

**ALLISSON FREIRE BENTO**

**EFEITO DO SB225002, ANTAGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR PARA  
QUIMIOCINAS CXCR2, NA COLITE INDUZIDA PELO ÁCIDO 2,4,6-  
TRINITROBENZENO SULFÔNICO (TNBS) EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

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

**Florianópolis - SC**

**2008**

*"A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez"*

*George Bernard Shaw*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, ajudando a transpor os momentos mais difíceis.

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

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

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

Ao Professor Dr. Adair R. S. Santos por ter me ajudado a ingressar nessa jornada, sempre ensinado como trilhar os melhores caminhos.

A querida Professora Dr<sup>a</sup>. Mariangela S. Azevedo, por ter acreditado em mim e por ser um exemplo como profissional e como ser humano.

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

A Daniela Hara, por tudo que me ensinou, sempre com muito carinho, paciência e alegria. Serei eternamente grato.

A minha tutora Daniela Leite, pela amizade e ajuda incondicional na realização deste trabalho. Obrigado por tudo.

As grandes amigas Flávia Meotti e Vanessa Heiden, por terem me ajudado de forma inesquecível em meus primeiros passos dessa caminhada. Vocês sempre estarão em meu coração.

Aos grandes amigos Carlos Vitor e Rafaela Claudino, pela amizade, apoio e ajuda incondicional nos momentos bons e ruins durante todo esse período. Vocês fazem parte da minha família, jamais os esquecerei.

Aos meus grandes “irmãos”, não de sangue, mas de coração, Rodrigo Marcon e Denise Lima, por estarem presentes tanto nos momentos de festa como nos momentos mais difíceis, me ajudando a superá-los. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos grandes amigos, Francis ou Ney, Léo, Greice, Cris Setim e Cris Baggio, pela amizade e por completarem a família do *Overnight Lounge Club*.

Aos amigos de laboratório, Alexandre, Andrey, Ana Flávia, Betinha, Cândida, Denise, Diogo, Edinéia, Estefânia, Fernanda, Gecioni, Giselle, Gustavo, Jarbas, Janice, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Katryn, Maíra Cola, Maíra Bicca, Marianne, Martha, Nara, Patrícia, Robson, Rodrigo Medeiros e Tânia pela convivência, amizade e conhecimentos passados.

A Juliana Gonçalves e Aline pela enorme amizade e por toda a ajuda para a realização deste trabalho.



Aos amigos da pós-graduação, Amélia, Mari Appel, Sílvia, Tatiany, Vanessa, Emerson, Lígia, Leandro e Maria Fernanda, pelos momentos de descontração e amizade.

Aos meus amigos da graduação, Flávio, Paulinho, Samuel, Netinha, Túlio e Marcela, por serem pessoas incríveis e que jamais serão esquecidas.

Aos demais funcionários do departamento de farmacologia Diana, Pedro, Rita pela atenção e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

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

## SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	i
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>O processo inflamatório</i> .....	1
1.2 <i>O Papel das quimiocinas e seus receptores na inflamação</i> .....	7
1.3 <i>Doenças inflamatórias intestinais</i> .....	10
1.4 <i>Papel da angiogênese nas doenças inflamatórias intestinais</i> .....	17
1.5 <i>Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais</i> .....	18
1.6 <i>Tratamentos em doenças inflamatórias intestinais</i> .....	21
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	27
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29

3.1 Animais.....	29
3.2 Indução de Colite.....	29
3.3 Tratamentos.....	30
3.4 Escore Macroscópico.....	31
3.5 Análise Histológica.....	32
3.6 Escore Microscópico.....	33
3.7 Atividade das Enzimas MPO, EPO e NAG.....	33
3.8 Dosagem de Citocinas.....	34
3.9 Preparação de Extratos Citosólicos e Nucleares.....	35
3.10 Western Blot.....	36
3.11 Drogas e Reagentes.....	36
3.12 Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Padronização do modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos da linhagem Balb/c.....	39
4.2 Efeito do tratamento com SB225002 sobre o dano macroscópico.....	40
4.3 Efeito do SB225002 sobre a mudança de peso corporal e mortalidade induzida pelo TNBS.....	41

4.4 Efeito do SB225002 sobre o comprimento e peso do cólon, e peso do baço, no modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.....	44
4.5 Efeito do tratamento com SB225002 sobre a atividade das enzimas MPO, EPO e NAG.....	47
4.6 Efeito do tratamento com o SB225002 sobre o dano microscópico.....	50
4.7 Efeito do tratamento com SB225002 sobre os níveis de IL-1 $\beta$ , KC, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ em camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS.....	52
4.8 Efeito do SB225002 na expressão da COX-2, iNOS e VEGF em camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS.....	57
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>ASA</b>	Ácido 5-aminosalicílico
<b>CARD15</b>	Domínio de recrutamento de caspase 15
<b>CCR</b>	Receptor para quimiocinas CC
<b>CD</b>	Doença de Crohn
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>CXCR</b>	Receptor para quimiocinas CXC
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DEX</b>	Dexametasona
<b>DSS</b>	Sulfato de dextrano sódico
<b>ENA 78</b>	Peptídeo ativador de neutrófilo 78
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EPO</b>	Eosinófilo peroxidase
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>GCP-2</b>	Proteína quimiotática de granulócitos

<b>GPCR</b>	Receptor acoplado à proteína G
<b>GRO</b>	Oncogene relacionado ao crescimento
<b>i. col.</b>	Intracolônico
<b>IBD</b>	Doenças inflamatórias intestinais
<b>ICAM1</b>	Molécula intercelular de adesão 1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>MUC-2</b>	Mucina 2
<b>NAG</b>	<i>N</i> -acetilglucosaminidase
<b>NAP-2</b>	Peptídeo ativador de neutrófilo 2
<b>NFκB</b>	Fator nuclear κb
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico neuronal

<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOD</b>	Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
<b>OCTN1</b>	Transportador de cátions orgânicos do tipo N1
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub> (prostaciclina)
<b>PI<sub>3</sub>K<math>\gamma</math></b>	Fosfatidilinositol-3-hidroxiquinase do tipo $\gamma$
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol-4,5 bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKB</b>	Proteína quinase B
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>S.E.M.</b>	Desvio padrão da média
<b>SB225002</b>	(N-(2-hidroxi-4-nitrofenil)-N'-(2-bromofenil) uréia)
<b>TCR</b>	Receptores de células T
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformante
<b>T<sub>H</sub></b>	Célula T auxiliar

<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNBS</b>	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TRL</b>	Receptores de reconhecimento padrão do tipo <i>toll</i>
<b>UC</b>	Colite Ulcerativa
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia de neutrófilos.....	5
Figura 2. Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes leucócitos humanos.....	8
Figura 3. Principais doenças inflamatórias intestinais.....	11
Figura 4. Patogênese das IBD.....	16
Figura 5. Estrutura química do SB225002.....	25
Figura 6. Protocolo experimental.....	31
Figura 7. Escore do dano macroscópico induzido por diferentes doses de TNBS.....	40
Figura 8. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o dano macroscópico induzido pelo TNBS (1,5 mg/animal) em camundongos.....	41
Figura 9. Efeito do tratamento com o antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, sobre o peso corporal, na colite induzida pelo TNBS.....	43
Figura 10. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, ou da dexametasona sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos.....	44

Figura 11. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, sobre o aumento do peso do cólon induzido pelo TNBS.....	45
Figura 12. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre encurtamento do cólon de camundongos após a administração do TNBS.....	46
Figura 13. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre aumento do peso do baço após a administração do TNBS.....	47
Figura 14. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon de animais, após administração do TNBS.....	48
Figura 15. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o aumento da atividade da eosinófilo peroxidase (EPO) induzido pelo TNBS.....	49
Figura 16. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a atividade da <i>N</i> -acetilglucosaminidase (NAG).....	50
Figura 17. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o dano tecidual microscópico induzido pelo TNBS.....	51
Figura 18. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o aumento dos níveis teciduais de IL-1 $\beta$ induzido pelo TNBS.....	52

Figura 19. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o aumento dos níveis de KC induzido pelo TNBS.....	53
Figura 20. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-4 induzida pelo TNBS.....	54
Figura 21. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-10 induzida pelo TNBS.....	55
Figura 22. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-12 induzida pelo TNBS.....	56
Figura 23. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IFN- $\gamma$ induzida pelo TNBS.....	56
Figura 24. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre o aumento da expressão da enzima COX-2 na colite induzida pelo TNBS.....	58
Figura 25. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a expressão da enzima iNOS na colite induzida pelo TNBS.....	59
Figura 26. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a expressão da proteína VEGF na colite induzida pelo TNBS.....	60
Figura 27. Bloqueio do receptor CXCR2 pelo SB225002.....	73

Figura 28. Mecanismos inflamatórios envolvidos em resposta à colite induzida pelo TNBS.....	81
Figura 29. Mecanismos envolvidos no tratamento com o SB225002 na colite induzida pelo TNBS.....	82

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Grade de escores para avaliação do dano macroscópico na colite induzida por TNBS.....	32
Tabela 2. Grade de escores para avaliação do dano microscópico na colite induzida por TNBS.....	33

## RESUMO

Os neutrófilos são células importantes para a eliminação de patógenos, no entanto, o recrutamento excessivo dessas células pode levar a lesão tecidual. Essa migração é mediada pelas quimiocinas CXC, e seus receptores, CXCR1 e CXCR2 presentes nos neutrófilos. Dessa forma, a redução do influxo de células durante o processo inflamatório, através da inibição desses receptores, pode ser uma alternativa terapêutica apropriada para o tratamento de inúmeras doenças inflamatórias, como as doenças inflamatórias intestinais (IBD). O presente estudo buscou avaliar se o tratamento sistêmico curativo com antagonista seletivo para o receptor CXCR2, SB225002, era capaz de reduzir a inflamação intestinal, no modelo de colite induzida pelo TNBS em camundongos. O SB225002 (SB) ou dexametasona (DEX) (controle positivo) foram administrados 24 h após a indução da colite, de 12 em 12 horas por três dias. No terceiro dia após a indução da colite, os animais foram sacrificados e diferentes parâmetros inflamatórios foram avaliados. A administração do TNBS induziu danos macro e microscópicos no cólon dos animais, encurtamento e edema desse tecido, além de aumento do peso do baço, causando, em muitos casos, a morte dos animais. Os tratamentos com SB ou DEX reduziram de forma significativa todos os parâmetros analisados, demonstrando uma melhoria no quadro inflamatório. Alguns dos mecanismos envolvidos nos efeitos do SB também foram analisados. O tratamento sistêmico reduziu o influxo de neutrófilos, a atividade da enzima MPO, os níveis de IL-1 $\beta$  e KC além da expressão das proteínas VEGF, iNOS e COX-2, no cólon dos animais. Adicionalmente, os níveis das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 estavam aumentados no cólon de animais que

receberam SB. Dessa forma, nossos resultados demonstraram que o bloqueio seletivo do receptor CXCR2, através da ação do antagonista SB, se mostrou eficaz em reduzir a inflamação colônica no modelo de colite induzida por TNBS, sugerindo que o SB é um potencial agente terapêutico para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

## ABSTRACT

Although neutrophils are strongly implicated in eliminating pathogens, excessive recruitment of these cells may cause tissue damage. Neutrophil migration is mediated by CXC chemokines and its receptors CXCR1 and CXCR2 which are expressed on neutrophil membrane. Therefore, reducing the influx of cells during an inflammatory process may be an alternative for treating a variety of inflammatory diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD). This study aimed to evaluate whether the systemic treatment with selective CXCR2 receptor antagonist, SB225002, was capable to reduce intestinal inflammation in TNBS-induced colitis. Both SB225002 (SB) and dexamethasone (DEX) (positive control) were administered 24 h after colitis induction, twice a day, during three days. Three days after TNBS administration animals were sacrificed and different inflammatory parameters were evaluated. TNBS administration induced edema, macro and microscopic damages in colon tissue, reduction of colon length besides augmentation in spleen weight, leading, in most cases, to animal death. Either treatment with SB or DEX significantly reduced all the parameters analyzed leading to an improvement of inflammatory signs. Furthermore, some mechanisms underlying SB effects were also analyzed. Systemic treatment with SB reduced neutrophil influx into colon tissue, the activity of MPO, IL-1 $\beta$  and KC levels, and the expression of VEGF, iNOS and COX-2 proteins. Additionally, IL-4 and IL-10 levels were increased in the colon of animals treated with SB. These results altogether demonstrate that selective blockade of CXCR2 receptor reduced colonic



inflammation in TNBS-induced colitis suggesting that SB is a potential therapeutic approach for the treatment of inflammatory bowel diseases.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O processo inflamatório

O processo inflamatório pode ser definido como uma resposta do sistema imune a infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física capazes de causar danos celulares e teciduais. Dessa forma, este processo geralmente protege o organismo, além de reparar os tecidos após eventuais danos (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

Durante o processo inflamatório ocorre aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, além da dilatação das vênulas e o recrutamento de células para o foco da inflamação. Estas alterações vasculares, celulares e bioquímicas são reguladas por mediadores inflamatórios, que podem ser definidos como moléculas solúveis e difusíveis, produzidos por células do sistema imune que migram para o local da lesão e por células residentes do tecido (Huerre e Gounon, 1996; Vivier e Malissen, 2005).

Diferentes tipos de células participam do processo inflamatório desempenhando funções distintas, mas muitas vezes sobrepostas. O epitélio é a maior barreira de proteção frente a microorganismos. No entanto, quando esta barreira é danificada, os microorganismos ativam as células residentes e desencadeiam a resposta inflamatória. Células residentes como, por exemplo, mastócitos degranulam e liberam mediadores, que sinalizam respostas rápidas, como o aumento da permeabilidade vascular. Entre outras células “sentinelas” estão as células dendríticas e macrófagos, que fagocitam e apresentam os antígenos a linfócitos que chegam mais tardiamente ao foco da infecção.

Adicionalmente, as células residentes e as células endoteliais também podem produzir mediadores inflamatórios responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o foco da lesão. Esses leucócitos emigrados fagocitam microorganismos e liberam outros mediadores inflamatórios, regulando assim a resposta imune (Delves e Roitt, 2000). No foco inflamatório os linfócitos T efetores atuam na eliminação de células infectadas, além de exacerbarem a resposta inflamatória recrutando outros tipos celulares como eosinófilos e basófilos, enquanto os linfócitos B ativados produzem anticorpos (Vivier e Malissen, 2005).

Os eventos que ocorrem durante o processo inflamatório, como a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, assim como a ativação e recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado, são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória após uma lesão ou infecção. Estes processos são dependentes da liberação de mediadores que podem ser representados por produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento, citocinas e óxido nítrico. Além destes, mediadores peptídicos [(cininas, neurocininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)], e mediadores lipídicos (leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação plaquetária), também exercem papel relevante no processo inflamatório (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

A vasodilatação é um fenômeno clássico associado à inflamação que facilita a disponibilidade local de mediadores e células inflamatórias. Este processo ocorre minutos após uma lesão, a qual primariamente envolve arteríolas, capilares e vênulas, levando inicialmente a um aumento do fluxo sanguíneo local. Esse processo é primeiramente mediado pelo óxido nítrico (NO) e por prostaglandinas vasodilatadoras (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). O NO é produzido a partir da L-

arginina, através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), que são constitutivamente expressas, e a forma induzida (iNOS), que é produzida após a ativação de leucócitos em condições inflamatórias (Vallance e Chan, 2001).

As prostaglandinas, tais como PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>; são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico através da ação da enzima ciclooxigenase (COX), esta última pode ser encontrada em duas isoformas, a ciclooxigenase tipo 1 (COX-1), que é constitutiva, e a ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que é induzida durante processos inflamatórios. A COX-1 é responsável pela rápida produção de prostaglandinas, como a prostaciclina, na mucosa gástrica, geralmente atuando nas fases primárias do processo inflamatório. Por outro lado, a COX-2 pode estar envolvida no desenvolvimento, progressão e até na resolução de condições patológicas (Mitchell *et al.*, 1995). Apesar de existirem exceções, as prostaglandinas produzidas via COX-1 são usualmente relacionadas com funções fisiológicas do organismo, enquanto que as sintetizadas via COX-2 geralmente estão envolvidas em processos inflamatórios (Simmons *et al.*, 2004).

Um importante fenômeno atribuído à vasodilatação e ao extravasamento de fluídos em processos patofisiológicos é o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Este processo compreende etapas como a marginação, adesão ao endotélio e a migração de células. Cerca de 50 a 60 % dos leucócitos presentes na circulação sanguínea são neutrófilos (Smith, 1994), sendo estes os primeiros e mais abundantes leucócitos a chegarem ao foco da inflamação.

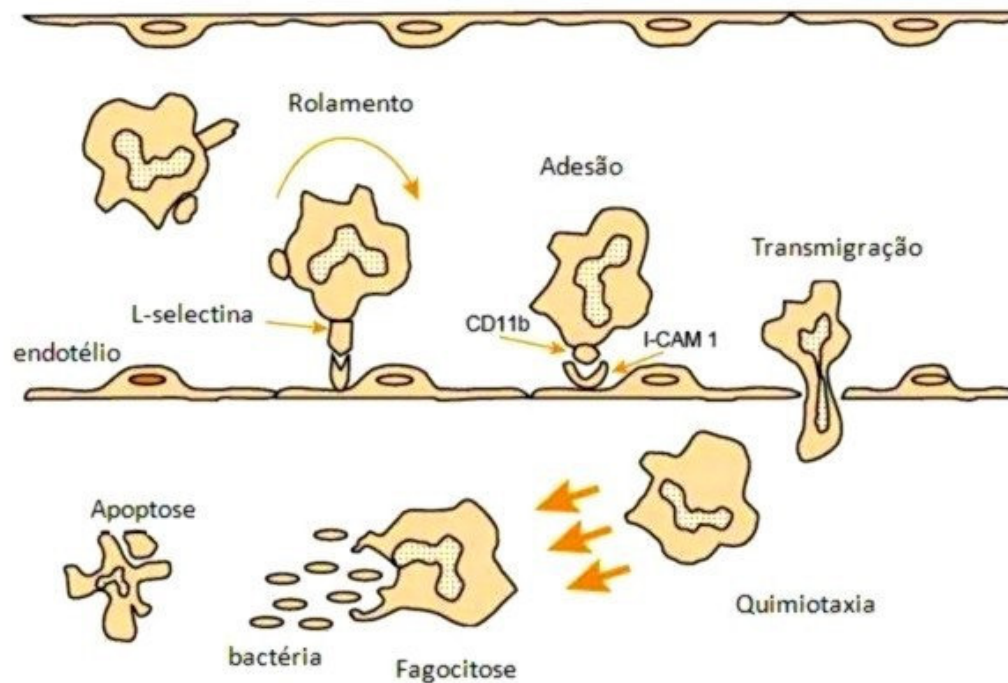
Uma das etapas fundamentais para que ocorra a migração de neutrófilos é a liberação de substâncias quimioatraentes que formam um gradiente de concentração entre a área lesionada e as vênulas pós-capilares, favorecendo a

adesão dos neutrófilos com as células endoteliais, dando início assim ao rolamento desses leucócitos pelo endotélio vascular (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kelly *et al.*, 2007).

O processo de transmigração de neutrófilos ocorre através de fases distintas: marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia (Figura 1). A marginação é o processo do movimento do neutrófilo da região central do fluxo sanguíneo para a periferia do vaso. Durante a vasodilatação ocorre uma retração das células endoteliais das pequenas vênulas (denominadas vênulas pós-capilares), que acarreta em aumento da permeabilidade vascular e no extravasamento de proteínas e de células, do sangue para o tecido, favorecendo o contato entre os leucócitos e o endotélio venular, auxiliando assim no processo de marginação. Após este processo, ocorre uma fraca interação adesiva entre o neutrófilo e as células endoteliais vasculares, fazendo com que os neutrófilos mantenham estreita proximidade com o endotélio vascular. A aderência dos neutrófilos ao endotélio vascular é mediado por moléculas de adesão expressas nas membranas celulares, denominadas selectinas, que por sua vez permitem o rolamento do leucócito sobre as células endoteliais (Marshall *et al.*, 2003). As selectinas (E-selectina e P-selectina) são expressas pelas células endoteliais e são proteínas fundamentais para o processo de rolamento, permitindo a desaceleração do movimento dos neutrófilos sobre o endotélio (Ley *et al.*, 2007).

Moléculas como as integrinas também participam do processo de rolamento auxiliando na adesão leucocitária. As integrinas  $\alpha_4\beta_7$  e  $\beta_2$  e a molécula intercelular de adesão 1 (ICAM1), dentre outras, estão intimamente ligadas ao processo de rolamento do leucócito sobre o endotélio vascular (Ley *et al.*, 2007), o que facilita à transmigração celular ao foco inflamatório.

Em seguida, os neutrófilos atravessam o endotélio através de junções entre as células, caracterizando assim o processo de diapedese (transmigração), que também pode ser facilitado por moléculas de adesão (Kelly *et al.*, 2007).



Fonte: Adaptado de Sherwood, ER e Toliver-Kinsky (2004).

**Figura 1. Mecanismos de rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia de neutrófilos.** A inflamação causa a marginação dos neutrófilos, facilitando as interações entre as células endoteliais vasculares e os neutrófilos. Essas interações são mediadas por selectinas e seus ligantes, os quais promovem o rolamento do neutrófilo. A adesão do neutrófilo é potencializada pela interação de integrinas e moléculas de adesão intercelular (ICAM). Os neutrófilos migram para o foco da lesão pela ação de moléculas quimioatraentes como quimiocinas e produtos bacterianos.

Os neutrófilos, assim como outros leucócitos, também necessitam de moléculas quimioatraentes para facilitar sua migração ao sítio da lesão ou infecção. Moléculas quimioatraentes são mediadores solúveis, como por exemplo,

bioprodutos de bactérias, componentes do complemento, citocinas quimioatraentes (quimiocinas), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ou o fator de ativação plaquetária (PAF) que ao agirem em seus receptores têm a função de atraem o leucócito ao tecido inflamado (Simon e Green, 2005). Quando ocorre uma inflamação tecidual há um expressivo aumento da produção local de quimiocinas, causando em consequência, recrutamento seletivo de leucócitos para o local afetado. As quimiocinas que são liberadas determinam os subtipos celulares recrutados para o sítio inflamatório (Luster, 1998). Esta seletividade na migração leucocitária é regulada pelos diferentes tipos de receptores de quimiocinas presentes na membrana celular dos leucócitos (D'ambrosio *et al.*, 2003).

Uma vez no foco inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar e liberar fatores citotóxicos, eliminando os microorganismos. Em seus grânulos citoplasmáticos, o neutrófilo possui várias enzimas proteolíticas capazes de lisar os microorganismos. Nos grânulos azurófilos, lisossomos verdadeiros ou grânulos primários estão presentes defensinas, lisozimas, mieloperoxidase, elastases, catepsinas, hidrolases ácidas, entre outras enzimas, que atuam na digestão dos microorganismos fagocitados. Após este evento o neutrófilo entra em processo de apoptose finalizando seu ciclo (Smith, 1994; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Kelly *et al.*, 2007).

O desencadeamento de outros processos como a cascata da coagulação e a ativação do sistema complemento, juntamente com os aspectos anteriormente expostos tornam a resposta inflamatória um complexo sistema de defesa do organismo. Entretanto, essa mesma resposta, quando desregulada, pode levar ao desencadeamento de inúmeras patologias.



## 1.2 O Papel das quimiocinas e seus receptores na inflamação

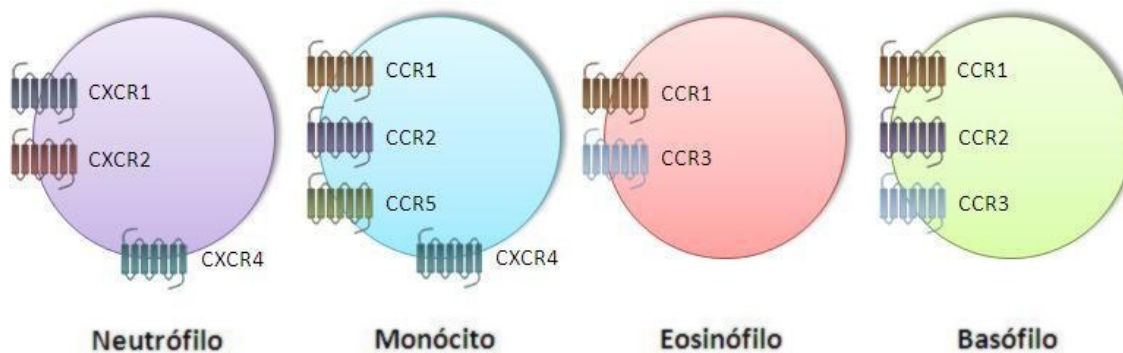
As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a sua migração direcionando-os a tecidos linfóides ou periféricos. Esse direcionamento depende do grau de maturação e da ativação celular, assim como do estado de inflamação do tecido; isso porque a produção das quimiocinas e a expressão de seus receptores são regulados por uma grande variedade de moléculas que contribuem para o estabelecimento da resposta inflamatória (Allen *et al.*, 2007).

A identificação de um grande número de receptores para as quimiocinas e a caracterização da seletividade de sua expressão em diferentes tipos de leucócitos tem auxiliado no esclarecimento de mecanismos envolvidos na regulação do tráfego de leucócitos em situações patogênicas e não-patogênicas (Baggiolini, 2001).

Mais de 45 genes não-alélicos de quimiocinas foram identificados no genoma humano (Rollins, 2006). As quimiocinas são classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína *N*-terminais. Um pequeno número de quimiocinas possui uma única cisteína (família C) ou duas cisteínas separadas por três aminoácidos (CX<sub>3</sub>C) (Abbas e Lichtman, 2003). As duas principais famílias são as da quimiocinas CC, onde os resíduos de cisteína são adjacentes, e a família CXC, na qual esses resíduos são separados por um aminoácido. A família CXC pode ainda ser dividida em duas; a CXC (ELR-) e CXC (ELR+), que tem como característica possuir a seqüência de aminoácidos *N*-terminal glutamato-leucina-arginina (Allen *et al.*, 2007).

Os fagócitos presentes na circulação sanguínea expressam diferentes tipos de receptores para quimiocinas (Figura 2). Os receptores CXCR1 e CXCR2 são comumente encontrados em neutrófilos, enquanto os monócitos, eosinófilos e

basófilos compartilham alguns receptores, entretanto também expressam receptores distintos (CCR3 em eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos). Dessa forma, esses leucócitos podem ser recrutados de forma seletiva, como no caso dos eosinófilos que possuem CCR3, o qual é ativado por eotaxinas que são liberadas principalmente em inflamações alérgicas (Baggiolini, 2001).



Fonte: Adaptado de Baggiolini, M (2001).

Figura 2. Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes leucócitos humanos.

Durante a resposta inflamatória as quimiocinas CXC (ELR+), como a interleucina-8 (IL-8/CXCL8/KC/GRO) atrai neutrófilos para o sítio da lesão através da ativação de dois receptores intimamente relacionados: CXCR1 e CXCR2, que assim como os demais receptores para quimiocinas são acoplados a proteína G (GPCR) e possuem sete domínios transmembranares. De modo similar a CXCL8 (KC), outras quimiocinas mais recentemente descritas também podem estimular ambos receptores (Proost *et al.*, 1993). Algumas quimiocinas ativam preferencialmente o receptor CXCR2, não exercendo efeitos sobre o receptor CXCR1, como a CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (GRO $\beta$ ), CXCL3 (GRO $\gamma$ ), CXCL5 (ENA 78), CXCL6 (GCP-2) e CXCL7 (NAP 2), enquanto que o receptor CXCR1 é ativado pela CXCL6, CXCL7 e CXCL8

(Walz e Baggiolini, 1989; Haskill *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2007).

Estudos recentes apresentaram resultados controversos em relação às funções desencadeadas pelos receptores CXCR1 e CXCR2. Algumas evidências indicam que o receptor CXCR1 desenvolve o papel central na quimiotaxia de polimorfonucleares (Bertini *et al.*, 2004; Di Cioccio *et al.*, 2004; Frydelund-Larsen *et al.*, 2007), e que o receptor CXCR2 está principalmente envolvido na angiogênese através da ativação pela CXCL8 (Addison *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2003; Frydelund-Larsen *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos de *binding* mostraram que a CXCL8 liga-se com maior afinidade ao receptor CXCR2 promovendo atividade quimioatraente preferencialmente por este receptor (White *et al.*, 1998; Catusse *et al.*, 2003).

Os mecanismos intracelulares desencadeados após ativação dos receptores CXCR1 e CXCR2 compreendem basicamente a ativação da enzima fosfolipase C do tipo B (PLCB). A PLCB cliva o fosfatidil-inositol-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) em dois segundos mensageiros intracelulares, o inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> induz a liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) de estoques intracelulares, promovendo aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup> disponível no citosol; já o DAG ativa diferentes isoformas de proteínas quinases C (PKC). Além disso, a via da fosfatidilinositol-3-hidroxiquinase do tipo  $\gamma$  (PI<sub>3</sub>K $\gamma$ ) também pode ser ativada gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato iniciando a ativação de outra quinase, a PKB (Thelen, 2001).

Vários trabalhos vêm demonstrando o papel das quimiocinas e seus receptores em diversas patologias, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso, doenças inflamatórias intestinais, inflamações pulmonares e aterosclerose

(Baggiolini, 2001). Nas inflamações intestinais, os macrófagos, as células endoteliais, os fibroblastos e as células epiteliais secretam moléculas quimioatraentes, como a CXCL8 e a CXCL5, que atuam na migração de neutrófilos. Além disso, as citocinas IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , que são liberadas por estes tipos celulares aumentam a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (Macdermott, 1999).

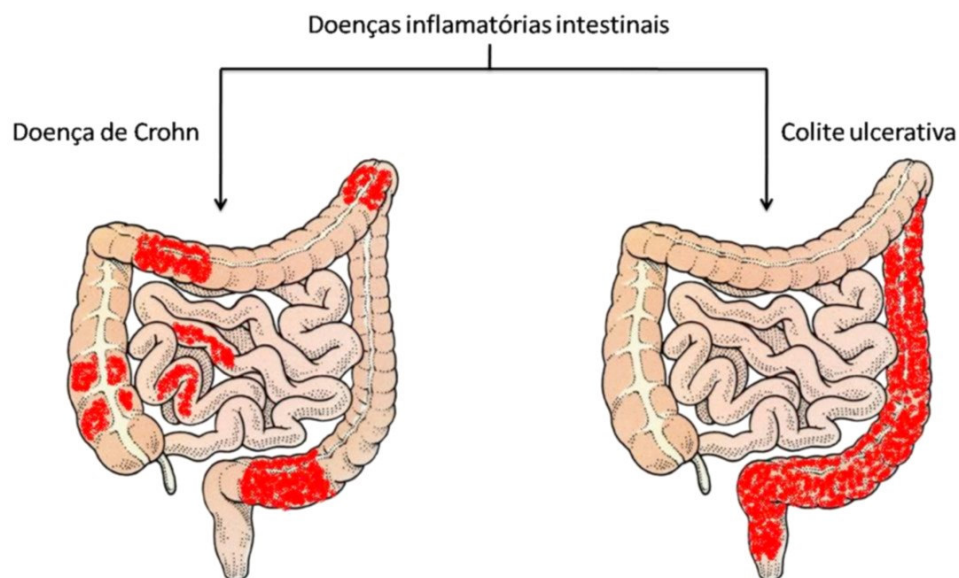
Este aumento na produção de quimiocinas e na expressão de moléculas de adesão promove uma maior migração de macrófagos e granulócitos presentes na circulação para a mucosa intestinal inflamada. Além disso, o aumento desse influxo celular promove a formação de espécies reativas de oxigênio, NO, leucotrienos e proteases que contribuem ainda mais para o aumento do dano tecidual que ocorre nas doenças inflamatórias (Macdermott, 1999).

### 1.3 Doenças Inflamatórias intestinais

Doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) é uma classificação genérica para um grupo de desordens inflamatórias do trato gastrointestinal que é caracterizada por dano e inflamação da mucosa intestinal. As duas principais IBD são a colite ulcerativa (UC, do inglês *ulcerative colitis*) e a doença de Crohn (CD, do inglês *Crohn's disease*) (Aharoni *et al.*, 2006).

A CD é geralmente caracterizada por ser uma doença inflamatória transmural que afeta todo o trato digestivo, podendo afetar desde a boca até o ânus. Por outro lado, a UC é uma doença inflamatória não transmural que está restrita ao cólon (Figura 3) (Baumgart e Carding, 2007).

A ocorrência das IBD pode envolver fatores como idade, raça, etnia e região geográfica. A UC e CD começaram a se estabilizar em regiões onde era considerada de alta incidência, como a América do Norte e o norte da Europa, entretanto têm se elevado em áreas como o sul da Europa, Ásia e em muitos outros lugares do mundo. Os casos de pessoas que sofrem destas doenças podem chegar a 1,4 milhão nos Estados Unidos e a 2,2 milhões na Europa (Loftus, 2004).



**Figura 3.** Principais doenças inflamatórias intestinais. Doença de Crohn (CD) e Colite ulcerativa (UC). A CD pode ocorrer ao longo de todo o trato gastrointestinal, enquanto a UC caracteriza-se por uma inflamação restrita ao cólon.

A UC e CD estão associadas com manifestações extraintestinais, como o aumento na incidência de câncer gastrointestinal (Blumberg e Strober, 2001). Além disso, ambas ocorrem tipicamente entre a segunda e terceira décadas de vida, sendo que a maioria dos indivíduos afetados desenvolve a doença em sua forma crônica (Xavier e Podolsky, 2007).

O componente hereditário tem se mostrado bastante relacionado ao desenvolvimento das IBD. Parentes de primeiro grau de indivíduos afetados parecem ter um risco cinco vezes maior no desenvolvimento desta patologia (Xavier e Podolsky, 2007).

Estudos recentes demonstraram que o transportador de cátions orgânicos do tipo N1 (OCTN1, do inglês *organic cation transporter N1*) está envolvido na suscetibilidade ao desenvolvimento das IBD (Lamhonwah *et al.*, 2003). Estas anormalidades podem resultar em um defeito na resposta imunológica, favorecendo a proliferação de diversos tipos de bactérias na mucosa intestinal, o que pode levar ao surgimento das IBD (Swidsinski *et al.*, 2002).

Os estudos sobre a resposta imune na patogênese das IBD avançaram muito após a identificação do gene CARD15 (do inglês, *caspase recruitment domain 15*), que codifica a NOD2 (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain 2*), o qual é preferencialmente expresso em macrófagos e células dendríticas. Esse gene codifica proteínas intracelulares que desencadeiam a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno e ativam o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), em resposta à estimulação bacteriana (Bonen *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Há alguns anos, estudos evidenciaram mutações no gene CARD15 em cerca 10-15% dos pacientes com CD (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Essas mutações são resultantes da substituição de três aminoácidos em regiões específicas, Arg702Trp, Gly908Arg e Leu1007fsinsCys (Lander *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002).

Um número cada vez maior de modelos de inflamação intestinal em animais tem contribuído de forma substancial para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das IBD.

Várias evidências sugerem que um equilíbrio dinâmico entre os microorganismos, especialmente os da flora comensal, a barreira epitelial da mucosa e a resposta imunológica do hospedeiro, exercem um papel central na iniciação e desenvolvimento da patogênese das IBD (Xavier e Podolsky, 2007). Alguns estudos demonstram que o sistema imunológico é ativado como resultado de um defeito próprio (ativação constitutiva ou falha em alguns mecanismos regulatórios), ou devido à estimulação continuada da mucosa, resultando em uma mudança da barreira epitelial (Mashimo *et al.*, 1996; Schmitz *et al.*, 1999).

Foi demonstrado que a flora entérica de pacientes com IBD é maior que em pacientes saudáveis (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Barnich *et al.*, 2007). A importância da flora intestinal no desenvolvimento das IBD é evidenciada por estudos que utilizam linhagens murinas específicas, cujo desenvolvimento de colite espontânea, parece depender da presença da flora luminal (Xavier e Podolsky, 2007).

A proteção da mucosa pela barreira epitelial é uma função tão importante quanto a função de absorção de nutrientes e a secreção de fluidos. Ela impede a penetração de macromoléculas e bactérias provenientes do lúmen. A importância desta barreira na predisposição ao desenvolvimento das IBD pode ser evidenciada por descobertas de anormalidades na permeabilidade intestinal em parentes de primeiro grau de portadores de CD (Irvine e Marshall, 2000; Buhner *et al.*, 2006).

As células do epitélio intestinal expressam receptores de reconhecimento padrão do tipo *toll* (TLR, do inglês *toll-like receptors*), NOD1 e 2, e receptores para diferentes tipos de quimiocinas (Cario *et al.*, 2000; Hisamatsu *et al.*, 2003). Os TLR são receptores que geralmente estão presentes na superfície celular e são os responsáveis pelo desencadeamento da sinalização em resposta a um agente

infeccioso. Já as moléculas NOD encontram-se no citoplasma de células epiteliais e imunes, e são responsáveis pelo reconhecimento de fragmentos derivados de peptidoglicanos bacterianos (Inohara *et al.*, 2003; Philpott e Girardin, 2004; Strober *et al.*, 2006).

As células *goblet* constituem um componente importante do epitélio intestinal. Elas são responsáveis pela produção de peptídeos que são cruciais tanto para defesa como para o reparo do epitélio da mucosa intestinal (Mashimo *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstraram que a mucina-2 (MUC2), a glicoproteína mais secretada pelas células *goblet*, é expressa com defeito em pacientes com IBD. Foi demonstrado ainda que camundongos com deleção gênica para a MUC2 (MUC<sup>-/-</sup>), são deficientes em células *goblet* e desenvolvem colite espontânea (An *et al.*, 2007). Entretanto, a deleção do gene que codifica a RELMB (do inglês, *resistin-like molecule beta*) outra proteína específica de células *goblet*, que é induzida na presença de bactérias, acarreta na redução da severidade da colite induzida por DSS em camundongos (Mcvay *et al.*, 2006). Dessa forma, as células goblet parecem estar atuando tanto na proteção como na patogênese da colite (Itoh *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de uma resposta imunológica desregulada, que geralmente está relacionada a alterações genéticas, é em grande parte mediada pela ativação desenfreada de neutrófilos e macrófagos, além de ser caracterizada por um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Martin *et al.*, 2006).

Os macrófagos são potenciais produtores de citocinas, quimiocinas, metaloproteinases de matriz, colagenases e elastases. A citocina IL-12, por exemplo, desenvolve importante papel na patogenicidade das IBD sendo produzida por macrófagos e células dendríticas, que por sua vez são especializadas no



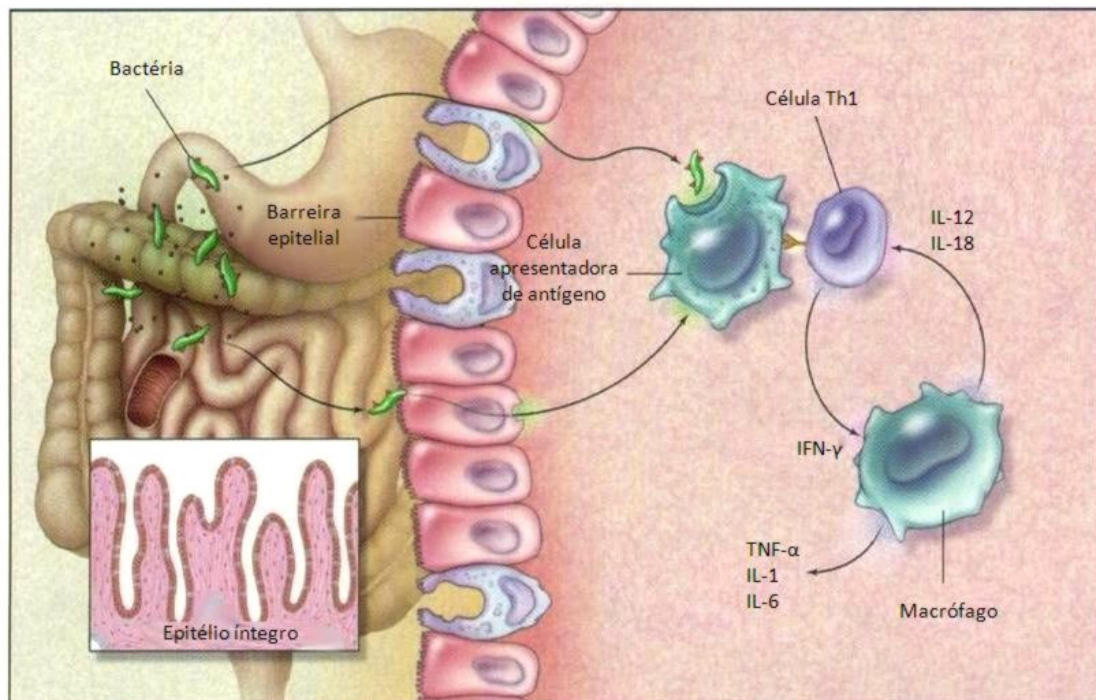
mecanismo de processamento e apresentação de antígenos no intestino inflamado, que é crucial no desenvolvimento de respostas mediadas por linfócitos T (Parronchi *et al.*, 1997).

Os neutrófilos também desempenham papel importante nas IBD. Eles causam dano tecidual e liberam diversos mediadores inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio, mediadores lipídicos, proteases e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Nikolaus *et al.*, 1998). Estudos indicam que o dano tecidual mediado por neutrófilos nas IBD deve-se, em parte, a um defeito no seu mecanismo de apoptose, o que prolonga sua vida útil (Brannigan *et al.*, 2000).

Os eosinófilos também participam da resposta inflamatória presente nas IBD. Essas células representam uma pequena parcela dos leucócitos presentes na circulação (Al-Haddad e Riddell, 2005), as quais são atraídas para o intestino inflamado em resposta a eotaxina, que é uma quimiocina expressa por todo trato gastrointestinal e encontra-se aumentada em pacientes portadores de IBD (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996; Mir *et al.*, 2002). Os eosinófilos secretam proteínas pró-inflamatórias como eosinófilo peroxidase, que pode causar dano tecidual e abrir poros nas membranas das células alvo, além de aumentar a reatividade do músculo liso gerando espécies reativas de oxigênio (Rothenberg *et al.*, 2001). No entanto, a resposta dos eosinófilos na inflamação intestinal parece estar mais relacionada à CD do que à UC (Mir *et al.*, 2002).

A caracterização dos mecanismos que levam à ativação de macrófagos e linfócitos T sugere que algumas citocinas, como o IFN- $\gamma$ , ativam os macrófagos, que por sua vez, produzem as citocinas IL-12 e IL-18, as quais estimulam os linfócitos Th1, formando um ciclo de ativação (Figura 4) (Podolsky, 2002).

Em pacientes com UC há uma predominância de linfócitos CD4+ com células do fenótipo Th2, caracterizada pela alta produção de TGF $\beta$  e IL-5. Por outro lado, na mucosa de pacientes com CD predomina a resposta do fenótipo Th1, que é caracterizada pela produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2) (Fuss *et al.*, 1996).



Fonte: Adaptado de Podolsky, DK (2002).

**Figura 4. Patogênese das IBD.** O epitélio intestinal íntegro constitui uma população de células que cria uma barreira contra os agentes patogênicos presentes no lúmen. A integridade da barreira pode estar comprometida por variações genéticas, reparo tecidual reduzido e por agentes externos. A quebra da integridade epitelial pode ocorrer pela ação de produtos de bactérias comensais na barreira epitelial, levando à interação direta com células imunes, como células dendríticas e populações de linfócitos. A produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos Th1, ativa macrófagos, que produzem IL-12 e IL-18 que irão estimular as células Th1, formando um ciclo de ativação. Os macrófagos ativados produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas, sobretudo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1.

Na CD a resposta Th1 parece estar influenciada pelas células Th17, que são caracterizadas pela produção da interleucina-17 (IL-17) (Kolls e Linden, 2004). A produção desta citocina é estimulada pela IL-6, TGF $\beta$  e IL-23, e por secretados de neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, especialmente as células dendríticas (Sartor, 2006). Os níveis tanto de IL-23 quanto de IL-17 encontram-se aumentados em tecidos de pacientes com CD e em alguns tipos de colite experimental (Fujino *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2005). Já o perfil da resposta das células T na UC é mais difícil de ser caracterizado. A produção das citocinas IL-4 e IL-5, as quais estão elevadas no tipo de resposta Th2, nem sempre são encontradas em altos níveis em tecidos com UC (Fuss *et al.*, 1996).

#### 1.4 Papel da angiogênese nas doenças inflamatórias intestinais

A angiogênese é um processo de formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, sendo um constituinte fundamental em diversos processos biológicos incluindo crescimento, desenvolvimento e reparo do tecido (Carmeliet, 2003).

Desde os processos de ulceração aos de regeneração, a angiogênese é sem dúvida um componente importante na patologia das IBD (Carvalho, J. F. *et al.*, 2007). Muitos estudos têm demonstrado que o fator pró-angiogênico VEGF encontra-se em níveis elevados em pacientes portadores de IBD, em comparação a pessoas saudáveis (Griga *et al.*, 1998; Kanazawa *et al.*, 2001; Danese *et al.*, 2006).

Entre as conseqüências da expansão dessa nova rede vasos durante o processo inflamatório estão o aumento no influxo de leucócitos, a maior oferta de nutrientes que mantém o processo imune metabolicamente ativo, e também a

ativação das células endoteliais que contribuem para a produção local de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz. Em conjunto, tais alterações contribuem para a progressão das IBD (Firestein, 1999; Szekanecz e Koch, 2004).

O infiltrado de leucócitos não só contribui para a iniciação do dano tecidual, mas também pode regular a atividade angiogênica. Diversos estudos têm evidenciado a produção de vários fatores angiogênicos, provenientes de diferentes tipos de leucócitos, que também podem modificar a matriz extracelular promovendo assim a formação de novos vasos (Cassatella, 1999; Kasama *et al.*, 2000; Shamamian *et al.*, 2001). Os neutrófilos são uma grande fonte de fatores angiogênicos como o VEGF e CXCL8, bem como metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9), que são liberados na foco da inflamação e regulam a angiogênese (Kusumanto *et al.*, 2003; Schrufer *et al.*, 2005). Os macrófagos desempenham papel angiogênico nas IBD, pois também são fontes de algumas citocinas pró-angiogênicas, tais como o VEGF, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), TNF- $\alpha$  e CXCL8 (Polverini, 1997; Knowles *et al.*, 2004).

Dessa forma, a liberação de fatores que promovem a migração de leucócitos, pode, direta ou indiretamente, promover a neovascularização na inflamação verificada nas IBD (Chidlow *et al.*, 2006).

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

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

das IBD que são difíceis de serem estudados em humanos, tais como mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas fases iniciais do desenvolvimento da UC e a busca por alternativas terapêuticas emergentes (Wirtz e Neurath, 2007).

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

Outro agente químico que pode induzir inflamação intestinal é o sulfato de dextrano sódico (DSS). Esse agente é diluído na água que os animais bebem e é administrado durante vários dias. Já foi descrito sua utilização em ratos, camundongos e cobaias. O desenvolvimento da inflamação intestinal causada pelo DSS é caracterizado principalmente por diarreia, ulcerações e infiltração de granulócitos (Okayasu *et al.*, 1990).

Existem também modelos animais em que as IBD desenvolvem-se espontaneamente. Nestes modelos, as mutações genéticas relacionadas aos

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

A deleção gênica para algumas citocinas também pode possibilitar o desenvolvimento de colite espontânea em animais. Dentre estes modelos se destacam os que utilizam camundongos *knockout* (KO) para as citocinas IL-10 e IL-2. Os animais com essas características desenvolvem enterocolite espontânea, devido à desregulação da interação entre as células do sistema imune e a flora entérica. A utilização destes modelos é considerada altamente reproduzível e também influenciável por fatores ambientais (Kuhn *et al.*, 1993; Sadlack *et al.*, 1993). A deleção ou deficiência de inúmeras outras proteínas presentes em células que participam do processo inflamatório mostraram-se importantes no desenvolvimento de colite espontânea.

### 1.6 Tratamentos em doenças inflamatórias intestinais

Os avanços nos estudos em imunologia das mucosas, ocorridos nos últimos anos, têm sido aplicados às IBD com o intuito de gerar novos potenciais

terapêuticos. Até recentemente, o arsenal terapêutico disponível para tratar UC e CD era relativamente limitado, compreendendo essencialmente os compostos do ácido 5-aminosalicílico (ASA), esteróides e o azatioprina/6-mercaptopurina. Durante a década de 1990, novos agentes terapêuticos foram testados e os agentes imunorregulatórios como o *metrotexato* e a *ciclosporina* foram incluídos (Korzenik e Podolsky, 2006).

O Azatioprina e a 6-mercaptopurina são usados para o tratamento de UC e CD em pequenas doses, e são geralmente co-administrados com corticosteróides. Essas drogas atuam na redução da população de linfócitos durante o processo inflamatório (Xu *et al.*, 2004). O metotrexato é um medicamento bastante utilizado para o tratamento de artrite reumatóide e psoríase, entretanto também exerce efeitos benéficos em pacientes portadores de IBD. Essa droga é utilizada quando o tratamento com corticosteróides ou com azatiopreno/6-mercaptopurina não obtêm efeitos satisfatórios. Sua administração é via intramuscular, e seus efeitos colaterais limitam bastante sua utilização (Xu *et al.*, 2004; Feagan *et al.*, 2005).

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

Em 1998, foi aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) o uso do *infliximab* (Remicade; Centocor) um anticorpo quimérico monoclonal

direcionado contra o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e para o tratamento de CD, dando origem a uma nova geração de agentes terapêuticos para IBD (Korzenik e Podolsky, 2006). O infliximab atua ao se ligar ao TNF- $\alpha$  impedindo que ele se ligue a seus receptores nas membranas das células alvo. No entanto, existem evidências de que sua ação no tratamento de doenças inflamatórias crônicas é, em parte, atribuída a sua habilidade em induzir a apoptose de monócitos (Podolsky, 2002).

Várias outras terapias anti-TNF têm sido avaliadas em ensaios clínicos controlados. O *Etanercept* e o *Ornecept*, dois anticorpos em fase de estudos, mostraram-se eficazes na indução de apoptose de células T e nos monócitos. Além disso, o *Certolizumab*, um agente anti-TNF não-apoptótico, apresentou resultados semelhantes na clínica (Lugering *et al.*, 2001; Baumgart e Sandborn, 2007). Entretanto, muitos desses anticorpos só apresentam eficácia quando administrados em altas doses, o que pode aumentar ainda mais seus efeitos colaterais, podendo causar complicações como a formação de auto-anticorpos, insuficiência cardíaca, linfoma e facilitar infecções por agentes oportunistas (Korzenik e Podolsky, 2006; Lichtenstein *et al.*, 2006a; Lichtenstein *et al.*, 2006b). Além disso, o alto custo da terapia anti-TNF limita de forma considerável o tratamento dos pacientes, sobretudo nos países em desenvolvimento.

Estudos clínicos envolvendo a modulação de outras citocinas também têm contribuído na atenuação do quadro inflamatório de UC e de CD. Em altas doses, o anticorpo anti-IFN (*Fontolizumab*) apresentou bons resultados em alguns grupos de pacientes (Hommes *et al.*, 2006; Reinisch *et al.*, 2006). Adicionalmente, existem anticorpos humanizados contra as interleucinas IL-12 e IL-23, o *ABT-874* e *CNTO 1275* respectivamente, que bloqueiam suas ações. Estudos atualmente em fase



clínica II com o *ABT-874*, em pacientes com CD, sugerem benefícios clínicos (Baumgart e Sandborn, 2007).

Como exposto anteriormente, as células T desempenham importante papel no desenvolvimento da resposta imune nas IBD. Várias terapias vêm buscando controlar a ativação dessas células, com o intuito de bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias, ou mesmo de induzir a apoptose de um grupo específico de linfócitos (Korzenik e Podolsky, 2006). Algumas terapias recentes para o tratamento CD têm procurado reduzir a resposta dos linfócitos T CD4+ através da utilização de anticorpos específicos anti-CD4 (Stronkhorst *et al.*, 1997). Outros anticorpos para células T têm se mostrado eficazes no tratamento da UC como o *Visilizumab* (anti-CD3), *Daclizumab* e *Simulect* (ambos anti-CD25) (Korzenik e Podolsky, 2006).

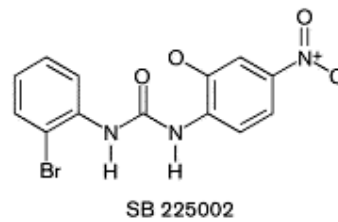
Ademais, a inibição da migração celular vem sendo alvo de diversos estudos, e se mostra vantajosa uma vez que reduz indiretamente a produção local de diversas citocinas. Inibidores seletivos de moléculas de adesão interferem na migração de leucócitos para o sítio inflamatório, uma vez que essas moléculas são essenciais para que ocorra tal processo (Korzenik e Podolsky, 2006; Baumgart e Sandborn, 2007). Dois estudos em fase clínica II mostraram que o *Natalizumab*, um anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ 4-integrina, foi eficaz no tratamento de pacientes com CD (Gordon *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2003). Outro anticorpo monoclonal para molécula de adesão, MLN02 (anti- $\alpha$ 4B7-integrina), mostrou-se eficaz na terapia de pacientes com UC (Feagan *et al.*, 2005).

Entretanto, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que combinem alta eficácia no tratamento e baixos efeitos indesejáveis, se faz necessária, pois os vários medicamentos utilizados não são seletivos para o

tratamento das IBD, além de possuírem inúmeros efeitos adversos. Além disso, apesar de muitos pacientes responderem e se manterem com as terapias existentes, as opções disponíveis permanecem inadequadas para outros. Somando-se a isso, os estudos mais recentes ainda não fornecem dados suficientes sobre a total eficácia das novas terapias e de seus efeitos colaterais.

Em resposta a demanda de novos medicamentos para a terapia das IBD, e tendo em vista a grande importância das quimiocinas e seus receptores em diversos processos inflamatórios, a indústria farmacêutica tem feito grandes esforços visando o desenvolvimento de drogas que possam tratar ou atenuar seus efeitos. Diante disso, esses receptores e seus ligantes tornaram-se uma importante ferramenta na busca por novas alternativas terapêuticas (Wells *et al.*, 2006). Os resultados dos esforços realizados na obtenção de moléculas que possam antagonizar esses receptores vêm se mostrando bastante promissores, e o número de patentes destas moléculas inibidoras da ação das quimiocinas tem aumentado rapidamente (Proudfoot, 2002).

Em 1998 foi descrito o primeiro antagonista não peptídico de receptor CXCR2, o SB225002 (N-(2-hidroxi-4-nitrofenil)-N'-(2-bromofenil) uréia) (Figura 5), (White *et al.*, 1998). Este composto inibe a ligação tanto da CXCL8 como da CXCL1 ao receptor CXCR2, e também bloqueia a quimiotaxia induzida por estas quimiocinas e a marginação de neutrófilos, em humanos e coelhos, sem interferir na ligação com o receptor CXCR1 (Catusse *et al.*, 2003).



Fonte: Hay, DWP (2000).

**Figura 5.** Estrutura química do SB225002. Antagonista seletivo não-peptídico de receptores CXCR2.

O SB225002 foi primeiro antagonista do receptor CXCR2 considerado como um potencial agente terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias, incluindo doença pulmonária obstrutiva crônica, artrite reumatóide e IBD (White *et al.*, 1998; Catusse *et al.*, 2003). Mais recentemente, a displasia bronco-pulmonária e as infecções por retrovírus têm sido propostas como novos alvos terapêuticos para antagonistas de receptores CXCR2 (Auten *et al.*, 2001; Lane *et al.*, 2001).

Mediante a necessidade de uma nova terapia para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e a promissora atividade do antagonista SB225002, este trabalho propôs avaliar se o composto SB225002 possui atividade antiinflamatória sobre a colite induzida pelo TNBS, e investigar o seu possível mecanismo de ação.

## **O**BJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

Investigar as ações do antagonista seletivo do receptor de quimiocinas CXCR2, SB225002, sobre alguns parâmetros inflamatórios no modelo de colite experimental induzida por TNBS em camundongos, através do emprego de técnicas farmacológicas, bioquímicas e moleculares.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- \* Investigar o possível efeito de diferentes doses do composto SB225002 sobre os parâmetros macroscópicos e microscópicos avaliados na colite induzida por TNBS em camundongos;
- \* Avaliar a migração de células inflamatórias no colón de camundongos tratados ou não com o composto SB225002;
- \* Investigar alguns dos mecanismos possivelmente relacionados com o efeito antiinflamatório do SB225002, como a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e KC) e a modulação da expressão de proteínas (iNOS, COX-2 e VEGF) importantes para o processo inflamatório decorrente da colite induzida pelo TNBS.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *BALB/c* machos pesando entre 20 - 25 g, criados no Biotério de Farmacologia ou Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em câmaras isoladas com ventilação, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e umidade (60 - 80%) em ciclo de 12 horas claro-escuro, além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo e os animais foram aclimatizados 1 hora antes do início dos testes. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (processo número 262/CEUA e 23080.035334/2003-16/UFSC).

#### 3.2 Indução de Colite

A colite experimental foi induzida conforme descrito originalmente para ratos (Wallace *et al.*, 1989) e modificado para camundongos (McCafferty *et al.*, 1999), com poucas adaptações as nossas condições experimentais (Hara *et al.*, 2007). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e colocados em jejum sólido, utilizando uma grade no fundo da caixa para evitar a coprofagia, e com livre acesso a solução de glicose 5%. Após 24 h de jejum os animais receberam anestesia com uma solução de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (80 mg/kg, i.p.), e então um cateter de polietileno PE - 50 (4 cm) acoplado a uma microseringa foi cuidadosamente inserido no interior do cólon do animal para a administração de

diferentes doses de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A colite foi induzida em camundongos da linhagem Balb/c utilizando-se 0,1 ml de TNBS 1,0; 1,5; 2,0 ou 2,5 mg em 35% de etanol. Os animais controle receberam 0,1 ml de uma solução estéril de salina 0.9 %. Após a indução de colite, os animais foram mantidos em posição inclinada a 45° por dois minutos. Decorridas 4 h da indução, os animais passaram a ter livre acesso à ração e água filtrada. Durante todo o experimento os animais sobreviventes foram monitorados em relação à mudança de peso corporal e mortalidade. Os animais foram sacrificados 72 h após a indução de colite. Os cólons foram removidos e as fezes presentes foram retiradas, e a seguir foram ou não abertos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e lavados com solução salina estéril. Os cólons foram pesados, seus comprimentos mensurados, e acondicionados em freezer -70 °C para posteriores análises. Adicionalmente o baço também foi retirado e pesado.

### *3.3 Tratamentos*

Para avaliar os efeitos terapêuticos da administração do antagonista seletivo não-peptídico para o receptor CXCR2, o SB225002, sobre a colite experimental induzida pelo TNBS, os animais receberam diferentes doses do SB225002 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.) duas vezes ao dia, em intervalos de 12 h, sendo o primeiro tratamento realizado 24 h após a indução de colite (Figura 6). Setenta e duas horas após a indução da colite e 4 h após o último tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Para o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c.) foi seguido o mesmo protocolo experimental, sendo esta droga escolhida como controle positivo para efeito de comparação.





**Figura 6.** Protocolo experimental. Após 24 h de jejum os animais receberam TNBS via intracolônica. Os animais controle receberam 0,1 ml de salina 0,9 %. Vinte e quatro horas após a indução iniciaram-se os tratamentos.

### 3.4 *Escore Macroscópico*

Após o sacrifício, a porção final do cólon foi removida, longitudinalmente aberta e cuidadosamente limpa com solução salina 0.9%. A severidade do dano no cólon foi avaliada usando-se uma escala de dano macroscópico baseada na tabela descrita por Wallace (1989) para ratos, mas adaptado para camundongos por McCafferty (1999) com poucas adaptações para as nossas condições experimentais (Hara *et al.*, 2007) (tabela 1).

**Tabela 1.** Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS (Wallace et al., 1989; Mccafferty et al., 1999; Hara et al., 2007).

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

### 3.5 Análise Histológica

Em uma nova série de experimentos, 72 h após a administração de TNBS, a porção distal do cólon foi removida, lavada com solução salina estéril para a retirada das fezes, e então imediatamente fixada em solução de formaldeído 10%. Os tecidos foram emblocados em parafina, seccionados a uma espessura de 5  $\mu$ m, transferidos para lâminas de vidro e desparafinizados. Para análise histológica geral, as lâminas foram coradas com o uso de hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio.

### 3.6 Escore Microscópico

Após divisão do cólon em regiões distal, média e proximal, o tecido foi histologicamente analisado em microscópio, com aumento de 200 x. Para avaliar a severidade do dano, foram analisados três cortes histológicos de cada animal, sendo que cada grupo experimental possuía um número de três animais. Para esta análise foi usada uma escala de escore publicada por Neurath (1995) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Grade de escores para avaliação de dano microscópico na colite induzida por TNBS (Neurath et al., 1995).

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

### 3.7 Atividade das Enzimas MPO, EPO e NAG

A migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o tecido do cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo peroxidase (EPO) e *N*-acetilglucosaminidase (NAG), respectivamente. Para isso, os cólons foram removidos, homogeneizados em

tampão EDTA/NaCl (pH 4,7), e centrifugados a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi resuspenso em tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Foi adicionado então, NaCl 0,2 % gelado e após 30 segundos; NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado formado foi outra vez resuspenso em tampão 2 gelado (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB); pH 5,4), e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C; e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO, EPO e NAG. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3 mM. A reação enzimática para EPO foi a realizada com a adição de *O*-fenilenediamina 1,5 mM, Tris-HCl 0.075 mM e peróxido de hidrogênio 6,6 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Finalmente a atividade da NAG foi determinada pela adição de 25 µl de *p*-nitrofenil-2-acetamidaβ-*D*-glucopiranosida 2,25 mM e 100 µl de tampão citrato (pH 4,5). A absorvância foi medida por espectrofotometria em 690, 490 e 405 nm para MPO, EPO e NAG respectivamente, sendo que todos os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

### 3.8 Dosagem de Citocinas

Os níveis teciduais de IL-1β, IL-4, IL-10, IL-12, KC, TNF-α e IFN-γ foram avaliados como descrito anteriormente (Campos *et al.*, 2002) com poucas modificações. Resumidamente, os cólons foram removidos e homogeneizados com

PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0.1 mM, cloreto de benzometônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se *Kits* específicos de ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) de acordo com as recomendações do fabricante. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos por densidade ótica por miligrama de proteína.

### 3.9 Preparação de Extratos Citosólicos e Nucleares

Os cólons foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e então homogeneizados em tampão contendo HEPES 10 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 10 mM, fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) 1 mM, leupetina 1 mg/ml, pepstatina A 1 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, ortovanodato de sódio 1 mM, b-glicerofosfato 10 mM, fluoreto de sódio 50 mM e ditioneitol 0,5 mM. Após a centrifugação (14,000 x g/1 h), o sobrenadante contendo a fração citosólica foi coletado e acondicionado em freezer -70 °C para posterior análise. Para a extração da fração nuclear, o *pellet* foi resuspenso em tampão (HEPES 20 mM, pH 7,8, NaCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25 %, PMSF 0,5 mM, DTT 0,5 mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml e pepstatina A 1 µg/ml) por 30 min em gelo e centrifugado a 15,000 x g por 15 min. As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método Bradford (Bradford, 1976). Os extratos foram congelados em freezer -70 °C para posterior análise.

### 3.10 Western Blot

As amostras de proteínas (35 µg) foram adicionadas ao tampão contendo; Tris 200 mM, glicerol 10 %, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04 % e, em seguida, foram fervidas durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de acrilamida 10 % e eletrotransferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a transferência, a fim de evitar ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas primeiramente com leite desnatado diluído em TBS (*Tris buffered saline*) *overnight* a 4 °C e então foram lavadas com TBS e Tween-20 a 5 % (TBST), por três vezes durante 5 min cada. Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos para as proteínas de interesse: COX-2 (1:1000), iNOS (1:150), VEGF (1:2000) ou β-actina (1:000). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST por três vezes de 5 min cada e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:80.000 por 1 h. As membranas foram novamente lavadas com TBST e então incubadas com streptavidina por 30 min. A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunoreativas foram visualizadas utilizando-se *kit* de aumento de quimioluminescência e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

### 3.11 Drogas e Reagentes

O antagonista do receptor CXCR2, *N*-(2-hidróxi-4-nitrofenil)-*N*9-(2-bromofenil) Uréia (SB225002) foi sintetizado por Dr. Paulo César Leal (Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,

Brasil), como descrito anteriormente (White et al., 1998). Dexametasona, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinina, eosina, hematoxilina, tetrametilbenzidina (TMB), O-fenilenediamina (OPD), ortovanadato de sódio e ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (St. Louis, USA). Formaldeído e Tris-HCl foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O β-mercaptoetanol e azul de bromofenol foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido). Xilazina foi adquirida da Vetbrands (São Paulo, Brasil) e quetamina da Sespo (São Paulo, Brasil). Os kits de Elisa para KC, IFN-γ, TGFβ, TNF-α, IL-4, IL-12, IL-10 and IL-1β/IL-1F2 foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, USA). Os anticorpos primários COX-2, β-actina, VEGF (C-1) e iNOS foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Os anticorpos secundários Envision Plus, streptavidina e 3,3-diaminobenzidina foram adquiridas da Dako Cytomation (Carpinteria, USA).

### 3.12 Análise estatística

Todos os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média. Para análise estatística dos dados não paramétricos entre 2 grupos foi utilizado o teste *U* de *Mann-Whitney*. Para análise de dados não paramétricos entre mais de 2 grupos o teste estatístico utilizado foi *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*. Para dados paramétricos as diferenças estatísticas entre dois grupos o teste *t* não pareado foi utilizado. A análise estatística entre mais de 2 grupos foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls*. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software *Graphpad Prism 4* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

**RESULTADOS**

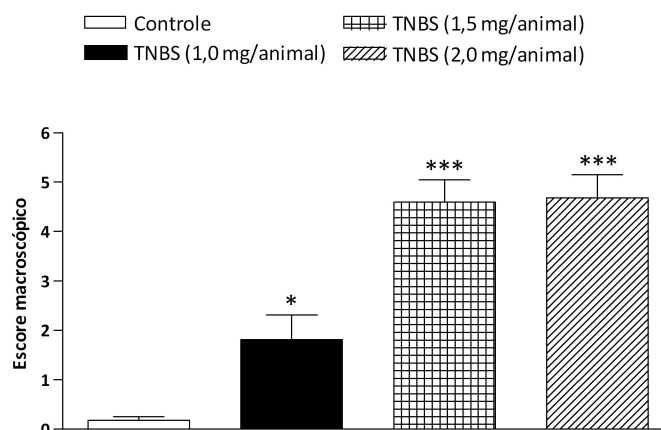
---



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Padronização do modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos da linhagem Balb/c

Inicialmente uma série de experimentos foi realizada como o intuito de padronizar uma dose efetiva e funcional de TNBS aplicada a camundongos da linhagem Balb/c. Como descrito anteriormente, o TNBS foi administrado via intracolônica após jejum de 24 h, nas doses de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/animal, em 35% de etanol. Setenta e duas horas após a indução da colite, os animais tiveram seus cólons removidos, em sua porção final (4 cm), e avaliados quanto ao dano macroscópico como descrito anteriormente (Hara *et al.*, 2007). A administração do TNBS na sua menor dose (1,0 mg/animal) causou um escore médio de  $1,9 \pm 0,4$  na resposta ao dano macroscópico observado, não representando um escore satisfatório para o estabelecimento do quadro de colite, que geralmente é considerado acima de 4 (Wallace *et al.*, 1989) (Figura 7). As doses de TNBS de 1,5 e 2,0 mg/animal apresentaram um escore médio de  $4,6 \pm 0,4$  e  $4,7 \pm 0,4$ , respectivamente sendo que não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 7). Na dose de 2,5 mg/animal foi registrado um índice de mortalidade dos animais de 100% em todos os experimentos realizados, inviabilizando a utilização desta dose. A partir desses resultados, a dose de TNBS escolhida para realização dos experimentos posteriores foi a de 1,5 mg/animal.

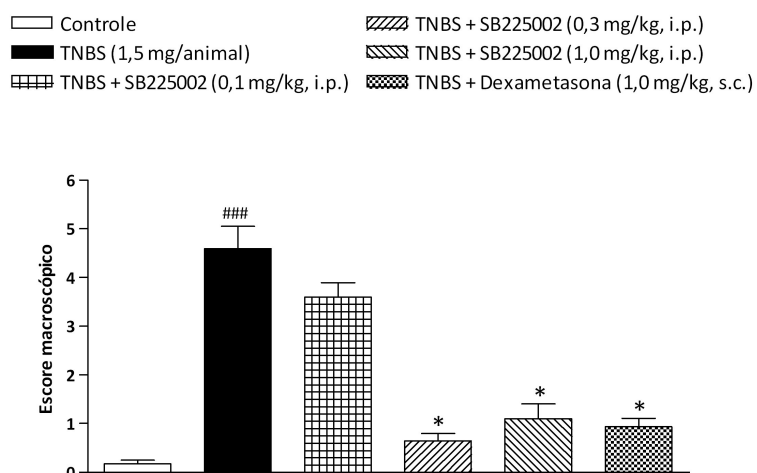


**Figura 7.** Escore do dano macroscópico induzido por diferentes doses de TNBS. Setenta de duas horas após a injeção de TNBS (1,0; 1,5 e 2,0 mg/animal, i.col.) os cólons foram removidos e avaliados quanto ao dano macroscópico. Cada coluna representa a média do dano macroscópico dos cólons de 8 - 12 animais por grupo e as barras verticais representam o desvio padrão da média. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  (teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*).

#### 4.2 Efeito do tratamento com SB225002 sobre o dano macroscópico

Com o objetivo de avaliar se o antagonista do receptor CXCR2, SB225002, exercia algum efeito curativo no dano tecidual causado pelo TNBS (1,5 mg/animal), o composto foi administrado nas doses de (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.). A dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo para efeito de comparação. O tratamento com o SB225002 foi capaz de reduzir o dano macroscópico de forma significativa nas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg. As porcentagens de inibição foram de  $89,3 \pm 3,4$  e  $79,1 \pm 7,0$  %, para as doses de 0,3 e 1,0 mg/kg, respectivamente. A menor dose de SB, no entanto, não foi capaz de reduzir de forma significativa o dano induzido pelo TNBS. O tratamento com dexametasona

também reduziu de forma significativa o dano macroscópico com porcentagem de inibição de  $82,7 \pm 1,0 \%$  (figura 8).

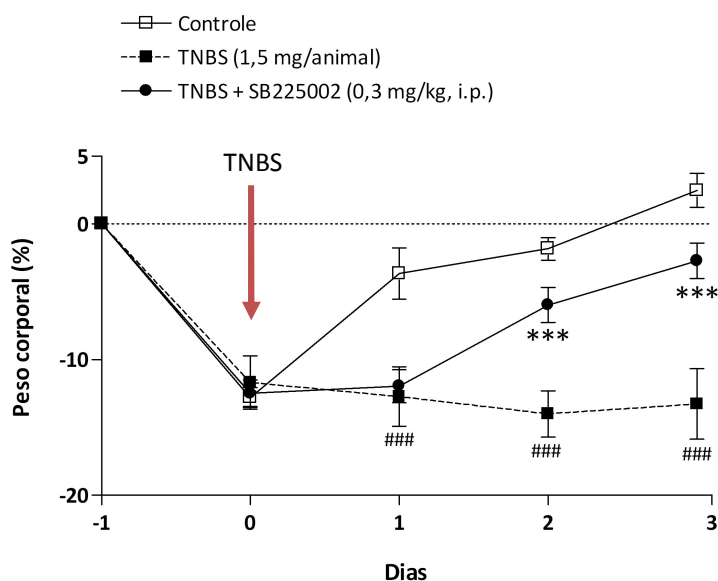


**Figura 8.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o dano macroscópico induzido pelo TNBS (1,5 mg/animal) em camundongos. Setenta e duas horas após a indução da colite os cólons foram removidos e avaliados quanto ao dano macroscópico. As colunas representam a média do escore macroscópico do cólon de 6 - 8 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo TNBS (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn).

#### 4.3 Efeito do SB225002 sobre o peso corporal e a mortalidade induzida pelo TNBS

Durante o período experimental os animais foram acompanhados com relação à mudança do peso corporal e o índice de sobrevivência. Como apresentado na figura 9, os animais foram colocados em jejum por 24 h (dia -1), o que levou a uma redução homogênea de peso em todos os grupos experimentais (dia 0). Neste dia, somente os animais dos grupos TNBS e TNBS + SB225002 tiveram a colite induzida. Dessa forma, 24 h após a administração do TNBS (dia 1), apenas esses

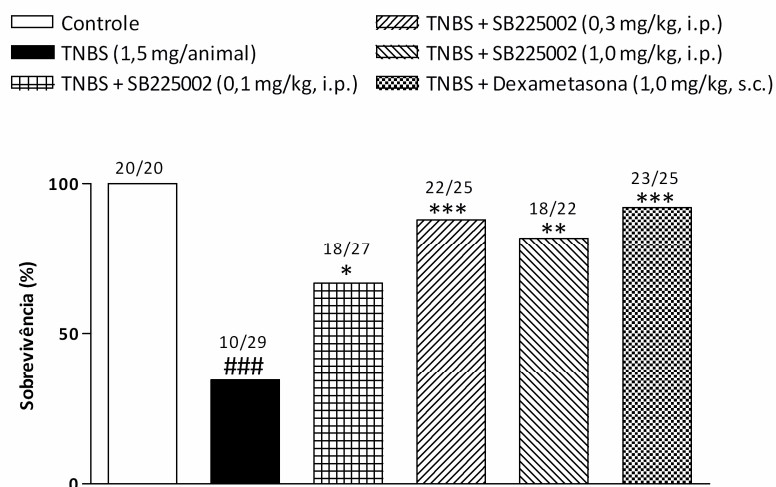
dois grupos não recuperaram o peso corporal, sugerindo que estes dois grupos estavam com colite, enquanto o grupo controle, o qual não recebeu TNBS, começou a recuperar o peso. Neste mesmo dia, após a pesagem dos animais, o SB225002 (0,3 mg/kg., i.p) foi administrado, sendo que no dia 2, ou seja 48 h após a indução da colite, este grupo começou a apresentar recuperação significativa do peso corporal, enquanto que o grupo administrado apenas com TNBS continuou a apresentar redução no peso corporal. No terceiro dia os animais do grupo controle apresentaram peso acima dos níveis basais, enquanto o grupo tratado com SB225002 mostrou uma recuperação de peso próxima a esses níveis, diferindo de forma significativa em comparação ao grupo TNBS, que por sua vez não apresentou recuperação significativa do peso corporal.



**Figura 9.** Efeito do tratamento com o antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, sobre o peso corporal, na colite induzida pelo TNBS. Após jejum (dia 0) os animais dos grupos TNBS e TNBS + SB225002 receberam TNBS (1,5 mg/animal), os quais não apresentaram recuperação do peso até o dia seguinte (dia 1). Neste dia os animais que receberam SB225002 apresentaram significativo ganho de peso em comparação ao grupo TNBS, o que ocorreu até o final do experimento. O grupo TNBS não apresentou recuperação do peso corporal comparado ao grupo controle quando avaliado até 72 h após a indução. Os resultados representam a média do peso corporal de 6 - 8 animais por grupo e as barras verticais os erros padrão das médias. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc Newman-Keuls*).

Vinte e quatro horas após a indução da colite por TNBS (1,5 mg/animal) o índice de mortalidade dos animais passou a ser observado. Como demonstrado na figura 10, ao longo dos dias 1, 2 e 3, após a indução da colite houve uma taxa de mortalidade de 65 % nos animais do grupo que recebeu apenas TNBS. O tratamento com SB225002 diminuiu a mortalidade dos animais de forma significativa, com taxa de mortalidade 44,4; 12,0 e 19,0 % para as doses de (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.),

respectivamente. O tratamento com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) também reduziu de maneira significativa a mortalidade dos animais para 8 %.

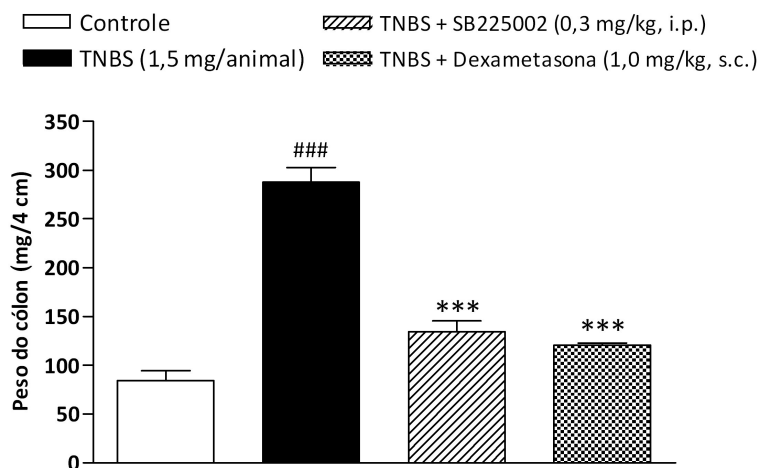


**Figura 10.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, ou da dexametasona, sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos. Vinte e quatro horas após a indução da colite os animais foram monitorados quanto ao índice de mortalidade até o final de todo o experimento. As colunas representam a porcentagem de sobrevivência em relação ao número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os números acima de cada barra representam a quantidade de animais mortos em relação ao número total de animais utilizados no experimento. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (Qui-quadrado).

#### 4.4 Efeito do SB225002 sobre o peso e comprimento do cólon, e peso do baço, no modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos

Três dias após a indução da colite por TNBS, os animais tiveram seus cólons removidos em sua porção final correspondendo a 4 cm. Os animais com colite apresentaram um aumento no peso do cólon de 3,4 vezes em comparação ao grupo controle. O tratamento com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter de

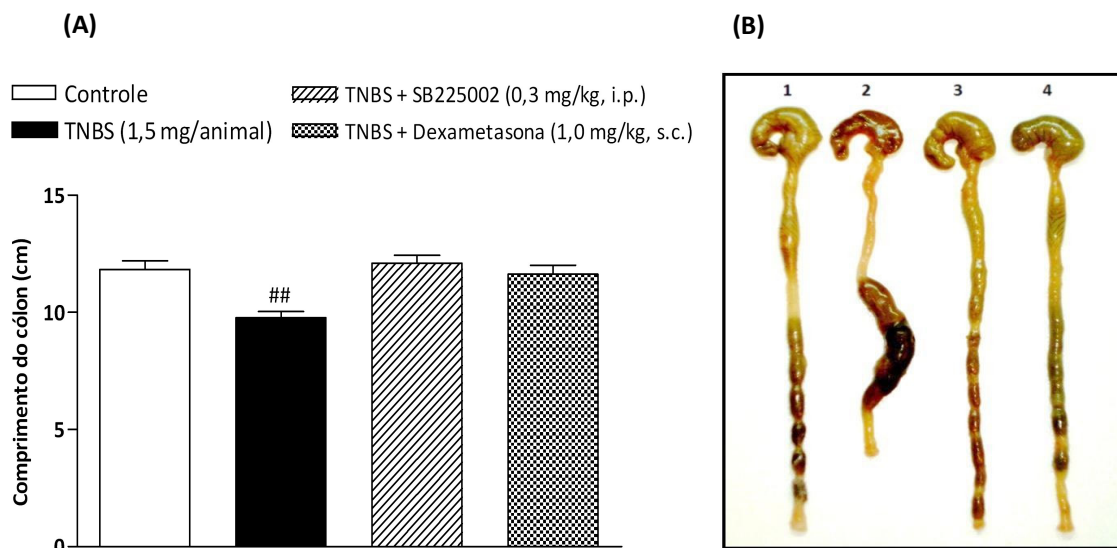
forma significativa esse aumento em  $75,2 \pm 5,4 \%$  (Figura 11). Os animais que receberam dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) apresentaram uma redução do índice de edema do cólon de  $82,0 \pm 1,0 \%$ .



**Figura 11.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento do peso do cólon de camundongos após a administração do TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite o cólons foram removidos em sua porção final (4 cm) e devidamente pesados. As colunas representam a média do peso dos cólons de 4 - 6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão das médias. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc Newman-Keuls*).

Para avaliar o efeito do SB225002 sobre a redução do comprimento do cólon induzida pelo TNBS, 72 h após a indução da colite, a porção intestinal que compreende desde o cecum até ao ânus foi retirada e medida. Como demonstrado na figura 12 (A e B) os animais que receberam apenas TNBS apresentaram uma redução no comprimento do cólon em cerca de 20,0 %, quando comparado ao grupo controle. Entretanto os animais que receberam TNBS + SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.)

ou TNBS + dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) não apresentaram redução significativa no comprimento do cólon.

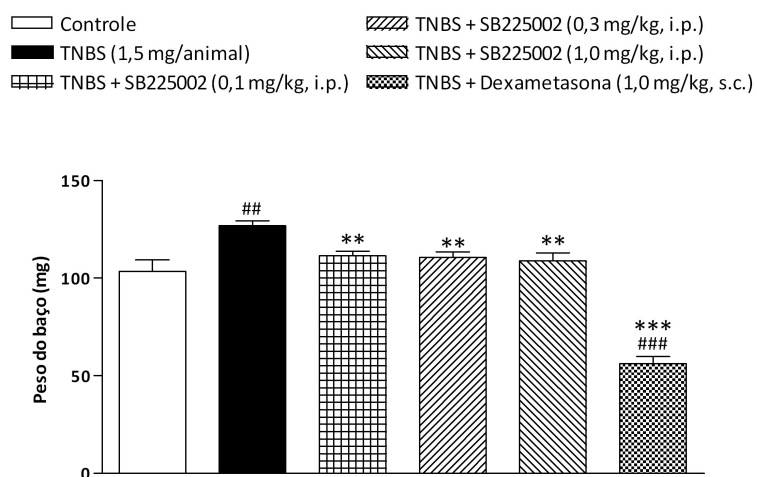


**Figura 12.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre encurtamento do cólon de camundongos após a administração do TNBS. Três dias após a indução da colite, os animais tiveram a porção intestinal que corresponde desde o cecum até ao ânus, removida e medida. **(A)** As colunas representam a média do comprimento dos cólons de 4 - 6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média. ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* Newman-Keuls). **(B)** Foto representativa de cólons dos grupos experimentais, (1) controle, (2) TNBS, (3) TNBS + SB225002 e (4) TNBS + dexametasona.

Outro parâmetro avaliado foi o aumento do peso do baço, o qual pode ser considerado como indicativo de inflamação sistêmica (Antonioli *et al.*, 2007), portanto este parâmetro também foi avaliado. Neste sentido, setenta e duas horas após a injeção de TNBS, os animais tiveram seus baços removidos e pesados. Os animais do grupo TNBS apresentaram aumento significativo no peso do baço em



cerca de 20 % em comparação ao grupo controle. Os animais que receberam SB225002 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.) não apresentaram nenhum aumento significativo no peso deste órgão (Figura 13). Entretanto, os animais tratados com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) mostraram uma diminuição do peso do baço abaixo dos níveis basais.

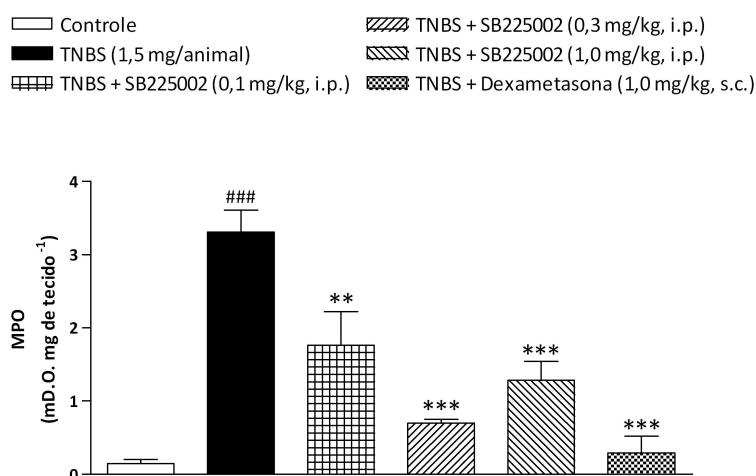


**Figura 13.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre aumento do peso do baço após a administração do TNBS. As colunas representam a média do peso do baço de 6 - 8 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média. ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

#### 4.5 Efeito do tratamento com SB225002 sobre a atividade das enzimas MPO, EPO e NAG

O infiltrado de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos foi quantificado indiretamente através da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), eosinófilo peroxidase (EPO) e *N*-acetilglucosaminidase (NAG) no cólon dos animais, respectivamente. A figura 14 mostra a atividade da enzima MPO. Os animais que

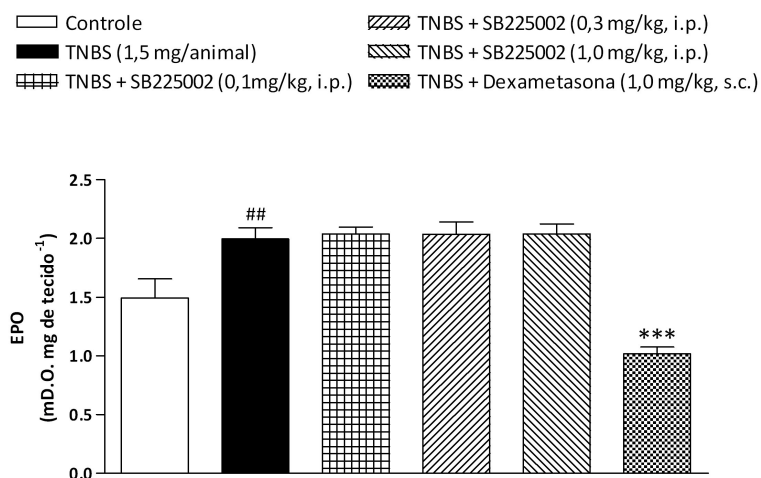
receberam TNBS apresentaram aumento da atividade desta enzima de 22,8 vezes em comparação ao grupo controle. O tratamento com o SB225002 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir de forma significativa a atividade da MPO em  $48,7 \pm 14,0$ ,  $82,5 \pm 1,6$  e  $63,8 \pm 8,0$  %, respectivamente quando comparado ao grupo que recebeu apenas TNBS. A administração sistêmica de dexametasona também reduziu significativamente a atividade dessa enzima significativamente em  $93,6 \pm 6,3$  %.



**Figura 14.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon de animais, após administração do TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e analisados quanto à atividade desta enzima. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$ ; comparado ao grupo controle; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc Newman-Keuls*).

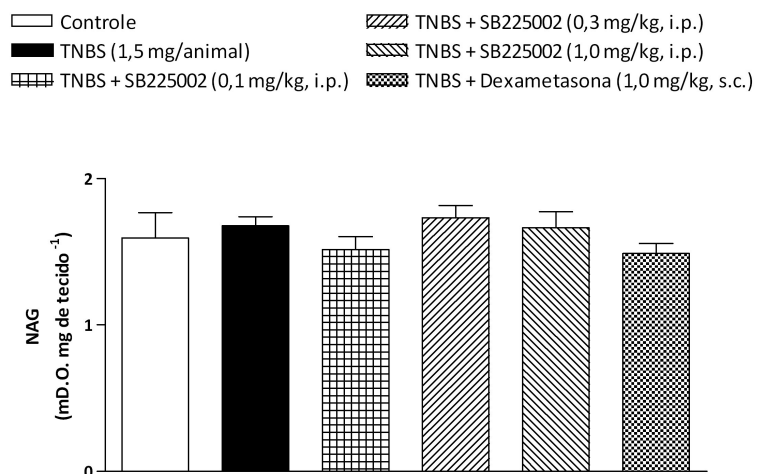
A figura 15 demonstra que a atividade da EPO aumentou de maneira significativa em 30 % no grupo que recebeu apenas TNBS quando comparado ao grupo controle. O tratamento com SB225002 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/kg, i.p.), contudo não foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de EPO no cólon dos

animais. Entretanto, os animais que receberam dexametasona apresentaram uma redução desta enzima abaixo dos níveis basais.



**Figura 15.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento da atividade da eosinófilo peroxidase (EPO) induzido pelo TNBS. Após 72 h da indução da colite, os animais tiveram seus cólons removidos e analisados quanto à atividade desta enzima. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ##  $p < 0,01$ ; comparado ao grupo controle; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* Newman-Keuls).

Finalmente avaliamos a participação dos macrófagos foi avaliada através da medida dos níveis de NAG, enzima presente em macrófagos ativados. Entretanto, 72 h após a indução de colite, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 16).



**Figura 16.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre a atividade da *N*-acetilglucosaminidase (NAG). Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e analisados quanto à atividade desta enzima. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* Newman-Keuls).

#### 4.6 Efeito do tratamento com o SB225002 sobre o dano microscópico

De acordo com a figura 17 (A-D), as imagens histológicas revelaram que, 72 horas após a indução de colite por TNBS, os cólons dos animais apresentaram grande infiltração de polimorfonucleares no interior da lâmina própria da mucosa do cólon. Além disso, foi verificado sinais de espessamento da parede da mucosa, destruição das criptas e perda de células goblet, resultando em dano tecidual. A avaliação do escore microscópico revelou um aumento do dano tecidual de 23,0 vezes em relação ao grupo controle (Figura 17 E). O tratamento sistêmico com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) causou diminuição da resposta inflamatória, reduzindo a infiltração de polimorfonucleares, assim como o espessamento da parede intestinal, além de manter a integridade das criptas, conferindo a proteção da

mucosa, reduzindo o dano microscópico em  $89,2 \pm 6,7 \%$ . Nos cólons dos animais tratados com dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.), pouquíssimo infiltrado celular e nenhum dano tecidual aparente pôde ser observado. Os cólons destes animais apresentaram uma redução do escore microscópico em  $93,8 \pm 3,0 \%$  (Figura 17 E).

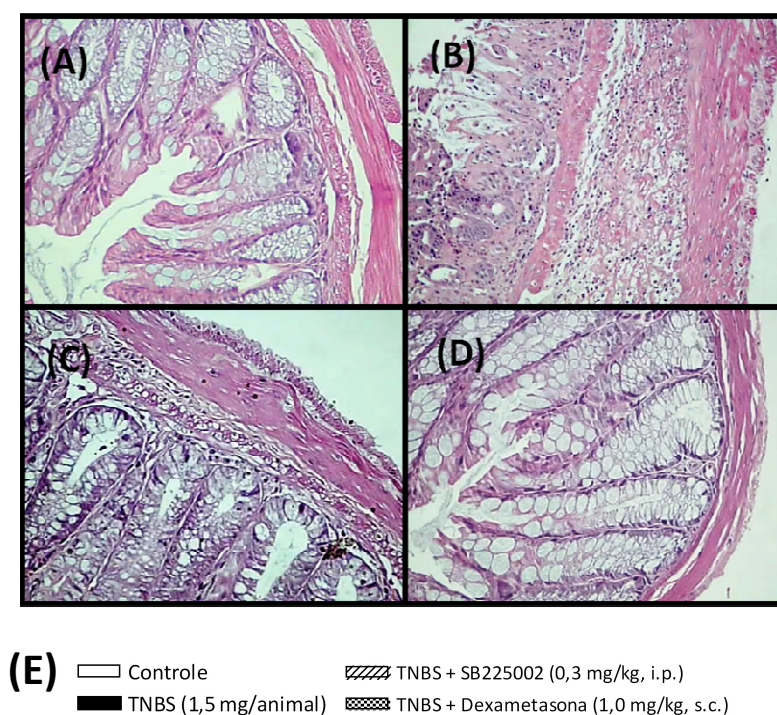


Figura 17. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o dano tecidual microscópico induzido pelo TNBS. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido de cólons fixados em H & E (aumento de 200 X) dos grupos: (A) controle, (B) TNBS, (C) TNBS + SB225002 e (D) TNBS + dexametasona. (E) As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).

#### 4.7 Efeito do tratamento com SB225002 sobre os níveis de IL-1 $\beta$ , KC, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ em camundongos com colite induzida pelo TNBS

Os níveis teciduais de IL-1 $\beta$ , KC, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$  foram quantificados nos cólons de todos os grupos experimentais. Três dias após a injeção de TNBS houve um aumento marcante dos níveis de IL-1 $\beta$  (16,3 vezes) em comparação aos animais controle. Os cólons dos animais que receberam SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) apresentaram o conteúdo dessa citocina reduzido em  $80,5 \pm 7,8$  e  $99,0 \pm 5,4$  %, respectivamente (Figura 18). Foi observado ainda aumento de 3,7 vezes nos níveis de KC nos cólons dos animais administrados com TNBS, quando comparado aos animais controle. Os tratamentos com o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) foram capazes de reduzir os níveis teciduais dessa citocina em  $76,8 \pm 9,0$  e  $78,2 \pm 5,2$  %, respectivamente (Figura 19).

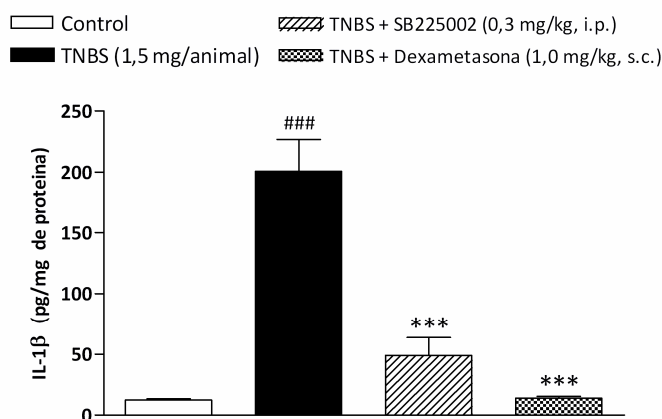


Figura 18. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento dos níveis teciduais de IL-1 $\beta$  induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

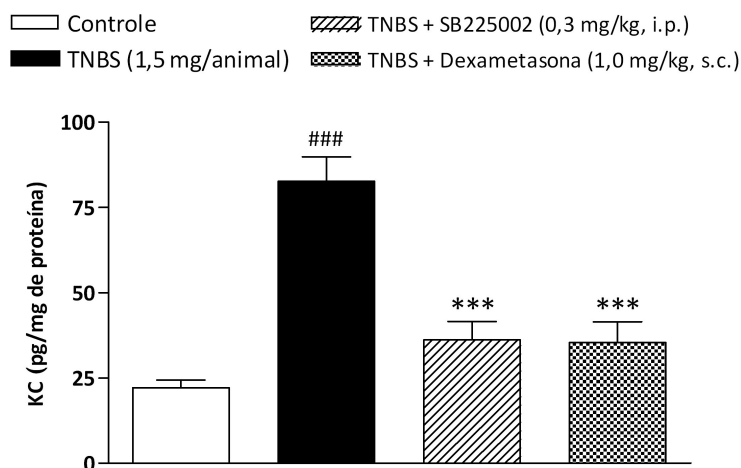


Figura 19. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento dos níveis de KC induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo salina; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

A administração do TNBS reduziu os níveis teciduais das citocinas IL-4 e IL-10 em  $51,4 \pm 8,9$  e  $49,9 \pm 5,6$  %, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figuras 20 e 21). Os animais com colite e tratados com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.), apresentaram aumento dos níveis de IL-4 e IL-10 em cerca de 2,6 e 2,9 vezes, respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas TNBS, atingindo valores acima dos níveis basais. O tratamento com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) também foi capaz de recuperar os níveis teciduais de ambas as citocinas atingindo níveis acima dos níveis basais (Figuras 20 e 21).

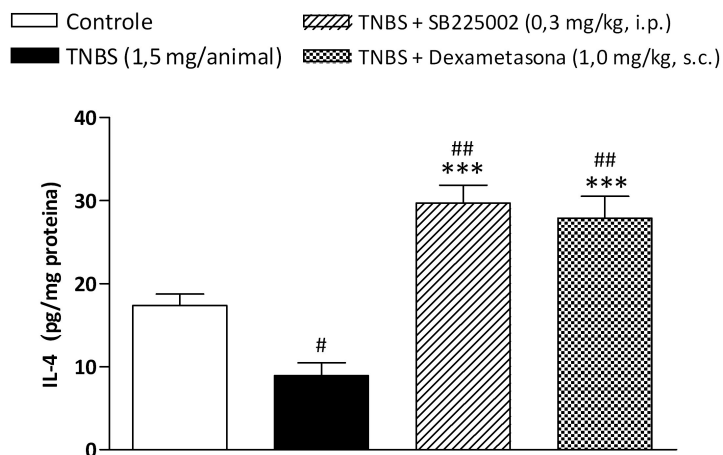
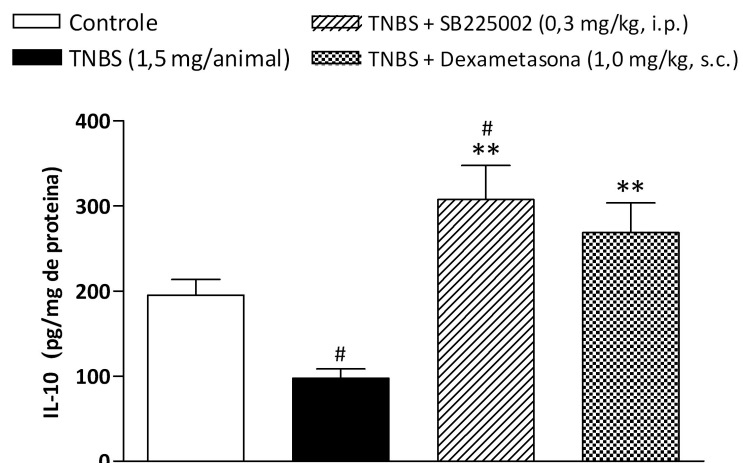


Figura 20. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-4 induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).





**Figura 21.** Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-10 induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

Não houve diferença significativa nos níveis de IL-12 entre os grupos experimentais 72 h após a indução de colite pelo TNBS (Figuras 22). Entretanto os níveis teciduais de IFN- $\gamma$  apresentaram aumento significativo nos grupos tratados com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) e com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) em comparação ao grupo controle e ao grupo TNBS (Figura 23).

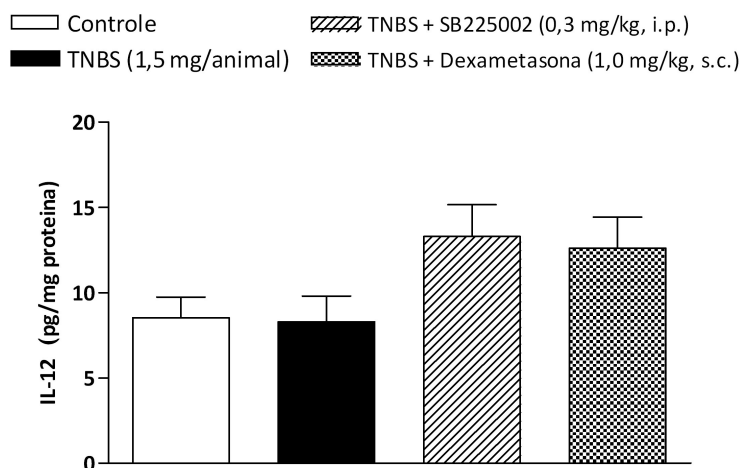


Figura 22. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IL-12 induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

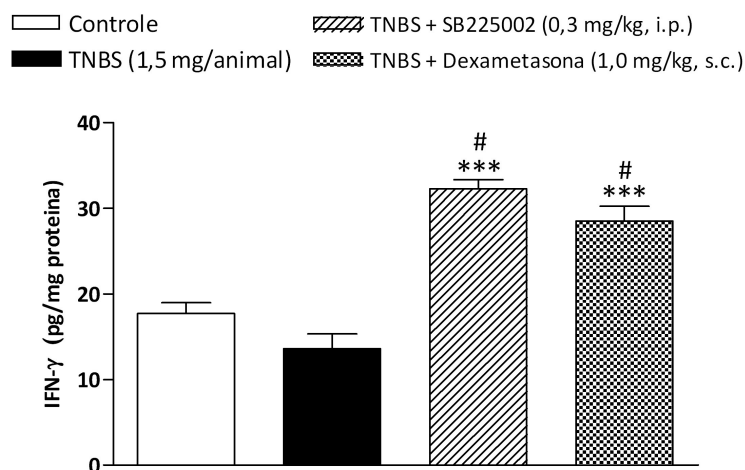


Figura 23. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 ou da dexametasona, sobre a redução dos níveis de IFN-γ induzido pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto aos níveis dessa citocina. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

Além disso, a citocina TNF- $\alpha$  também foi dosada nas mesmas condições experimentais, entretanto não foi detectada em quantidades significativas no tecido do cólon de nenhum animal, independente do grupo experimental (resultados não mostrados).

#### *4.8 Efeito do SB225002 na expressão da COX-2, iNOS e VEGF no cólon de camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS*

Com o objetivo de avaliar a possível participação da enzima COX-2 na resposta inflamatória induzida pelo TNBS em cólons de camundongos, ensaios de *Western Blot* foram realizados. Os resultados da figura 24 demonstram que 72 h após a indução de colite, ocorreu um aumento significativo na expressão da enzima COX-2 (2,3 vezes) em relação ao grupo controle. Os animais que receberam SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) apresentaram uma redução da expressão dessa enzima ( $51,1 \pm 2,2$  % e  $55,4 \pm 1,8$  %, respectivamente). A expressão da enzima iNOs também foi avaliada na colite experimental induzida pelo TNBS. Os animais que receberam apenas TNBS apresentaram aumento na expressão dessa enzima de (1,7 vezes), em comparação ao grupo controle. Os tratamentos com o SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou com a dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) foram capazes de reduzir a expressão da iNOS com inibições em  $87,5 \pm 6,1$  e  $90,0 \pm 3,6$  %, respectivamente, como apresentado na figura 25.

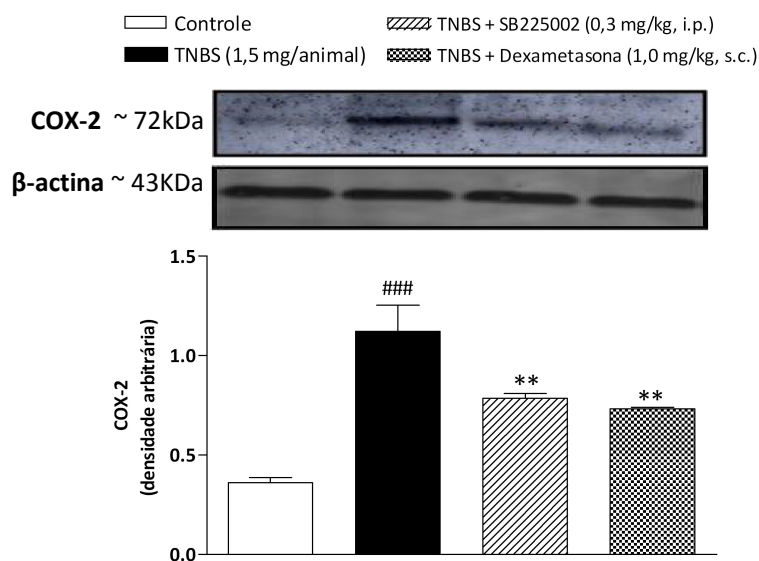


Figura 24. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento da expressão da enzima COX-2 na colite induzida pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto à expressão desta proteína. As colunas representam a média de 3 - 4 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

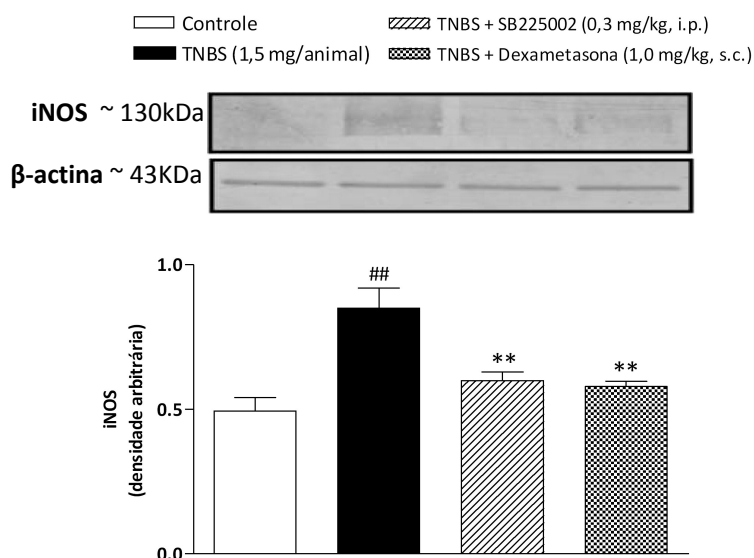


Figura 25. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre a indução da expressão da enzima iNOS na colite induzida pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto à expressão desta proteína. As colunas representam a média de 3 - 4 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

A expressão da proteína VEGF também foi estudada, a fim de verificar a participação da angiogênese 72 h após a indução da colite. Como apresentado na figura 26, ocorreu um aumento significativo na expressão do VEGF (7,5 vezes) nos animais que receberam apenas TNBS. Os animais que foram tratados com SB225002 (0,3 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) tiveram uma redução significativa na expressão desta proteína ( $96,4 \pm 1,4$  e  $79,8 \pm 1,9$  %, respectivamente).

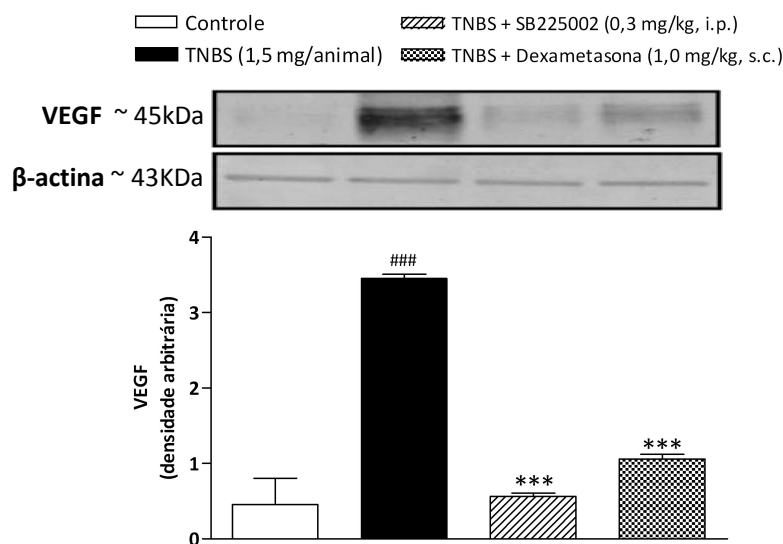


Figura 26. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre a indução da expressão da proteína VEGF na colite induzida pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os animais tiveram seus cólons removidos e avaliados quanto à expressão desta proteína. As colunas representam a média de 3 - 4 animais e as barras verticais o desvio padrão da média. ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls).

## **DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

Tendo em vista o importante papel exercido pela migração de neutrófilos na patogenicidade da UC, o presente estudo procurou explorar o possível potencial terapêutico do antagonista seletivo e não-peptídico do receptor CXCR2, o SB225002, sobre a inflamação intestinal induzida por TNBS em camundongos. Nossos resultados demonstraram que o tratamento sistêmico com o SB225002 foi capaz de reduzir significativamente os parâmetros inflamatórios macro e microscópicos, bem como a migração celular, os níveis de alguns mediadores pró-inflamatórios e a expressão de proteínas envolvidas no modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.

O modelo murino de inflamação intestinal adotado no presente estudo foi descrito em 1995, por Neurath e colaboradores e utiliza o reagente hapteno TNBS em solução de etanol. O modelo de colite induzida pelo TNBS vem sendo amplamente utilizado em vários estudos, devido a sua similaridade com as IBD em humanos, e tem contribuído para a investigação dos mecanismos envolvidos na UC e também para a descoberta de novas alternativas terapêuticas, principalmente, para a fase aguda da UC (Morris *et al.*, 1989; Elson *et al.*, 1995; Elson *et al.*, 2005; Menozzi *et al.*, 2006).

Neste modelo experimental, a inflamação intestinal é geralmente mais acentuada nos primeiros três a cinco dias após a administração do TNBS, em função disso, a maioria dos pesquisadores, inclusive os do nosso grupo, avalia os diferentes parâmetros dentro deste período (Wirtz *et al.*, 2007). Dados recentes indicam que, a suscetibilidade para o desenvolvimento da colite por TNBS varia entre as



diferentes linhagens de camundongos, por exemplo, camundongos das linhagens SJL e Balb/c são mais suscetíveis, enquanto que C57BL/6 são mais resistentes à indução da colite pelo TNBS (Kawada *et al.*, 2007).

O TNBS penetra na parede intestinal causando ulcerações e necrose no tecido do cólon, que estão associadas à perda das junções entre as células epiteliais e ao aumento do infiltrado celular na lâmina própria, causando lesão das criptas intestinais (Torres *et al.*, 1999; Menozzi *et al.*, 2006). Essas alterações teciduais desencadeiam outras complicações sistêmicas, como a diminuição da absorção de nutrientes, perda de peso, diarreia e prolapso retal (Neurath *et al.*, 1995; Kawada *et al.*, 2007). De acordo com essas alterações previamente descritas e corroborando com os resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, o presente estudo demonstrou que a indução de colite, através da utilização do TNBS, foi capaz de promover aumento do dano tecidual, impedir o ganho de peso, assim como elevar a mortalidade dos animais, (Sugimoto *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2007; Zhao, J. *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram também que no primeiro dia após o jejum, os animais do grupo controle passaram a recuperar o peso, enquanto que os animais que receberam apenas TNBS mantiveram o peso reduzido. Ademais, no nosso laboratório observamos, em linhagens menos susceptíveis (*Swiss* e *Hannover*), que alguns animais que recebem TNBS e ganham peso no primeiro dia após a indução da colite, não apresentam um escore compatível ao final de 72 h. Desta forma, essas observações são importantes, pois sugerem que os animais que ganham peso após a injeção de TNBS, na realidade não apresentam quadro de colite.

Nossos resultados demonstraram ainda um aumento significativo no peso do cólon, assim como redução do seu comprimento nos animais que receberam apenas

a injeção intrarectal de TNBS, corroborando assim com resultados descritos em outros trabalhos (Daniel *et al.*, 2006; Whittle *et al.*, 2006; Zhao, J. *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2008). Além disso, os animais com colite apresentaram também aumento no peso do baço, dado este, indicativo de inflamação sistêmica, observada em vários modelos de colite experimental (Ukil *et al.*, 2003; Antonioli *et al.*, 2007; Ramakers *et al.*, 2007). Dessa forma, nossos dados revelaram que, em nossas condições experimentais, o TNBS foi eficaz na indução da colite, mostrando-se, portanto, reprodutível e concordante com os dados da literatura.

Como observado em diversos trabalhos descritos na literatura, assim como no presente estudo, durante o desenvolvimento do processo inflamatório intestinal ocorreu massiva infiltração de granulócitos, sendo a grande maioria correspondente aos neutrófilos. Inúmeras moléculas participam da migração dessas células até o tecido inflamado, entre elas as quimiocinas, como a KC (análogo murino da CXCL8) e seus receptores CXCR1 e CXCR2 (Ajuebor *et al.*, 2004).

Em biópsias de reto de pacientes com UC ou CD foram encontrados níveis elevados da quimiocina CXCL8 (Mahida *et al.*, 1992; Izzo *et al.*, 1993; Raab *et al.*, 1993). Song e colaboradores (1999), demonstraram que a infiltração de neutrófilos no tecido do cólon, está relacionada com o aumento da expressão de KC/CXCL8 em camundongos com enterocolite, evidenciando assim, o papel crucial desta quimiocina no desenvolvimento da colite experimental em camundongos. Adicionalmente, no modelo de colite induzido por TNBS em ratos *Wistar*, foi verificado que a expressão do receptor CXCR2, e de seu principal ligante, KC, encontra-se aumentada no cólon de animais a partir de 8h após a indução da colite, permanecendo até 7 dias (Ajuebor *et al.*, 2004). O presente estudo corrobora tais dados, demonstrando que a produção de KC está significativamente

aumentada nos animais que receberam TNBS via intrarectal. Ademais, recentemente Buanne e colaboradores (2007) demonstraram que no modelo de colite experimental induzida pelo DSS, camundongos com deleção gênica para o receptor CXCR2 apresentavam a atividade da MPO significativamente diminuída, sugerindo que o recrutamento de neutrófilos para a mucosa intestinal parece estar associado principalmente à ativação deste receptor.

A mobilização rápida e adequada dos neutrófilos é um dos eventos essenciais para a proteção do organismo, entretanto, os vários tipos de metabólitos tóxicos que são liberados por esses leucócitos podem também causar dano ao próprio tecido do hospedeiro (Smith, 1994; Xiao *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2007). No presente trabalho, observamos aumento expressivo da atividade da enzima MPO no tecido do cólon dos camundongos, três dias após a indução da colite. A MPO está presente nos grânulos do citoplasma dos neutrófilos ativados, onde é responsável pela destruição dos microorganismos que são fagocitados por essas células, clivando estes agentes externos em pequenos peptídeos (Nauseef, 2007). Esta enzima é fundamental na regulação da explosão respiratória nos neutrófilos, entretanto pode ser altamente tóxica aos tecidos (Edwards e Swan, 1986). Adicionalmente, a MPO pode ser liberada para o exterior da célula, podendo dessa forma aumentar, junto às espécies reativas de oxigênio, a destruição tecidual (Klebanoff, 2005). De fato, nossos resultados demonstram uma correlação direta entre os níveis elevados de MPO e lesão tecidual.

A formação de abscessos na mucosa epitelial é uma característica da lesão causada pela transmigração de neutrófilos através do espaço paracelular. Este processo permite a separação dos enterócitos, causando a abertura de espaços entre as estreitas junções que unem as células epiteliais, fazendo com que os

neutrófilos se acumulem no interior das criptas (Kucharzik *et al.*, 2001; Williams e Parkos, 2007). Uma vez ativados, os neutrófilos causam rápido consumo de oxigênio por meio de uma oxidase de membrana (NADPH oxidase), que reduz o oxigênio para ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Bruno *et al.*, 2004). Dessa forma, os neutrófilos presentes no tecido do cólon inflamado induzem a formação de  $O_2^-$  e a liberação de enzimas presentes em seus grânulos citoplasmáticos. Estes agentes são os principais responsáveis pela lesão no tecido inflamado e contribuem de uma forma geral para o aumento da resposta inflamatória (Weiss, 1989; Bruno *et al.*, 2004). Deste modo, os neutrófilos são considerados uma das principais células responsáveis pelas lesões e disfunções associadas às IBD (Kucharzik *et al.*, 2001; Williams e Parkos, 2007). Estudos realizados por Natsui e colaboradores (1997) demonstraram, que no modelo de colite aguda induzida pelo DSS, que o anticorpo monoclonal (RP-3), que provoca a depleção de neutrófilos, é capaz de reduzir o dano tecidual no cólon de ratos. Outro estudo revelou que o bloqueio da adesão dos neutrófilos, por meio dos anticorpos para a integrina CD11b/CD18, reduz o infiltrado celular e o tamanho das ulcerações no modelo de colite aguda induzida pelo TNBS (Palmen *et al.*, 1995).

Os estudos de Mazzucchelli e colaboradores (1994), realizados em cólons de pacientes portadores de UC, demonstraram que a expressão da quimiocina CXCL8, envolvida na migração dos neutrófilos, está intimamente relacionada com a severidade da inflamação. Desta forma, outra estratégia para a redução da migração de neutrófilos e conseqüentemente do dano tecidual, seria a depleção e/ou inibição dos receptores desta quimiocina. De fato, Buanne e colaboradores (2007) demonstraram recentemente que camundongos com deleção gênica para o receptor CXCR2 apresentavam drástica redução dos parâmetros histopatológicos avaliados no modelo de colite experimental induzida pelo DSS. Corroborando com

esses resultados, o presente estudo demonstrou que no modelo de colite induzida por TNBS em camundongos, o tratamento com o antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002, iniciado 24 h após a indução da colite, reduziu de forma significativa a atividade da MPO, bem como o dano tecidual macroscópico e microscópico no cólon dos animais.

No entanto, outros estudos revelaram papel controverso exercido pelos neutrófilos em relação ao dano tecidual observado, em diferentes modelos experimentais de colite (Yamada *et al.*, 1991; Buell e Berin, 1994; Kuhl *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a inibição da infiltração de neutrófilos, através do bloqueio de moléculas de adesão ou da depleção de neutrófilos, agravou a colite induzida pelo TNBS em ratos (Kuhl *et al.*, 2007). De fato, os neutrófilos, assim como outras células do sistema imune, exercem papel na defesa do organismo, principalmente contra infecções de origem bacteriana, e devido a isso, a depleção dessas células pode agravar determinados tipos de inflamação quando ocorre supressão de sua resposta (Williams e Parkos, 2007). Entretanto, como citado anteriormente, a resposta exacerbada desses leucócitos ocasiona eminente dano tecidual, através da liberação de agentes tóxicos. De acordo com esses dados, a atenuação da atividade dos neutrófilos parece ser interessante. Inúmeros estudos têm demonstrado a importância do bloqueio da migração de neutrófilos, pela utilização de antagonistas para os receptores CXCR1/2, em diferentes modelos de inflamação. Por exemplo, Barsante e colaboradores (2007), demonstraram diminuição marcante da atividade da MPO e do dano tecidual em ratos com artrite experimental, através do uso do antagonista DF 2162, para os receptores CXCR1/2. Outro antagonista do receptor CXCR2, o antileuquinato, também reduziu de forma significativa a atividade da MPO e o dano tecidual no modelo de pancreatite

induzida por ceruleína em ratos (Bhatia e Hegde, 2007). Além disso, Zhao e colaboradores (2007) demonstraram que o antagonista humanizado para os receptores CXCR1/2, bG31P, mostrou-se eficaz em causar redução da atividade da MPO e do dano tecidual no modelo de endotoxemia pulmonar aguda em cobaias.

Esses resultados, em conjunto com os descritos no presente estudo, sugerem que a inibição da ativação do receptor CXCR2 pelos seus ligantes, como o CXCL8/KC, é capaz de reduzir a migração de neutrófilos para o tecido inflamado, diminuindo conseqüentemente a liberação de substâncias pró-inflamatórias e redução da lesão tecidual. Dessa forma, a diminuição do dano tecidual observada em nossos resultados, pode ser pelo menos em parte, mediada pela redução do número de neutrófilos presentes no tecido do cólon. Além disso, a redução dessa migração pode também ter colaborado para a diminuição da resposta inflamatória, contribuindo assim para a recuperação da integridade do tecido inflamado, para o ganho de peso corpóreo e a redução da mortalidade dos animais.

Ainda com o objetivo de avaliar o efeito do SB225002 sobre a migração celular para o cólon, foram avaliadas a participação dos eosinófilos e macrófagos, através da quantificação da atividade das enzimas EPO e NAG, respectivamente. Como citado anteriormente, os eosinófilos são leucócitos multifuncionais com capacidade de iniciar ou potencializar a resposta inflamatória, através da liberação de uma variedade de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Gleich *et al.*, 1993; Rothenberg, 1998; Rothenberg *et al.*, 2001). Essas células podem produzir disfunções gastrointestinais através da ação de proteínas presentes em seus grânulos citoplasmáticos, como por exemplo, a eosinófilo peroxidase (EPO). Alguns estudos clínicos têm apontado correlação positiva entre o número de eosinófilos, através da atividade da EPO, e a severidade da UC em biópsias de tecido de

pacientes (Carlson *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 1999; Jeziorska *et al.*, 2001; Sangfelt *et al.*, 2001). Essa enzima possui 70 % de homologia com a MPO (O'brien, 2000), e também desempenha papel fundamental na lise de microorganismos patogênicos, entretanto, sua liberação em massa pode contribuir para a lesão de tecidos subjacentes ao foco inflamatório (McCormick *et al.*, 1994).

Nossos resultados demonstraram que houve aumento significativo na atividade da EPO, três dias após a indução da colite, no cólon dos animais que receberam apenas TNBS. Além disso, eles demonstraram ainda que o tratamento dos animais com diferentes doses do antagonista CXCR2, o SB225002, não foi capaz de reduzir a atividade desta enzima no tecido colônico. Em concordância com esses resultados, Petering e colaboradores, (1999), demonstraram que a CXCL8, mesmo em altas concentrações, não foi capaz de induzir quimiotaxia e nem aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular em eosinófilos humanos, mas apenas em neutrófilos e linfócitos. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que os receptores CXCR1/2 são expressos em neutrófilos e linfócitos e não em eosinófilos. Diante do exposto, o antagonista SB225002, apresentou alta seletividade para os receptores da família CXC, não apresentando ação sobre os receptores presentes na membrana dos eosinófilos, como o CCR3. Dessa forma, como já descrito, esse antagonista parece estar agindo seletivamente sobre a migração de neutrófilos e não em eosinófilos presentes na mucosa intestinal de camundongos com colite experimental.

A importância dos eosinófilos em modelos de colite experimental já foi descrita em diversos trabalhos (Forbes *et al.*, 2004; Al-Haddad e Riddell, 2005; Eijkelkamp *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2007). No entanto, de acordo com nossos resultados, os neutrófilos parecem ter maior participação no dano tecidual verificado no cólon dos animais tratados com TNBS. Como dito anteriormente, os

neutrófilos correspondem a cerca de 60 % de todos os leucócitos circulantes e formam a primeira linha de defesa celular do organismo em uma reação inflamatória (Smith, 1994). Diante desse dado, e de acordo com nossos resultados, os neutrófilos parecem apresentar maior relevância que os eosinófilos no dano tecidual observado no modelo de colite experimental utilizado nesse estudo.

Tem sido descrito que os macrófagos estão envolvidos na patogenicidade das IBD, principalmente por produzirem citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e TNF- $\alpha$  e também a quimiocina atraente de neutrófilos, CXCL8/KC (Rogler e Andus, 1998; Kanai *et al.*, 2001; Autschbach *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2003). Kanai e colaboradores (2001) demonstraram que há um aumento do número de macrófagos ativados no cólon de animais com colite induzida pelo TNBS e que a depleção destas células reduz a inflamação intestinal. Essas células também podem gerar metabólitos reativos de oxigênio e de nitrogênio, além de proteases que degradam a matriz extracelular causando dano tecidual (Mahida, 2000). Entretanto, os macrófagos podem apresentar diferentes fenótipos funcionais, podendo, em alguns casos, produzir fatores imunossupressores e atuar no reparo do tecido lesado (Garside, 1999; Jurjus *et al.*, 2004). No modelo de colite induzida por DSS, Qualls e colaboradores (2006) demonstraram que a depleção de macrófagos aumenta a lesão tecidual e o conteúdo de neutrófilos no cólon dos camundongos.

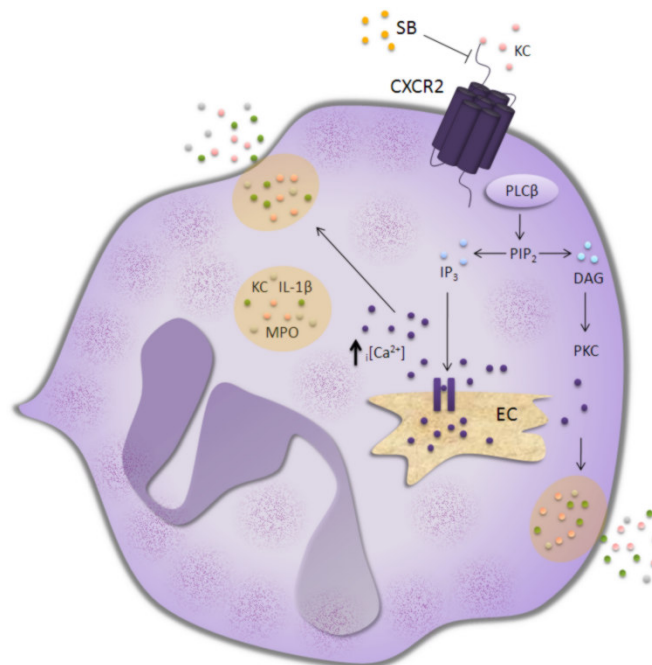
Apesar da aparente contradição desses resultados, tanto Kanai quanto Qualls demonstraram que o número elevado de macrófagos só é detectado nas fases mais tardias da colite experimental, o que corresponde ao período de sete a quatorze dias após a indução da colite (Kanai *et al.*, 2001; Qualls *et al.*, 2006), sugerindo que o período inicial do processo de inflamação intestinal não parece depender da migração de macrófagos. Nossos resultados corroboram tal hipótese, pois não



observamos nenhuma diferença significativa no conteúdo de NAG entre os grupos experimentais, indicando novamente que no nosso modelo, 72 horas após a indução da colite, não há migração de macrófagos. Entretanto, no presente estudo verificamos um nível basal da atividade da NAG no cólon dos animais em todos os grupos experimentais, o que provavelmente corresponde à população de macrófagos residentes. Essas células participam da fagocitose de detritos de leucócitos emigrados e contribuem, em conjunto com células epiteliais para a liberação de fatores quimioatraentes para neutrófilos como a CXCL8/KC (Araki *et al.*, 2005; Qualls *et al.*, 2006).

A IL-1B é um importante e potente mediador inflamatório que atua ativando diferentes células através de sua ligação ao seu receptor específico (IL-1R). Esta citocina induz a síntese e a secreção de quimiocinas e outras citocinas, promovendo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Lin *et al.*, 2002). Estudos demonstraram que o bloqueio do receptor IL-1R, diminui a severidade da inflamação em modelos experimentais de colite (Bachmann *et al.*, 2006). Além disso, muitos trabalhos têm verificado que a expressão da IL-1B está aumentada em pacientes com IBD (Mahida *et al.*, 1989; Ligumsky *et al.*, 1990; Isaacs *et al.*, 1992; Youngman *et al.*, 1993; Casini-Raggi *et al.*, 1995; Radford-Smith e Jewell, 1996; Andus *et al.*, 1997; Jurjus *et al.*, 2004). Dessa forma, a IL-1B contribui para o agravamento do quadro de UC, tanto em modelos animais como em estudos clínicos. Nossos resultados estão de acordo com essas evidências, demonstrando que animais com colite induzida pelo TNBS apresentam aumento da produção de IL-1B e sugerem que a redução da lesão tecidual verificada nos animais tratados com SB225002 pode ser, pelo menos em parte, resultante da diminuição dos níveis dessa citocina pró-inflamatória.

Tanto a IL-1 $\beta$  quanto o KC podem ser produzidos por neutrófilos, células epiteliais e macrófagos ativados. Como demonstrado no presente estudo, essas citocinas estão aumentadas no cólon de camundongos administrados com TNBS. No entanto, nos animais que receberam TNBS e foram tratados com SB225002 há uma diminuição significativa dos níveis dessas citocinas, o que pode estar correlacionado com a redução do influxo de polimorfonucleares para o tecido do cólon, não só em função do menor número de neutrófilos produtores de IL-1 $\beta$  e KC, mas também pela melhora do quadro inflamatório. Ou seja, uma menor liberação de mediadores inflamatórios poderia reduzir a ativação de células como os macrófagos e células endoteliais, impedindo assim a amplificação da resposta inflamatória e diminuindo a liberação moléculas quimioatraentes como o KC. Este fenômeno viria a contribuir ainda mais para a redução do influxo de neutrófilos para o tecido inflamado. Ademais, os poucos neutrófilos presentes no tecido poderiam ter o receptor CXCR2 antagonizado pelo SB225002, impedindo dessa forma, a ativação da via da PLC $\beta$ , que por sua vez, não formaria mensageiros intracelulares, como o IP $_3$ , reduzindo a concentração de Ca $^{2+}$  intracelular e impossibilitando a liberação de vesículas ricas em mediadores inflamatórios, tais como KC e IL-1 $\beta$  (Figura 27). Deste modo, essa reação em cadeia, melhoraria substancialmente a inflamação intestinal desses animais.



**Figura 27. Bloqueio do receptor CXCR2 pelo SB225002.** A administração sistêmica do antagonista seletivo e não peptídico do receptor CXCR2 (SB), inibe o desencadeamento da via intracelular da fosfolipase C do tipo B (PLCβ), impedindo a quebra do fosfatidilinositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), bloqueando assim o aumento de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), proveniente do estoques de cálcio (EC), e a conseqüente liberação de vesículas ricas em mediadores inflamatórios como a IL-1β e KC, ou mesmo mieloperoxidase (MPO).

Ao contrário do que foi observado para a IL-1β, os dados publicados sobre a expressão do TNF-α nas IBD são contraditórios. Alguns grupos têm demonstrado aumento dos níveis de TNF-α em diferentes modelos de colite experimental (Braegger *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1992; Fiorucci *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2003). Por outro lado, outros estudos não foram capazes de detectar níveis significativos dessa citocina em pacientes com UC (Youngman *et al.*, 1993). No presente estudo, 72 h após a indução da colite, o TNF-α não foi detectável no cólon dos animais. Esses resultados confirmam dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, onde o mesmo protocolo experimental foi utilizado em animais de

diferentes linhagens. Entretanto, nossos resultados não descartam a importância do TNF- $\alpha$  neste processo inflamatório. Possivelmente, a discordância entre os dados da literatura deve ser, pelo menos em parte, resultante da cinética de produção desta citocina, uma vez que resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, sugerem que o TNF- $\alpha$  atua nas primeiras horas após à indução da colite pelo TNBS.

Outras citocinas importantes envolvidas na patogenicidade da colite induzida por TNBS em camundongos e que foram analisadas no presente estudo são a IL-12 e o IFN- $\gamma$  (Neurath *et al.*, 1995). Inúmeros trabalhos já relataram elevados níveis dessas citocinas em cólons de animais com colite experimental (Hong *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2002; Ukil *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). No entanto, nenhum deles utilizava exatamente o nosso modelo e/ou tipo de animal. Desta forma, nossos resultados demonstraram que, três dias após a indução da colite por TNBS, não houve diferença significativa nos níveis das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  entre o grupo controle e grupo administrado apenas com TNBS, confirmando assim resultados de outros trabalhos (Bailon *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). No estudo realizado por Ukil e colaboradores (2006), foi detectado aumento expressivo na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  em animais com colite induzida pelo TNBS. Porém, nesse mesmo estudo, esse aumento foi significativo somente quatro dias após a indução da colite, sendo que a elevação dos níveis dessas citocinas se estendeu até o oitavo dia após a injeção de TNBS. Além disso, a dose de TNBS utilizada para a indução da colite foi de 6 mg/animal, enquanto que em nossos experimentos a dose de trabalho foi de 1,5 mg/animal. Dessa forma, a diferença entre as linhagens dos animais, os agentes indutores de colite, a complexidade da resposta imune em diferentes modelos, e entre as condições experimentais de modo geral, podem explicar os resultados controversos.

As citocinas IL-10 e IL-4 também foram estudadas no presente trabalho. Diversos estudos têm demonstrado o papel dessas citocinas na regulação atividade antiinflamatória, tanto em modelos experimentais de colite, como em pacientes com UC (Hong *et al.*, 2002; Ukil *et al.*, 2003). A citocina IL-10 é produzida por uma variedade de células, incluindo os linfócitos T e B, tímócitos, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células do epitélio intestinal (Papadakis e Targan, 2000). Camundongos com deleção gênica para a IL-10 desenvolvem colite espontânea, e esse processo pode ser prevenido através da reposição de IL-10 (Kuhn *et al.*, 1993; Papadakis e Targan, 2000; Lindsay *et al.*, 2004; Shiraki *et al.*, 2004). Essa citocina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Fiorentino *et al.*, 1991; Fiocchi, 1998). Além disso, a terapia gênica com IL-10 tem se mostrado eficiente em alguns modelos de colite experimental (Lindsay *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2004). Dessa forma, a IL-10 parece desenvolver um papel crucial no mecanismo de defesa do organismo e na regulação da resposta inflamatória na mucosa intestinal. Como exposto anteriormente, nossos resultados demonstraram redução significativa nos níveis da citocina IL-10 no cólon dos animais que receberam apenas TNBS, quando comparado ao grupo controle, dado este já observado em outros trabalhos (Fiorucci *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Adicionalmente, ocorreu um aumento dessa citocina acima dos níveis basais, nos animais que receberam SB225002. Esse resultado sugere que a IL-10 pode também contribuir, pelo menos em parte, na diminuição da inflamação no cólon desses animais após o tratamento com o SB225002.

Além disso, nossos resultados demonstraram redução significativa nos níveis teciduais de IL-4 no cólon dos animais administrados apenas com TNBS, e que três dias após a indução da colite, os níveis dessa citocina aumentaram

significativamente nos animais tratados com SB225002. A IL-4 também possui propriedades antiinflamatórias e imunoregulatórias importantes nas IBD (Niessner e Volk, 1995). Esta citocina é capaz de inibir a formação de colônias de macrófagos e a liberação de mediadores inflamatórios, como a IL-1B (Rogler e Andus, 1998). Desse modo, macrófagos residentes e/ou células epiteliais, poderiam estar liberando grandes quantidades dessas citocinas (IL-4 e IL-10), que por sua vez, agiriam em conjunto sobre células inflamatórias, inibindo a liberação da IL-1B, assim como de outros mediadores inflamatórios presentes no epitélio intestinal, contribuindo de um modo geral para a redução da severidade da colite observada nos animais tratados com o SB225002.

Além das citocinas antiinflamatórias outras proteínas podem apresentar papel protetor nas IBDs. Alguns estudos têm sugerido papel benéfico da COX-2, na resolução do quadro de colite experimental (Colon *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004; Radaelli *et al.*, 2005). Recentemente, Okayama e colaboradores (2007), demonstraram que o tratamento com inibidores seletivos da enzima COX-2 pode exacerbar a resposta inflamatória e aumentar o dano tecidual em cólons de ratos com colite induzida pelo DSS.

Entretanto, uma grande quantidade de estudos têm evidenciado o papel da COX-2 para a patogênese da colite. Alguns trabalhos indicam a existência de relação entre o aumento do dano tecidual com o aumento da expressão dessa enzima COX-2 (Martin *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004; Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2005; Talero *et al.*, 2006). Em pacientes com UC, a expressão do mRNA para a COX-2 encontra-se aumentado nas áreas inflamadas (Jiang *et al.*, 2006), o que novamente sugere o envolvimento dessa enzima na patogenicidade dessa doença. Outros estudos têm demonstrado a relação entre o aumento da expressão da COX-

2, com a atividade da MPO, dano macroscópico, assim como com os níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias (Jiang *et al.*, 2006).

De forma semelhante, alguns trabalhos demonstraram a relação entre o aumento da expressão da iNOS com a intensidade da inflamação, lesões na mucosa e ulcerações no intestino de animais com colite. No estudo realizado por Kankuri e colaboradores (2001), foi demonstrado que a expressão da iNOS está relacionada com a infiltração de neutrófilos e com o aumento sustentado do edema do cólon e do escore macroscópico.

Recentemente, Ballester e colaboradores (2007), demonstraram aumentos marcantes na expressão da COX-2 e da iNOS no cólon de ratos com colite induzida pelo TNBS. Além disso, vários outros trabalhos têm demonstrado aumento na expressão dessas enzimas durante o desenvolvimento da colite em diferentes modelos experimentais (Camuesco *et al.*, 2004; Busserolles *et al.*, 2005; Ukil *et al.*, 2006; Antonioli *et al.*, 2007; Camacho-Barquero *et al.*, 2007). Nossos resultados corroboram o papel pró-inflamatório destas enzimas, quando analisadas no período de 72 h após a indução da colite. Em nossos resultados, tanto a expressão da COX-2 como da iNOS estiveram acompanhadas do aumento da atividade da MPO, assim como do escore macroscópico no cólon dos animais, entre outros parâmetros analisados. Todavia, o tratamento com o SB225002, mostrou-se eficiente na diminuição da expressão da COX-2 e da iNOS e a lesão tecidual. Essa diminuição também pode estar relacionada ao menor influxo de neutrófilos para o epitélio intestinal, que, indiretamente, pode ter diminuído a ativação de células inflamatórias, potenciais produtoras dessas enzimas, que contribuiriam de forma importante para o aumento da resposta inflamatória, e consequente dano tecidual.

Outro fenômeno que parece ter grande importância no desenvolvimento da colite é a formação de novos vasos (Danese *et al.*, 2006). A formação dessa nova rede de vasos no tecido do cólon inflamado, auxilia no aumento do influxo de células inflamatórias para o epitélio intestinal, aumentando indiretamente a liberação de enzimas proteolíticas e mediadores inflamatórios, assim como a formação de espécies reativas de oxigênio, que irão, em conjunto, lesionar o tecido e agravar o estado inflamatório. O VEGF é um dos principais fatores de crescimento envolvidos na formação de novos vasos durante a ocorrência de processos inflamatórios, e estudos em pacientes com IBD têm demonstrado o aumento da expressão desta citocina (Danese *et al.*, 2006; Carvalho, J. F. *et al.*, 2007). Além disso, experimentos em animais também têm evidenciado a participação dessa proteína na patogênese da colite experimental (Mazzon *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2005; Carvalho, A. T. *et al.*, 2007). Corroborando a literatura, nossos resultados demonstraram aumento marcante na expressão do VEGF nos animais que receberam apenas TNBS, sugerindo que houve aumento da angiogênese, fator que pode ter contribuído de forma indireta para o aumento do dano tecidual observado no cólon dos animais.

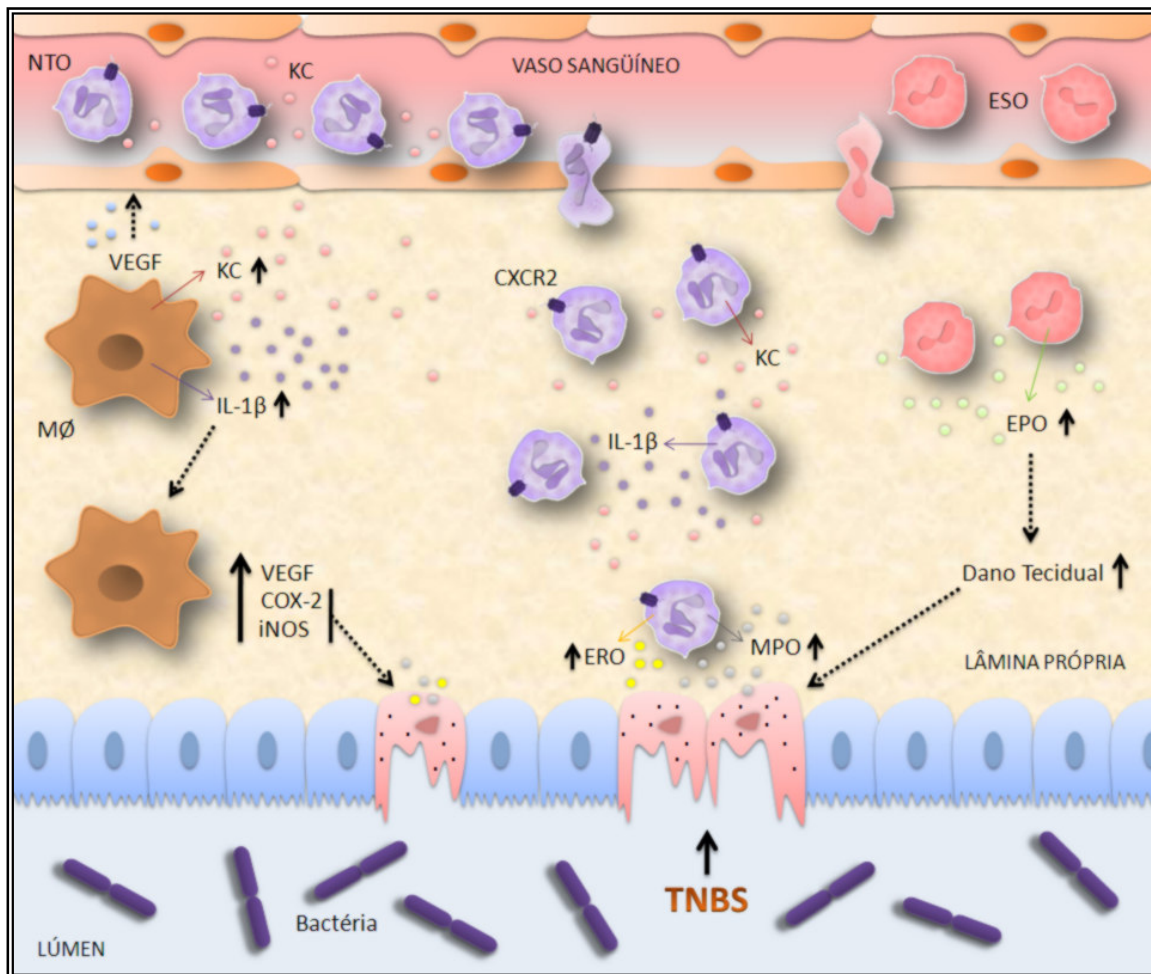
Além do VEGF, a quimiocina CXCL8 (KC) também pode promover a angiogênese durante o processo inflamatório. De modo geral, o aumento da expressão das quimiocinas CXC ELR<sup>+</sup> está relacionado ao aumento da angiogênese, sendo que este processo parece ser mediado pelo receptor CXCR2, expresso por células endoteliais (Addison *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns mediadores, como o IFN- $\gamma$ , apresentam propriedades angiostáticas, inibindo a produção de fatores angiogênicos como o VEGF, levando a supressão da formação de novos vasos (Strieter *et al.*, 1995; Addison *et al.*, 2000; Strieter *et al.*, 2004;



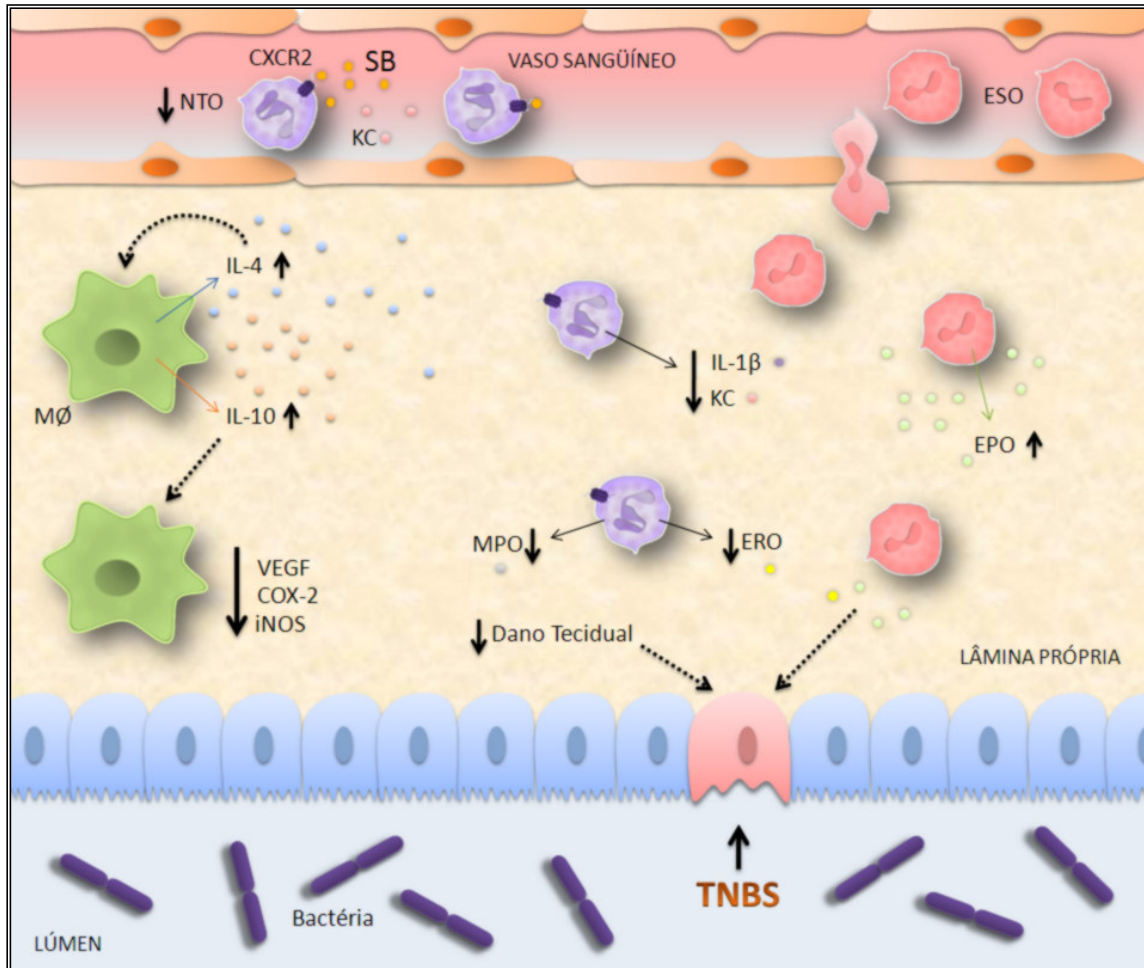
Wang e Klein, 2007). Desse modo, parece haver um balanço regulatório entre fatores angiogênicos e angiostáticos, durante o desenvolvimento da colite experimental. De modo interessante, a administração sistêmica do SB225002 acarretou em aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$ , além de redução marcante da expressão do VEGF, sugerindo assim que esses eventos parecem estar correlacionados. Ademais, nossos dados permitem propor que o SB225002 ao antagonizar o receptor CXCR2, envolvido na indução da expressão de VEGF, reduz a expressão de VEGF, reduzindo dessa forma, a formação de novos vasos e consequentemente, o influxo de células e o dano tecidual.

Diante desses resultados e dos relatos descritos na literatura, o bloqueio seletivo do receptor CXCR2, através da ação do antagonista não peptídico, SB225002, se mostrou eficaz em inibir vários parâmetros analisados no modelo experimental de colite induzida pelo TNBS. O bloqueio desse receptor, parece ter levado a redução drástica na migração dos neutrófilos para a mucosa intestinal. Esse menor influxo de neutrófilos pode ter ocasionado menor atividade da MPO, bem como a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases e mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas IL-1 $\beta$  e KC. Além disso, macrófagos residentes e/ou células endoteliais podem ter contribuído para o aumento das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10. Adicionalmente, pode ter ocorrido menor ativação de células inflamatórias, decorrente da diminuição do influxo de neutrófilos, reduzindo a produção de IL-1 $\beta$ , KC e a expressão das proteínas COX-2, iNOS e VEGF. Deste modo, esse conjunto de fatores pode ter contribuído para a diminuição do dano tecidual, e como consequência, para a melhora substancial dos sintomas dessa patologia nos animais tratados com TNBS (Figura 28 e 29).

Tendo em vista, o papel relevante exercido pelos neutrófilos no dano tecidual e nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento das IBD, podemos concluir, com base nos resultados do presente trabalho, que o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, o SB225002, apresenta potencial terapêutico para o tratamento da UC, uma vez que esse composto revelou-se altamente eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados nos animais com colite induzida pelo TNBS.



**Figura 28.** Possíveis mecanismos inflamatórios envolvidos em resposta à colite induzida pelo TNBS. Após a injeção de TNBS ocorre massiva infiltração de neutrófilos (NTO) em resposta a ativação do receptor CXCR2 pela quimiocina KC, produzida por macrófagos (MØ) ou células endoteliais. Além disso, os macrófagos produzem grandes quantidades de IL-1 $\beta$ , que pode estimular a expressão de VEGF, COX-2 e iNOS. Os neutrófilos presentes no tecido também podem liberar IL-1 $\beta$  e KC, auxiliando na amplificação da resposta inflamatória, além de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mieloperoxidase (MPO), que contribuem para a lesão tecidual. Adicionalmente, os eosinófilos (ESO) liberam eosinófilo peroxidase (EPO), que também podem lesionar o epitélio intestinal.



**Figura 29.** Possíveis alvos de ação do SB225002 na colite induzida pelo TNBS. O tratamento com o SB (SB225002) bloqueia a migração dos neutrófilos (NTO) para o tecido, diminuindo assim, a produção local de citocinas IL-1 $\beta$  e KC, bem como de mieloperoxidase (MPO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A redução da inflamação local pode acarretar em diminuição na produção de VEGF, COX-2 e iNOS pelas células endoteliais e macrófagos (MØ) residentes. Ademais há maior produção de IL-4 e IL-10. A atividade da enzima eosinófilo peroxidase (EPO) não é inibida pelo SB, sugerindo que o influxo de eosinófilos continue para a mucosa intestinal.

**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

O antagonista seletivo para o receptor CXCR2, o SB225002, apresentou potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, uma vez que esse composto revelou-se altamente eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados nos animais com colite induzida pelo TNBS, caracterizado pela diminuição do dano tecidual e consequente redução da mortalidade dos animais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbas, A. K. e Lichtman, A. H. Philadelphia, Pa. ; London: W. B. Saunders. 2003.  
560 p. p.

Addison, C. L., Daniel, T. O., Burdick, M. D., Liu, H., Ehlert, J. E., Xue, Y. Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A. e Strieter, R. M. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, v.165, n.9, Nov 1, p.5269-77. 2000.

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

Ajuebor, M. N., Zagorski, J., Kunkel, S. L., Strieter, R. M. e Hogaboam, C. M. Contrasting roles for CXCR2 during experimental colitis. *Exp Mol Pathol*, v.76, n.1, Feb, p.1-8. 2004.

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

Allen, S. J., Crown, S. E. e Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, v.25, p.787-820. 2007.



An, G., Wei, B., Xia, B., Mcdaniel, J. M., Ju, T., Cummings, R. D., Braun, J. e Xia, L. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. **J Exp Med**, v.204, n.6, Jun 11, p.1417-29. 2007.

Andus, T., Daig, R., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Lock, G., Hollerbach, S., Kollinger, M., Scholmerich, J. e Gross, V. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa--association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2. **Gut**, v.41, n.5, Nov, p.651-7. 1997.

Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Da Settimo, F., Natale, G., Kastsuchenka, O., Duranti, E., Viridis, A., Vassalle, C., La Motta, C., Mugnaini, L., Breschi, M. C., Blandizzi, C. e Del Taca, M. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, v.322, n.2, Aug, p.435-42. 2007.

Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S. e Watanabe, M. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. **J Gastroenterol**, v.40, n.1, Jan, p.16-23. 2005.

Auten, R. L., Richardson, R. M., White, J. R., Mason, S. N., Vozzelli, M. A. e Whorton, M. H. Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxia-exposed newborn rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.299, n.1, Oct, p.90-5. 2001.

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

Bachmann, M. F., Kopf, M. e Marsland, B. J. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.2, Feb, p.159-64. 2006.

Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, v.250, n.2, Aug, p.91-104. 2001.

Bailon, E., Camuesco, D., Nieto, A., Concha, A., Fernandez De Arriba, A., Roman, J., Ramis, I., Merlos, M., Zarzuelo, A., Galvez, J. e Comalada, M. The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition. *Biochem Pharmacol*, v.74, n.10, Nov 15, p.1496-506. 2007.

Ballester, I., Daddaoua, A., Lopez-Posadas, R., Nieto, A., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O. e Sanchez De Medina, F. The bisphosphonate alendronate improves the damage associated with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Br J Pharmacol*, v.151, n.2, May, p.206-15. 2007.

Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P. e Sheron, N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol*, v.199, n.1, Jan, p.28-35. 2003.

Barnich, N., Carvalho, F. A., Glasser, A. L., Darcha, C., Jantscheff, P., Allez, M., Peeters, H., Bommelaer, G., Desreumaux, P., Colombel, J. F. e Darfeuille-Michaud, A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, v.117, n.6, Jun, p.1566-74. 2007.

Barsante, M. M., Cunha, T. M., Allegretti, M., Cattani, F., Policani, F., Bizzarri, C., Tafuri, W. L., Poole, S., Cunha, F. Q., Bertini, R. e Teixeira, M. M. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol*, Sep 24. 2007.

Baumgart, D. C. e Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, v.369, n.9573, May 12, p.1627-40. 2007.

Baumgart, D. C. e Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, v.369, n.9573, May 12, p.1641-57. 2007.

Bertini, R., Allegretti, M., Bizzarri, C., Moriconi, A., Locati, M., Zampella, G., Cervellera, M. N., Di Cioccio, V., Cesta, M. C., Galliera, E., Martinez, F. O., Di Bitondo, R., Troiani, G., Sabbatini, V., D'anniballe, G., Anacardio, R., Cutrin, J. C., Cavalieri, B., Mainiero, F., Strippoli, R., Villa, P., Di Girolamo, M., Martin, F., Gentile, M., Santoni, A., Corda, D., Poli, G., Mantovani, A., Ghezzi, P. e Colotta, F. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.32, Aug 10, p.11791-6. 2004.

Bhatia, M. e Hegde, A. Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. **Regul Pept**, v.138, n.1, Jan 10, p.40-8. 2007.

Blumberg, R. S. e Strober, W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. **Jama**, v.285, n.5, Feb 7, p.643-7. 2001.

Bonen, D. K., Ogura, Y., Nicolae, D. L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F. F., Foster, S. J., Duerr, R. H., Brant, S. R., Cho, J. H. e Nunez, G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. **Gastroenterology**, v.124, n.1, Jan, p.140-6. 2003.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Braegger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S. e Macdonald, T. T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, v.339, n.8785, Jan 11, p.89-91. 1992.

Brannigan, A. E., O'connell, P. R., Hurley, H., O'Neill, A., Brady, H. R., Fitzpatrick, J. M. e Watson, R. W. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. **Shock**, v.13, n.5, May, p.361-6. 2000.

Bruno, O., Brullo, C., Arduino, N., Schenone, S., Ranise, A., Bondavalli, F., Ottonello, L., Dapino, P. e Dallegri, F. Synthesis and biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. **Farmaco**, v.59, n.3, Mar, p.223-35. 2004.

Buane, P., Di Carlo, E., Caputi, L., Brandolini, L., Mosca, M., Cattani, F., Pellegrini, L., Biordi, L., Coletti, G., Sorrentino, C., Fedele, G., Colotta, F., Melillo, G. e Bertini, R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. **J Leukoc Biol**, v.82, n.5, Nov, p.1239-46. 2007.

Buell, M. G. e Berin, M. C. Neutrophil-independence of the initiation of colonic injury. Comparison of results from three models of experimental colitis in the rat. **Dig Dis Sci**, v.39, n.12, Dec, p.2575-88. 1994.

Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H. H. e Lochs, H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? **Gut**, v.55, n.3, Mar, p.342-7. 2006.

Busserolles, J., Paya, M., D'auria, M. V., Gomez-Paloma, L. e Alcaraz, M. J. Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M. **Biochem Pharmacol**, v.69, n.10, May 15, p.1433-40. 2005.

Camacho-Barquero, L., Villegas, I., Sanchez-Calvo, J. M., Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., Motilva, V. e Alarcon De La Lastra, C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **Int Immunopharmacol**, v.7, n.3, Mar, p.333-42. 2007.

Campos, M. M., De Souza, G. E., Ricci, N. D., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M. e Calixto, J. B. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. **Br J Pharmacol**, v.135, n.5, Mar, p.1107-14. 2002.

Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., Lorente, M. D., Concha, A., Zarzuelo, A. e Galvez, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **Br J Pharmacol**, v.143, n.7, Dec, p.908-18. 2004.

Cario, E., Rosenberg, I. M., Brandwein, S. L., Beck, P. L., Reinecker, H. C. e Podolsky, D. K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. **J Immunol**, v.164, n.2, Jan 15, p.966-72. 2000.

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

Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v.9, n.6, Jun, p.653-60. 2003.

Carvalho, A. T., Souza, H., Carneiro, A. J., Castelo-Branco, M., Madi, K., Schanaider, A., Silv, F., Pereira Junior, F. A., Pereira, M. G., Tortori, C., Dines, I., Carvalho, J., Rocha, E. e Elia, C. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: synergistic effects on TNF-alpha, IL-12 and VEGF production. **World J Gastroenterol**, v.13, n.15, Apr 21, p.2166-73. 2007.

Carvalho, J. F., Blank, M. e Shoenfeld, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. **J Clin Immunol**, v.27, n.3, May, p.246-56. 2007.

Casini-Raggi, V., Kam, L., Chong, Y. J., Fiocchi, C., Pizarro, T. T. e Cominelli, F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **J Immunol**, v.154, n.5, Mar 1, p.2434-40. 1995.

Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol**, v.73, p.369-509. 1999.

Catusse, J., Liotard, A., Loillier, B., Pruneau, D. e Paquet, J. L. Characterization of the molecular interactions of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen alpha (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB 225002) with the human CXCR2. **Biochem Pharmacol**, v.65, n.5, Mar 1, p.813-21. 2003.

Chidlow, J. H., Jr., Langston, W., Greer, J. J., Ostanin, D., Abdelbaqi, M., Houghton, J., Senthilkumar, A., Shukla, D., Mazar, A. P., Grisham, M. B. e Kevil, C. G. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. **Am J Pathol**, v.169, n.6, Dec, p.2014-30. 2006.

Colon, A. L., Menchen, L. A., Hurtado, O., De Cristobal, J., Lizasoain, I., Leza, J. C., Lorenzo, P. e Moro, M. A. Implication of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis. **Cytokine**, v.16, n.6, Dec 21, p.220-6. 2001.

D'ambrosio, D., Panina-Bordignon, P. e Sinigaglia, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **J Immunol Methods**, v.273, n.1-2, Feb, p.3-13. 2003.

Danese, S., Sans, M., De La Motte, C., Graziani, C., West, G., Phillips, M. H., Pola, R., Rutella, S., Willis, J., Gasbarrini, A. e Fiocchi, C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v.130, n.7, Jun, p.2060-73. 2006.



Daniel, C., Radeke, H. H., Sartory, N. A., Zahn, N., Zuegel, U., Steinmeyer, A. e Stein, J. The new low calcemic vitamin D analog 22-ene-25-oxa-vitamin D prominently ameliorates T helper cell type 1-mediated colitis in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.319, n.2, Nov, p.622-31. 2006.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A. e Colombel, J. F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.115, n.6, Dec, p.1405-13. 1998.

Delves, P. J. e Roitt, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v.343, n.1, Jul 6, p.37-49. 2000.

Di Cioccio, V., Strippoli, R., Bizzarri, C., Troiani, G., Cervellera, M. N., Gloaguen, I., Colagrande, A., Cattozzo, E. M., Pagliei, S., Santoni, A., Colotta, F., Mainiero, F. e Bertini, R. Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis. **Immunology**, v.111, n.4, Apr, p.407-15. 2004.

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

Eijkelkamp, N., Heijnen, C. J., Lucas, A., Premont, R. T., Elsenbruch, S., Schedlowski, M. e Kavelaars, A. G protein-coupled receptor kinase 6 controls chronicity and severity of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. **Gut**, v.56, n.6, Jun, p.847-54. 2007.

Elson, C. O., Cong, Y., Mccracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G. e Weaver, C. T. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immunol Rev**, v.206, Aug, p.260-76. 2005.

Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S. e Riddell, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.109, n.4, Oct, p.1344-67. 1995.

Feagan, B. G., Greenberg, G. R., Wild, G., Fedorak, R. N., Pare, P., Mcdonald, J. W., Dube, R., Cohen, A., Steinhart, A. H., Landau, S., Aguzzi, R. A., Fox, I. H. e Vandervoort, M. K. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. **N Engl J Med**, v.352, n.24, Jun 16, p.2499-507. 2005.

Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, n.1, Jul, p.182-205. 1998.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. e O'garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**, v.147, n.11, Dec 1, p.3815-22. 1991.

Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Del Soldato, P., Flower, R. J., Clark, M. J., Morelli, A., Perretti, M. e Ignarro, L. J. NCX-1015, a nitric-oxide derivative of prednisolone, enhances regulatory T cells in the lamina propria and protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.24, Nov 26, p.15770-5. 2002.

Firestein, G. S. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v.103, n.1, Jan, p.3-4. 1999.

Forbes, E., Murase, T., Yang, M., Matthaei, K. I., Lee, J. J., Lee, N. A., Foster, P. S. e Hogan, S. P. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. **J Immunol**, v.172, n.9, May 1, p.5664-75. 2004.

Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S. e Pedersen, B. K. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. **Exp Physiol**, v.92, n.1, Jan, p.233-40. 2007.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T. e Fujiyama, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.52, n.1, Jan, p.65-70. 2003.

Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., De La Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C. e Strober, W. Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*, v.157, n.3, Aug 1, p.1261-70. 1996.

Garcia-Zepeda, E. A., Rothenberg, M. E., Ownbey, R. T., Celestin, J., Leder, P. e Luster, A. D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med*, v.2, n.4, Apr, p.449-56. 1996.

Garside, P. Cytokines in experimental colitis. *Clin Exp Immunol*, v.118, n.3, Dec, p.337-9. 1999.

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

Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. e Sansonetti, P. J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, v.278, n.11, Mar 14, p.8869-72. 2003.

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

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

Griga, T., Tromm, A., Spranger, J. e May, B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v.33, n.5, May, p.504-8. 1998.

Hara, D. B., Fernandes, E. S., Campos, M. M. e Calixto, J. B. Pharmacological and biochemical characterization of bradykinin B2 receptors in the mouse colon: influence of the TNBS-induced colitis. **Regul Pept**, v.141, n.1-3, Jun 7, p.25-34. 2007.

Haskill, S., Peace, A., Morris, J., Sporn, S. A., Anisowicz, A., Lee, S. W., Smith, T., Martin, G., Ralph, P. e Sager, R. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.19, Oct, p.7732-6. 1990.

Heidemann, J., Ogawa, H., Dwinell, M. B., Rafiee, P., Maaser, C., Gockel, H. R., Otterson, M. F., Ota, D. M., Lugering, N., Domschke, W. e Binion, D. G. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. **J Biol Chem**, v.278, n.10, Mar 7, p.8508-15. 2003.

Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H. C., Nadeau, W. J., McCormick, B. A. e Podolsky, D. K. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v.124, n.4, Apr, p.993-1000. 2003.

Hommes, D. W., Mikhajlova, T. L., Stoinov, S., Stimac, D., Vucelic, B., Lonovics, J., Zakuciova, M., D'haens, G., Van Assche, G., Ba, S., Lee, S. e Pearce, T. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. **Gut**, v.55, n.8, Aug, p.1131-7. 2006.

Hong, T., Jin, G. B., Yoshino, G., Miura, M., Maeda, Y., Cho, S. e Cyong, J. C. Protective effects of Polygalae root in experimental TNBS-induced colitis in mice. **J Ethnopharmacol**, v.79, n.3, Mar, p.341-6. 2002.

Huerre, M. R. e Gounon, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res Immunol**, v.147, n.7, Sep, p.417-34. 1996.

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

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

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

Irvine, E. J. e Marshall, J. K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. **Gastroenterology**, v.119, n.6, Dec, p.1740-4. 2000.

Isaacs, K. L., Sartor, R. B. e Haskill, S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. **Gastroenterology**, v.103, n.5, Nov, p.1587-95. 1992.

Itoh, H., Beck, P. L., Inoue, N., Xavier, R. e Podolsky, D. K. A paradoxical reduction in susceptibility to colonic injury upon targeted transgenic ablation of goblet cells. **J Clin Invest**, v.104, n.11, Dec, p.1539-47. 1999.

Izzo, R. S., Witkon, K., Chen, A. I., Hadjiyane, C., Weinstein, M. I. e Pillecchia, C. Neutrophil-activating peptide (interleukin-8) in colonic mucosa from patients with Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol**, v.28, n.4, Apr, p.296-300. 1993.

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

Jiang, H., Deng, C. S., Zhang, M. e Xia, J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. **World J Gastroenterol**, v.12, n.24, Jun 28, p.3848-53. 2006.

Jones, S. A., Dewald, B., Clark-Lewis, I. e Baggiolini, M. Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. **J Biol Chem**, v.272, n.26, Jun 27, p.16166-9. 1997.

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

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

Kanazawa, S., Tsunoda, T., Onuma, E., Majima, T., Kagiya, M. e Kikuchi, K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **Am J Gastroenterol**, v.96, n.3, Mar, p.822-8. 2001.

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



Kankuri, E., Vaali, K., Knowles, R. G., Lahde, M., Korpela, R., Vapaatalo, H. e Moilanen, E. Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. **J Pharmacol Exp Ther**, v.298, n.3, Sep, p.1128-32. 2001.

Kasama, T., Kobayashi, K., Yajima, N., Shiozawa, F., Yoda, Y., Takeuchi, H. T., Mori, Y., Negishi, M., Ide, H. e Adachi, M. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, v.121, n.3, Sep, p.533-8. 2000.

Katayama, K., Wada, K., Nakajima, A., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawa, S., Kadowaki, T., Nagai, R., Kamisaki, Y., Blumberg, R. S. e Mayumi, T. A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**, v.124, n.5, May, p.1315-24. 2003.

Kawada, M., Arihiro, A. e Mizoguchi, E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v.13, n.42, Nov 14, p.5581-93. 2007.

Kelly, M., Hwang, J. M. e Kubes, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v.120, n.1, Jul, p.3-10. 2007.

Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v.77, n.5, May, p.598-625. 2005.

Knowles, H., Leek, R. e Harris, A. L. Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy. **Novartis Found Symp**, v.256, p.189-200; discussion 200-4, 259-69. 2004.

Kolls, J. K. e Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, n.4, Oct, p.467-76. 2004.

Korzenik, J. R. e Podolsky, D. K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Drug Discov**, v.5, n.3, Mar, p.197-209. 2006.

Kucharzik, T., Walsh, S. V., Chen, J., Parkos, C. A. e Nusrat, A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. **Am J Pathol**, v.159, n.6, Dec, p.2001-9. 2001.

Kuhl, A. A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S. e Hoffmann, J. C. Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. **Gastroenterology**, v.133, n.6, Dec, p.1882-92. 2007.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. e Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

Kusumanto, Y. H., Dam, W. A., Hospers, G. A., Meijer, C. e Mulder, N. H. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. **Angiogenesis**, v.6, n.4, p.283-7. 2003.

Lamhonwah, A. M., Skaug, J., Scherer, S. W. e Tein, I. A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). **Biochem Biophys Res Commun**, v.301, n.1, Jan 31, p.98-101. 2003.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., Levine, R., Mcewan, P., Mckernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., Mcpherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P.,

Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., Mccombie, W. R., De La Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., Mclysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J.,

Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., De Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. e Chen, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n.6822, Feb 15, p.860-921. 2001.

Lane, B. R., Lore, K., Bock, P. J., Andersson, J., Coffey, M. J., Strieter, R. M. e Markovitz, D. M. Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy. **J Virol**, v.75, n.17, Sep, p.8195-202. 2001.

Lee, J., Kim, M. S., Kim, E. Y., Park, H. J., Chang, C. Y., Jung, D. Y., Kwon, C. H., Joh, J. W. e Kim, S. J. 15-deoxyspergualin prevents mucosal injury by inhibiting production of TNF-alpha and down-regulating expression of MD-1 in a murine model of TNBS-induced colitis. **Int Immunopharmacol**, v.7, n.8, Aug, p.1003-12. 2007.

Lesage, S., Zouali, H., Cezard, J. P., Colombel, J. F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'morain, C., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Merlin, F., Chamaillard, M., Jannot, A. S., Thomas, G. e Hugot, J. P. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. **Am J Hum Genet**, v.70, n.4, Apr, p.845-57. 2002.

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

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

Lichtenstein, G. R., Feagan, B. G., Cohen, R. D., Salzberg, B. A., Diamond, R. H., Chen, D. M., Pritchard, M. L. e Sandborn, W. J. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.4, n.5, May, p.621-30. 2006b.

Ligumsky, M., Simon, P. L., Karmeli, F. e Rachmilewitz, D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, v.31, n.6, Jun, p.686-9. 1990.

Lin, T. J., Garduno, R., Boudreau, R. T. e Issekutz, A. C. Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. **J Immunol**, v.169, n.8, Oct 15, p.4522-30. 2002.

Lindsay, J., Van Montfrans, C., Brennan, F., Van Deventer, S., Drillenburger, P., Hodgson, H., Te Velde, A. e Sol Rodriguez Pena, M. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. **Gene Ther**, v.9, n.24, Dec, p.1715-21. 2002.

Lindsay, J. O., Sandison, A., Cohen, P., Brennan, F. M. e Hodgson, H. J. IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Dig Dis Sci**, v.49, n.7-8, Aug, p.1327-34. 2004.

Liu, S. P., Dong, W. G., Wu, D. F., Luo, H. S. e Yu, J. P. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. **World J Gastroenterol**, v.9, n.12, Dec, p.2786-90. 2003.

Loftus, E. V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, n.6, May, p.1504-17. 2004.

Lugering, A., Schmidt, M., Lugering, N., Pauels, H. G., Domschke, W. e Kucharzik, T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. **Gastroenterology**, v.121, n.5, Nov, p.1145-57. 2001.

Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v.338, n.7, Feb 12, p.436-45. 1998.

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

Maeda, M., Watanabe, N., Neda, H., Yamauchi, N., Okamoto, T., Sasaki, H., Tsuji, Y., Akiyama, S., Tsuji, N. e Niitsu, Y. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.14, n.3, p.451-61. 1992.

Mahida, Y. R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v.6, n.1, Feb, p.21-33. 2000.

Mahida, Y. R., Ceska, M., Effenberger, F., Kurlak, L., Lindley, I. e Hawkey, C. J. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. **Clin Sci (Lond)**, v.82, n.3, Mar, p.273-5. 1992.

Mahida, Y. R., Wu, K. e Jewell, D. P. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. **Gut**, v.30, n.6, Jun, p.835-8. 1989.

Marshall, B. T., Long, M., Piper, J. W., Yago, T., Mcever, R. P. e Zhu, C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v.423, n.6936, May 8, p.190-3. 2003.

Marshall, J. K. e Irvine, E. J. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v.40, n.6, Jun, p.775-81. 1997.



Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C. e Alarcon De La Lastra, C. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, attenuates mucosal damage due to colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. **Eur J Pharmacol**, v.481, n.2-3, Nov 28, p.281-91. 2003.

Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C. e De La Lastra, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochem Pharmacol**, v.67, n.7, Apr 1, p.1399-410. 2004.

Martin, A. R., Villegas, I., Sanchez-Hidalgo, M. e De La Lastra, C. A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **Br J Pharmacol**, v.147, n.8, Apr, p.873-85. 2006.

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

Mazzon, E., Muia, C., Di Paola, R., Genovese, T., De Sarro, A. e Cuzzocrea, S. Thalidomide treatment reduces colon injury induced by experimental colitis. **Shock**, v.23, n.6, Jun, p.556-64. 2005.

Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J. A. e Mueller, C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. **Am J Pathol**, v.144, n.5, May, p.997-1007. 1994.

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

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

Mcvay, L. D., Keilbaugh, S. A., Wong, T. M., Kierstein, S., Shin, M. E., Lehrke, M., Lefterova, M. I., Shifflett, D. E., Barnes, S. L., Cominelli, F., Cohn, S. M., Hecht, G., Lazar, M. A., Haczku, A. e Wu, G. D. Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. **J Clin Invest**, v.116, n.11, Nov, p.2914-23. 2006.

Menzio, A., Pozzoli, C., Poli, E., Lazzaretti, M., Grandi, D. e Coruzzi, G. Long-term study of TNBS-induced colitis in rats: focus on mast cells. **Inflamm Res**, v.55, n.10, Oct, p.416-22. 2006.

Mir, A., Minguez, M., Tatay, J., Pascual, I., Pena, A., Sanchiz, V., Almela, P., Mora, F. e Benages, A. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v.97, n.6, Jun, p.1452-7. 2002.

Mitchell, J. A., Larkin, S. e Williams, T. J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochem Pharmacol**, v.50, n.10, Nov 9, p.1535-42. 1995.

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

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

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

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

Niessner, M. e Volk, B. A. Phenotypic and immunoregulatory analysis of intestinal T-cells in patients with inflammatory bowel disease: evaluation of an in vitro model. **Eur J Clin Invest**, v.25, n.3, Mar, p.155-64. 1995.

Nikolaus, S., Bauditz, J., Gionchetti, P., Witt, C., Lochs, H. e Schreiber, S. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. **Gut**, v.42, n.4, Apr, p.470-6. 1998.

O'brien, P. J. Peroxidases. **Chem Biol Interact**, v.129, n.1-2, Dec 1, p.113-39. 2000.

Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. e Cho, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, n.6837, May 31, p.603-6. 2001.

Okayama, M., Hayashi, S., Aoi, Y., Nishio, H., Kato, S. e Takeuchi, K. Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. **Dig Dis Sci**, v.52, n.9, Sep, p.2095-103. 2007.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. e Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v.98, n.3, Mar, p.694-702. 1990.

Okuda, T., Azuma, T., Ohtani, M., Masaki, R., Ito, Y., Yamazaki, Y., Ito, S. e Kuriyama, M. Hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic colitis. **World J Gastroenterol**, v.11, n.10, Mar 14, p.1535-9. 2005.

Palmen, M. J., Dijkstra, C. D., Van Der Ende, M. B., Pena, A. S. e Van Rees, E. P. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. **Clin Exp Immunol**, v.101, n.2, Aug, p.351-6. 1995.

Papadakis, K. A. e Targan, S. R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annu Rev Med**, v.51, p.289-98. 2000.

Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Beccchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F. e Romagnani, S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. **Am J Pathol**, v.150, n.3, Mar, p.823-32. 1997.

Petering, H., Gotze, O., Kimmig, D., Smolarski, R., Kapp, A. e Elsner, J. The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. **Blood**, v.93, n.2, Jan 15, p.694-702. 1999.

Philpott, D. J. e Girardin, S. E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. **Mol Immunol**, v.41, n.11, Nov, p.1099-108. 2004.

Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v.347, n.6, Aug 8, p.417-29. 2002.

Polverini, P. J. Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. **Exs**, v.79, p.11-28. 1997.

Proost, P., De Wolf-Peeters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A. e Van Damme, J. Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. **J Immunol**, v.150, n.3, Feb 1, p.1000-10. 1993.

Proudfoot, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.2, Feb, p.106-15. 2002.

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

Raab, Y., Gerdin, B., Ahlstedt, S. e Hallgren, R. Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis. **Gut**, v.34, n.9, Sep, p.1203-6. 1993.

Radaelli, F., Feltri, M., Meucci, G., Spinzi, G., Terruzzi, V. e Minoli, G. Ischemic colitis associated with rofecoxib. **Dig Liver Dis**, v.37, n.5, May, p.372-6. 2005.

Radford-Smith, G. e Jewell, D. P. Cytokines and inflammatory bowel disease. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v.10, n.1, Mar, p.151-64. 1996.

Ramakers, J. D., Verstege, M. I., Thuijls, G., Te Velde, A. A., Mensink, R. P. e Plat, J. The PPARgamma agonist rosiglitazone impairs colonic inflammation in mice with experimental colitis. **J Clin Immunol**, v.27, n.3, May, p.275-83. 2007.

Reinisch, W., Hommes, D. W., Van Assche, G., Colombel, J. F., Gendre, J. P., Oldenburg, B., Teml, A., Geboes, K., Ding, H., Zhang, L., Tang, M., Cheng, M., Van Deventer, S. J., Rutgeerts, P. e Pearce, T. A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. **Gut**, v.55, n.8, Aug, p.1138-44. 2006.

Robinson, A., Keely, S., Karhausen, J., Gerich, M. E., Furuta, G. T. e Colgan, S. P. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. **Gastroenterology**, v.134, n.1, Jan, p.145-55. 2008.

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

Rollins, B. J. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. **Eur J Cancer**, v.42, n.6, Apr, p.760-7. 2006.

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

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

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

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

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

Sanchez-Hidalgo, M., Martin, A. R., Villegas, I. e Alarcon De La Lastra, C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*, v.69, n.12, Jun 15, p.1733-44. 2005.



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

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

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

Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H. D., Bentzel, C. J., Riecken, E. O. e Schulzke, J. D. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.116, n.2, Feb, p.301-9. 1999.

Schruefer, R., Lutze, N., Schymeinsky, J. e Walzog, B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.288, n.3, Mar, p.H1186-92. 2005.

Shamamian, P., Schwartz, J. D., Pocock, B. J., Monea, S., Whiting, D., Marcus, S. G. e Mignatti, P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. **J Cell Physiol**, v.189, n.2, Nov, p.197-206. 2001.

Sherwood, E. R. e Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, Sep, p.385-405. 2004.

Shiraki, M., Aihara, H., Kinouchi, Y., Takahashi, S., Oki, M., Noguchi, M., Takahashi, K., Miyazaki, J. e Shimosegawa, T. IL-12 p40 prevents the development of chronic enterocolitis in IL-10-deficient mice. **Lab Invest**, v.84, n.11, Nov, p.1491-500. 2004.

Simmons, D. L., Botting, R. M. e Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v.56, n.3, Sep, p.387-437. 2004.

Simon, S. I. e Green, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v.7, p.151-85. 2005.

Singh, V. P., Patil, C. S., Jain, N. K. e Kulkarni, S. K. Aggravation of inflammatory bowel disease by cyclooxygenase-2 inhibitors in rats. **Pharmacology**, v.72, n.2, Oct, p.77-84. 2004.

Smith, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, v.56, n.6, Dec, p.672-86. 1994.

Song, F., Ito, K., Denning, T. L., Kuninger, D., Papaconstantinou, J., Gourley, W., Klimpel, G., Balish, E., Hokanson, J. e Ernst, P. B. Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. *J Immunol*, v.162, n.4, Feb 15, p.2275-80. 1999.

Strieter, R. M., Belperio, J. A., Phillips, R. J. e Keane, M. P. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol*, v.14, n.3, Jun, p.195-200. 2004.

Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D. e Et Al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, v.270, n.45, Nov 10, p.27348-57. 1995.

Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. e Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.1, Jan, p.9-20. 2006.

Stronkhorst, A., Radema, S., Yong, S. L., Bijl, H., Ten Berge, I. J., Tytgat, G. N. e Van Deventer, S. J. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. *Gut*, v.40, n.3, Mar, p.320-7. 1997.

Sugimoto, K., Hanai, H., Tozawa, K., Aoshi, T., Uchijima, M., Nagata, T. e Koide, Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, v.123, n.6, Dec, p.1912-22. 2002.

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

Szekanecz, Z. e Koch, A. E. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. **Rheum Dis Clin North Am**, v.30, n.1, Feb, p.97-114. 2004.

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

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

Talero, E., Sanchez-Fidalgo, S., Ramon Calvo, J. e Motilva, V. Galanin in the trinitrobenzene sulfonic acid rat model of experimental colitis. **Int Immunopharmacol**, v.6, n.9, Sep, p.1404-12. 2006.

Thelen, M. Dancing to the tune of chemokines. **Nat Immunol**, v.2, n.2, Feb, p.129-34. 2001.

Torres, M. I., Garcia-Martin, M., Fernandez, M. I., Nieto, N., Gil, A. e Rios, A. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. **Dig Dis Sci**, v.44, n.12, Dec, p.2523-9. 1999.

Ukil, A., Maity, S. e Das, P. K. Protection from experimental colitis by theaflavin-3,3'-digallate correlates with inhibition of IKK and NF-kappaB activation. **Br J Pharmacol**, v.149, n.1, Sep, p.121-31. 2006.

Ukil, A., Maity, S., Karmakar, S., Datta, N., Vedasiromoni, J. R. e Das, P. K. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **Br J Pharmacol**, v.139, n.2, May, p.209-18. 2003.

Vallance, P. e Chan, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v.85, n.3, Mar, p.342-50. 2001.

Vivier, E. e Malissen, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v.6, n.1, Jan, p.17-21. 2005.

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

Walz, A. e Baggiolini, M. A novel cleavage product of beta-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**, v.159, n.3, Mar 31, p.969-75. 1989.

Wang, X. e Klein, R. D. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor secretion in prostate cancer cells through EP2 receptor-mediated cAMP pathway. **Mol Carcinog**, v.46, n.11, Nov, p.912-23. 2007.

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

Wells, T. N., Power, C. A., Shaw, J. P. e Proudfoot, A. E. Chemokine blockers--therapeutics in the making? **Trends Pharmacol Sci**, v.27, n.1, Jan, p.41-7. 2006.

White, J. R., Lee, J. M., Young, P. R., Hertzberg, R. P., Jurewicz, A. J., Chaikin, M. A., Widdowson, K., Foley, J. J., Martin, L. D., Griswold, D. E. e Sarau, H. M. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. **J Biol Chem**, v.273, n.17, Apr 24, p.10095-8. 1998.

Whittle, B. J., Varga, C., Posa, A., Molnar, A., Collin, M. e Thiemermann, C. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. **Br J Pharmacol**, v.147, n.5, Mar, p.575-82. 2006.

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

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

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

Wirtz, S. e Neurath, M. F. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59, n.11, Sep 30, p.1073-83. 2007.

Xavier, R. J. e Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.448, n.7152, Jul 26, p.427-34. 2007.

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

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

Yamada, T., Zimmerman, B. J., Specian, R. D. e Grisham, M. B. Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammation**, v.15, n.5, Oct, p.399-411. 1991.

Youngman, K. R., Simon, P. L., West, G. A., Cominelli, F., Rachmilewitz, D., Klein, J. S. e Fiocchi, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, v.104, n.3, Mar, p.749-58. 1993.

Zhang, M., Deng, C., Zheng, J., Xia, J. e Sheng, D. Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Int Immunopharmacol**, v.6, n.8, Aug, p.1233-42. 2006.

Zhao, J., De Vera, J., Narushima, S., Beck, E. X., Palencia, S., Shinkawa, P., Kim, K. A., Liu, Y., Levy, M. D., Berg, D. J., Abo, A. e Funk, W. D. R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, v.132, n.4, Apr, p.1331-43. 2007.

Zhao, X., Li, F., Town, J. R., Zhang, X., Wang, W. e Gordon, J. R. Humanized forms of the CXCR1/CXCR2 antagonist, bovine CXCL8((3-74))K11R/G31P, effectively block ELR-CXC chemokine activity and airway endotoxemia pathology. **Int Immunopharmacol**, v.7, n.13, Dec 15, p.1723-31. 2007.