromossômicos reguladores da barreira epitelial, da produção de interleucinas e da diferenciação de células T auxiliares 1 e 17 (Th1 e Th17) (2, 3, 9).

1.1 Características e funções do gene *Ahr*

Particularmente o gene *Ahr* (*Aryl hydrocarbon receptor*) tem sido alvo de estudos devido aos diversos papéis em muitas funções celulares, tais como: regulador de genes envolvidos com proliferação celular, produção de quimiocinas e citocinas, regulação da inflamação e imunidade, apoptose, diferenciação adiposa, função supressora de tumores, diferenciação celular imune e função reprodutiva além de ser um fator de transcrição e manter a homeostasia da mucosa intestinal (10-12).

O AHR é uma proteína de *helix-loop-helix* (bHLH) e um membro da superfamília de PAS (*Per-Arnt-Sim*), cujo o domínio funciona como uma superfície de ligação para os ligantes aromáticos. O locus *Ahr*, localizado no cromossomo 12, é polimórfico em camundongos e em humanos; estudos com diferentes linhagens de camundongos demonstraram polimorfismo genético representado por 4 alelos, onde o alelo *Ahr^d*, que codifica o receptor de baixa afinidade, está presente nas linhagens DBA/2, SJL, CAST/Ei e 129/SvJ; já os alelos *Ahr^{b1}*, *Ahr^{b2}* e *Ahr^{b3}* que codificam o receptor de alta afinidade, estão presentes, nas linhagens C57Bl/6, Balb/cB4, C3H/HeJ, A/J e CBA/J (13).

Os efeitos de ativação são mediados por polimorfismos funcionais presentes no gene *Ahr*. Em camundongos AIRmax e AIRmin, fenotipicamente selecionados para a resposta inflamatória aguda (AIR, *Acute Inflammatory Response*), essas variações estão associadas com o *Ahr^d* que codifica o receptor de baixa afinidade, e o alelo *Ahr^{b1}* de alta afinidade, respectivamente. A baixa afinidade está relacionada com uma substituição no receptor de uma valina por uma alanina (A375V) no sítio de ligação do alelo *Ahr*, o que leva uma suscetibilidade em relação à resposta inflamatória na colite ulcerativa (14, 15).

O AHR foi identificado pela primeira vez como mediador da toxicidade da dioxina, no entanto apresenta papéis diversos em muitas funções celulares (10, 16). A molécula AHR é ativada em uma variedade de tipos celulares, tais como: células T, células B, células NK, macrófagos e células dendríticas, bem como células epiteliais, células linfóides inatas e linfócitos intra-epiteliais (17). Há estudos demonstrando que o AHR controla a geração e o equilíbrio de células T CD4 regulatória (Treg) e Th17, consideradas células regulatórias importantes no início de doenças autoimunes, através da modificação da produção de citocinas (18).

O AHR pode ser ativado por ligantes do meio exógeno como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e poluentes ambientais, além de compostos endógenos do tipo aminoácidos derivados de triptofano (19, 20).

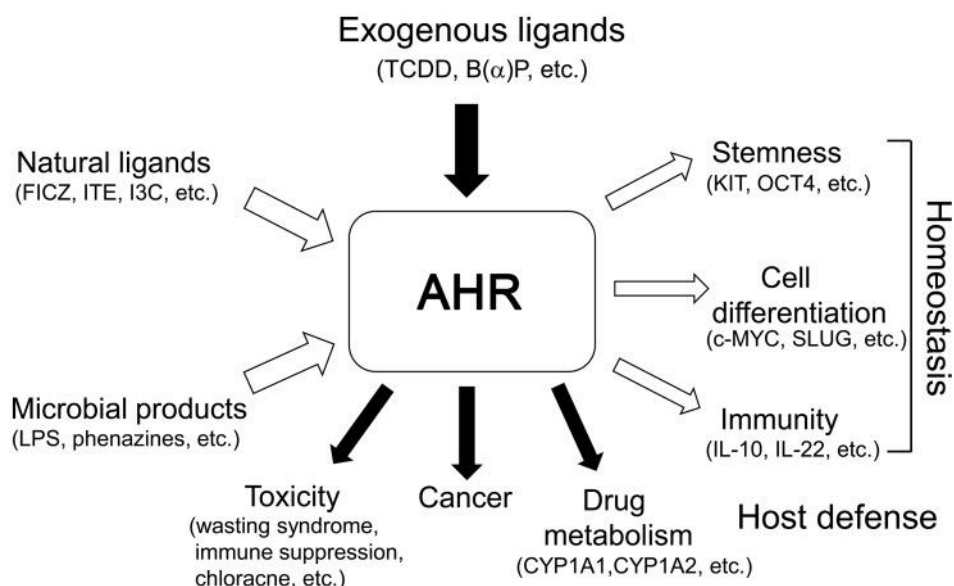


Figura 1- Os diversos ligantes endógenos e exógenos do receptor AHR. Fonte: Kawajiri K, et. al. (2017).

Conhecido como receptor de dioxina, após a sua ativação com um ligante, o AHR desloca-se do citoplasma para o núcleo onde se heterodimeriza com um translocador nuclear, levando à ativação da transcrição de genes que codificam as enzimas do citocromo P450 responsáveis pela transformação de xenobióticos em metabólitos ativos (21).

De um modo geral, é dado que AHR proporciona sinais protetores no intestino, sugerindo que a produção defeituosa do receptor pode contribuir para aumentar e manter o processo patológico na UC. Assim o aumento da ativação desse receptor pode desencadear sinais regulatórios com efeito de inibição da produção de citocinas inflamatórias, prostaglandina E2 e com supressão da colite (10, 11).

1.2 Indução de colite por Sulfato Sódico de Dextrana - DSS

A indução de colite por DSS foi proposta pela primeira vez em 1985 (22). A partir deste momento diversos estudos demonstraram que o DSS usado em concentrações que variavam de 1 a 6%, quando oferecido na água aos animais, resultava em uma inflamação aguda ou crônica no cólon, dependendo do protocolo

utilizado. Foi possível então mensurar diferentes aspectos da colite produzida por essa substância em relação à avaliação clínica, fatores genéticos e patológicos (23).

O mecanismo exato que permite que o DSS induza a colite ainda não é totalmente esclarecido, no entanto existem demonstrações de que essa indução ocorra pela alteração da barreira epitelial intestinal, levando à ruptura das criptas intestinais, promovendo agressão às células epiteliais, aumentando a permeabilidade da barreira epitelial na mucosa do cólon e permitindo a passagem de moléculas grandes como o próprio DSS (24). Esse processo propicia o encontro da microbiota intestinal com os granulócitos presentes na mucosa causando inflamação e ulceração, e futuramente, cicatrização e reparo tecidual, o que permite concluir a importância da integridade da barreira epitelial intestinal para a manutenção da homeostasia na prevenção da colite e outras doenças intestinais (17,25).

1.3 Modelo animal utilizado para o desenvolvimento da colite ulcerativa

Desde 2004, cientistas vêm utilizando, não só linhagens isogênicas como modelo de camundongos sensíveis à colite, como também animais geneticamente modificados em genes específicos reguladores do sistema imune, no sentido de compreender os mecanismos genéticos da UC, assim como testar diferentes meios terapêuticos para inibir a expressão de genes específicos envolvidos na regulação da sensibilidade às doenças intestinais (23). Esses modelos de animais, por serem isogênicos, não refletem fielmente uma população geneticamente heterogênea como é o caso da humana e, sendo uma doença complexa e multifatorial, a UC apresenta regulação genética complexa para o entendimento total da doença. Deste modo, propomos a utilização de modelo de camundongos produzidos segundo um processo de seleção fenotípica artificial.

1.3.1 Linhagens fenotipicamente selecionadas para a reatividade inflamatória aguda

Durante anos, o grupo de pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan vem estudando a regulação genética de respostas imunológica específica e não específica representada pelos fenótipos de produção quantitativa de anticorpos e o desenvolvimento de reação inflamatória aguda, com o objetivo de produzir linhagens de camundongos com características fenotípicas quantitativas opostas. Assim, por meio de experimentos de seleção fenotípica bidirecional, foram

obtidas linhagens de camundongos com alta ou baixa produção quantitativa de anticorpos e linhagens com máxima ou mínima reatividade inflamatória aguda (AIR, *Acute Inflammatory Response*) a corpo estranho, Biogel P100 (26, 27).

A partir de uma população geneticamente heterogênea (F0), resultante de cruzamentos entre oito linhagens isogênicas (Figura 2), foram obtidas as linhagens de camundongos denominadas AIRmax e AIRmin. Foi usado, como agente selecionador, gel de poliacrilamida (Biogel) que, ao ser injetado no tecido subcutâneo dos camundongos, induz uma reação inflamatória. A reação inflamatória produzida foi avaliada após 24 horas da injeção, considerando o número total de leucócitos infiltrados e a taxa de proteínas extravasadas (26, 28).

Os camundongos que apresentaram alta ou baixa resposta inflamatória foram acasalados seletivamente entre si para a produção das linhagens AIRmax e AIRmin. Estes acasalamentos foram realizados consecutivamente a cada geração de Seleção, sendo que o máximo de separação fenotípica entre as linhagens foi atingido ao redor de 20 gerações. Neste momento, os genes responsáveis pela regulação de máxima ou mínima resposta fixaram-se em homozigose mantendo um fundo genético heterogêneo (28).

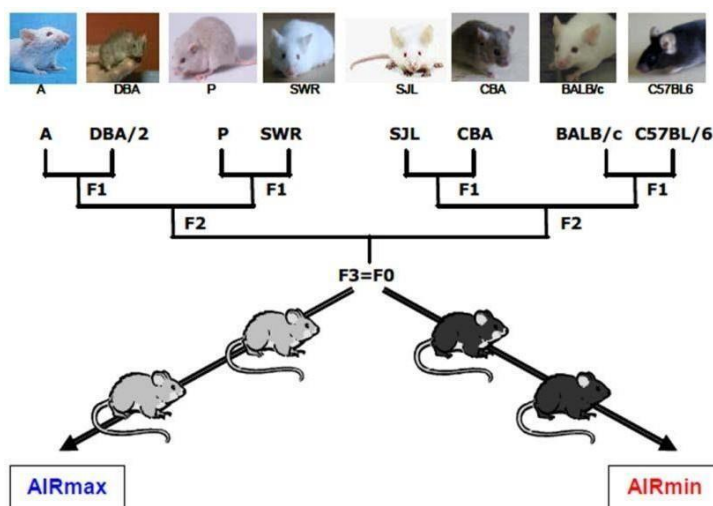


Figura 2 - Seleção genética bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin.

Fonte: Própria

Estudos com esses animais foram realizados com o intuito de compreender e avaliar a regulação genética de características complexas como: artrite reumatoide (29), tumorigênese de pele (14, 28) e de pulmão (30), tumor de cólon por

metilhidrazina (15), doenças infecciosas (31, 32) e alterações na medula óssea (20, 33).

Durante o processo seletivo dessas linhagens houve a fixação de alelos *d* e *b1* do gene *Ahr* em AIRmax e AIRmin, respectivamente. Estes alelos codificam receptores de baixa ou alta afinidade por hidrocarbonetos aromáticos, característica dos animais AIRmax e AIRmin, respectivamente (14). Assim, este polimorfismo funcional determinou diferenças importantes na susceptibilidade à carcinogênese de pele, onde os animais AIRmin que expressam o alelo *Ahr^{b1}* de alta afinidade apresentam maior incidência e multiplicidade de lesões (28) e um quadro de mielodisplasia (33) quando submetidos ao tratamento com hidrocarboneto aromático do tipo DMBA (Dimetilbenzoantraceno).

Em decorrência da diferença de afinidade do receptor AHR existente nas linhagens AIRmax e AIRmin, propusemos um estudo de indução de colite ulcerativa experimental por DSS, utilizando como modelo os camundongos AIRmax e AIRmin.

Utilizamos como referência as linhagens isogênicas Balb/c e C57Bl/6 por terem contribuído, cada uma, com 12,5% do pool gênico da população inicial de seleção (27) e por apresentarem sensibilidade ao DSS (34). Nossa hipótese foi de que os animais AIRmin que expressam AHR de alta afinidade, liguem com maior eficiência os ligantes endógenos (35) e, conseqüentemente, module negativamente a gravidade da doença. Para testar esta hipótese, utilizamos o ligante, α -Naftoflavona (15, 21).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência do gene *Ahr* no fenótipo de resistência ou suscetibilidade a Colite Ulcerativa induzida por Sulfato Sódico de Dextrana (DSS) em animais geneticamente selecionados para intensidade da Inflamação Aguda.

2.2 ESPECÍFICO

Caracterizar o Índice de Atividade da Doença (IAD) por meio de aspectos clínicos e alterações histológicas nas fases aguda e crônica da Colite. Avaliar a atividade da Mieloperoxidase no cólon, como medida indireta de processo inflamatório, avaliar citocinas anti e pró-inflamatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal utilizado na indução da colite ulcerativa

Foram selecionados camundongos machos ou fêmeas das linhagens AIRmax e AIRmin com idade de 4 a 6 semanas mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan e camundongos machos das linhagens Balb/c e C57Bl/6 da mesma idade, mantidos no Laboratório Central do Instituto Butantan. Os experimentos obedeceram aos preceitos do Comitê de Ética do Instituto Butantan (CEUAIB) segundo protocolo nº 9573060317.

3.2 Indução da colite ulcerativa nos animais AIRmax e AIRmin ao desenvolvimento e modulação por α -naftoflavona

Os animais das duas linhagens foram separados em grupos constituídos de camundongos controles ou tratados que receberam água ou DSS 30-50 kDa (MP Biomedicals) diluído em concentrações variadas de 2 a 3% em água destilada durante 7 dias continuamente. Grupos de camundongos foram também tratados com α -naftoflavona (α NF), ligante de AHR, dissolvido em óleo de oliva na dose de 1mg/camundongo administrado oralmente, por gavagem, durante 7 dias consecutivos, do dia 0 ao 6. O quadro clínico foi avaliado considerando a perda de peso, diarreia e presença de sangue nas fezes (IAD) durante 10 ou 30 dias para o estudo agudo ou crônico da colite. No 10º ou 30º dia do tratamento os camundongos foram laparatomizados para a retirada do cólon conforme o grupo de estudo.

3.3 Análise fenotípica da Colite

A análise do fenótipo da Colite foi realizada de acordo com o quadro clínico obtido, considerando os critérios de: 1-alteração de peso corporal, 2-consistência das fezes e 3-presença ou não de sangue nestas ou no ânus dos camundongos. Estes foram pesados diariamente e observados quanto à presença destes sinais. Foram determinados então os valores diários do chamado Índice de Atividade da Doença (IAD) calculado de acordo com a fórmula: $IAD = \text{perda de peso corporal} + \text{escore de diarreia} + \text{escore de sangramento}$, conforme tabela 1.

Tabela 1- Escores do Índice de Atividade da Doença.

Escore	Perda de peso	Diarreia	Sangue nas fezes	Sangue no ânus
0	Nenhuma perda	Ausente	Ausente	Ausente
1	1-5%	Semi-pastosa	Pequenos filetes	Restrito ao orifício em pequena quantidade
2	5-10%	Pastosa	Sangue vivo	Além do orifício abundante
3	10-20%	Líquidas ou ânus	-	Além do orifício e muito abundante
4	>20%	-	-	-

O escore acumulativo é calculado somando os escores de cada dia. Após a avaliação clínica, os animais passaram por eutanásia, e por meio de laparotomia foi retirado o cólon, lavado com solução salina, tendo seu comprimento e peso e registrados.

3.4 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Fragmentos do cólon foram homogeneizados em 1mL de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%, em EDTA (10 mM) com o auxílio do polytron (BRINCKMAN). As amostras foram centrifugadas a 12000 x g, durante 10 minutos a 4°C. O ensaio de MPO foi realizado em 10µl do sobrenadante de cada amostra em placa de 96 poços, adicionando 200 µl de tampão substrato, formado de: tampão fosfato 50mM, pH 6.0, peróxido de hidrogênio 0,1%, orto-dianisidina 1,3% em H₂O. Após 5 minutos, a reação era interrompida com 50 µl de solução de azida sódica 1,3% em H₂O. Os valores dessa atividade foram obtidos pela absorbância, lida a 450 nm em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments)® e corrigido pelo peso em gramas do segmento.

3.5 Análise Histológica

Os fragmentos do cólon foram removidos e fixados em paraformaldeído 10% por 24hs, sendo armazenados em etanol 70% até o processamento histológico. As amostras foram embebidas em parafina e seccionadas a 5µm para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) após uma série de passagens em xilol para diafanizar e em diferentes concentrações de álcool para hidratação. Os cortes foram analisados em microscópio óptico Diaplan Leitz® e as imagens obtidas por captação com câmera digital Leica modelo DFC295.

3.6 Análise estatística

Na análise estatística as diferenças entre as médias foram calculadas por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Turkey para comparar os grupos. Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$, bicaudal. O programa usado foi GraphPadPrism 4.0 (GraphPad Software®, San Diego, CA, EUA).

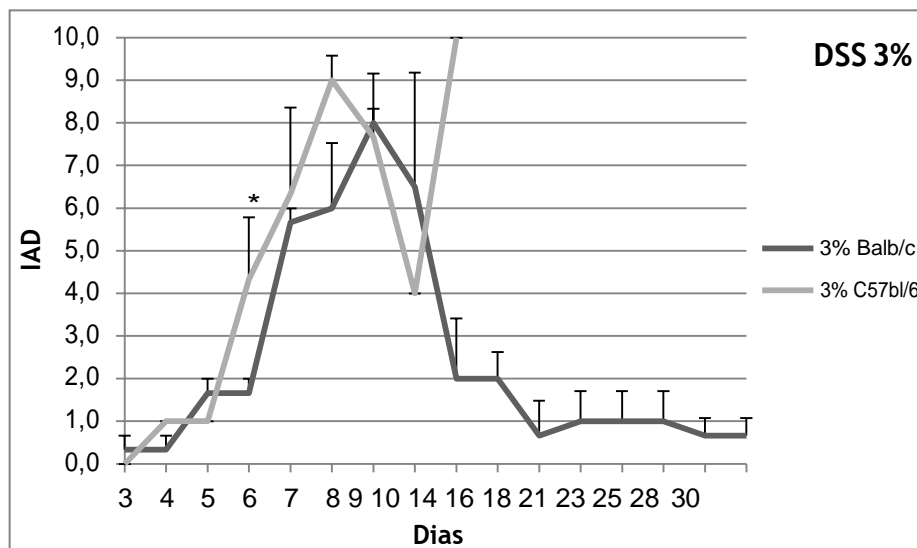
4. RESULTADOS

Os animais das linhagens selecionadas AIRmax e AIRmin assim como os camundongos Balb/c e C57Bl/6 foram submetidos ao tratamento com DSS por 7 dias e observados durante 30 dias, para avaliar os perfis de desenvolvimento da UC e determinar a melhor dose que discrimina as duas linhagens AIRmax e AIRmin. Foram estabelecidos grupos experimentais de machos e fêmeas de cada linhagem AIR constituídos de: 2 camundongos controles que receberam apenas água e 6 camundongos que receberam DSS dissolvido em água em diferentes concentrações (2, 2,5 e 3%) durante 7 dias continuamente. A partir do 8º dia o DSS foi suspenso e os animais foram mantidos apenas com água até o momento da retirada do cólon. Primeiramente, os animais foram avaliados durante 30 dias quanto ao quadro clínico, considerando a perda de peso, diarreia e presença de sangue nas fezes ou no ânus (Índice de Atividade da Doença - IAD), baseando-se em escores registrados durante todo o período considerado.

Camundongos machos Balb/c e C57Bl/6 foram tratados com uma única dose de 3% de DSS, por se tratar da alta resistência destas linhagens ao DSS. O Gráfico 1 mostra o perfil de UC apresentado pelas duas linhagens. Observamos que estas apresentaram níveis de IAD altos e com uma maior sensibilidade dos animais C57Bl/6, já que cerca de 100% dos animais morreram aos 14 dias após o início do

tratamento. Por outro lado, os animais Balb/c, embora tenham apresentado escores semelhantes, recuperaram a normalidade após a suspensão do DSS.

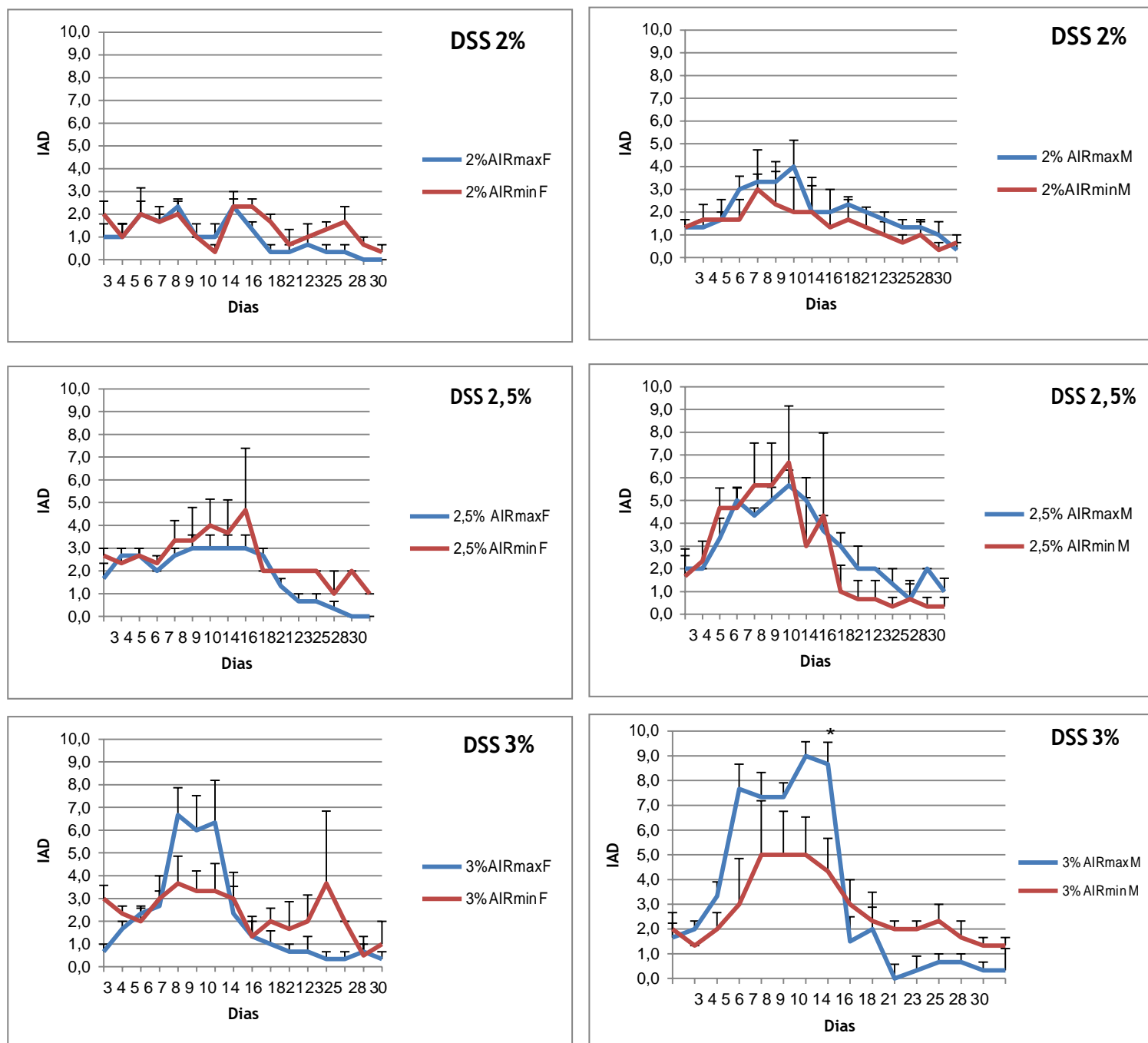
Gráfico 1 - Índice de Atividade da Doença (IAD) das linhagens Balb/c e C57BL/6, na dose de 3% de DSS, durante 30 dias.



Com relação às linhagens AIRmax e AIRmin, foram observados diferentes comportamentos em resposta à ingestão de DSS nesses animais, conforme o Gráfico 2. Foi inicialmente observada uma diferença entre os gêneros de animais AIRmax e AIRmin, onde as fêmeas mostraram-se ser mais resistentes em relação aos machos da mesma linhagem, pois apresentaram um IAD aumentado somente com a maior dose de 3% de DSS, enquanto os machos responderam ao tratamento com 2,5%.

De um modo geral, os animais AIRmax mostraram-se mais sensíveis dos que os AIRmin, sobretudo nos períodos iniciais nos grupos de machos e fêmeas com 3% de DSS.

Gráfico 2 – Cinética da medida do Índice de Atividade da Doença em fêmeas e machos das linhagens AIRmax e AIRmin, nas doses de 2, 2,5 e 3% de DSS durante 30 dias.



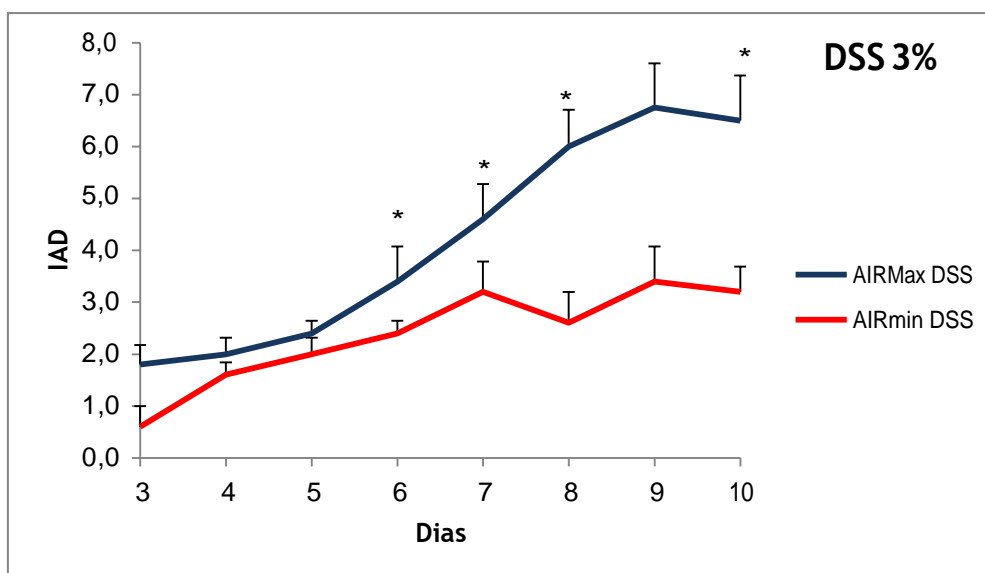
De acordo com os resultados até aqui apresentados, a diferença de IAD entre as linhagens AIRmax e AIRmin foi estatisticamente significativa nos tempos iniciais de indução da Colite ao redor de 10 dias. A partir deste período os níveis de escores diminuiram sensivelmente até atingir os níveis basais. Esta recuperação deu-se em todos os animais e em todas as condições experimentais (Gráfico 1 e 2).

Para avaliar a diferença entre as linhagens na fase aguda da doença, novos grupos de camundongos AIRmax e AIRmin machos foram submetidos ao tratamento com 3% de DSS, por ser esta dose que mais discriminou as duas linhagens.

Essa fase consiste de 10 dias, sendo 7 dias com administração de DSS, seguida de 3 dias com água. A avaliação do Índice de Atividade da Doença (IAD) foi feita a partir do 3º até o 10º dia, seguindo os escores descritos na metodologia.

Como resultado destes tratamentos, observamos inicialmente que a diferença encontrada nos 10 primeiros dias do experimento anterior foi reproduzida, onde os animais AIRmax apresentaram maior sensibilidade ao DSS do que os camundongos AIRmin na dose de 3% (Gráfico3).

Gráfico 3 - Índice de Atividade da Doença dos machos das linhagens AIRmax e AIRmin, na dose de 3% DSS e DSS+ α NF durante 10 dias.



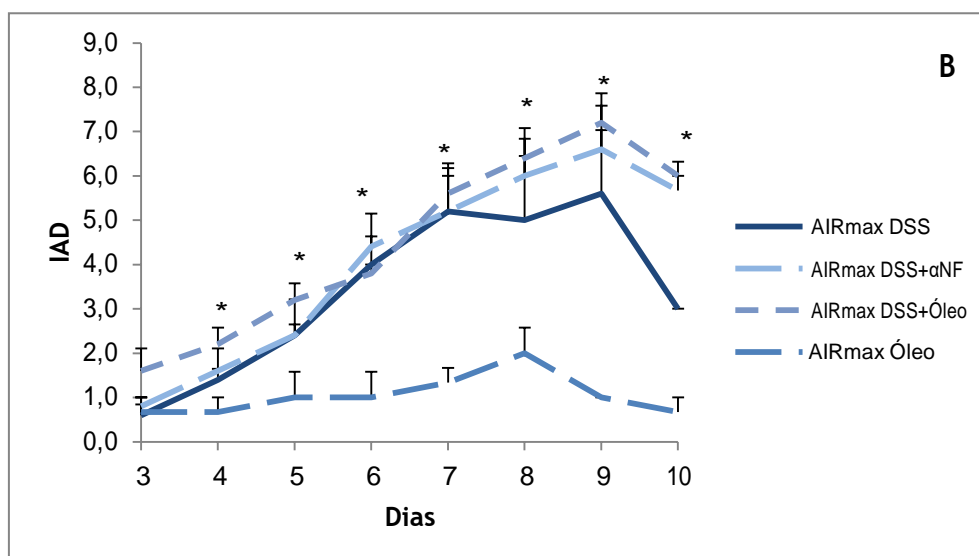
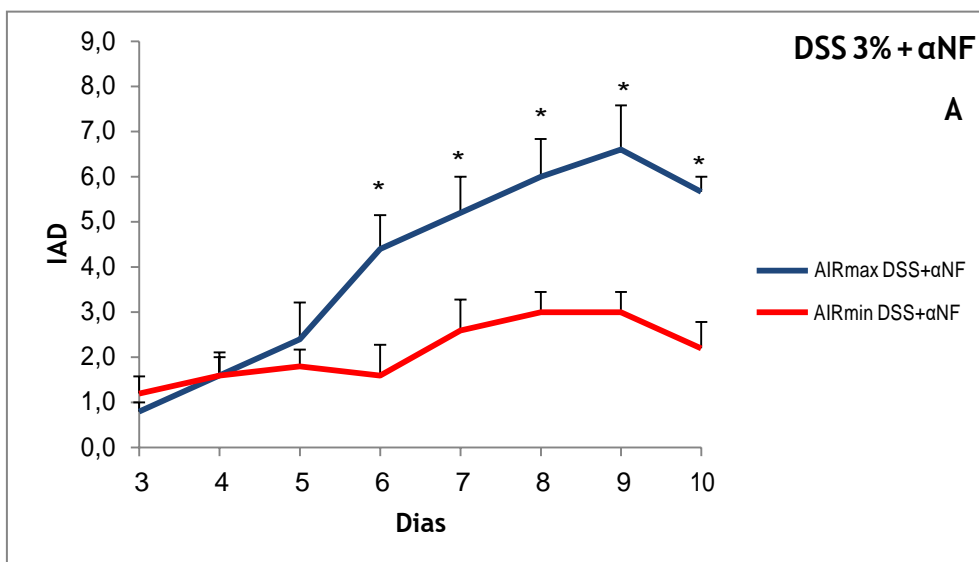
Diferenças significativas (*) entre AIRmax e AIRmin ($p \leq 0,05$).

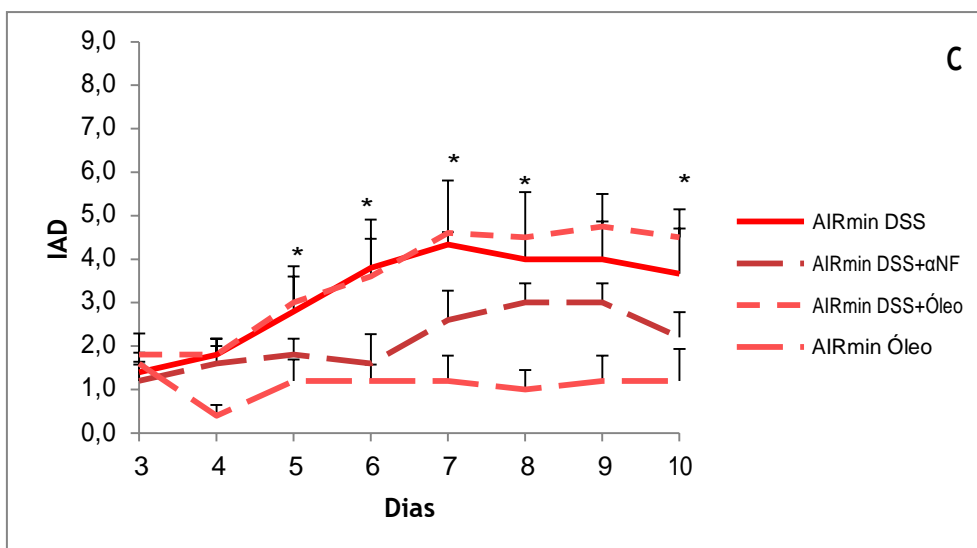
Considerando o polimorfismo no gene *Ahr* que determina alta ou baixa afinidade para AIRmin e AIRmax para ligantes endógenos, respectivamente, realizamos um novo experimento onde os animais foram separados em quatro grupos: um grupo tratado com 3% de DSS e outro com a mesma dose de DSS dissolvido na água do bebedouro e α -Naftoflavona (α NF) por gavagem do dia 0 ao 6, um grupo com DSS+óleo e grupos controle. A α NF é utilizada como antagonista do AHR, impedindo a ligação de possíveis ligantes exógenos ou mesmo endógenos.

Analisando os dados (Gráfico 4), verificamos uma diferença significativa entre as linhagens tratadas com DSS+ α NF, do 6º ao 10º dia. Quando analisamos os

grupos separadamente observamos que existe uma diferença nos grupos que fazem ingestão de α NF comparado aos grupos que recebem apenas DSS (Gráfico 4B e C).

Gráfico 4 – Cinética do Índice de Atividade da Doença (IAD) nas linhagens AIRmax e AIRmin, com a dose de DSS a 3% e α NF 1 μ g/ camundongo, durante 10 dias (A). Grupos AIRmax (B), grupos AIRmin (B).



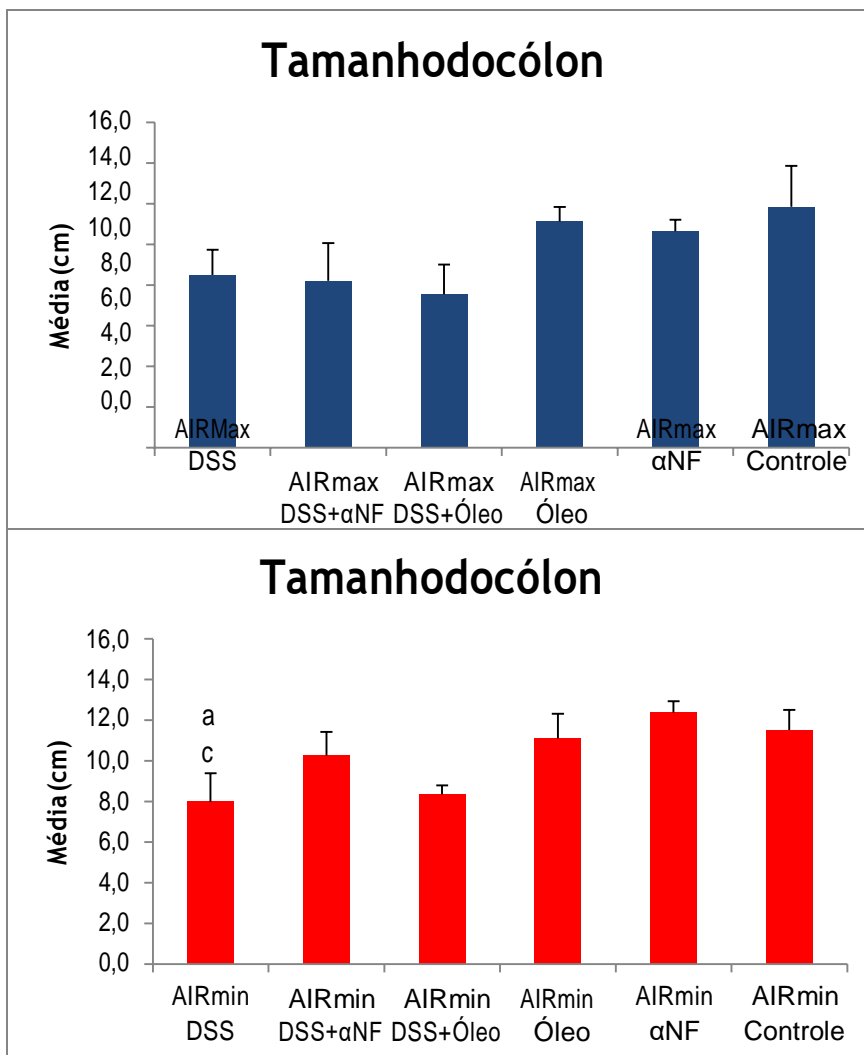


*AIRmax>AIRmin $p \leq 0,05$.

No sentido de obter o máximo de informações sobre os mecanismos da UC nestes animais, consideramos três outros parâmetros relacionados à intensidade da doença: tamanho do cólon a partir do Ceco, a medida indireta do processo inflamatório por meio da avaliação da atividade de MPO no segmento distal e análise histológica no mesmo segmento, todos avaliados na fase aguda aos 10 dias (Gráfico 5, 6 e 7).

Assim, obtivemos as médias dos cólons dos animais dos diferentes grupos (controle, DSS, DSS+αNF e DSS+óleo) que estão representadas no Gráfico 5. Podemos observar que os animais de ambas as linhagens tratados com DSS apresentaram diminuição significativa quando comparados com os respectivos controles. Após o tratamento com αNF, houve uma reversão do efeito do DSS somente na linhagem AIRmin, atingindo valores próximos aos controles.

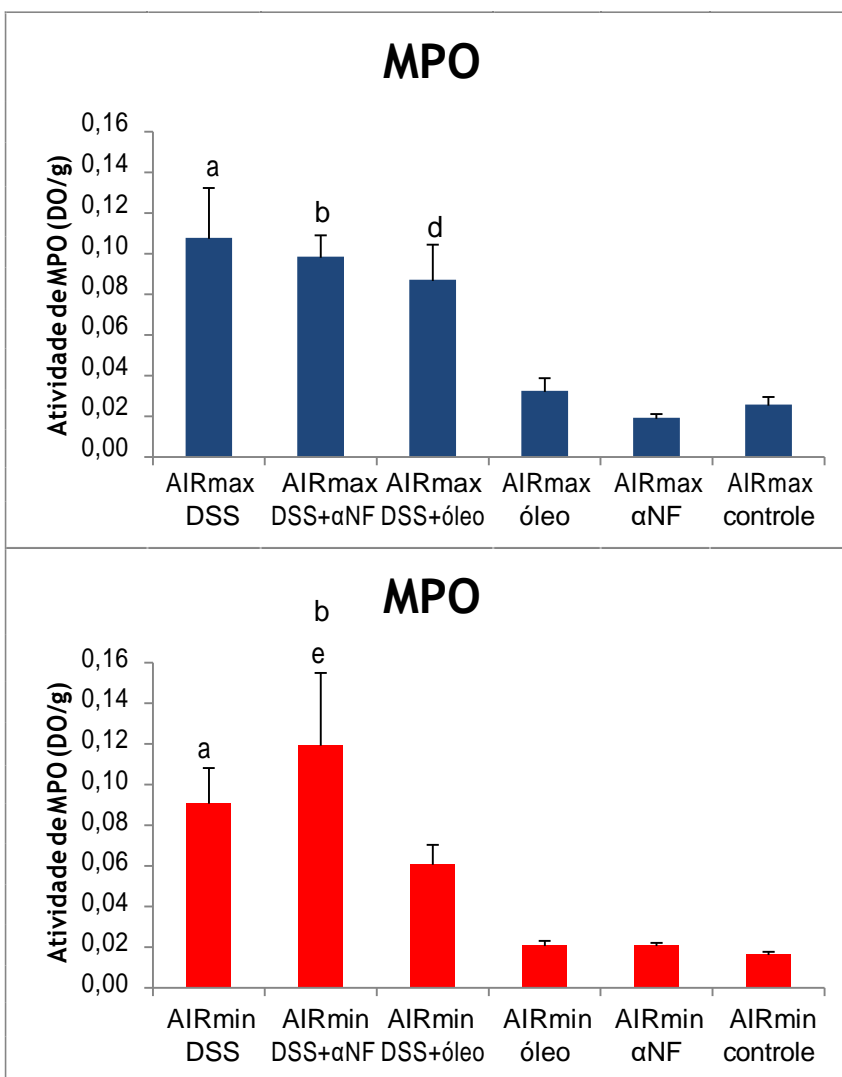
Gráfico 5 - Medida do Tamanho do Cólon na fase aguda (10 dias) dos animais AIRmax e AIRmin.



(a): diferença entre grupo DSS e controle água. (b): diferença entre grupo DSS+αNF e controle αNF. (c): diferença entre grupo DSS e DSS+αNF. $p \leq 0.05$.

A análise da atividade da Mieloperoxidase, que avalia condições inflamatórias devido à presença da enzima Mieloperoxidase, revelou valores muito baixos de Densidade Ótica (DO). Apesar destes baixos valores, pudemos identificar um aumento significativa de MPO no grupo de animais AIRmin tratados com DSS-αNF no segmento distal do cólon (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Análise da atividade de MPO no segmento distal do cólon dos animais AIRmax e AIRmin.



(a): diferença entre grupo DSS e controle água. (b): diferença entre grupo DSS+αNF e controle αNF. (c): diferença entre grupo DSS e DSS+αNF. (d): diferença entre grupo DSS+óleo e controle óleo. (e): diferença entre grupo DSS+αNF e grupo DSS+óleo. Significância quando $p \leq 0,05$.

Nas análises histológicas realizadas com o segmento distal do cólon dos animais AIRmax e AIRmin, foi observado, em relação aos controles, que os animais tratados com a dose de 3% de DSS apresentaram uma alteração da arquitetura das criptas, juntamente com a presença de um infiltrado inflamatório sendo esse mais intenso nos animais AIRmax quando comparado aos AIRmin (Figura 3).

Contudo foi observado nos animais do grupo experimental, que receberam DSS em conjunto com αNF, uma perda de arquitetura menor em relação aos animais que receberam somente DSS (Figura 3).

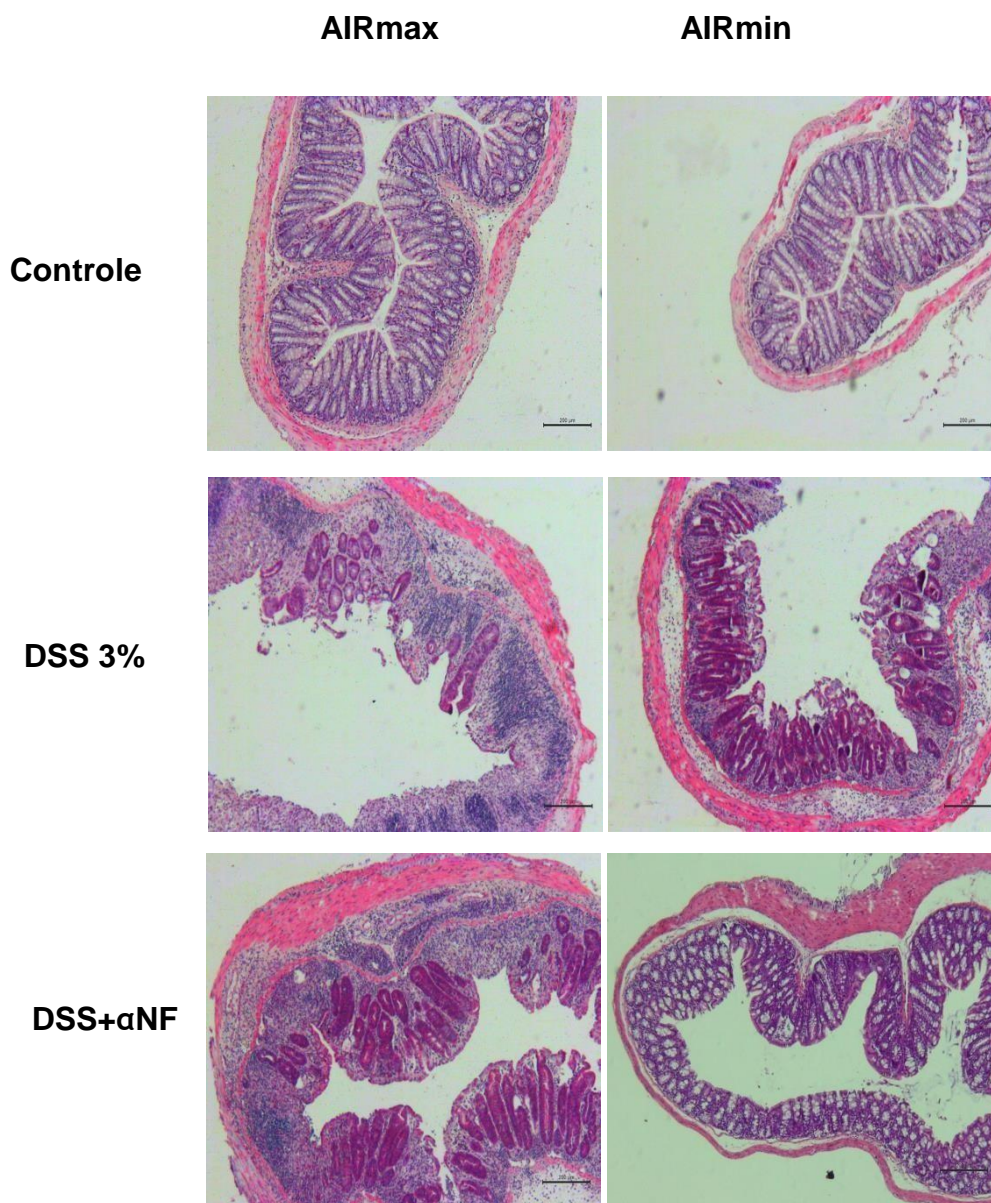


Figura 3 - Análise histológica dos grupos AIRmax e AIRmin, do segmento distal corados com Hematoxilina-Eosina.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho desenvolvemos o estudo relativo à sensibilidade ou resistência à colite ulcerativa em modelo de linhagens de camundongos selecionados para a alta (AIRmax) ou baixa (AIRmin) Reatividade Inflamatória Aguda. Estas linhagens apresentam um polimorfismo no gene *Ahr* que está descrito como influente na UC. Embora a UC já tenha sido descrita nessas linhagens, é a primeira vez que abordamos o papel do gene *Ahr*.

Conforme revisado por Kawajiri, 2017 (36) o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR) está envolvido em diversos mecanismos fisiológicos ou fisiopatológicos, dependendo do que o ativa. Alguns ligantes deste receptor foram identificados e descritos os seus efeitos: ligantes endógenos, produtos do metabolismo normal como, extratos de vegetais ou materiais derivados de vegetais como Quercetin, Tangeritin e Flavonoides, além de produtos bacterianos como indol-3-carbinol (I3C) (35).

Alguns ligantes exógenos protótipos, dentre os quais destacamos o DimetilBenzoantraceno (DMBA) e a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), são amplamente utilizados experimentalmente para mimetizar os efeitos nocivos de produtos ambientais como aqueles oriundos do cigarro, da combustão incompleta de combustível fóssil e de alimentos excessivamente processados.

O efeito de diferentes ligantes na produção da Colite Ulcerativa está relacionado com a destruição epitelial, mucosa e submucosa, e propicia a translocação de representantes da microbiota intestinal cujos produtos bacterianos tais como Lipolissacarídeos, Fenazinas e Naftoquinona, podem ligar ao AHR e ativar genes de efeitos diversos.

O gene que codifica o AHR está localizado no cromossomo 12 do camundongo e no cromossomo 7 humano. Este gene *Ahr* apresenta polimorfismo que confere diferenças na afinidade do receptor. Este fato determina, portanto, os efeitos subsequentes à ativação do AHR após atingir o núcleo e atuar como fator de transcrição em uma variedade de células (21).

Para estudar o papel do AHR na Colite Ulcerativa, utilizamos como modelo, camundongos heterogêneos que foram selecionados pelo fenótipo de Reatividade Inflamatória Aguda (AIR). Assim, como descrito anteriormente, foram produzidas duas linhagens com características opostas, AIRmax e AIRmin. Estas linhagens apresentam, dentre outros, polimorfismo genético funcional no gene *Ahr*, sendo os

AIRmax portador do alelo de baixa afinidade (*Ahr^d*) e os camundongos AIRmin o alelo de alta afinidade (*Ahr^{b1}*) (14). Por esta razão utilizamos estas linhagens para verificar a participação dos alelos na determinação e/ou na modulação da Colite Ulcerativa.

Para tanto avaliamos a UC utilizando DSS por 7 dias consecutivos em três diferentes doses, 2, 2,5 e 3% por via oral dissolvido na água do bebedouro. Considerando o Índice de Atividade da Doença (IAD) em machos e fêmeas, acompanhamos os sinais clínicos por 30 dias, a partir do terceiro dia de oferta do DSS. No 30° dia os animais foram avaliados quanto a outros parâmetros.

Os resultados mostraram que os animais AIRmax foram os mais sensíveis, apresentando uma diferença em relação aos AIRmin apenas na dose de 3%.

Além disso, foi observada uma maior resistência das fêmeas no que concerne ao IAD, devido, provavelmente a fatores hormonais, onde de fato, o estrógeno possui ação anti-inflamatória, uma vez que não houve controle do ciclo estral destes animais nos experimentos (37).

Esta sensibilidade maior dos camundongos AIRmax nos 10 primeiros dias foi esperada quando comparada com os dados de Di Pace e colaboradores (15). No referido estudo, a linhagem que apresentou maior sensibilidade foi AIRmax com a dose de 2,5% de DSS com níveis de IAD altos. Ademais, todos os animais sensíveis que sobreviveram, apresentaram recuperação total do IAD a partir do 15° dia após o início do DSS. Inclusive as linhagens isogênicas utilizadas como referência, Balb/c e C57Bl/6 mesmo com diferença de sensibilidade entre elas.

Baseando-se nos resultados obtidos de IAD com as diferentes doses de DSS, optamos por avaliar o período agudo, 10 dias, utilizando a dose de 3% por considerá-la mais discriminante entre os camundongos machos de ambas as linhagens AIR. Paralelamente realizamos uma avaliação da modulação com ligante não tóxico do AHR, α -Naftoflavona. Este composto liga-se ao AHR bloqueando a ligação de outros compostos endógenos. O nosso objetivo, portanto, foi o de modular de maneira diferente a UC nestas linhagens, isto é, nos animais AIRmin tratados com α -Naftoflavona, o IAD seria maior do que nos AIRmin tratados somente com DSS devido ao seu receptor AHR de alta afinidade.

Verificamos que o fenótipo de IAD manteve-se nos animais tratados apenas com DSS. Por outro lado, o grupo tratado também com α -Naftoflavona apresentou

um IAD semelhante até o 6º dia de tratamento e a partir deste tempo que houve uma diferença entre as linhagens, onde os animais AIRmax tiveram um aumento maior do IAD quando comparado aos AIRmin. Estes resultados indicam um potencial papel do AHR no controle da UC (21).

Outros parâmetros também foram avaliados e que compõem o fenótipo de UC: tamanho do cólon, MPO e análise histológica. Corroborando os resultados de modulação do IAD, os dados de tamanho do cólon foram também superiores nos animais AIRmin tratados com α -Naftoflavona, atingindo valores próximos aos controles tratados apenas com óleo. No que concerne aos níveis de inflamação induzida por DSS, verificamos que a medida da MPO não foi um método suficientemente sensível neste caso, pois a atividade desta enzima foi muito baixa.

As análises histológicas, no entanto, revelaram diferenças importantes: os segmentos distais dos camundongos AIRmax e AIRmin estiveram bem alterados, com um intenso infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa e com alterações profundas nas criptas. Os animais AIRmin, que receberam o α -NF junto com o DSS, apresentaram uma diminuição do processo inflamatório mais evidente do que os AIRmax, seguindo o observado para o IAD.

Com isso, entendemos que o receptor AH possui um papel importante na modulação da UC e que esta modulação é dependente da sua afeição, já que o receptor de alta afinidade presente na linhagem AIRmin induziu maior proteção aos efeitos do DSS. Este fato indica que a α -Naftoflavona atuou como agonista do AHR e não impedindo a ligação de ligantes endógenos, mostrando com isso que o AHR tem um papel anti-inflamatório quando ativado.

Este quadro foi observado somente quando tratamos com ligante exógeno pois fisiologicamente não identificamos no presente estudo os mecanismos regulatórios que determinam uma maior resistência dos camundongos AIRmax que possuem AHR de baixa afinidade.

6. CONCLUSÃO

Concluimos com este estudo que os animais AIRmax e AIRmin apresentaram diferenças de sensibilidade à Colite Ulcerativa em resposta ao DSS e que esta diferença pode estar associada ao polimorfismo do gene *Ahr* presente nestas linhagens, já que o receptor de alta afinidade presente nos camundongos AIRmin inibiu a colite quando “ativado” pela α -Naftoflavona. A característica de heterogeneidade destas linhagens mimetiza o que acontece em uma população natural como a humana. Estratégias terapêuticas podem ser adotadas no sentido de focar no receptor AHR o alvo na modulação de doenças intestinais como Colite e, conseqüentemente, prevenindo o organismo do desenvolvimento de possíveis lesões neoplásicas decorrentes de processos inflamatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
2. Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN, Dubinsky MC, Hanauer SB, et al. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106 Suppl 1:S2-25; quiz S6.
3. Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Hibi T, Watanabe M, Takebayashi T. Prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Japan. *Journal of gastroenterology*. 2009;44(7):659-65.
4. Hoentjen F, Sakuraba A, Hanauer S. Update on the management of ulcerative colitis. *Current gastroenterology reports*. 2011;13(5):475-85.
5. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015;12(4):205-17.
6. Legaki E, Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2016;7(1):112-25.
7. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(18):1713-25.
8. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(10):599-608.
9. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2009;361(21):2066-78.
10. Takamura T, Harama D, Matsuoka S, Shimokawa N, Nakamura Y, Okumura K, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(6):685-9.
11. Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Aryl hydrocarbon receptor and colitis. *Semin Immunopathol*. 2013;35(6):671-5.
12. Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(1):40-53.
13. Thomas RS, Penn SG, Holden K, Bradfield CA, Rank DR. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse Ahr gene. *Pharmacogenetics*. 2002;12(2):151-63.
14. De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, et al. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *Int J Cancer*. 2009;124(6):1478-82.
15. Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WH, De Franco M, Starobinas N, et al. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis*. 2006;27(8):1517-25.
16. Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: friend or foe? A little of both. *Front Immunol*. 2014;5:458.
17. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495-549.
18. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65-71.
19. Seidel SD, Winters GM, Rogers WJ, Ziccardi MH, Li V, Keser B, et al. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(4):187-96.
20. Katz IS, Albuquerque LL, Suppa AP, de Siqueira DM, Rossato C, da Silva GB, et al. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced myelotoxicity differs in mice selected for high or low acute inflammatory response: relationship with aryl hydrocarbon receptor polymorphism. *Int J Toxicol*. 2014;33(2):130-42.
21. Furumatsu K, Nishiumi S, Kawano Y, Ooi M, Yoshie T, Shiomi Y, et al. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(9):2532-44.

22. Ohkusa T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 1985;82(5):1327-36.
23. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:718617.
24. Chassaing B, Koren O, Carvalho FA, Ley RE, Gewirtz AT. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut*. 2014;63(7):1069-80.
25. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim*. 1999;48(3):137-43.
26. Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2555-63.
27. Stiffel C, Ibanez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. *Exp Clin Immunogenet*. 1990;7(4):221-33.
28. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):337-46.
29. Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, Siqueira M, et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol*. 2000;30(2):431-7.
30. Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene*. 2003;22(3):426-32.
31. Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2913-20.
32. Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Koury Cabrera WH, Starobinas N, et al. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. *Microbes Infect*. 2006;8(12-13):2766-71.
33. Katz IS, Albuquerque LL, Suppa AP, da Silva GB, Jensen JR, Borrego A, et al. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced genotoxicity on bone marrow cells from mice phenotypically selected for low acute inflammatory response. *DNA Repair (Amst)*. 2016;37:43-52.
34. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1328-38.
35. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:309-34.
36. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim*. 2017;66(2):75-89.
37. Bábíčková J, Tóthová Ľ, Lengyelová E, Bartoňová A, Hodosy J, Gardlík R, et al. Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens. *Inflammation*. 2015;38(5):1996-2006.