

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

Rodrigo Marcon

**O PAPEL DA MARESINA 1, UM MEDIADOR LIPÍDICO
DERIVADO DO ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA-
3, NA COLITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2013

Rodrigo Marcon

**O PAPEL DA MARESINA 1, UM MEDIADOR LIPÍDICO
DERIVADO DO ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO ÔMEGA-
3, NA COLITE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis
2013

Marcon, Rodrigo

O papel da Maresina 1, um mediador lipídico derivado do ácido graxo poliinsaturado ômega-3, na colite experimental em camundongos [tese] / Rodrigo Marcon ; orientador, João Batista Calixto - Florianópolis, SC, 2013.

112 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Colite. 3. Ômega-3. 4. Maresina. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“O papel da Maresina 1, um mediador lipídico derivado do ácido graxo poliinsaturado omega-3, na colite experimental em camundongos”

por

Rodrigo Marcon

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 01/PPGFMC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

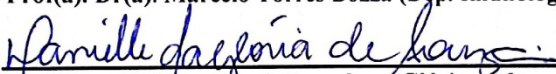
Banca Examinadora:




Prof(a). Dr(a). João Batista Calixto
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



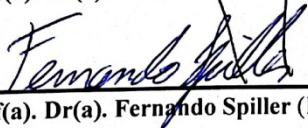
Prof(a). Dr(a). Marcelo Torres Bozza (Dep. Imunologia/UFRJ)



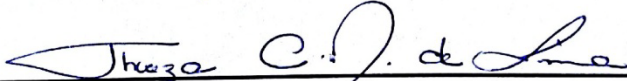
Prof(a). Dr(a). Danielle da Glória de Souza (Dep. Microbiologia/UFMG)



Prof(a). Dr(a). Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Fernando Spiller (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 01 de fevereiro de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus
pais Odacir e Oldina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os caminhos onde passei e pelas pessoas maravilhosas que colocaste na minha vida.

Ao Professor Dr. João Batista Calixto, que pela sua dedicação e amor a ciência nos transmitiu ensinamentos valiosos e sábios, que às vezes ultrapassavam as paredes do laboratório e nos serviam para a vida, e possibilitou meu crescimento como profissional e como pessoa, um exemplo de perseverança, competência e dedicação incondicional à ciência.

Aos meus pais, Odacir e Oldina, pela confiança, carinho, dedicação e amizade, pelo amor eterno entre pais e filhos.

Ao meu irmão Ricardo, embora mais novo muitos momentos fez o papel do irmão mais velho, obrigado pela sua amizade, bom humor e lealdade, obrigado por tudo.

A minha namorada Thaise, pelo seu exemplo de dedicação, de companheirismo, amizade e amor. Obrigado por tudo meu anjo.

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

Ao meu irmão adotivo Allisson, pelo exemplo de amizade, de confiança, incentivo, pela ajuda em todos os momentos, amigo que a gente tem que cuidar e manter por perto.

Aos grandes amigos Rafaela Claudino, Rafael Dutra, Maíra Cola, Daniela Leite e Juliana Gonçalves pela amizade, pelas incansáveis idéias, pela confiança, simplicidade, companheirismo, grandes pessoas e grandes amigos.

Aos amigos de laboratório, Edinéia, Marianne, Fabiana, Robson, Patrícia, Jarbas, Maíra Bicca, Carol, Juliana Chaves e Raquel, pela convivência, amizade e conhecimentos passados.

Ao Pedro e demais funcionários do Departamento de Farmacologia pela atenção e suporte.

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

“Knowing is not enough; we must apply.
Willing is not enough; we must do.”
(GOETHE)

RESUMO

Os óleos de peixe, bem como alguns vegetais apresentam quantidades significantes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, sendo que os principais encontrados em derivados marinhos são: o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e o ácido graxo docosahexaenóico (DHA). Estudos prévios têm demonstrado que uma dieta rica em óleo de peixe pode exercer efeitos benéficos sobre inúmeras doenças com características inflamatórias, dentre as quais se destacam as doenças inflamatórias intestinais (IBD). Um novo mediador lipídico derivado do DHA, denominado maresina 1 (MaR1) têm apresentado potente atividade analgésica, antiinflamatória e pró-resolutiva em distintos modelos experimentais de inflamação, sendo assim, foi hipotetizado que o processo de resolução desencadeado pela MaR1 também poderia prevenir ou atenuar a inflamação intestinal em camundongos. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o papel da MaR1, no modelo de colite aguda induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS) (com um ou dois ciclos de DSS), e no modelo de colite aguda induzido pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em camundongos. Os resultados observados demonstraram que o tratamento sistêmico com a MaR1 reduziu o escore clínico experimental e o dano tecidual colônico nos modelos de colite induzida pelo DSS (tanto no primeiro quanto no segundo ciclo), bem como na colite aguda induzida pelo TNBS. O efeito benéfico da MaR1 parece estar associado com sua habilidade em reduzir a liberação das citocinas: interleucina (IL)-1 β , factor de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6 e interferon (IFN)- γ no modelo agudo com único ciclo com DSS, e IL-1 β e IL-6, mas não TNF- α e IFN- γ no modelo agudo com dois ciclos com DSS, além da inibição da expressão da molécula de adesão ICAM-1, e de proteínas relacionadas ao inflamassoma, como o NALP3 e a pró-caspase-1, e pela ação sobre a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B). Adicionalmente, através de experimentos *in vitro*, evidenciou-se que a MaR1 reduziu a liberação de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ provenientes de macrófagos, e parece induzir a polarização de macrófagos para o fenótipo antiinflamatório M2. Em conclusão, o conjunto dos resultados contribui para estender os conhecimentos acerca dos mecanismos de ação antiinflamatório e pró-resolutivos da MaR1 e sugere uma nova abordagem terapêutica para o tratamento das IBD.

Palavras-chave: doenças inflamatórias intestinais. ômega-3. maresina. colite.

ABSTRACT

The fish oils, as well as some vegetables have a significant amount of omega-3 polyunsaturated fatty acid, and the main found in marine derivatives are: eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). It has been previously reported that dietary fish oils, rich in EPA and DHA, can exert beneficial effects in several inflammatory conditions, including the inflammatory bowel disease (IBD). A new lipid mediator generated from DHA, named Maresin 1 (MaR1), has been shown a potent analgesic, anti-inflammatory and pro-resolution effects in experimental models of inflammation. For this reason, was hypothesized that MaR1 also could prevent or attenuates the inflammatory bowel disease in mice. Thus, in this study, we investigated the effects MaR1, in dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis (one or two cycles of DSS) and against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in mice. The systemic treatment with MaR1 significantly attenuated the DSS-induced acute colitis (in both cycles) as well as TNBS-induced colonic inflammation by improvement of disease activity index, body weight loss and colonic tissue damage. MaR1 treatment resulted in a significant decrease of inflammatory mediators such as interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6 and interferon (IFN)- γ in the end of first cycle with DSS, and for IL-1 β and IL-6, but not TNF- α and IFN- γ in the end of second cycle with DSS. Additionally, MaR1 decreased intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA levels in both cycles of DSS-induced colitis. The beneficial effects of MaR1 were associated with the inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and pro-caspase-1 expression and by the modulation of the NALP3 inflammasome in colonic tissue. Furthermore, MaR1 also reduced IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IFN- γ secretion in bone marrow-derived macrophage cultures stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and seems to induce a M2-macrophage polarization. These results indicate that MaR1, a new lipid mediator derived from DHA, consistently protects mice against different models of experimental colitis, possibly by inhibiting multiple inflammatory components through the NF- κ B and caspase-1 pathways. Thus, MaR1 may offer a promising new therapeutic strategy for both the prevention and treatment of IBD.

Keywords: inflammatory bowel disease, omega-3; maresin; colitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	O trato gastrointestinal e suas divisões.....	1
Figura 2.	Características anatômicas e histopatológicas da colite ulcerativa.....	3
Figura 3.	Características anatômicas e histopatológicas da doença de Crohn.....	6
Figura 4.	O sistema imune no intestino.....	13
Figura 5.	Esquema ilustrativo sobre o processo de inflamação agudo, crônico e a resolução.....	19
Figura 6.	A inflamação aguda e mediadores pró-resolução.....	22
Figura 7.	Esquema de indução da colite aguda por um ou dois ciclos de DSS.....	29
Figura 8.	Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por um ciclo de DSS	41
Figura 9.	Efeito da MaR1 sobre a atividade da enzima MPO e o dano microscópico na colite aguda induzida por DSS um ciclo de DSS.....	43
Figura 10.	Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por dois ciclos de DSS.....	45
Figura 11.	Efeito da MaR1 sobre o dano microscópico na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS	46
Figura 12.	Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por um ciclo de DSS.....	48
Figura 13.	Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS.....	50
Figura 14.	Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF- κ B, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda induzida por um ciclo de DSS	52
Figura 15.	Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF- κ B, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda por dois ciclo de DSS	54
Figura 16.	Efeito da MaR1 sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 na colite aguda induzida por um ou dois ciclos de DSS.....	56
Figura 17.	Efeito da MaR1 sobre a secreção de mediadores inflamatórios em cultura primária de macrófagos.....	58

Figura 18.	Efeito da MaR1 sobre a expressão de MCR1 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.....	60
Figura 19.	Efeito da MaR1 sobre a alteração do peso corporal, dano macroscópico e microscópico e migração celular na colite induzida pelo TNBS.....	62
Figura 20.	Esquema ilustrativo sobre a síntese dos mediadores lipídicos derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 e o efeitos da MaR1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Escores utilizados para a avaliação do dano macroscópico do cólon na colite induzida pelo DSS em camundongos....	30
Tabela 2.	Escores utilizados para a avaliação do dano macroscópico do cólon na colite induzida pelo TNBS em camundongos.	32
Tabela 3.	Escores utilizados para a avaliação do dano microscópico do cólon na colite induzida pelo DSS em camundongos....	33
Tabela 4.	Escores utilizados para a avaliação do dano microscópico do cólon na colite induzida pelo TNBS em camundongos.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASA** - Ácido 5-aminosalicílico
AT - Produzido pela aspirina (do inglês, aspirin-triggered)
AT-RvD - Resolvina D formada pela via da aspirina
CARD15 - Domínio de recrutamento de caspase 15
APC - Célula apresentadora de antígeno
ASC- Proteína adaptadora associada a apoptose
CBA - Cytometer bead array
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
COX - Ciclooxygenase
DAB - 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico
DMEM - Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DNAc - Ácido desoxirribonucléico complementar
dNTPs - Deoxinucleotídeos
DSS - Sulfato sódico de dextrana
DTT - Ditioneitol
e.v. - Endovenoso
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
H&E - Hematoxilina e eosina
HEPE - Hidroxieicosapentaenóico
HTAB - Hexadeciltrimetilamônio
i. col. - Intracolônico
IAD - Índice de atividade da doença
IBD - Doenças inflamatórias intestinais
ICAM - Molécula intercelular de adesão 1
IFN - Interferon
IL - Interleucina
I κ B - Proteína inibitória do NF- κ B
LAFEX - Laboratório de Farmacologia Experimental
LCCM - Meio de cultura condicionado de células L929
LFA - Antígeno associado à função dos linfócitos
LOX - Lipoxigenase
LPS - Lipopolissacarídeo
LTB4 - Leucotrieno B4
LXA4 - Lipoxina A4
MaR1 - Maresina 1
M-CSF - Fator estimulador de formação de colônias de macrófagos
MDP - Dipeptídeo muramíl
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
M-MLV - Moloney Murine Leukemia Virus

MPO - Mieloperoxidase
NALP3-Proteína que contém o domínio 3 de pirina
NFκB - Fator nuclear κB
NOD - Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOS - Sintase do óxido nítrico
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PG - Prostaglandina
PMN - Polimorfonuclear
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPR - Receptores de reconhecimento padrão
RNA - Ácido ribonucléico
RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro
RNasin - Inibidor de RNase
RvD - Resolvina D
RvE- Resolvina E
SFB - Soro fetal bovino
TCR - Receptores de células T
TGF - Fator de crescimento transformante
Th - Célula T auxiliar
TLR - Receptores de reconhecimento padrão do tipo toll
TMB - Tetrametilbenzidina
TNBS - Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TNF-α - Fator de necrose tumoral α
Treg - Célula T regulatória
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VCAM - Molécula vascular de adesão celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doenças Inflamatórias Intestinais	1
1.2	Colite Ulcerativa.....	2
1.3	Doença de Crohn.....	4
1.4	Prevalência das IBD.....	7
1.5	Etiologia das IBD	8
1.5.1	Susceptibilidade Genética	8
1.5.2	A microbiota intestinal	10
1.5.3	O sistema imune.....	12
1.5.4	Fatores ambientais.....	14
1.6	O processo inflamatório e sua resolução.....	16
1.7	Tratamento das IBD.....	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Animais.....	28
3.2	Colite experimental induzida pelo DSS.....	28
3.2.1	Índice de atividade da doença (IAD)	29
3.2.2	Escore macroscópico para a colite induzida pelo DSS..	29
3.3	Colite experimental induzida por TNBS.....	30
3.3.1	Escore macroscópico para a colite induzida pelo TNBS ...	31
3.3.2	Escore microscópico para a colite induzida pelo DSS e TNBS.....	32
3.4	Atividade da enzima MPO.....	33
3.5	Dosagem de citocinas.....	34
3.6	Extração do RNA total.....	34
3.7	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	36
3.8	Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea.....	36
3.9	Preparação do extrato total.....	37
3.10	Western blot.....	37
3.11	Drogas e reagentes.....	38
3.12	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por um ciclo de DSS	40
4.2	Efeito da MaR1 sobre a atividade da enzima MPO e o	

	dano microscópico na colite aguda induzida por DSS um ciclo de DSS.....	42
4.3	Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por dois ciclos de DSS.....	44
4.4	Efeito da MaR1 sobre o dano microscópico na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS	46
4.5	Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por um ciclo de DSS.....	47
4.6	Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS.....	49
4.7	Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF-κB, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda induzida por um ciclo de DSS	51
4.8	Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF-κB, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda por dois ciclos de DSS	53
4.9	Efeito da MaR1 sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 na colite aguda induzida por um ou dois ciclos de DSS.....	55
4.10	Efeito da MaR1 sobre a secreção de mediadores inflamatórios em cultura primária de macrófagos.....	57
4.11	Efeito da MaR1 sobre a expressão de MCR1 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.....	59
4.12	Efeito da MaR1 sobre a alteração do peso corporal, dano macroscópico e microscópico e migração celular na colite induzida pelo TNBS.....	61
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

O trato gastrointestinal (TGI) é composto pela boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e reto. A boca tem a função de receber o alimento, triturar e misturar com a secreção salivar. O esôfago é encarregado de conduzir o alimento até o estômago, onde o mesmo será pré-digerido, podendo também ser absorvido. Em seguida, o quimo resultante da transformação do alimento no estômago segue para o intestino delgado, o qual é dividido em duodeno, jejuno e íleo, onde ocorre grande parte da absorção dos alimentos, e por fim o intestino grosso, que é subdividido em cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide e reto, onde ocorre grande parte da absorção de água, eletrólitos e nutrientes (Figura 1) (Sobotta *et al.*, 2006).

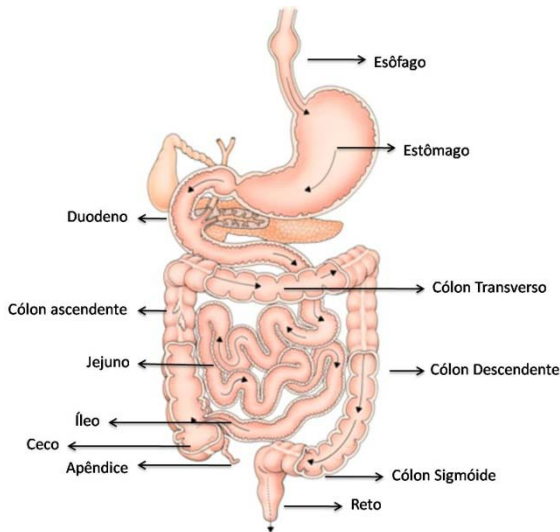


Figura 1: O trato gastrintestinal e suas divisões. O trato gastrintestinal é composto pela boca, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide e reto). **Fonte:** Adaptado de Getty Images.

As principais patologias que acometem o TGI são as doenças inflamatórias intestinais (do inglês *inflammatory bowel disease - IBD*), uma denominação genérica, a qual engloba patologias intestinais com causa conhecida, como a colite isquêmica, bem como doenças inflamatórias com causas desconhecidas, dentre estas, as mais

importantes são a colite ulcerativa e a doença de Crohn, sendo que elas são responsáveis por 80% a 90% dos casos de inflamação intestinal no mundo. Ambas podem levar o indivíduo a outras complicações, incluindo a incidência de câncer colorretal (Podolsky, 2002b).

1.2 COLITE ULCERATIVA

Há relatos de doenças que se assemelhavam à colite ulcerativa no livro *Corpus Hippocraticum Peri Syriggon*, escrito por Hipócrates no século IV a.C., e também naqueles escritos no século II d.C., por Aretius de Cappadocia e Soranus de Éfeso (Muegge *et al.*, 2011), mas somente em 1859 a colite passou a ser encarada como uma entidade patológica através dos estudos conduzidos pelo médico britânico Samuel Wilks (Wilks, 1859). Em 1862 o médico britânico Samuel Osborne Habershon descreveu que as ulcerações observadas no intestino tendem a coalescência até ocorrer à completa destruição da mucosa intestinal (Muegge *et al.*, 2011). Apenas em 1961, Lockhart-Mummery e Morson demonstraram as características distintas entre a colite ulcerativa com a outra importante doença que acomete o trato gastrointestinal, a doença de Crohn (Birrenbach *et al.*, 2004).

A colite ulcerativa difere da doença de Crohn pela localização da doença e pelo comprometimento de camadas da mucosa intestinal. As lesões da primeira acometem a região do cólon, iniciando principalmente pelo reto, podendo se propagar de forma contínua por todo o intestino grosso até a região do ceco (Figura 1 e 2A), e apresentam características não-transmurais, ou seja, limitam-se à região da mucosa intestinal, com presença de ulcerações epiteliais (Baumgart *et al.*, 2007b). A causa da colite ulcerativa não está completamente esclarecida, mas é sabido que fatores genéticos aumentam a suscetibilidade à doença, juntamente com fatores ambientais que parecem ser os responsáveis pelo desencadeamento (Ahuja *et al.*, 2010; Hilmi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). A colite ulcerativa pode iniciar em qualquer idade, sendo homens e mulheres igualmente afetados e o pico de incidência em geral ocorre entre os 15 e 30 anos de idade, podendo ocorrer surtos de incidência em idosos (Korzenik, 2005).

O diagnóstico da colite ulcerativa é estabelecido pela avaliação do histórico clínico, juntamente com exames laboratoriais que incluem hemograma completo, função hepática e renal, proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação (VHS) e eletrólitos, além de exames de fezes e confirmação através de endoscopia e análise histopatológica. Através da análise histológica e endoscópica é possível observar nas regiões afetadas superfície irregular devido a extensas ulcerações,

hemorragias, pseudopólipos e formação de abscessos (Figura 2B) (Baumgart *et al.*, 2007b). Além disso, a análise histológica revelou ainda massiva migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos em direção à lâmina própria (camada de tecido conjuntivo abaixo das células epiteliais intestinais que contém células do sistema imune) e criptas intestinais, e destruição das células produtoras de muco, denominadas células caliciformes, o que conseqüentemente causa a perda da proteção do muco sobre as células epiteliais intestinais (Figura 2C) (Baumgart *et al.*, 2007b).



Figura 2: Características anatômicas e histopatológicas da colite ulcerativa. (A) A colite ulcerativa é caracterizada por lesões somente no intestino grosso, que agredem a região do cólon, iniciando principalmente pelo reto, podendo se propagar de forma contínua por todo o intestino grosso até a região do ceco. (B) Análise endoscópica do cólon descendente, com superfície irregular devido a extensas ulcerações, hemorragias, pseudopólipos. (C) Análise histológica corada com hematoxilina e eosina, como massiva infiltração de células inflamatórias e comprometimento da mucosa intestinal, com perda das criptas intestinais e das células caliciformes. Magnificação 200X. **Fonte:** Adaptado de Baumgart (2007b).

Os principais sintomas da colite ulcerativa são diarreia sanguinolenta, principalmente após as refeições, evacuação de pus e muco e também fortes cólicas abdominais (Baumgart *et al.*, 2007b). Quanto à severidade da colite ulcerativa, ela é classificada principalmente através do índice de Truelove-Witts, publicado em 1955 (D'Haens *et al.*, 2007). Este índice classifica a colite ulcerativa como: **leve**, quando ocorrem no máximo quatro evacuações diárias com ou sem sangue, a temperatura corporal é normal, os níveis de hemoglobina são maiores que 10,5 g/dL e o VHS é menor que 30 mm/1ª hora; **moderada**, quando ocorrer de quatro a seis evacuações sanguinolentas diariamente, com o mínimo de comprometimento sistêmico; ou **severa**, com mais de seis evacuações sanguinolentas diárias, e com evidência de

comprometimento sistêmico como febre, taquicardia, anemia, os níveis de hemoglobina menores que 10,5 g/dL e VHS maior que 30 mm/1^a hora, nestes casos se ocorrer sangramento contínuo o paciente pode necessitar de transfusão de sangue (Carter *et al.*, 2004; D'Haens *et al.*, 2007; Kornbluth *et al.*, 2010).

A colite ulcerativa é uma doença que evolui através de surtos, ocorrendo períodos de doença ativa (surto) e intercalados por períodos em que a doença se manifesta em estado de latência (remissão) das lesões e sintomas, e muitos pacientes permanecem em remissão por períodos longos, embora a ausência de surtos por 2 anos ocorram em apenas 20% dos pacientes com alguma IBD (Baumgart *et al.*, 2007a). O tratamento é importante tanto nos períodos de surto, onde é fundamental o clínico observar a tabela de Truelove-Witts para definir o tratamento ideal, bem como nos períodos de remissão, a fim de manter o paciente sem a doença ativa, proporcionando melhor qualidade de vida. Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (OMG), foi delineado através das diretrizes de 2010 o arsenal farmacológico e as condutas ideais para os períodos de surtos e remissões, sendo definidos para o tratamento da colite ulcerativa na fase de surto os aminossalicilatos, corticóides, imunossupressores e antibióticos (Bernstein *et al.*, 2010).

1.3 DOENÇA DE CROHN

As primeiras evidências acerca da doença de Crohn datam dos tempos da Grécia Antiga (Hilmi *et al.*, 2009; Muegge *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Os estudos mais específicos sobre a doença de Crohn apontam para o médico cirurgião alemão Guilielmus Fabricius Hildanus em 1623 (Baumgart *et al.*, 2007a). Em 1898, casos de doença de Crohn foram relatados por John Berg, e em 1904 por Antoni Lesniowski (Kirsner, 1988). O reconhecimento da doença de Crohn como uma entidade clínica foi embasado principalmente pelos trabalhos publicados pelo cirurgião Kennedy Dalziel (1913) por Moschcowitz e Wilensky (1923) (Muegge *et al.*, 2011). Em 1930, os médicos Burrill Crohn, Leon Ginzburg e Gordon Oppenheimer fizeram importantes observações em 14 pacientes com ileíte regional, sendo publicado o trabalho intitulado: “Regional ileitis: a pathologic and chronic entity”, onde foi descrito as características desta doença para a associação médica americana. Após a divulgação deste trabalho, esta doença inflamatória intestinal passou a ser denominada de doença de Crohn pelas muitas publicações que assim as denominava, principalmente na revista *Lancet*, a qual tinha Brian Brooke, amigo de Burrill Crohn como autor dos principais trabalhos na área (Baron, 2000; Brooke, 1959; Brooke, 1953).

Como descrito anteriormente, a doença de Crohn difere da colite ulcerativa pelo comprometimento de diferentes camadas da mucosa intestinal e pela localização anatômica da doença. Os segmentos do tubo digestivo mais frequentemente acometidos são o íleo, o cólon e a região perianal (Figura 1) (Baumgart *et al.*, 2007a). Além de acometer o sistema digestivo, a doença de Crohn pode apresentar manifestações extra-intestinais, sendo mais frequentes as oftalmológicas, dermatológicas e reumatológicas (Baumgart *et al.*, 2007b). Em relação às camadas intestinais, a doença de Crohn é caracterizada pelo acometimento assimétrico e transmural, ou seja, não se restringe à mucosa e submucosa intestinal, podendo comprometer todas as camadas teciduais, e também várias partes do tubo digestivo desde a boca até o ânus (Hanauer *et al.*, 2001) (Figura 3A). A origem da doença de Crohn é desconhecida, mas evidências indicam que fatores genéticos e ambientais influenciam na suscetibilidade à condição (Hilmi *et al.*, 2009; Korzenik, 2005; Wang *et al.*, 2010; Xavier *et al.*, 2007), sendo a doença observada com mais frequência entre indivíduos de 15 a 30 anos, embora possa acometer qualquer faixa etária (Korzenik, 2005).

O diagnóstico definitivo da doença de Crohn é difícil devido à multiplicidade de apresentações e à sua semelhança com outras doenças. Os exames necessários para o diagnóstico incluem hemograma completo, função hepática e renal, proteína C reativa, VHS e eletrólitos, além de exames de fezes e análise histopatológica. Através dos dados endoscópicos e histológicos é possível observar áreas inflamadas onde são observadas lesões ulceradas, estenoses (estreitamento do tubo digestivo) e fístulas (canais que normalmente não existem), entremeadas de áreas com mucosa normal (Figura 3B) (Baumgart *et al.*, 2007b). Os dados histológicos são importantes e têm a finalidade de detectar padrões segmentares e a presença de granulomas pela agregação de macrófagos, característico da doença de Crohn (Figura 3C) (Baumgart *et al.*, 2007b).

Os sintomas clínicos mais frequentes da doença de Crohn estão diretamente relacionados à localização da doença, e podem incluir diarreia, dor abdominal, febre, obstrução intestinal e fezes sanguinolentas com presença de muco (Baumgart *et al.*, 2007b). A avaliação clínica se baseia no índice de Harvey-Bradshaw ou no índice de atividade da doença de Crohn (IADC) que levam em consideração o número de evacuações líquidas na última semana, dor abdominal, febre, alteração no peso corporal, complicações sistêmicas como artralgia, uveíte, eritema e aftas (Sandborn *et al.*, 2002; Targan *et al.*, 1997). Em relação à gravidade da doença, os sintomas clínicos da doença de Crohn

são classificados como: **leve**, quando o paciente é capaz de tolerar a alimentação oral sem manifestações de desidratação, toxicidade, obstrução intestinal e perda de menos que 10% do peso corporal; **moderada**, quando o paciente apresenta febre, perda de peso maior que 10%, dor abdominal persistente, náusea, vômito ou significativa anemia; **severa ou fulminante**, quando o paciente apresenta febre elevada, vômito persistente, obstrução intestinal e/ou abscessos intestinais (Baumgart *et al.*, 2007b).



Figura 3: Características anatômicas e histopatológicas da doença de Crohn. (A) A doença de Crohn pode acometer todas as camadas teciduais do intestino e várias partes do tubo digestivo desde a boca até o ânus. (B) Análise endoscópica do cólon sigmóide, com lesões ulceradas, estenoses e fístulas entremeadas de áreas com mucosa normal. (C) Análise histológica corada com hematoxilina e eosina, como massiva infiltração de células inflamatórias e formação de granulomas. Magnificação 200X. **Fonte:** Adaptado de Baumgart (2007b)

A doença de Crohn não é clínica ou cirurgicamente curável e sua história natural é marcada por surtos e remissões (Sachar, 2002). Após um quadro inicial agudo da inflamação na doença de Crohn, 55 a 65% se recuperam e entram em um estado de remissão da doença. Este quadro se inverte com o passar dos anos, onde apenas 10 a 13% dos pacientes com doença de Crohn continuam em remissão e a grande maioria apresenta um decurso intermitente crônico de inflamação (Feagan, 2002; Loftus *et al.*, 2002). O tratamento baseia-se no estado sintomático da doença, observado através dos resultados do IADC e/ou do índice de Harvey-Bradshaw, a fim de definir a melhor terapia farmacológica, as quais englobam os mesmos tratamentos utilizados para a colite ulcerativa, como os aminossalicilatos, corticóides, imunossupressores e antibióticos, com a diferença que para a doença de Crohn tem sido utilizado também o anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral (TNF)- α (Bernstein *et al.*, 2010).

1.4 PREVALÊNCIA DAS IBD

As prevalências da colite ulcerativa e da doença de Crohn são consideradas elevadas em países com índice de desenvolvimento humano alto, tais como os países do norte europeu, Estados Unidos e Canadá, embora, as taxas de incidência das IBD estejam começando a se estabilizar nesses países. Em contrapartida, nos países com índices de prevalência mais baixos, tais como os países do Leste Europeu, Asiáticos e da América do Sul, o percentual de incidência permanece ascendente (Lakatos, 2006; Loftus, 2004). Estima-se que aproximadamente quatro milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela colite ulcerativa ou doença de Crohn, e cerca de 1,4 milhões desses casos ocorrem somente nos Estados Unidos (Loftus, 2004), onde se gasta aproximadamente U\$ 20.000,00 dólares por paciente ao ano (Loftus, 2004). Portanto, as IBD apresentam importante impacto econômico, tanto no sistema de saúde, bem como na taxa de crescimento da economia em geral.

Os dados sobre a incidência de IBD no Brasil são restritos a algumas regiões do país, e mostram que a região Norte apresenta menor número de internações, seguida pela região Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Há relatos indicando que houve aumento no número de casos de pacientes com IBD no interior do Estado das Minas Gerais e no hospital universitário da cidade de Ribeirão Preto no estado de São Paulo (Souza *et al.*, 2002; Victoria *et al.*, 2009). Além disso, em relação à prevalência de IBD no centro-oeste do estado de São Paulo, foi constatada maior incidência em jovens brancos que vivem em áreas urbanas. Este estudo também mostrou que a taxa de incidência de colite ulcerativa (4,48 casos/100.000 habitantes) foi maior que a de doença de Crohn (3,5 casos/100.000 habitantes) no período estudado. Embora tenha sido observado crescimento na taxa de incidência de IBD no Brasil, na área estudada a mesma foi tão baixa quanto a de outros países da América Latina e menor do que a encontrada em países do sul da Europa (Sachar, 2002).

1.5 ETIOLOGIA DAS IBD

Um dos gargalos para a prevenção e o tratamento das IBD é o conhecimento ainda escasso sobre as causas destas doenças, uma vez que as IBD apresentam sintomas imprevisíveis, tratamentos que apresentam efeitos colaterais inviáveis e muitas vezes com melhora limitado no quadro inflamatório, bem como um constante aumento no número de pacientes ao redor do mundo (Arend *et al.*, 1970; Baumgart

et al., 2007a; Lakatos, 2006). Algumas teorias vêm sendo propostas para tentar elucidar a real causa das IBD, e as mais bem aceitas para o desencadeamento são: susceptibilidade genética, problemas na microbiota intestinal, no sistema imunológico, além de fatores ambientais (Hilmi *et al.*, 2009; Korzenik, 2005; Wang *et al.*, 2010; Xavier *et al.*, 2007). Embora esteja bem claro que nenhum destes componentes tem isoladamente a capacidade de desencadear as IBD, acredita-se que o conjunto deles determinará seu aparecimento.

1.5.1 Susceptibilidade Genética

A causa da ocorrência de IBD foi considerada por muito tempo desconhecida, porém parece haver uma predisposição genética para estas doenças, uma vez que a ocorrência de IBD em gêmeos é 800 vezes maior eu a população em geral (Xavier *et al.*, 2007). Contudo, somente nos últimos anos vem sendo comprovado que determinados genes têm papel importante sobre estas doenças intestinais (Orholm *et al.*, 1991). Análises gênicas identificaram regiões no genoma que podem conferir suscetibilidade às IBD, e o primeiro gene associado à inflamação intestinal foi o *domínio de recrutamento de caspase, membro 15* (CARD15), também conhecido como domínio 2 de oligomerização de nucleotídeo (NOD2) (Hampe *et al.*, 2001). Posteriormente, evidências apontaram para outros genes, incluindo o receptor de reconhecimento padrão do tipo toll 4 (*TLR4*) (Franchimont *et al.*, 2004), *TNFSF15* (Thiebaut *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2005), variação no gene do receptor de interleucina (IL)-23 (Duerr *et al.*, 2006), *ATG16L1* (Csongei *et al.*, 2010) e do gene do receptor da família NOD contendo o domínio 3 de pirina (*NLRP3*), que codifica a proteína NALP3 (Villani *et al.*, 2009a).

As alterações observadas no gene *CARD15/NOD2* foram identificados principalmente em pacientes com doença de Crohn (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). A proteína NOD2 é um receptor intracelular que reconhece estruturas específicas encontradas em certas bactérias gram-positivas e gram-negativas e desempenha papel fundamental na ativação da resposta imune inata (Rosenbaum *et al.*, 2003). As mutações no gene *NOD2* afetam diretamente a habilidade do sistema imune de processar produtos bacterianos, o que pode gerar resposta imune prolongada e ineficaz. Um dos principais componentes desencadeados pela ativação do NOD2 são os fatores de transcrição como, por exemplo, o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), importante para a estimulação do sistema imune e a proteção contra infecções. Assim, essas anormalidades podem favorecer a proliferação de diversos tipos de

bactérias patogênicas na mucosa intestinal, podendo desencadear o surgimento de inflamações intestinais (Swidsinski *et al.*, 2002).

Alterações no gene do receptor de reconhecimento padrão 4 (do inglês, *toll-like receptor 4*, *TLR4*) foram encontrados em pacientes com colite ulcerativa (Franchimont *et al.*, 2004); o que reforça a noção de que a resposta da imunidade inata frente a bactérias patogênicas pode estar defeituosa, uma vez que este receptor é importante para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) por células imunológicas e epiteliais. Outro gene onde foi observada alteração é o *TNFSF15*, que codifica a proteína TL1A, um membro da família do TNF- α , a qual é produzida por células dendríticas e estimula os linfócitos T CD4⁺ a liberar interferon (IFN)- γ (Torres *et al.*, 2008), auxiliando no combate a vírus e bactérias e no controle tumoral. O gene *TNFSF15* apresentou polimorfismo em pacientes asiáticos, norteamericanos e europeus portadores de alguma IBD (Thiebaut *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2005).

A interleucina IL-23 é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, e é capaz de estimular a produção de mediadores inflamatórios como a IL-17, TNF- α e IL-6 pelas células T-helper CD4⁺ 17 (Th17) (Torres *et al.*, 2008). A IL-17 apresenta potente atividade pró-inflamatória, induzindo a expressão de quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão pelas células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (Kolls *et al.*, 2004). Pacientes portadores de colite ulcerativa ou de doença de Crohn apresentam polimorfismo genético no gene *IL23R* que codifica o receptor de IL-23, e sua expressão se encontra significativamente aumentada em pacientes com inflamação intestinal (Duerr *et al.*, 2006). E embasando esta idéia, foi demonstrado que o desenvolvimento de IBD é suprimido em animais que não possuem o gene que codifica a citocina IL-23 (Yen *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram que existe uma estreita correlação entre mutações no gene *ATG16L1* e a susceptibilidade a doença de Crohn (Goyette *et al.*, 2007; Hampe *et al.*, 2007; Hugot *et al.*, 2001). A proteína ATG16L1 é expressa no cólon e no intestino delgado, principalmente em células epiteliais intestinais (Fujita *et al.*, 2008). A ATG16L1 é um componente do complexo protéico essencial para a autofagia celular (Mizushima *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2004), o qual é fundamental para a degradação de componentes citoplasmáticos como, por exemplo, organelas (Gionchetti *et al.*, 2003). O processo de

autofagia também é utilizado pela célula para a destruição e processamento de bactérias dentro dos fagolisossomos (Naser *et al.*, 2012). Desta forma, se o mecanismo de autofagia estiver alterado, a célula pode entrar em necrose e causar lesões e ulcerações no TGI, que em conjunto poderia ser uma condição inicial das IBD.

Estudos recentes têm apontado para o gene que codifica a proteína NALP3 como um mecanismo que induz a susceptibilidade as IBD (Villani *et al.*, 2009b; Zaki *et al.*, 2011). A proteína NALP3, juntamente com a proteína adaptadora associada à apoptose (ASC) e à enzima caspase-1 originam o inflamossoma, que quando ativado, promove a clivagem da citocina pró-IL-1 β inativa para formar a IL-1 β biologicamente ativa (Martinon *et al.*, 2002; Martinon *et al.*, 2005). As mutações que ocorrem no gene que codifica a proteína NALP3 têm sido associadas ao surgimento de inúmeras doenças auto-imunes (Aganna *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2011; Kastner, 2005), caracterizadas por episódios recorrentes de febre e inflamações na camada serosa do intestino (Agostini *et al.*, 2004). Há evidências sobre o aumento na expressão de NALP3 em pacientes com doença de Crohn quando comparado a pacientes saudáveis (Villani *et al.*, 2009a), o que foi também demonstrado em modelos experimentais de inflamação intestinal em roedores, nos quais se observou que a expressão de NALP3 aumentou de 9,3 vezes na colite aguda induzida pelo TNBS e de 2,7 vezes na fase crônica do modelo (Villani *et al.*, 2009a).

1.5.2 A microbiota intestinal

Os microorganismos da microbiota intestinal representam uma importante fonte de ativação das células do sistema imune entérico. O desenvolvimento da reatividade imunológica a bactérias entéricas é um processo fisiológico e fundamental para criar um estado de tolerância vitalícia contra estes microorganismos e o desenvolvimento do sistema imune maduro no TGI em humanos (Mackie *et al.*, 1999; Olszak *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos apontam para a “hipótese da higiene”, no qual tem sido mostrado que condições melhores de vida na infância, onde ocorre menor contato com bactérias e vírus, estão diretamente associadas ao aumento no risco de apresentar doenças auto-imunes (von Mutius, 2007), e também estão associadas a um risco maior de apresentar alguma IBD na fase adulta (Lopez-Serrano *et al.*, 2010).

A composição da microbiota intestinal é totalmente manipulável e influenciável por diferentes fatores, como por exemplo, através do parto vaginal ou cesariano, pela amamentação no peito ou mamadeira, por fatores genéticos e/ou fatores ambientais (Morelli,

2008). Evidências têm demonstrado que a microbiota comensal intestinal e a resposta imunológica do hospedeiro exercem um papel central na gênese das IBD (Xavier *et al.*, 2007), uma vez que animais que não desenvolveram tolerância imunológica na infância, devido à ausência total de microorganismos (do inglês, *germ-free*), apresentam maior susceptibilidade às inflamações intestinais. Por outro lado, animais que apresentam microbiota intestinal normal, mas estão livres de microorganismos patogênicos (do inglês, *specific pathogen free*, SPF) são menos susceptíveis à inflamação intestinal (Olszak *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante da microbiota intestinal é seu papel na estimulação de células de Paneth a liberar um peptídeo antibacteriano denominado defensina (Salzman *et al.*, 2010; Selsted *et al.*, 1992). A defensina atua contra bactérias patogênicas, como a *Salmonella sp.*, e também controla o crescimento de bactérias intestinais como um todo, contribuindo assim para a homeostase intestinal (Salzman *et al.*, 2010). O mecanismo de controle da homeostase intestinal entre micróbios entéricos e organismo do hospedeiro parece ser fundamental na patogênese das IBD, uma vez que a produção de defensina está diminuída em pacientes com doença de Crohn, o que provoca redução na atividade antimicrobiana na porção colônica destes pacientes (Nuding *et al.*, 2007; Wehkamp *et al.*, 2005). A teoria da quebra da homeostase intestinal como causa das inflamações intestinais é embasada pela utilização de probióticos (organismos vivos que exercem ação benéfica sobre o balanço da microbiota intestinal), os quais têm demonstrado possuir a capacidade de aumentar a produção da interleucina anti-inflamatória IL-10 e diminuir a produção de IFN- γ de linfócitos Th1 (Adam *et al.*, 2006; Gionchetti *et al.*, 2003).

1.5.3 O sistema imune

Atualmente, está bem estabelecida a importância da barreira epitelial na predisposição às IBD, uma vez que a permeabilidade intestinal é anormal em pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa (Buhner *et al.*, 2006; Gionchetti *et al.*, 2003; Irvine *et al.*, 2000; Soderholm *et al.*, 2002), o que parece ter relevância na ativação da resposta imune (Fiocchi, 2009; Jernberg *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2011). De fato, a ruptura da barreira epitelial do intestino pode conferir ativação excessiva de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T (Martin *et al.*, 2006). Ademais, pacientes portadores de IBD apresentam alterações na expressão de TLR4, os

quais desempenham papel fundamental na ativação da resposta imune (Cario *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2011), o que poderia resultar na ativação desenfreada do sistema imune inato e consequente dano tecidual (Podolsky, 2002a).

Como observado anteriormente, o reconhecimento e o processamento de antígenos por macrófagos e células dendríticas são desregulados em pacientes com IBD (Cario *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2011). Estudos conduzidos *in vitro* têm mostrado que células dendríticas podem reconhecer microorganismos da microbiota e desencadear a ativação da resposta imune adaptativa, mais especificamente promoveram um direcionamento do linfócito T naive, para os fenótipos Th1, Th2 e Th17 (Figura 4) (Franchimont *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2004). Em pacientes com doença de Crohn há predomínio da resposta dos fenótipos Th1 e Th17 caracterizada pela produção de IFN- γ , IL-12 e IL-17 (Fujino *et al.*, 2003; Fuss *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2008). Em contrapartida, pacientes com colite ulcerativa há predomínio de linfócitos T CD4⁺ com fenótipos Th2 e Th17, caracterizada pela alta produção de IL-4 e IL-17 (Fujino *et al.*, 2003; Fuss *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008), sugerindo que as duas doenças, embora similares, apresentam características imunologicamente distintas.

A hipótese de que as IBD sejam causadas pela ativação desenfreada de linfócitos T é baseada no fato da maioria dos antígenos presentes na mucosa intestinal falharem em induzir respostas efetoras através do desenvolvimento de “tolerância oral” (Strober *et al.*, 1998). A tolerância oral é um fenômeno de homeostase que ocorre entre a microbiota intestinal e o sistema imune, resultando em resposta imunológica auto-limitada frente a antígenos intestinais (Strober *et al.*, 1998). A idéia de que o desenvolvimento inadequado da tolerância oral vitalícia pode levar à ativação descontrolada de células T, que passam a não reconhecer de maneira limitada os antígenos presentes no lúmen intestinal, é embasado pelos estudos mostrando que animais imunodeficientes desenvolvem inflamação intestinal após serem inoculados com células T (CD45RB^{high}) ativadas (Powrie *et al.*, 1994; Powrie *et al.*, 1993).

A subpopulação de linfócitos T CD4⁺ que expressam o fator de transcrição FoxP3 (do inglês, *forkhead box p3*) denominados linfócitos Treg, apresentam papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal por liberar principalmente citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF- β (Figura 4) (Uhlir *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007). Estudos recentes demonstraram que pacientes com doença de Crohn ou com colite ulcerativa apresentam alterações na frequência de linfócitos

T CD4⁺ FoxP3⁺ ativados durante o decurso da doença, sugerindo assim uma possível correlação entre a severidade clínica da doença e as células Treg periféricas (Saruta *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2006). Corroborando essa hipótese, animais com deleção do gene responsável pela expressão da IL-10 ou do TGF- β , citocinas liberadas principalmente pelas células Treg, desenvolvem inflamação intestinal de forma espontânea (Gorelik *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 1993).

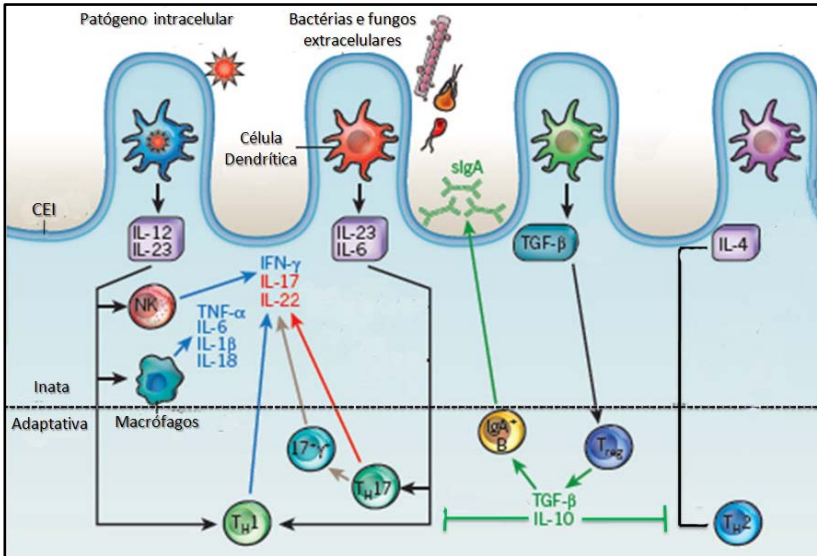


Figura 4: O sistema imune no intestino. A primeira barreira frente a antígenos presentes no lúmen são as células epiteliais intestinais (CEI) que, juntamente com o muco, formam a proteção mecânica frente aos microorganismos. As CEI e as células dendríticas reconhecem distintos agentes infecciosos e liberam diferentes mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-12, IL-23 e IL-6. A população de células imunes residentes [macrófagos, células dendríticas e células exterminadoras naturais (NK)] podem rapidamente produzir e liberar mediadores inflamatórios como IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-18; entre outras, para impedir o crescimento dos microorganismos e ativação celular até que a resposta adaptativa tenha sido gerada. Os linfócitos podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e Treg, e orquestrar uma resposta imune com especificidade. Na doença de Crohn há predomínio da resposta do fenótipo Th1 e Th17, enquanto que na colite ulcerativa há um direcionamento para o fenótipo Th2 e Th17. Adaptado de Maloy (2004)

1.5.4 Fatores ambientais

A diferença na incidência das IBD ao redor do mundo tem apontado a importância dos fatores ambientais no surgimento e na perpetuação destas doenças. Os países reconhecidamente industrializados, com a maioria da população vivendo em cidades, como os Estados Unidos da América (EUA) e os países do norte da Europa, apresentam altos níveis de prevalência de IBD. Contudo, nos últimos anos o índice de industrialização também vem crescendo exponencialmente em países asiáticos e na América do Sul, e o diagnóstico das IBD vem acompanhando este crescimento (Boyko *et al.*, 1988; Cottone *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 2010). Um indício desta mudança sócio-comportamental na prevalência das IBD é o fato de que o decurso clínico da colite ulcerativa e da doença de Crohn ser mais brando e as complicações menores em países em desenvolvimento (Ahuja *et al.*, 2010; Hilmi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010), similarmente ao que ocorria nos primeiros casos de IBD nos EUA e Europa, mostrando que parece haver uma correlação direta entre a agressividade das inflamações intestinais com o nível de industrialização de cada país.

A industrialização de alimentos associada às mudanças nos hábitos das pessoas através da melhoria das condições de saneamento básico, água tratada, vacinação, diminuição de parasitoses e utilização de medicamentos, entre outros, são fatores importantes que participam ativamente da formação da população da microbiota intestinal, os quais posteriormente entram em contato com o sistema imune ao longo da vida (Jernberg *et al.*, 2010; Muegge *et al.*, 2011; Weinstock, 2012). Um exemplo é a utilização de antibióticos que, mesmo por um curto período de tempo pode levar a alterações importantes na microbiota intestinal que persistem por anos, e quando são administrados em crianças onde não houve ainda a maturação completa do sistema imune intestinal, pode aumentar o risco de surgimento de IBD na adolescência ou na fase adulta (Jernberg *et al.*, 2010; Shaw *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2010).

O efeito do tabagismo do ponto de vista clínico agrava o estado de saúde dos pacientes com doença de Crohn, o qual parece ocasionar a indução de surtos, que como consequência acarreta em aumento nas complicações da doença, com maior incidência de hospitalizações e (Birrenbach *et al.*, 2004; Cottone *et al.*, 1994). Por outro lado, o tabagismo pode trazer efeitos benéficos para os pacientes com colite ulcerativa, reduzindo as hospitalizações em relação aos pacientes com colite ulcerativa não-fumantes (Boyko *et al.*, 1988). Os principais argumentos que tentam explicar este efeito discrepante sobre as duas doenças vêm do papel da nicotina, que atua sobre o sistema imune, na

regulação da motilidade, permeabilidade, fluxo sanguíneo do TGI e na produção de muco (Birrenbach *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2000). Corroborando tal discrepância, o efeito do tabagismo vem de encontro com o papel distinto do sistema imune sobre a gênese das IBD, e aponta de maneira clara que há diferenças na patogênese das duas maiores formas de inflamação intestinal.

1.6 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E SUA RESOLUÇÃO

A evolução proporcionou uma importante aliada contra infecções, cânceres e lesões teciduais, denominada **inflamação**, a qual foi primeiramente descrita em papiros pelos Egípcios por volta de 3200-2780 a.C., e posteriormente por Aulus Cornelius Celsus (30 a.C. a 38 d.C.), o qual descreveu os quatro sinais principais da inflamação: calor, rubor, dor e edema. Posteriormente, o médico grego Galeno (130 d.C. a 200 d.C.), adicionou o quinto sinal da inflamação, a perda da função tecidual (Consolaro, 2009).

Primeiramente, a inflamação foi considerada como uma doença isolada e com consequências maléficas ao paciente. Contudo, este conceito passou por mudanças ao longo do tempo, e desde 1800 foi postulado que a inflamação é um processo ativo e, portanto, benéfico quando decorrente de algum dano ou lesão tecidual. A inflamação aguda ocorre através de mecanismos orquestrados por diferentes mediadores químicos que, por si só, ou em cooperação, desencadeiam alterações no calibre dos pequenos vasos sanguíneos, atraem células que estão na circulação sistêmica a migrar ao local da lesão, modificam e estimulam células para que se tornem altamente responsivas a antígenos, induzem a proliferação celular, sensibilizam neurônios aferentes primários a responder mais vigorosamente a estímulos, desencadeando a sensação dolorosa (Larsen *et al.*, 1983; Ryan *et al.*, 1977). Todos os eventos anteriormente descritos culminam na gênese dos cinco sinais cardinais da inflamação aguda previamente descrita por Celsius e Galeno.

A inflamação ocorre pelo fato de haver a necessidade de controlar o agente agressor e posteriormente induzir o restabelecimento da área lesionada, recompondo assim o tecido o mais próximo possível das condições anatômicas normais e devolvendo as funções fisiológicas (Consolaro, 2009). De maneira geral, a inflamação inicia-se minutos após o dano tecidual, e se o processo ocorrer de forma adequada, ela se resolve em poucas horas, naturalmente seguida pela cura caracterizada pela reparação e/ou regeneração tecidual, como observado na figura 5A

(Schmid-Schonbein, 2006; Serhan *et al.*, 2008). Se houver falhas em mecanismos endógenos de resolução da resposta inflamatória, poderão ocorrer modificações de intensidade e nas características da inflamação, podendo estabelecer assim a cronicidade que pode persistir por semanas, meses, ou até anos, como observado na figura 5B (Schmid-Schonbein, 2006; Serhan *et al.*, 2008).

A inflamação pode ser gerada por agentes físicos, químicos e biológicos, sendo que os mastócitos parecem ser um dos responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória aguda; os mastócitos são encontrados na pele, no TGI e nos pulmões e, quando ativados liberam grânulos contendo diferentes mediadores químicos pré-formados, como a serotonina, histamina, leucotrienos e citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, que contribuem para os eventos vasculares do processo inflamatório agudo (para Revisão ver (Larsen *et al.*, 1983). Outros candidatos que contribuem para o início da inflamação são os neuropeptídeos liberados pelas terminações livres de neurônios aferentes primários. Estes neurônios são ativados por estímulos nocivos ou potencialmente nocivos e liberam, por exemplo, a substância P, neuropeptídeo Y e o peptídeo intestinal vasoativo, dentre outros, que atuam nos vasos, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, culminando na gênese do edema e favorecendo a migração de células inflamatórias (para Revisão ver (Larsen *et al.*, 1983; Ryan *et al.*, 1977).

Contribuindo para a manutenção da inflamação aguda, outros mediadores são produzidos e liberados por células e tecidos no local da lesão, como por exemplo, os derivados do ácido araquidônico. O ácido araquidônico pode sofrer ação da enzima ciclooxigenase (COX) e da enzima lipoxigenase (LOX), dando origem as prostaglandinas (PG), ao tromboxano A₂ e aos leucotrienos (para Revisão ver (Smith *et al.*, 2000). Estes mediadores lipídicos sensibilizam neurônios aferentes primários responsáveis por conduzir o estímulo doloroso ao sistema nervoso central e contribuem também para a manutenção da vasodilatação [para Revisão (Moalem *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2000)]. Os leucotrienos, juntamente com citocinas pró-inflamatórias, induzem a expressão de moléculas de adesão no endotélio de pequenos vasos, bem como na superfície das células inflamatórias, desencadeando a adesão e a transmigração destas últimas da luz dos vasos aos tecidos (Dahlen *et al.*, 1981).

Durante a inflamação aguda ocorre recrutamento inicial rápido de neutrófilos para o local da lesão. Este evento normalmente ocorre em minutos a horas após o início da lesão tecidual, sendo que com o passar do tempo a população de neutrófilos decresce e vai sendo substituída

por monócitos que (Figura 5A e B) (Delves *et al.*, 2000; Vivier *et al.*, 2005), através de estimulação por mediadores químicos, se diferenciam em macrófagos ativos e passam a liberar citocinas como IFN- γ , IL-6 e IL-8, aumentando sua capacidade fagocítica contra antígenos e recrutando novas células ao local da lesão [para Revisão (Nathan, 2002)]. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas apresentam os antígenos fagocitados aos linfócitos T, que produzem uma resposta mais específica e de maior duração contra o agente causador da lesão (para Revisão ver (Abbas *et al.*, 1996; Nathan, 2002; Steinman *et al.*, 2007). Se ocorrer o controle efetivo do causador da lesão e os eventos vasculares e celulares for sendo suprimidos, os sinais cardinais da inflamação tendem a desaparecer. O processo ativo, organizado e orquestrado que caracteriza estes eventos foi denominado de *resolução* (Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008; Serhan *et al.*, 2005).

A resolução da inflamação é considerada atualmente como um processo ativo e finamente controlado, com liberação de mediadores antiinflamatórios e substâncias que são denominadas de pró-resolutivas. A finalidade da liberação destes mediadores ocorre devido à necessidade de redução no calibre dos vasos, alteração da população e características celulares para um estado antiinflamatório, drenagem de células que migraram para espaços extravasculares e para a limpeza de células mortas, para que o tecido retome sua função normal (Mantovani *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2006; Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008; Serhan *et al.*, 2005). Há uma gama de mediadores envolvidos no estímulo e perpetuação do processo inflamatório, porém o controle ativo deste processo, envolvendo a produção e a liberação de mediadores responsáveis pela resolução é atual e relevante. Neste contexto vem se demonstrando que mediadores lipídicos derivados dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6 são sintetizados e liberados no decorrer do processo inflamatório, contribuindo ativamente para sua resolução (Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008; Serhan *et al.*, 2005).

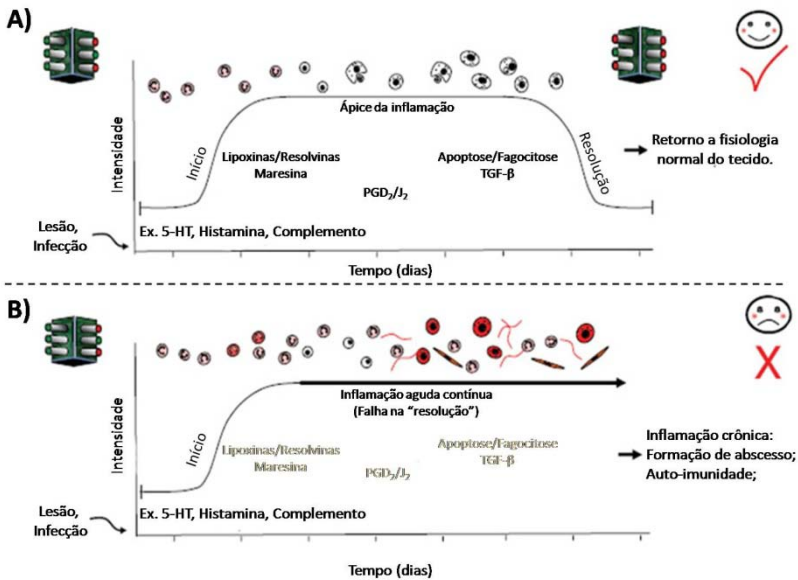


Figura 5: Esquema ilustrativo sobre o processo de inflamação agudo e crônico e a resolução. (A) Minutos após a lesão tecidual ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como serotonina (5-HT), histamina, proteínas do sistema complemento, dentre outros, que em conjunto tem ação nos vasos e na quimioatração de células. As primeiras células a migrar são os neutrófilos seguidos de monócitos/macrófagos e linfócitos que controlam e destroem o agente agressor, onde começa a ser induzido o processo de resolução, através da liberação de lipoxinas, resolvinas, maresina, prostaglandinas D₂/I₂, TGF-β, que induzem o processo de apoptose e fagocitose de células e debrís, ocorrendo a completa resolução da inflamação e recuperação do processo fisiológico normal. (B) Através da incapacidade de controle do agente agressor pelas células inflamatórias, ou por falhas em mecanismos endógenos de resolução da resposta inflamatória, a inflamação pode persistir e se tornara crônica. **Fonte:** Adaptado de Serhan (2007).

O ácido graxo poliinsaturado ômega-6, também conhecido como ácido linoléico possui 18 carbonos e duas dupla ligações (C18:2), é um ácido graxo essencial, ou seja, não é sintetizado endogenamente em humanos e deve ser adquirido pela dieta. O ácido linoléico é encontrado em óleos de girassol, soja, milho e açafrão (Calder, 1998; Li *et al.*, 1999; Nettleton, 1991) e endogenamente é biotransformado a

ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um constituinte de membrana celular, e como anteriormente descrito, é o precursor de inúmeros mediadores pró-inflamatórios derivados da ação das enzimas COX e LOX, como as prostaglandinas e os leucotrienos (Scher *et al.*, 2009). Porém, evidências têm apontado um papel dual do ácido araquidônico no processo inflamatório; durante a fase de resolução da inflamação o ácido araquidônico passa a dar origem a metabólitos com características antiinflamatórias e pró-resolutivas, tais como a lipoxina A₄ (LXA₄), lipoxina B₄ (LXB₄) e as prostaglandinas D₂/J₂ (Petasis *et al.*, 2005; Samuelsson *et al.*, 1987; Serhan *et al.*, 1995).

As lipoxinas LXA₄ e LXB₄ apresentam características de promoverem a resolução do processo inflamatório, principalmente por diminuir a migração de neutrófilos (Serhan *et al.*, 1995), reduzir a permeabilidade vascular (Takano *et al.*, 1998) e aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos (Godson *et al.*, 2000). As lipoxinas atuam em receptores ligados a proteínas G denominados ALX/FPR2 (do inglês, *lipoxin A4 receptor*) e inibem a geração de peroxinitrito, IL-8 e a ativação de fatores de transcrição NF-κB e AP-1 em neutrófilos, monócitos e linfócitos (Jozsef *et al.*, 2002). Os receptores ALX estão presentes em células epiteliais intestinais, indicando que as lipoxinas poderiam apresentar alguma função sobre a homeostase do TGI (Kucharzik *et al.*, 2003).

O ácido araquidônico, através da enzima COX também origina a prostaglandina D₂ (PGD₂), que pode sofrer desidratação e formar prostaglandinas biologicamente ativas da série J, denominadas de PGJ₂, Δ^{12,14}-PGJ₂, 15-deoxi-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂) (Ricote *et al.*, 1998; Scher *et al.*, 2009). A 15d-PGJ₂ apresenta potente ação anti-inflamatória sendo capaz de inibir a migração de neutrófilos, principalmente pelo seu efeito sobre a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas, sendo que estes efeitos parecem estar relacionados com a ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma-gamma (PPAR-γ), (; Scher *et al.*, 2009), além da inibição do fator de transcrição NF-κB (Lawrence *et al.*, 2001). Assim, é sugerido que as prostaglandinas não participam somente da iniciação do processo inflamatório, mas também contribuem ativamente para a sua resolução.

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, conhecidos também por ácido α-linolênico apresenta 18 carbonos e três dupla ligações (C18:2), ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) e ácido docosahexanoenóico (DHA) (C20:6). A exemplo dos ômega-6, estes também são essenciais, sendo adquiridos diretamente da dieta. Os ácidos graxos poliinsaturados

ômega-3, principalmente o α -linolênico, são encontrados no óleo de linhaça, canola, soja e noz (Li *et al.*, 1999; Nettleton, 1991). O α -linolênico é convertido endogenamente em humanos, em órgãos como fígado, cérebro e tecido adiposo, dando origem aos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3: EPA e DHA. Em derivados de animais marinhos como o atum, arenque, bacalhau, sardinha e salmão há elevados níveis de ômega-3 EPA e DHA pré-formados (Li *et al.*, 1999; Nettleton, 1991).

O EPA e o DHA apresentam efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular (Kinsella *et al.*, 1990), câncer (Leitzmann *et al.*, 2004), melhoram a atividade cerebral de pacientes com doença de Alzheimer (Connor *et al.*, 2007) e o escore clínico de pacientes com IBD (Lorenz *et al.*, 1989; Simopoulos, 1999). Estudos recentes levantaram a hipótese de que os efeitos benéficos do DHA e EPA sobre diferentes doenças poderiam ser devido à sua conversão em derivados biologicamente ativos. Através da utilização de modelos experimentais de inflamação, aliada a novas tecnologias em lipidômica e bioinformática, diversos mediadores lipídicos derivados do DHA e do EPA foram identificados, sendo denominados de resolvinas, protectinas e a maresina; além dos derivados pró-resolutivos do ômega-6 (ácido araquidônico), como as lipoxinas (Figura 6) (Arita *et al.*, 2005a; Kohli *et al.*, 2009; Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 1995; Serhan *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007).

O EPA dá origem à família das resolvinas da série E (RvE), enquanto que o DHA dá origem à família das resolvinas da série D (RvD) (Serhan, 2007; Serhan *et al.*, 2004). As resolvinas são produtos endógenos biossintetizados na fase de resolução do processo inflamatório. As resolvinas da série E foram as primeiras a serem identificadas e atualmente existem três subtipos, RvE₁ a RvE₃ (Isobe *et al.*, 2012; Serhan *et al.*, 2004; Serhan *et al.*, 2002). Seus efeitos estão relacionados com a inibição da migração de leucócitos PMN/neutrófilos, redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como aumentam a atividade fagocítica dos macrófagos, o que ajuda na “limpeza” tecidual (Campbell *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2009; Tjonahen *et al.*, 2006). O efeito benéfico da RvE₁ foi atribuído à sua interação com o receptor ligado a proteína G, denominado ChemR23 (Arita *et al.*, 2005a)

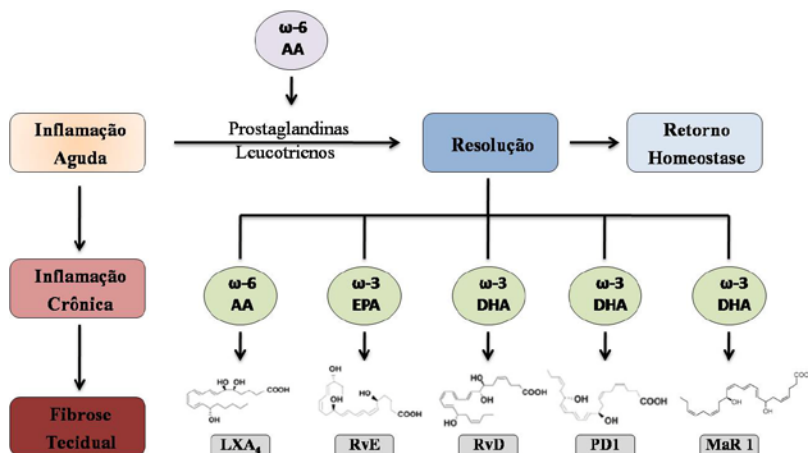


Figura 6: A inflamação aguda e mediadores pró-resolução. Na inflamação aguda há liberação de mediadores inflamatórios, tais como as prostaglandinas (PGE_2) e leucotrienos (LTB_4). No processo fisiológico, após ser controlado o agente causador da inflamação, ocorre a diminuição na produção de PGE_2 e LTB_4 e inicia-se a síntese de mediadores pró-resolução como, por exemplo, o derivado do ômega-6 (ácido araquidônico), lipoxina A_4 (LXA_4), derivados do ômega-3 EPA ($RvE_{1,3}$) e produtos do metabolismo do ômega-3 DHA resolvinas da série D (RvD_{1-5}), protectinas (PD1) e maresina (MaR1), afim de retornar a homeostase tecidual. Se este processo não ocorrer, a inflamação pode se tornar crônica e causar fibrose tecidual, e em alguns casos perda da função. **Fonte:** Adaptado de Serhan (2005)

A família das resolvinas derivadas do DHA possuem até o momento 5 membros já identificados, os quais são sintetizados a partir das enzimas lipooxigenases (LOX) (Chiang *et al.*, 2012a; Sun *et al.*, 2007), sendo denominadas de RvD_1 à RvD_5 . Evidências recentes também indicam que as $RvDs$ possuem potente ação anti-inflamatória e imunoreguladora; sendo que os efeitos benéficos das $RvDs$ parecem estar diretamente ligados ao bloqueio da produção de mediadores inflamatórios, inibição da migração de células inflamatórias ao local da lesão e aumento na atividade fagocítica de macrófagos (Duffield *et al.*,

2006; Hong *et al.*, 2003; Serhan *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2002; Serhan *et al.*, 2005; Spite *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007).

A enzima COX-2, responsável pela síntese de mediadores pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos, quando acetilada pelo ácido acetilsalicílico passa a formar isômeros da LXA₄ e B₄, denominados 15-*epi*-LXA₄ e 15-*epi*-LXB₄ (Serhan *et al.*, 2000). Além disso, a COX-2 acetilada pelo ácido acetilsalicílico também utiliza como substrato do DHA, e gera os produtos da síntese lipídica denominados de resolvinas formadas pela aspirina, do inglês *aspirin-triggered resolvins* (AT-Rvs) (Serhan, 2007; Serhan *et al.*, 2004). Assim como seus isômeros, as 15-*epi*-LXs e AT-Rvs apresentam potente ação anti-inflamatória e pró-resolução em modelos experimentais de artrite reumatóide (), asma (Levy *et al.*, 2003; Rogerio *et al.*, 2012) inflamação intestinal (Bento *et al.*, 2011) e câncer (Claria *et al.*, 1996).

Recentemente, foi demonstrado em macrófagos uma nova rota de transformação do ácido graxo DHA, que pode ser convertido através de reação de 14-lipoxigenação em intermediários 14S-HpDHA, culminando com a produção do ácido 7,14-dihidroxidocosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaenóico, denominado mediador de macrófagos na resolução da inflamação (Maresina 1, MaR1) (Serhan *et al.*, 2009). Estudos posteriores demonstraram que a MaR1 foi efetiva em reduzir a migração de PMN para a cavidade peritoneal, após indução de peritonite por zimozano, bem como aumentou a fagocitose de neutrófilos apoptóticos (Serhan *et al.*, 2009). Além de seus efeitos pró-resolutivos na inflamação, a MaR1 parece exercer um papel importante no reparo e na regeneração tecidual após lesão, uma vez que foi demonstrado aumento da biosíntese de MaR1 após a lesão tecidual em planárias, bem como o encurtamento no intervalo de tempo requerido para a regeneração tecidual da planária após a administração de MaR1 (Serhan *et al.*, 2012a).

1.7 TRATAMENTO DAS IBD

Os tratamentos farmacológicos convencionais para as IBD visam induzir a remissão e manter a doença latente, evitando complicações mais graves. A primeira opção para o tratamento das IBD consideradas de grau *leve* e para a manutenção da remissão são os aminossalicilatos, como a mesalazina e a sulfassalazina (Ghosh *et al.*, 2000). Os pacientes que não respondem ao tratamento com os aminossalicilatos devem ser tratados com corticóides a fim de induzir a remissão (Korzenik *et al.*, 2006); contudo, este tratamento não deve ser

utilizado como terapia de manutenção devido aos efeitos colaterais dos corticóides, como a síndrome de *Cushing* iatrogênico, hipertensão, diabetes mellitus, osteoporose, catarata e glaucoma (Lichtenstein *et al.*, 2006; Marshall *et al.*, 1997). Os imunossuppressores são importantes ferramentas terapêuticas para o controle das IBD, mas não são efetivos em induzir rapidamente a remissão devido às suas ações serem principalmente exercidas em nível transcricional, sendo conseqüentemente mais lentas. A cirurgia é necessária para tratar obstruções, perfuração no cólon, sangramento retal e intoxicação durante o tratamento, onde há a retirada de porções do intestino (Berg *et al.*, 2002).

O avanço recente das terapias biológicas com os anticorpos monoclonais visa buscar a cicatrização da mucosa lesionada, o que não é o objetivo terapêutico convencional observado com os aminossalicilatos, imunossuppressores, corticóides e antibióticos, que objetivam o alcance da remissão e do controle da doença, mas não a completa resolução do quadro inflamatório (Korzenik *et al.*, 2006). Além disso, a maior dificuldade para o tratamento das IBD são os pacientes que não respondem às terapias acima citadas, bem como os diversos efeitos colaterais que muitas vezes inviabilizam a utilização contínua desses medicamentos. Com a finalidade de se buscar novas alternativas terapêuticas que possam apresentar menos efeitos colaterais e resultados efetivos, vem se abordando a utilização de componentes da dieta para o tratamento das IBD. Neste contexto, o DHA e o EPA, bem como seus derivados vêm apresentando importante eficácia sobre as inflamações intestinais (Belluzzi *et al.*, 1996; Bento *et al.*, 2011; Calder, 2008).

O interesse nos efeitos benéficos de uma dieta rica com ômega-3 foi estimulado pelo estudo em esquimós da Groelândia (Bang *et al.*, 1976; Dyerberg *et al.*, 1975), que apresentam alta expectativa de vida e tem sua dieta composta basicamente de proteínas e gorduras, com ingestão diária acima de 10 g de ômega-3, e poucos carboidratos comparados a uma dieta comum (Kromann *et al.*, 1980). Posteriormente, foi demonstrado por Leaf e Wever (1988) que uma dieta rica em ômega-3 proporciona efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, sugerindo que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 são os responsáveis pela alta longevidade dos povos esquimós.

Além dos efeitos vasculares, foi demonstrado ainda que uma dieta enriquecida com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 também apresenta atividade anti-inflamatória (Lee *et al.*, 1985). Um estudo clínico duplo-cego avaliou o efeito da suplementação da dieta com óleo

de peixe contendo aproximadamente 3 g de ômega-3 por dia em pacientes com IBD. Os autores demonstraram que os pacientes do grupo tratado com ômega-3 apresentaram melhora significativa no quadro clínico da colite ulcerativa, embora não tenha sido observado melhora em pacientes com doença de Crohn (Lorenz *et al.*, 1989). Este estudo foi complementado por Aslan e colaboradores (1992), no qual foi concluído que a suplementação da dieta com óleo de peixe apresentou efeito moderado na melhora clínica de pacientes com colite ulcerativa.

Através da utilização do modelo experimental de inflamação intestinal induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico (TNBS) em roedores, Vilaseca e colaboradores () demonstraram que uma dieta rica em ômega-3 pode prevenir a progressão da inflamação, principalmente através da redução na formação de tromboxano. Além disso, os autores demonstraram que em uma dieta rica em ômega-6 ocorrem picos de formação de PGE₂ e LTB₄ após a administração de TNBS, além de contínua síntese de tromboxano, o que, interessantemente não ocorreu em animais que receberam ômega-3. Corroborando esses dados, Shoda e colaboradores () demonstraram que a inflamação intestinal induzida pelo TNBS foi significativamente recuperada pelo tratamento com óleo de perilla, extraído da planta *Perilla frutescens* e conhecida como “semente da saúde”, a qual é utilizada por povos orientais a mais de 5000 mil anos e conhecida por apresentar concentração elevada de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.

A administração de cápsulas de dissolução entérica contendo óleo de peixe, o qual equivale a quase 3 g diárias da mistura de DHA e EPA, foi efetiva em manter a remissão de pacientes com doença de Crohn. Após um ano da ingestão diária das cápsulas, 59% dos pacientes permaneceram em remissão em comparação com os 26% do grupo placebo (Belluzzi *et al.*, 1996). A suplementação com óleo de peixe (Camuesco *et al.*, 2006), bem como com DHA (Cho *et al.*, 2011) também foi efetiva em reduzir a severidade da colite experimental induzida pelo sulfato de dextrana sódica (DSS), sendo este efeito relacionado à redução na expressão de mediadores pró-inflamatórios no tecido colônico.

A pesquisa com os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 avançou consideravelmente a partir do ano 2000, quando foram identificados e isolados os derivados do EPA e DHA. Como anteriormente citado, a partir do EPA foram identificadas as RvE₁-RvE₃ (Isobe *et al.*, 2012; Serhan *et al.*, 2004; Serhan *et al.*, 2002), e do DHA as RvD₁-RvD₅, as neuroprotectinas D₁, protectinas D₁ e mais recentemente a maresina (Chiang *et al.*, 2012a; Hong *et al.*, 2003;

Marcheselli *et al.*, 2003; Serhan *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007). Além disso, os isômeros sintetizados a partir da acetilação da enzima COX-2 pelo ácido acetilsalicílico, como as 15-*epi*-lipoxinas, derivadas do AA (Takano *et al.*, 1997) e as derivadas do DHA, as AT-resolvinas (Serhan *et al.*, 2002).

O efeito benéfico das RvEs vêm sendo descrito em diferentes modelos animais de inflamação intestinal. No modelo de colite induzida pelo TNBS, o tratamento com RvE₁ aumentou a sobrevivência dos animais e diminuiu a perda de peso (). Ademais, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a AT-RvD₁ apresentou efeito antiinflamatório na colite induzida pelo DSS, protegendo os animais da perda de peso corporal e do dano ao cólon, sendo esses efeitos dependentes da ativação do receptor de lipoxina A₄ (ALX) (Bento *et al.*, 2011). Além disso, a AT-RvD₁ e a RvD₂ também apresentaram potente efeito antiinflamatório na colite induzida pelo TNBS em camundongos ().

Diante do exposto, pôde-se observar os efeitos benéficos do ômega-3 sobre a colite ulcerativa e a doença de Crohn em humanos, bem como o papel antiinflamatório das RvDs e RvEs quando avaliadas em modelos murinos de inflamação intestinal. Sendo assim, nossa hipótese é que o processo de resolução desencadeado pela MaR1 também poderia atenuar a inflamação intestinal em roedores. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos pelo qual a MaR1 apresenta ação antiinflamatória e pró-resolutivas. Assim, é extremamente importante que se avalie o efeito deste mediador lipídico derivado do DHA sobre modelos animais de inflamação intestinal, bem como tentar elucidar o mecanismo de ação pelo qual a MaR1 exerce seus efeitos antiinflamatórios. Estes estudos também são promissores e relevantes no campo das inflamações intestinais, uma vez que as IBD apresentam alta prevalência mundial e os tratamentos atualmente disponíveis muitas vezes são ineficientes e apresentam em alguns casos custos muito elevados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do mediador lipídico derivado do ômega-3, MaR1, em modelos experimentais de colite aguda em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da MaR1 nos modelos experimentais de colite aguda com um ou dois ciclos de DSS em camundongos;
- Analisar o efeito da MaR1 no modelo experimental de colite aguda induzida pelo TNBS em camundongos;
- Investigar o papel da MaR1 sobre a produção de mediadores inflamatórios ao final do primeiro e do segundo ciclo da colite induzida pelo DSS em camundongos;
- Avaliar o possível mecanismo de ação da MaR1 na colite aguda induzida pelo DSS em camundongos;
- Avaliar o possível mecanismo de ação da MaR1 em macrófagos derivados da medula óssea e estimulados com lipopolissacarídeo;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem CD1 machos pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (06:00-18:00). Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC (CEUA, processo número PP00496).

3.2 Colite experimental induzida pelo DSS

A colite experimental induzida pelo DSS foi realizada através da administração de sulfato sódico de dextrana (DSS, de peso molecular 36,000-50,000, obtido da ICN Biomedicals, Solon, OH, EUA) na água de beber. A indução da colite aguda (único ciclo com DSS) foi realizada através da administração de DSS 2% *ad libitum*, diluído na água de beber dos animais por um período de 5 dias (um ciclo). No 5º dia o DSS foi substituído por água filtrada por mais dois dias, sendo que no final do 7º dia os animais foram sacrificados (ver esquema de indução de colite na figura 7A). Os animais controle receberam somente água no período de sete dias. Durante a fase aguda de um ciclo os animais foram tratados com MaR1 (0,1; 0,3 e 1 µg/animal) pela via endovenosa (e.v.) ocular, uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 7. A colite aguda (dois ciclos com DSS) foi induzida pela administração de DSS 2% *ad libitum* por 5 dias (primeiro ciclo), sendo que no final do 5º dia o DSS foi substituído por água filtrada por 10 dias e no 15º dia os animais receberam um novo ciclo de DSS 2% por mais 5 dias (segundo ciclo). No 20º dia o DSS foi substituído por água filtrada por mais dois dias e no final do 22º dia os animais foram eutanasiados (ver esquema de indução de colite na figura 7B). Os animais controles receberam somente água nos 22 dias de experimentação. No protocolo com dois ciclos de DSS, a MaR1 (0,3 µg/animal) foi administrada e.v. uma vez ao dia, iniciando o tratamento no 15º dia até o 22º dia. As doses da MaR1 foram escolhidas com base em estudos previamente publicados (Bento *et al.*, 2011; Serhan *et al.*, 2012a; Serhan *et al.*, 2009). A MaR1 foi solubilizada em solução 0,9% NaCl. Ao longo de ambos os protocolos experimentais foi avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais foram

monitorados diariamente em relação a mudanças de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência fecal. Ao final da fase aguda ou crônica os cólons foram removidos, lavados em solução 0,9% NaCl, pesados e seus comprimentos mensurados. Os tecidos colônicos foram armazenados em freezer -70°C para análises histológicas e bioquímicas.

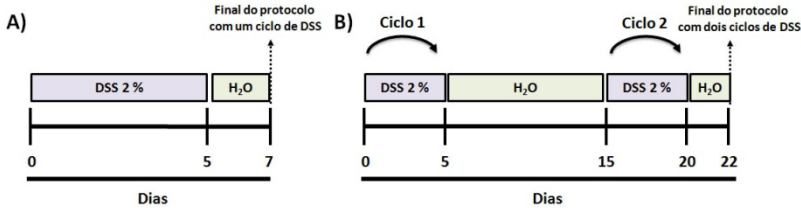


Figura 7. Esquema de indução da colite aguda pelo DSS. (A) Representação do protocolo de colite aguda (um ciclo) induzida pela administração de DSS 2% em camundongos da linhagem CD1 machos. O DSS 2% diluído na água de beber foi oferecido *ad libitum* durante cinco dias. No quinto dia o DSS foi retirado e substituído por água filtrada até o sétimo dia. (B) Representação esquemática do protocolo de indução de colite aguda (dois ciclos) induzida por DSS 2% em camundongos da linhagem CD1 machos. O DSS 2% diluído na água de beber foi oferecido *ad libitum* durante cinco dias (primeiro ciclo). No quinto dia o DSS foi retirado e substituído por água filtrada por 10 dias, no 15^o dia os animais receberam um novo ciclo de DSS 2% por 5 dias (segundo ciclo). No 20^o dia o DSS foi substituído por água filtrada por mais dois dias, no final do 22^o dia os animais foram eutanasiados.

3.2.1 Índice de atividade da doença (IAD)

Durante o protocolo experimental da colite induzida pelo DSS os animais foram examinados diariamente para avaliar o índice de atividade da doença (IAD) como descrito anteriormente (Ghia *et al.*, 2008). O IAD é o somatório combinado de escores referentes à perda de peso corporal [(0) para ausência de perda de peso ou perda de até 1 % do peso inicial dos animais, (1) para perda de peso de 1-5 %, (2) para perda de peso de 5-10 %, (3) para perda de peso de 10-15% e (4) para perda de peso maior que 15 % do peso inicial], consistência fecal, [(0) para fezes consistentes, (2) fezes frouxas e (4) diarréia], sangramento das fezes, [(0) para ausência de sangue nas fezes, (2) para presença de sangue oculto (Feca-cult, INLAB, SP, Brasil) e (4) para sangue evidente nas fezes].

3.2.2 Escore macroscópico para a colite induzida pelo DSS

Ao final do protocolo da colite induzida pelo DSS os animais foram eutanasiados, os seus cólons foram removidos e abertos

longitudinalmente (em toda a extensão) e cuidadosamente limpos com solução 0,9% NaCl. O dano ao cólon foi avaliado segundo a tabela previamente estabelecida por Kimball e colaboradores (Kimball *et al.*, 2006; Kimball *et al.*, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 – Escores utilizados para a avaliação do dano macroscópico do cólon na colite induzida pelo DSS em camundongos.

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

3.3 Colite experimental induzida por TNBS

A colite experimental foi induzida conforme o método descrito por Wallace e colaboradores (1989), adaptado para camundongos McCafferty e colaboradores (1999a). Os animais foram mantidos em jejum sólido com livre acesso a solução de glicose 5% por 24 horas. Após 24 h de jejum sólido, os animais foram anestesiados com uma

solução de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (80 mg/kg, i.p.), e a colite foi induzida através da administração intracolônica (i.col.) de 0,1 ml do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, 1 mg/animal em 35 % de etanol), utilizando-se um cateter de polietileno PE – 50 (4 cm) acoplado a uma microseringa. Os animais controle receberam 0,1 ml de uma solução de 0,9 % NaCl. Para que não houvesse vazamento do TNBS, ao final da administração os animais foram inclinados a 45° com a cabeça posicionada para baixo por 2 min. Após 4 horas da indução de colite, os animais tiveram livre acesso a ração e água filtrada. Os animais foram tratados pela via e.v. com MaR1 (0,3 µg/animal) uma vez ao dia por 3 dias. Animais controle receberam somente veículo (0,9% NaCl) no período de 3 dias. Durante todo o experimento, os animais foram monitorados em relação à mudança de peso corporal. Os animais foram eutanasiados 72 horas após a indução da colite. Os cólons foram removidos e segmentos do cólon foram lavados com solução 0,9% NaCl estéril e acondicionados em freezer -70°C. Outros segmentos foram utilizados para histologia, sendo acondicionados imediatamente em paraformaldeído 4%.

3.3.1 Escore macroscópico para a colite induzida pelo TNBS

Ao final do protocolo da colite induzida por TNBS os animais foram sacrificados, os cólons removidos e abertos longitudinalmente (em toda a extensão) e cuidadosamente limpos com solução 0,9 % NaCl. O dano ao cólon foi avaliado segundo a tabela adaptada para camundongos por McCafferty e colaboradores (1999b) (Tabela 2).

Tabela 2 - Escores utilizados para a avaliação do dano macroscópico do cólon na colite induzida pelo TNBS em camundongos.

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

3.2.2 Escore microscópico para a colite induzida pelo DSS e TNBS

Os cólons foram removidos no 7^o dia (um ciclo) ou no 22^o dia (dois ciclos) após a administração de DSS 2%, e também no 3^o dia após a administração de TNBS. Imediatamente após a sua coleta, os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4%, sendo posteriormente embebidos em parafina e os blocos cortados em espessura de 4 µm foram montados posteriormente as lâminas confeccionadas foram desparafinizadas para a coloração com a técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Os tecidos colônicos foram analisados em microscópico óptico (Nikon Eclipse 50i, Melville, NY, EUA). O dano ao cólon foi quantificado para a colite induzida pelo DSS de acordo com a escala previamente publicada (Van der Sluis *et al.*, 2006) (tabela 3) e para a colite induzida pelo TNBS de acordo com a tabela 4 (Neurath *et al.*, 1995).

Tabela 3 - Escores utilizados para a avaliação do dano microscópico do cólon na colite induzida pelo DSS em camundongos.

ESCORE MICROSCÓPICO	
Escore	Avaliação
0-4	Presença de células caliciformes
0-4	Espessamento da mucosa
0-4	Presença de células inflamatórias
0-4	Abscessos nas criptas
0-4	Infiltração de células na submucosa
0-4	Destruição da arquitetura tecidual
0-4	Ulceração

Tabela 4 - Escores utilizados para a avaliação do dano microscópico do cólon na colite induzida pelo TNBS em camundongos.

ESCORE MICROSCÓPICO	
Escore	Avaliação
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 caliciformes.

3.4 Atividade da enzima MPO

A migração de células PMN como os neutrófilos para o cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para isso, os cólons foram removidos no 7^o dia (um ciclo) após a administração de DSS 2% e no 3^o dia após a administração de TNBS. Os tecidos foram 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 diluído em tampão (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4) gelado. Foi adicionado na solução NaCl 0,2% gelado e após 30 segundos, NaCl 1,6% contendo glicose 5% (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi resuspenso em tampão (Na₂PO₄ 0,5 M e 5% de hexadeciltrimetilamônio, pH 5,4) gelado, 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. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, Na_2PO_4 80 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm. Os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

3.5 Dosagem de citocinas

Os níveis celulares e teciduais das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ foram avaliados seguindo a metodologia do Kit Cytometer Bead Array (CBA) de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido colônico foi coletado no 7^o dia (um ciclo) e no 22^o dia (dois ciclos) após a administração de DSS 2%, e os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4) contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA sódico 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. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Os resultados foram expressos como a quantidade de citocina por miligrama de proteína da amostra. Para os experimentos *in vitro*, o sobrenadante das células em cultura foi coletado e utilizado para a dosagem de citocinas, sendo os resultados expressos como a concentração de citocinas por 1×10^6 células. As citocinas foram dosadas pelo Kit CBA, através da quantificação usando o citometro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As análises foram realizadas utilizando FCAP Array Soft Flow EUA (BD Biosciences).

3.6 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de células de acordo com o protocolo do TRIzol, e para a extração do RNA tecidual foi realizada a homogeneização dos tecidos pelo kit SV Total RNA Isolation System Z3100 (Prômega, EUA). Para o protocolo com o kit SV Total RNA Isolation System Z3100 foi utilizado de 70 -100 mg de tecido, os quais foram homogeneizados com 175 μl de RNA *Lysis Buffer*, com auxílio de homogeneizador portátil, em tubo de centrífuga de 5 ml de capacidade. Ao lisado obtido, foram adicionados 350 μl de RNA *dilution buffer* e as amostras foram incubadas a 70°C por 3 minutos, seguindo por centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. Os

sobrenadantes contendo o RNA total foram transferidos para novo tubo de microcentrífuga (1,5 ml) contendo 200 µl de etanol 95% (Merk, Alemanha). Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma coluna de filtração e foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. O RNA total retido no filtro foi lavado com 600 µl de RNA wash solution. Após centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto, foi adicionado diretamente sobre as membranas das colunas de filtração o mix de DNase contendo: 40 µl de *yellow core buffer*, 5 µl de $MnCl_2$ 0,09 M e 5 µl de *DNase I enzyme*, seguido por incubação por 15 minutos a 25 °C. Foram então adicionados 200 µl de DNA stop solution sobre as membranas e as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. Novamente, as membranas foram lavadas com 600 µl de RNA wash solution e centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto. As colunas foram então transferidas para novos tubos de microcentrífuga e o RNA total foi eluído com 100 µl de água livre de nucleases, com centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto. Para a extração do RNA *in vitro*, as células foram homogeneizadas em 500 µL de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Após a homogeneização foi adicionado de 200 µL de cloroformio à amostra seguido de agitação e centrifugação (10.000 rpm, 15 min., 4 °C). O sobrenadante obtido da centrifugação corresponde à fração rica em RNA, a qual foi transferida para um tubo, seguido da adição de 500 µl de álcool isopropílico. Após, a mistura foi mantida em repouso em temperatura ambiente por 10 min e então submetida a centrifugação a 10.000 r.p.m., 10 min, a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado, sendo que o precipitado obtido foi ressuspenso em 1 ml de etanol 4 °C. Em seguida, a amostra foi submetida à nova centrifugação a 5.000 r.p.m., 5 min., 4°C, o sobrenadante desprezado e o precipitado resultante contendo RNA foi ressuspenso em água ultra pura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, Alemanha). O RNA foi aliquotado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso. A quantidade de 10 ng (células) e 50 ng (tecido) de RNA total foi utilizado para a síntese do DNA complementar (DNAc). Para cada reação da transcrição reversa, as amostras contendo RNA total (células e tecido) foram incubadas com 1 µl de oligo dT 15, 1 µl do mix de dNTP (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12 µl. Essas amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C, resfriadas por 5 min a 4 °C e acrescidas de 4 µl de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM e $MgCl_2$ 15 mM), 2 µl de DTT 0,1 mM, e 1 µl de inibidor de RNase (2.500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37°C por 2 min e

a enzima M-MLV (1 μ l, 200 U) adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 min e a inativação da reação foi realizada por incubação a 75 °C por 15 min. O DNAC foi estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

3.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNAC foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com sondas e probes específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para ICAM-1 (Mm00516024_g1), MCR1 (Mm00485148_m1), NOS2 (Mm01309898_m1) e GAPDH (NM_008084.2) o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 μ l de DNAC, 5 μ l de master mix, 0,5 μ l de primer e 3,5 μ l de água ultrapura, em um volume final de 10 μ l. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 50 ciclos. A fluorescência foi mensurada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação relativa.

3.8 Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos da linhagem CD1 foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e tiveram seus fêmures e as tíbias extraídos. As extremidades proximal e distal destes ossos foram seccionadas e cada qual injetadas com 3 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) sem soro. A suspensão de células assim obtida foi centrifugada a 1.000 r.p.m. por 10 min, e o precipitado foi ressuspenso em DMEM 10 ml por animal e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO). A seguir, as células foram submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 μ m (BD FALCON) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram ressuspendidas em 2 ml de DMEM suplementado e então foram contadas em câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 6 poços na concentração de 2×10^5 células/poço. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 20% de sobrenadante de cultura de L929 filtrado (LCCM,

L929 cell conditioned medium), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas foram então incubadas a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂. Quatro dias após o plaqueamento das células, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo 20% de LCCM. Após 10 dias os macrófagos foram contados e incubados em placa de 96 poços a 2 x 10⁵ células/poço e mantidos a 37°C em 5% de CO₂ e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (1 µg/ml) por 24 horas, na presença ou na ausência de MaR1 (300 nM/poço, 30 min antes). O sobrenadante foi coletado e estocado em -70 °C para a quantificação dos mediadores inflamatórios (IL-1β, TNF-α, IL-6 e INF-γ). A partir das células aderidas foi extraído o RNA, sendo realizado posteriormente PCR em tempo real para avaliar o receptor de manose tipo-1 (MCR1) e para a enzima síntese do óxido nítrico induzido (NOS2).

3.9 Preparação do extrato total

Os tecidos colônicos foram coletados no 7^o dia (um ciclo) ou no 22^o dia (dois ciclos) após a administração de DSS 2% e os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (RIPA – modified radioimmunoprecipitation buffer). O tampão RIPA é constituído de NaCl 150 mM, Triton X-100 1,0%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, Tris 50 mM, pH 8, aprotinina 4µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, ortovanadato de sódio 1mM. Após a centrifugação (12.000 r.p.m., 20min 4 °C), o sobrenadante contendo o extrato total foi coletado e acondicionado em freezer -70°C para posterior análise. As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). O extrato quantificado foi misturado com tampão contendo: SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%, Tris HCl 0,125 M, pH 6,8 e em seguida aquecido a 95°C por 5 min.

3.10 Western blot

As amostras de proteínas (20 µg) foram aplicadas em gel Bis-Tris (4-12%, NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e separadas por eletroforese, em seguida as amostras em gel foram transferidas a seco em membrana de nitrocelulose (iBlot, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a transferência, a fim de evitar ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas inicialmente com leite desnatado diluído em TBS (Tris buffered saline) por 2 h a 4 °C e então foram lavadas com TBS e Tween-20 a 5% (TBS-T), por três vezes durante 5 minutos cada.

Em seguida, a membrana foi incubada com um dos seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-phospho-NF- κ B (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), policlonal anti-caspase 1 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, EUA) e policlonal anti-NALP3 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, EUA), e incubadas *overnight*. Após a incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada e foi incubada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (1:10000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Os imunocomplexos foram visualizados usando Super Sinal (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) e os valores de densidade foram normalizados usando anticorpo monoclonal β -actina (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Os níveis de proteínas foram quantificados por densidade óptica usando o programa Image-J, expressando a razão de proteínas com β -actina representado por unidade arbitrária.

3.11 Drogas e reagentes

O DSS (P.M. 36.000–50.000) MP Biomedicals (Solon, OH, EUA). Maresina 1 foi obtida da Cayman (Charlotte, NC, EUA). O anticorpo monoclonal anti-fosfo-NF- κ B e anti- β -actina foram obtidos da Cell Signaling Technology, Inc., (Beverly, MA, EUA). O anticorpo policlonal anti-caspase 1 e o anticorpo policlonal anti-NALP3 foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, USA). O Triton X-100, leupeptina, pepstatina A, β -mercaptoetanol, pastilhas de PBS, tartarato de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), FOLIN-Ciocalteu Fenol, Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinina, PBS, H&E, tetrametilbenzidina (TMB), 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e lipopolissacarídeo (LPS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), o Azul de Trypan, o soro fetal bovino, água ultrapura a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas da GIBCO BRL Life technologies (Gaithersburg, MD, EUA). A enzima transcriptase reversa, dodecil sulfato de sódio, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), o oligo dT 15, os deoxinucleotídeo (dNTPs), o tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa, o inibidor de RNase (RNasin) e o dietiltreitol (DTT), TRIzol, Nupage gel bis-tris e iBlot transfer stack foram procedentes da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, a placa de reação óptica de 96 poços, os primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os MCR1 (Mm00485148_m1), NOS2 (Mm01309898_m1), ICAM-1 (Mm005616024_g1) e GAPDH (NM_008084.2) foram todos obtidos da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). O

paraformaldeído, hematoxicilina de Harris, NaCl, sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e deoxicolato de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha); a quetamina da Sespo (São Paulo, SP, Brasil); a xilazina da Vetbrands (São Paulo, Brasil). O kit Bead Array Mouse Inflammation para dosagem de IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α foram adquiridos da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). O azul de bromofenol e o paraformaldeído foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.12 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por um ciclo de DSS

Inicialmente foi investigado o possível papel antiinflamatório da MaR1 no modelo de inflamação intestinal aguda induzida pelo DSS em um único ciclo de administração em camundongos. A administração oral de DSS por 5 dias (um ciclo) induziu inflamação intestinal severa, caracterizada por diarreia sanguinolenta, culminando em um significativo aumento no escore do IAD (Figura 8A), e sustentada perda de peso corporal (Figura 8B). Em estudos prévios foi demonstrado o papel da MaR1 como um potente mediador lipídico com propriedades analgésicas, antiinflamatórias e pró-resolutivos (Serhan *et al.*, 2012b; Serhan *et al.*, 2009). Com o objetivo de avaliar a atividade da MaR1 na inflamação induzida pelo DSS, os animais da linhagem CD1 machos foram tratados um vez ao dia com a MaR1 (0,1; 0,3 e 1 µg/animal, e.v.) durante os sete dias do protocolo experimental. O tratamento sistêmico com a MaR1 apresentou marcada atividade antiinflamatória quando testada nas duas maiores doses (0,3 e 1 µg/animal), evidenciadas pela redução do escore do IAD (Figura 8A), associada com a prevenção na perda de peso corporal dos animais (Figura 8B). Uma característica bem descrita da inflamação intestinal induzida pelo DSS é o marcante encurtamento do cólon (Figura 8C). Para determinar se a MaR1 poderia proteger o encurtamento colônico induzido pelo DSS, o intestino grosso foi medido e comparado com os animais que receberam somente DSS. Análises morfológicas realizadas no sétimo dia (protocolo agudo) revelaram que o tratamento preventivo com a MaR1 nas doses de 0,3 e 1 µg/animal preveniu significativamente o encurtamento do cólon (Figura 8C). Além disso, nossos resultados demonstraram que a administração do DSS resultou em inflamação colônica associada com hiperemia, ulcerações e espessamento da parede intestinal, levando ao aumento no escore macroscópico (Figura 8D). O tratamento sistêmico com a MaR1 melhorou a aparência tecidual e reduziu o espessamento intestinal quando testada nas doses de 0,3 µg/animal e 1 µg/animal, com inibição do escore macroscópico em $63 \pm 9\%$ e $48 \pm 6\%$, respectivamente (Figura 8D).

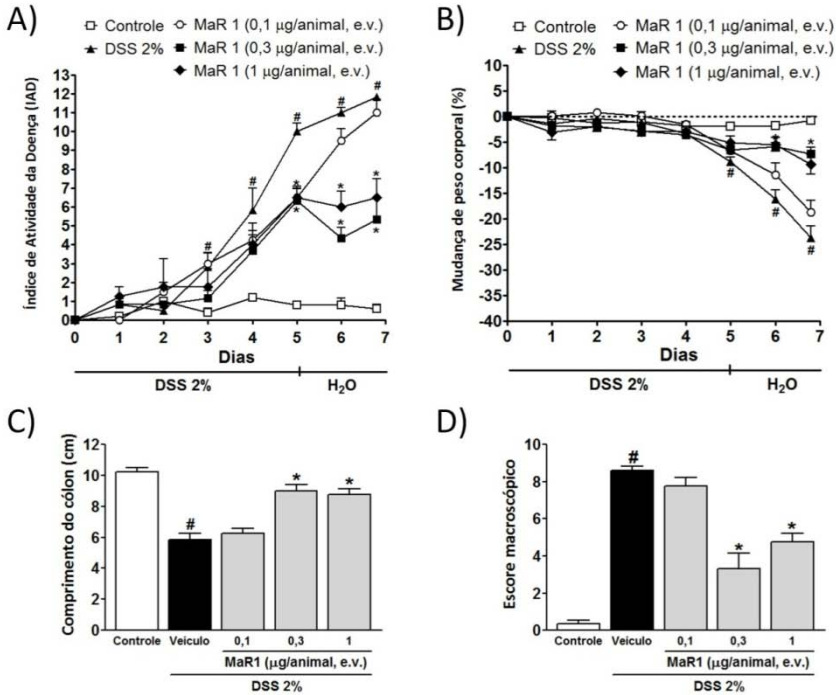


Figura 8: Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por um ciclo de DSS. Os animais foram tratados com veículo ou com a MaR 1 (0,1; 0,3 e 1µg/animal e.v.) uma vez ao dia durante 7 dias. A colite aguda (um ciclo) foi induzida pela administração de DSS 2% por 5 dias, seguido de água filtrada por mais 2 dias. O grupo controle recebeu somente água filtrada por 7 dias. O tratamento com a MaR1 reduziu significativamente o índice de atividade da doença (IAD) (A), preveniu a perda de peso corporal (B), preveniu a severidade do dano tecidual colônico (C) e também protegeu o encurtamento do cólon (D). Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média (S.E.M.) de 6 a 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.2 Efeito da MaR1 sobre a atividade da enzima MPO e o dano microscópico na colite aguda induzida por DSS um ciclo de DSS

Estudos têm sugerido que o dano tecidual induzido pelo DSS é mediado por células da imunidade inata, principalmente por neutrófilos (Dieleman *et al.*, 1994; Stevceva *et al.*, 2001). Por este motivo, neste trabalho foi avaliado o efeito da MaR1 sobre a migração de neutrófilos através da medida indireta da atividade da MPO. Como apresentado na Figura 9A, o grupo que recebeu somente o DSS durante um único ciclo apresentou marcado aumento na atividade de MPO quando comparado com o grupo controle negativo. O tratamento dos animais com a MaR1 nas doses de 0,3 e 1 µg/animal reduziu significativamente a atividade da MPO no tecido colônico dos camundongos, com inibição de $78 \pm 9\%$ e $73 \pm 10\%$, respectivamente (Figura 9A). Assim, como descrito anteriormente (Tanaka *et al.*, 2008), foram observadas marcantes alterações na histologia intestinal em camundongos que receberam somente DSS, caracterizadas por intensa inflamação na mucosa, marcado infiltrado de células inflamatórias, além de destruição das criptas intestinais e fibrose tecidual (Figura 9B-C). A observação histológica revelou ainda que o tratamento sistêmico dos animais com a MaR1 (0,3 e 1 µg/animal, e.v.) restaurou a integridade tecidual, preveniu a perda de células epiteliais, bem como a ulceração na mucosa quando comparado com o grupo que recebeu somente DSS, resultando em inibição do escore microscópico em $69 \pm 5\%$ na dose de 0,3 µg/animal e $61 \pm 8\%$ na dose de 1 µg/animal (Figura 9B-C). Assim como demonstrado anteriormente, a MaR1 nas doses de 0,3 e 1 µg/animal apresentou efeitos bastantes similares (Figura 8 e 9), e por esta razão a dose de 0,3 µg/animal foi utilizada para os experimentos subsequentes.

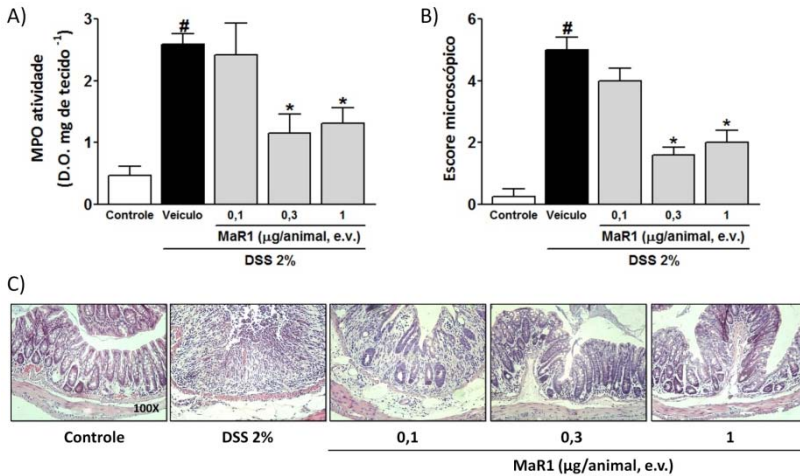


Figura 9: Efeito da MaR1 sobre a atividade da enzima MPO e o dano microscópico na colite aguda induzida por DSS um ciclo de DSS. No sétimo dia após a indução da colite aguda (um ciclo) pelo DSS 2% a atividade de MPO e o dano microscópico foram avaliados. O tratamento sistêmico com a MaR1 (0,1; 0,3 e 1 µg/animal e.v.) reduziu significativamente a atividade da MPO (A) e o dano microscópico (B). As imagens histológicas foram coradas com H&E e são representativas dos grupos controle negativo, controle positivo (veículo + DSS 2%) e MaR1 (0,1; 0,3 e 1 µg/animal e.v.) (C). Ampliação das imagens 100X. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, ^{*} $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.3 Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por dois ciclos de DSS

A administração oral de DSS 2% durante os dois ciclos foi marcada pelo aumento significativo no IAD no decorrer do primeiro e no segundo ciclo de DSS; porém, com significativa redução do IAD no período de recuperação, onde os animais receberam somente água filtrada (5^o ao 15^o dia) (Figura 10A). Em ambas os ciclos o aumento do IAD foi acompanhado por marcada redução do peso corporal dos animais (Figura 10B), com recuperação no período onde os animais receberam somente água filtrada (5^o ao 15^o dia). No início do segundo ciclo com DSS, os animais foram tratados uma vez ao dia com MaR1 (0,3 µg/animal, e.v.) até o 22^o do protocolo experimental. A MaR1 preveniu significativamente o aumento do IAD (Figura 10A) e protegeu a perda de peso corporal nos animais tratados com DSS (Figura 10B). Adicionalmente, o tratamento sistêmico com a MaR1 preveniu o encurtamento do cólon (Figura 10C). De forma semelhante ao que foi observado na fase aguda (um ciclo com DSS), na fase aguda (dois ciclos com DSS) também houve marcante hiperemia, ulcerações e espessamento da parede intestinal, resultando em significativo aumento no escore macroscópico (Figura 10D). Interessante notar que o tratamento com a MaR1 (0,3µg/animal) restaurou o tecido do colón, resultando em redução do escore macroscópico em $90 \pm 8\%$ (Figura 10D).

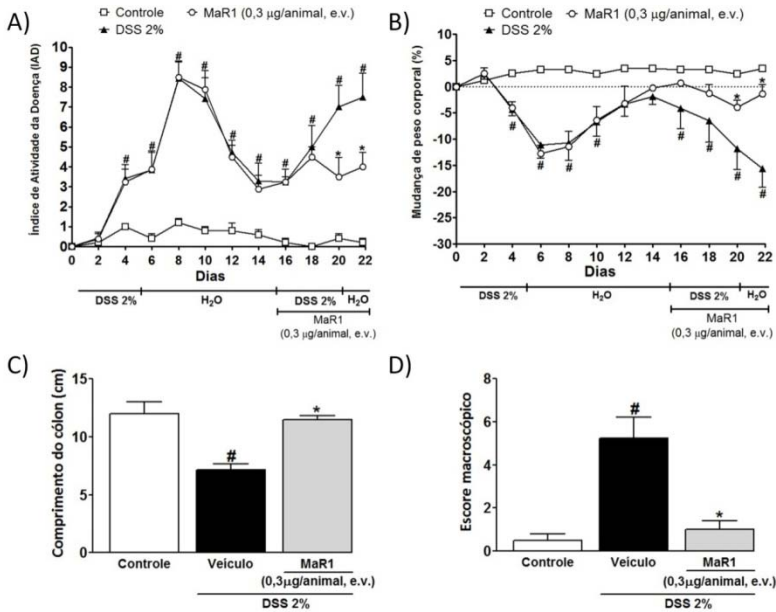


Figura 10: Efeito da MaR1 sobre os parâmetros macroscópicos da colite aguda induzida por dois ciclos de DSS. Os animais foram tratados com veículo ou com a MaR1 (0,3µg/animal, e.v.) uma vez ao dia, do dia 15 ao 22.. A colite aguda (dois ciclos) foi induzida pela administração de DSS 2% por 5 dias (primeiro ciclo) seguido de água filtrada por 10 dias, e em seguida com DSS 2% por 5 dias (segundo ciclo) e mais 2 dias com água filtrada. O grupo controle recebeu somente água filtrada por 22 dias. O tratamento com a MaR1 reduziu significativamente o índice de atividade da doença (IAD) (A), preveniu a perda de peso corporal (B), preveniu a severidade do dano tecidual colônico (C) e também protegeu o encurtamento do cólon (D). Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.4 Efeito da MaR1 sobre o dano microscópico na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS

As alterações histológicas observadas no cólon dos animais ao final do segundo ciclo com DSS mostrou severa inflamação da mucosa com intensa infiltração de células inflamatórias, perda de células caliciformes, destruição das criptas intestinais e fibrose tecidual, resultando em elevado escore macroscópico (Figura 11A-B). O tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$, e.v.) melhorou significativamente os sinais inflamatórios no tecido, restaurou a aparência histológica normal da mucosa e sub-mucosa e reduziu a destruição das células epiteliais e ulcerações na mucosa, quando comparado com o grupo que recebeu somente DSS, resultando em inibição de $79 \pm 11\%$ para o escore microscópico (Figura 11A-B).

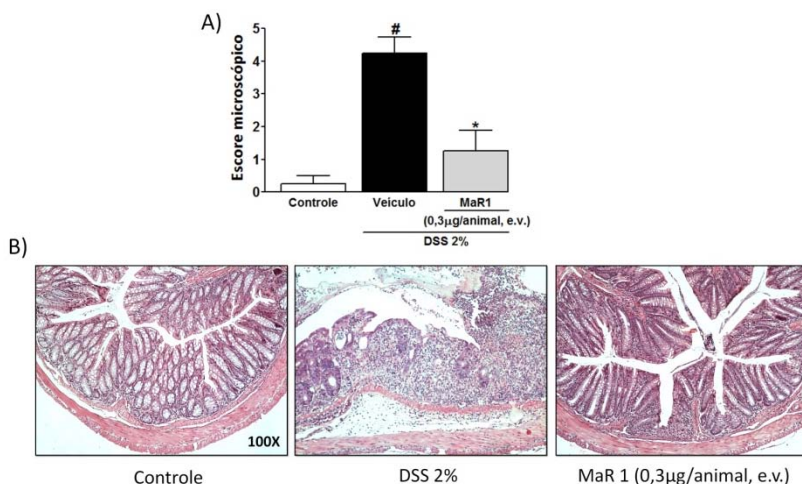


Figura 11: Efeito da MaR1 sobre o dano microscópico na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS. No vigésimo segundo dia da indução de colite induzida pelo DSS 2% o dano microscópico foi avaliado. O tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ e.v.) reduziu significativamente o dano microscópico (A). As imagens histológicas foram coradas com H&E e são representativas dos grupos controle, veículo + DSS 2% e DSS 2% + MaR1 (0,3 $\mu\text{g}/\text{animal}$ e.v.) (B). Ampliação das imagens 100X. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.5 Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por um ciclo de DSS

Estudos têm sugerido que citocinas inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ são cruciais para o recrutamento e ativação de células inflamatórias durante a progressão das IBD (Abraham *et al.*, 2009). Com a finalidade de avaliar se os mediadores previamente citados poderiam estar alterados na inflamação aguda após um ciclo com DSS, os cólons foram removidos no 7^o dia e a quantificação das citocinas foi realizada através do método de CBA por citometria de fluxo. Pelo fato da MaR1 ter diminuído o dano ao cólon e o infiltrado celular observado pelos dados de MPO e histologia, foi avaliado neste trabalho se a MaR1 poderia também alterar os níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias durante o primeiro ciclo da colite induzida pelo DSS. Os resultados demonstraram que o DSS administrado por 5 dias resultou em um pronunciado aumento nos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ (Figura 12A–D). Por outro lado, o tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 μ g/animal, e.v.) durante os sete dias do protocolo agudo, reduziu significativamente os níveis das citocinas IL-1 β em $100 \pm 4\%$, IL-6 em $99 \pm 2\%$, TNF- α em $87 \pm 9\%$ e IFN- γ em $85 \pm 4\%$ (Figura 12A–D).

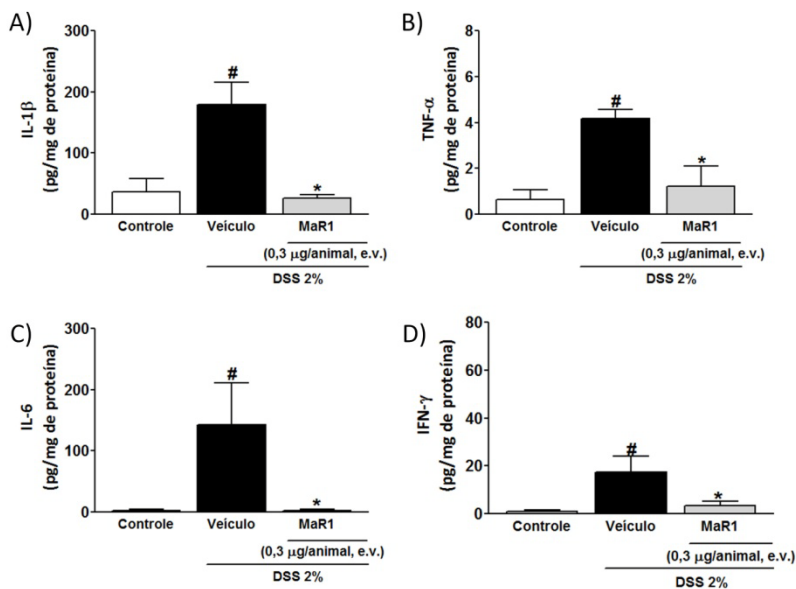


Figura 12: Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por um ciclo de DSS. No sétimo dia da indução de colite aguda (um ciclo) pelo DSS 2%, os níveis de mediadores inflamatórios foram avaliados no tecido colônico. O tratamento sistêmico com a MaR1 reduziu significativamente os níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IFN- γ (D) no tecido cômico no modelo agudo de colite experimental. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.6 Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS

Seguindo o protocolo de inflamação intestinal aguda por dois ciclos de DSS, foi avaliado se os mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ também estariam alterados. Com esta finalidade os cólons foram removidos no 22^o dia e a quantificação das citocinas foi mensurada através do método de CBA por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a administração de dois ciclos de DSS por 5 dias aos animais resultou em elevação nos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ (Figura 13A–D). Por outro lado, o tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 μ g/animal, e.v.) durante os sete dias do protocolo com dois ciclos da colite induzida pelo DSS reduziu significativamente os níveis de IL-1 β em $89 \pm 4\%$, IL-6 em $92 \pm 6\%$, TNF- α em $52 \pm 11\%$ quando comparado ao grupo que recebeu somente DSS (Figure 13A-C). Ao contrário da fase com apenas um ciclo, ao final de segundo ciclo o tratamento com MaR1 não foi capaz de reduzir os níveis teciduais de IFN- γ (Figura 13D).

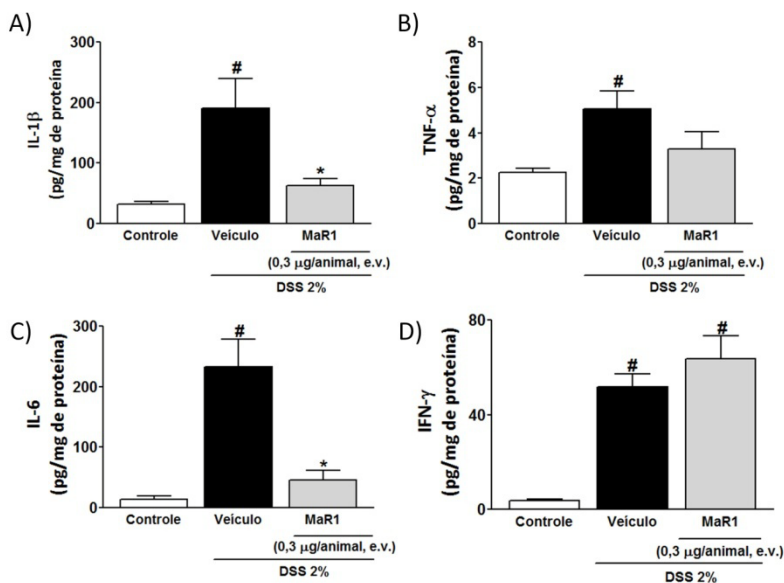


Figura 13: Efeito da MaR1 sobre a liberação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por dois ciclos de DSS. No vigésimo segundo dia da indução de colite por dois ciclos de DSS 2%, a concentração de mediadores inflamatórios foram avaliados no tecido colônico. O tratamento sistêmico com a MaR1 reduziu significativamente os níveis de IL-1 β (A), e IL-6 (C), mas não reduziu significativamente os níveis de TNF- α (B) e IFN- γ (D) no tecido do cólon. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. #p < 0,05 versus o grupo controle negativo, *p < 0,05 versus o grupo controle com DSS.

4.7 Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF- κ B, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda induzida por um ciclo de DSS

O fator de transcrição NF- κ B controla a expressão de muitos genes envolvidos no processo inflamatório (Ledebuer *et al.*, 2005), e sua inibição é capaz de prevenir a colite experimental (Neurath *et al.*, 1997). Com o objetivo de verificar se os efeitos benéficos da MaR1 na colite por DSS poderiam estar envolvidos com a modulação da ativação do NF- κ B, foi verificado neste estudo a quantificação da forma ativa do NF- κ B (subunidade p-p65) no cólon dos animais com inflamação induzida pelo DSS. Os resultados apresentados na figura 14A e B mostram pronunciada ativação do NF- κ B no cólon dos animais com inflamação aguda (um ciclo) induzida pelo DSS. No entanto, a ativação do fator de transcrição NF- κ B foi marcadamente inibida ($75 \pm 9\%$) pelo tratamento sistêmico com a MaR1 (Figura 14A e B). Estudos têm sugerido que a ativação do NF- κ B é importante para modular os efeitos do NALP3, o qual resulta na clivagem de pró-caspase 1 para caspase-1 ativa (Bauernfeind *et al.*, 2009; Dinarello, 2009). Por esta razão foram avaliados os níveis de NALP3 e pró-caspase-1 no tecido colônico ao final do protocolo de colite induzida pelo DSS. Os resultados mostraram que a administração de DSS aumentou significativamente a expressão de NALP3 e pró-caspase-1 no intestino durante o primeiro ciclo com DSS (Figura 14A ,C-D). Por outro lado, o tratamento sistêmico com a MaR1 foi efetivo em reduzir a expressão de NALP3 em $100 \pm 12\%$ e pró-caspase-1 em $81 \pm 10\%$ neste mesmo período (Figura 14A ,C-D).

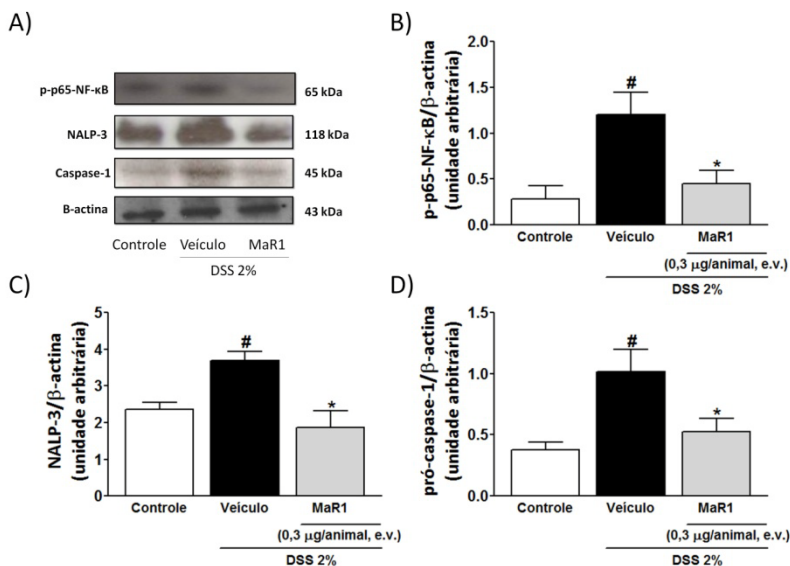


Figura 14: Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF-κB, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda induzida por um ciclo de DSS. No sétimo dia da indução de colite aguda (um ciclo) pelo DSS 2% a ativação do NF-κB, e a via de sinalização NALP3/caspase-1 foram avaliadas. A quantificação colônica da proteína ativada para a subunidade p65 do NF-κB (A e B) foi reduzida pelo tratamento sistêmico com MaR1, assim como a expressão do NALP3 (A e C) e a pró-caspase-1 (A e D). Os dados estão representados como a média ± S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, ^{*} $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.8 Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF- κ B, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda por dois ciclo de DSS

A ativação do NF- κ B tem demonstrado ser importante também para a cronicidade de inflamações intestinais (Bento *et al.*, 2012a). Sendo assim, ao final do 22^o dia do protocolo de inflamação com dois ciclos de DSS foi avaliado a ativação do NF- κ B e o papel da MaR1 sobre este fator de transcrição. A quantificação da p-p65, forma ativa do NF- κ B, foi significativamente aumentada no grupo que recebeu dois ciclos com DSS (Figura 15A-B). Por outro lado, o tratamento sistêmico com MaR1 preveniu a ativação do NF- κ B em $88 \pm 11\%$ (Figura 15A e B). Como previamente descrito, o NF- κ B tem papel fundamental na expressão de moléculas importantes para a formação do inflamassoma, como o NALP3, dessa forma avaliamos também a expressão da NALP3 na fase aguda (dois ciclos) da colite por DSS, assim como a pró-caspase-1. A inflamação intestinal induzida pelo DSS quando realizada em dois ciclos não parece exercer papel importante sobre a expressão de NALP3, uma vez que não foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 15A e C). Entretanto, houve marcante aumento na expressão da pró-caspase-1 no intestino dos animais durante a colite aguda (dois ciclos) (Figura 15A e D). O tratamento sistêmico com a MaR1 foi efetivo em reduzir a expressão de pró-caspase-1 em $97 \pm 3\%$ (Figura 15A e D). É interessante notar que o tratamento com a MaR1 aumentou significativamente a expressão da NALP3 ao final de segundo ciclo da colite induzida pelo DSS quando comparado com o grupo que recebeu somente DSS (Figura 15A e C).

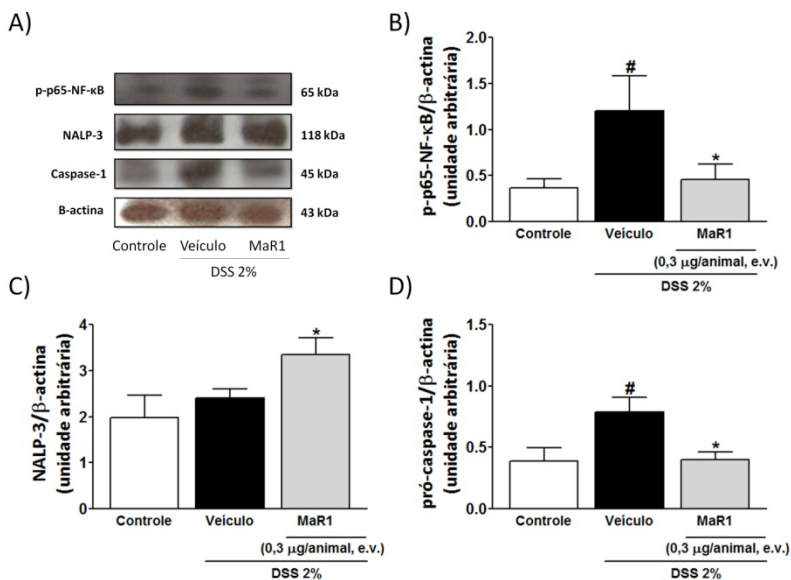


Figura 15: Efeito da MaR1 sobre a ativação do NF-κB, e a expressão de NALP-3 e pró-caspase-1 na colite aguda por dois ciclos de DSS. No vigésimo segundo dia da indução de colite aguda (dois ciclos) pelo DSS 2% a ativação do NF-κB, e a via de sinalização NALP3/caspase -1 foram avaliadas. A quantificação colônica da proteína ativada para a subunidade p65 do NF-κB (A e B) foi reduzida de forma significativa no grupo tratado com MaR1. O tratamento sistêmico com MaR1 aumentou significativamente a expressão de NALP3 (A e C) e reduziu os níveis de pró-caspase-1 (A e D) no tecido colônico no modelo crônico de colite experimental. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 6 a 8 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.9 Efeito da MaR1 sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 na colite aguda induzida por um ou dois ciclos de DSS

As moléculas de adesão, em especial a ICAM-1, são importantes para a adesão de leucócitos no endotélio celular, permitindo subsequente transmigração destas células para o local da inflamação (Sans *et al.*, 1999). Com o objetivo de verificar se as alterações na migração celular observada com o tratamento com MaR1 nos dois protocolos experimentais de colite induzida pelo DSS ocorrem devido a alterações na expressão de ICAM-1, foi realizado a quantificação do RNAm desta molécula de adesão ao final da primeira e da segunda fase da colite experimental. A administração de DSS resultou em pronunciado aumento na expressão do RNAm para ICAM-1 no tecido colônico ao final das duas fases da colite por DSS (Figura 16A-B). De maneira relevante, o tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 µg/animal) diminuiu significativamente o RNAm para ICAM-1 ao final do primeiro ciclo em $95 \pm 6\%$ e ao final do segundo ciclo em $92 \pm 10\%$ quando comparado com o grupo que recebeu somente DSS (Figura 16A-B).

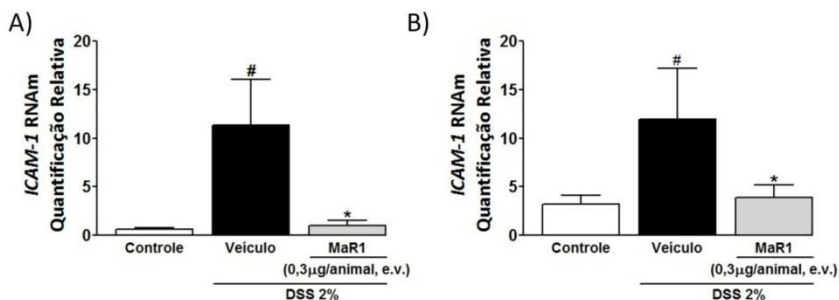


Figura 16: Efeito da MaR1 sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 na colite aguda induzida por um ou dois ciclos de DSS. Os cólons foram coletados ao final do sétimo dia ou no vigésimo segundo dia da colite induzida pelo DSS 2%, e a expressão da molécula de adesão ICAM-1 foi avaliada por PCR em tempo real. O tratamento sistêmico com MaR1 reduziu a expressão do RNAm da ICAM-1 tanto ao final do primeiro ciclo com DSS (A) quanto ao final do segundo ciclo (B) da colite induzida pelo DSS. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em duplicata e o GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os dados estão representados como a média \pm S.E.M. de 4 a 6 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, ^{*} $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.10 Efeito da MaR1 sobre a secreção de mediadores inflamatórios em cultura primária de macrófagos

Os mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α estão diretamente relacionados ao fenótipo pró-inflamatório (M1) dos macrófagos, e estão elevados em pacientes com inflamação intestinal (Berndt *et al.*, 2007; Ferretti *et al.*, 1994; Tabas, 2010). Sendo assim, avaliamos o efeito da MaR1 *in vitro* sobre a liberação de citocinas do perfil M1 em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO). Os dados representados na Figura 17 mostram que a incubação de MDMO com LPS (1 μ g/ml, por 24 h) produziu aumento significativo de citocinas do tipo M1, como a IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D) quando comparado ao grupo controle sem LPS. A incubação *in vitro* da MaR1 (300nM) reduziu de forma marcante os níveis de IL-1 β em $56 \pm 8\%$, IL-6 em $53 \pm 7\%$, TNF- α em $70 \pm 7\%$ e IFN- γ em $98 \pm 7\%$, quando comparado ao grupo que recebeu somente LPS (Figura 17A-D).

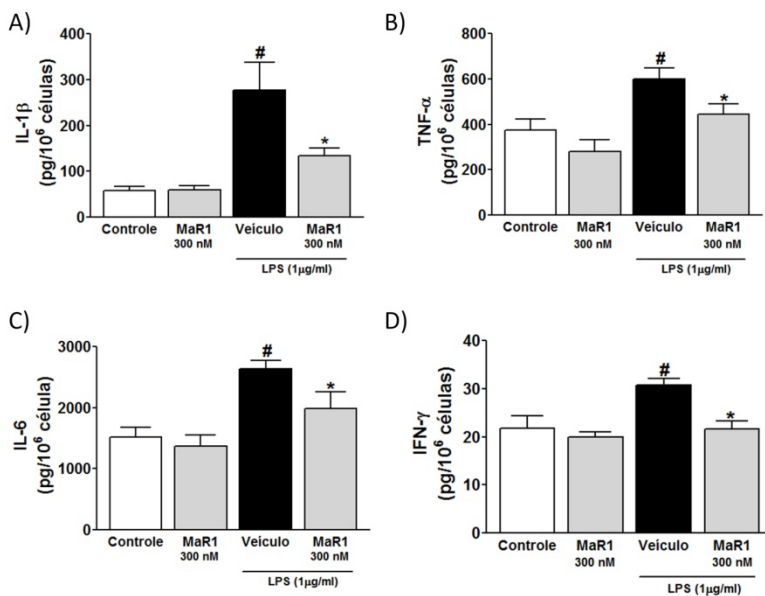


Figura 17: Efeito da MaR1 sobre a secreção de mediadores inflamatórios em cultura primária de macrófagos. Os níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS. A pré-incubação (30 minutos antes) com MaR1 (300 nM/poço) reduziu de forma significativa a secreção de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IFN- γ (D) em macrófagos tratados com LPS (1 μ g/ml). Os resultados estão representados como a média \pm S.E.M. # p < 0,05 versus o grupo controle negativo, * p < 0,05 versus o grupo controle com DSS.

4.11 Efeito da MaR1 sobre a expressão de MCR1 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.

A diferenciação de macrófagos de um perfil pró-inflamatório (M1) para um estado antiinflamatório (M2) é fundamental para o processo de resolução da inflamação, bem como da recuperação tecidual (Shalhoub *et al.*, 2011; Tabas, 2010). Com o objetivo de verificar se as alterações na liberação de mediadores pró-inflamatórios pelo tratamento com a MaR1 poderia ocorrer devido a polarização de macrófagos para um perfil antiinflamatório, foi avaliado a expressão do RNAm para o MCR1, o qual é um marcador de macrófago M2 e o RNAm de NOS2, o qual é expresso principalmente em macrófagos M1 (Martinez *et al.*, 2006). Os dados apresentados na figura 18 demonstram que a estimulação *in vitro* com LPS (1µg/ml, por 24h) induziu marcante redução na expressão do RNAm de MCR1 (Figura 17A), e elevação na expressão do RNAm de NOS2 (Figura 18B) quando comparado ao grupo controle sem LPS. A incubação das células com a MaR1 não alterou de maneira significativa a expressão do RNAm para MCR1 e para a NOS2 após estimulação por LPS (Figura 18A-B). É interessante notar que a incubação de macrófagos com MaR1 sem a estimulação com LPS aumentou significativamente os níveis de RNAm para MCR1, sugerindo um possível efeito de polarização de macrófagos para o perfil M2 (Figura 18A-B). Porém, na presença de LPS, esta ação da MaR1 foi bloqueada.

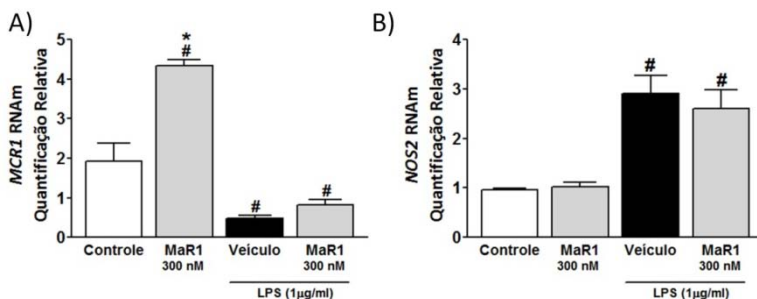


Figura 18: Efeito da MaR1 sobre a expressão de MCR1 e NOS2 em cultura primária de macrófagos.. Os níveis de RNAm para o receptor de manose do tipo 1 (MCR1) e para a enzima síntese do óxido nítrico induzido (NOS2) foram quantificados por PCR em tempo real em macrófagos estimulados com LPS. O LPS (1µg/ml) induziu marcada redução na expressão do RNAm de MCR1 (A) e causou aumento significante na expressão do RNAm de NOS2 (B) quando comparado ao grupo controle. A pré-incubação (30 minutos antes) com a MaR1 (300 nM/poço) não alterou de maneira significativa, a expressão do RNAm para MCR1 (A) e NOS2 (B) após estimulação por LPS. A MaR1 sem a estimulação com LPS aumentou significativamente os níveis de RNAm para MCR1 (A). O ensaio de PCR em tempo real foi feito em duplicata e o RNAm do GAPDH foi utilizado para normalizar a quantidade relativa de RNAm. Os dados foram representados como a média \pm S.E.M. # $p < 0,05$ versus o grupo controle negativo, * $p < 0,05$ versus o grupo controle com DSS.

4.12 Efeito da MaR1 sobre a alteração do peso corporal, dano macroscópico e microscópico e migração celular na colite induzida pelo TNBS

É atualmente bem estabelecido que uma única administração de TNBS induz a formação de granulomas associado a intensa infiltração de células inflamatórias em todas as lamina intestinais, resultando em grande espessamento da parede intestinal, hiperplasia epitelial e ulcerações (Neurath *et al.*, 1995). Com o objetivo de avaliar o efeito da MaR1 em outro modelo de inflamação intestinal, foi conduzido o experimento de colite induzido pelo TNBS em camundongos. De acordo com dados prévios, foi observado que o TNBS induziu colite severa, caracterizada por marcante perda de peso dos animais (Figura 19A). O tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 µg/animal, e.v.) recuperou a perda de peso induzida pelo TNBS (Figura 19A). Adicionalmente, o TNBS induziu necrose tecidual, hiperemia e ulcerações, levando a um aumento no dano macroscópico (Figura 19B) e da atividade da MPO (Figura 19C). Já o tratamento sistêmico com MaR1 (0,3 µg/animal, e.v.) foi efetivo em proteger o dano tecidual, resultando em inibição de $47 \pm 15\%$ do escore macroscópico e inibição de $83 \pm 9\%$ da atividade da MPO (Figura 19B-C). A análise histológica da colite induzida pelo TNBS foi caracterizada por aumento na infiltração de células inflamatórias na mucosa e sub-mucosa, bem como pela destruição da arquitetura tecidual e da barreira tecidual, resultando em elevado escore microscópico (Figura 19D-E). O tratamento sistêmico com a MaR1 (0,3 µg/animal, e.v.) também reduziu o dano colônico e restaurou a estrutura e aparência da mucosa, resultando em significativa melhora no escore microscópico ($58 \pm 7\%$), quando comparado com o grupo tratado com TNBS (Figura 19D-E).

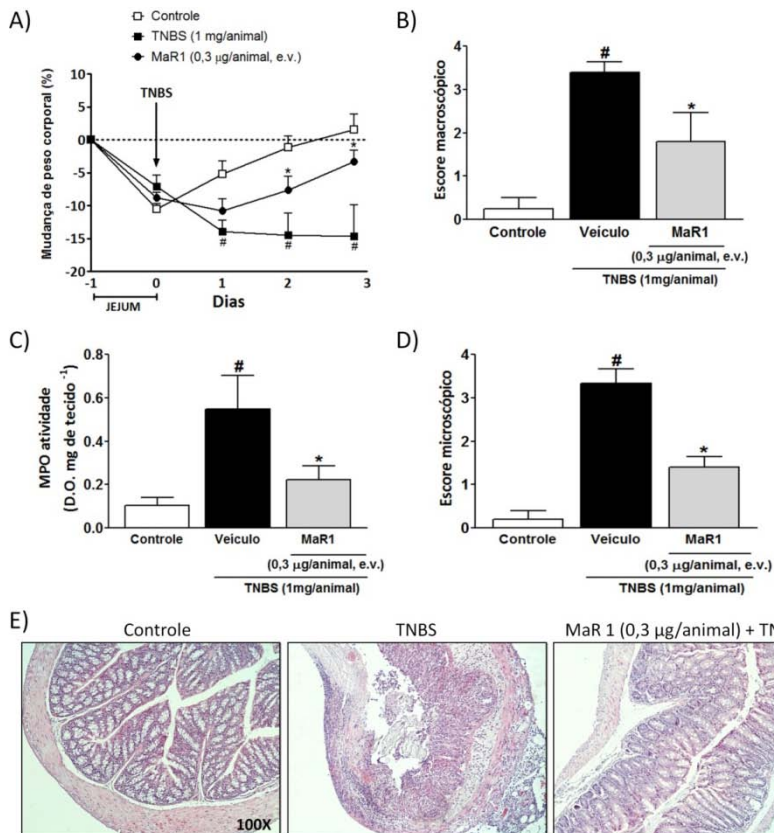


Figura 19: Efeito da MaR1 sobre a alteração do peso corporal, dano macroscópico e microscópico e migração celular na colite induzida pelo TNBS. Os animais permaneceram em jejum por 24h, antes da administração do TNBS. Neste modelo foi avaliado a alteração do peso corporal, o dano tecidual colônico, bem como a atividade da MPO. Os animais foram tratados com veículo ou com a MaR1 (0,3µg/animal e.v.) por 3 dias. O tratamento com a MaR1 protegeu contra a perda de peso corporal (A), preveniu a severidade do dano tecidual colônico (B), reduziu significativamente a atividade da MPO (C) e o dano microscópico (D). As lâminas histológicas foram coradas com H&E e são representativas dos grupos controle negativo, controle positivo (veículo + TNBS) e MaR1 (0,3µg/animal e.v.) + TNBS (D). Amplificação das imagens de 100X. Os dados foram representados como a média ± S.E.M. de 5 a 7 animais por grupo. #p< 0,05 versus o grupo controle negativo, *p< 0,05 versus o grupo controle com TNBS.

5.DISSCUSSÃO

A MaR1 (do inglês, *macrophage mediator in resolin inflammation*, Maresin) foi recentemente identificada como um potente mediador lipídico gerado endogenamente, a qual utiliza como precursor o ácido graxo poliinsaturado docosahexanoenóico (DHA), por uma rota de biossíntese que engloba as enzimas 12/15-LOX em macrófagos (Serhan *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram que a MaR1 é produzida na fase de resolução do processo inflamatório, sendo caracterizada por apresentar importante efeito regulador sobre a migração e fagocitose de leucócitos (Serhan *et al.*, 2012b; Serhan *et al.*, 2009). Seus efeitos sistêmicos também se estendem ao controle do processo nociceptivo/doloroso, bem como na recuperação e regeneração tecidual (Serhan *et al.*, 2012b). Os mecanismos pelos quais a MaR1 exerce seus efeitos antiinflamatórios e pró-resolução são ainda pouco compreendidos e estudos adicionais são necessários para elucidar-los. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, as ações antiinflamatórias da MaR1 em modelos agudo e crônico de inflamação intestinal em camundongos. Os resultados do presente estudo demonstram que a MaR1 apresentou atividade anti-inflamatória pronunciada nos modelos experimentais de inflamação intestinal aguda e crônica induzida pelo sulfato de dextrana sódica (DSS), e também na inflamação intestinal aguda induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em camundongos. O efeito antiinflamatório da MaR1 nos modelos de inflamação intestinal parece estar associado com sua habilidade em interferir com a produção e/ou liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, em inibir a migração de leucócitos, modular a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), NALP3 e ópr -caspase-1, e também em promover a polarização de macrófagos para o fenótipo M2.

Os estudos acerca das doenças inflamatórias intestinais (IBD) têm avançado de forma intensa, sobretudo na última década, uma vez que essas doenças representam um importante problema de saúde pública mundial (Baumgart *et al.*, 2007a). A fase aguda das IBD é de maneira geral bastante semelhante ao que se observam em outras doenças inflamatórias, sendo caracterizada por intensa migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN)/neutrófilos para o foco inflamatório (Baumgart *et al.*, 2007a). Porém, a cronicidade das IBD parece envolver fatores genéticos e imunológicos, os quais impossibilitam que os mecanismos de reparo e/ou resolução do processo inflamatório possam atuar adequadamente no controle da inflamação. De fato, há relatos na literatura de que alguns pacientes portadores de

IBD apresentam falhas permanentes em mecanismos que “disparam” a resolução do processo inflamatório, enquanto outros apresentam fases de remissão (estado quiescente da doença), quando a resposta inflamatória é controlada, ocorrendo reparo tecidual e melhora no quadro clínico dos pacientes (Baumgart *et al.*, 2007a).

Devido às questões éticas que impossibilitam avaliar novos agentes terapêuticos para o tratamento das IBD diretamente em humanos, alguns modelos experimentais de inflamação intestinal têm sido largamente utilizados como ferramentas de grande valia para o melhor entendimento da patogênese das IBD. Neste contexto, vários modelos experimentais de inflamação intestinal estão disponíveis, cada um apresentando mecanismos distintos de gênese da inflamação. Os modelos de inflamação intestinal mais amplamente utilizados são os induzidos por agentes químicos, como o TNBS, oxazolona e o DSS (Mizoguchi *et al.*, 2010; Xavier *et al.*, 2007).

O modelo experimental de inflamação intestinal induzido pelo DSS, inicialmente padronizado para *hamsters* por Ohkusa (1985) e posteriormente adaptado para camundongos (Okayasu *et al.*, 1990) tem se tornado uma importante ferramenta de pesquisa. A inflamação intestinal induzida pelo DSS é um modelo interessante principalmente pela sua similaridade com as IBD observadas em humanos, e também pela possibilidade de fornecer informações sobre o decurso temporal da doença (Bento *et al.*, 2012b; Perse *et al.*, 2012). Neste modelo experimental é possível avaliar a inflamação aguda através da administração de um único ciclo de DSS (5 dias), bem como da inflamação crônica, através da administração de dois ou mais ciclos de DSS, mimetizando dessa forma as fases de surto e remissão da doença. Além disso, permite avaliar os mecanismos endógenos que regulam o processo inflamatório e sua resolução (Clapper *et al.*, 2007).

A inflamação aguda e crônica observada durante a administração de DSS mimetiza os sinais clássicos da colite ulcerativa e da doença de Crohn, tais como o sangramento ao evacuar, a redução do peso corporal e a alteração estrutural e funcional significativa do tecido epitelial intestinal, caracterizada por perda das criptas e da integridade da barreira epitelial (Wirtz *et al.*, 2007a; Wirtz *et al.*, 2000; Wirtz *et al.*, 2007b). Diante do exposto, nossos resultados demonstraram que o mediador lipídico derivado do DHA, a MaR1, administrada sistemicamente é efetiva em proteger os animais tratados com DSS ou TNBS da perda de peso corporal, além de reduzir o sangramento retal e melhorar a consistência das fezes tanto na fase aguda quanto na fase crônica da colite induzida pelo DSS, o que consequentemente reduziu o

escore clínico ou índice de atividade da doença. Corroborando nossos resultados, foi demonstrado que o tratamento de animais com DHA ou com óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (DHA e EPA), promoveu melhora significativa no escore clínico da colite aguda (um ciclo) induzida pelo DSS, associada a redução na transmigração de leucócitos e inibição na liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido colônico (Camuesco *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2011).

O modelo de inflamação intestinal induzido pelo DSS difere tanto em aspectos imunológicos quanto patológicos de outros modelos murinos de inflamação intestinal, como por exemplo, a colite induzida pelo TNBS. O TNBS induz a inflamação intestinal por se ligar a proteínas autólogas ou à microbiota, deixando-as imunogênicas ao sistema imune do hospedeiro (Wirtz *et al.*, 2007a). Além disso, a inflamação intestinal induzida pelo TNBS é caracterizada pela intensa migração de linfócitos T CD4⁺, os quais quando estimulados *in vitro* produzem grande quantidade de IFN- γ e reduzida quantidade de IL-4 comparado com células T de animais controle (Elson *et al.*, 1996; Neurath *et al.*, 1995). Por esta razão, a inflamação intestinal induzida pelo TNBS está associada com uma resposta T helper (Th) 1 e é imunologicamente semelhante à doença de Crohn, a qual também apresenta predomínio de células Th1 (Fuss *et al.*, 1996; Parronchi *et al.*, 1997).

Uma única administração de TNBS por enema resulta na formação de granulomas, resposta esta semelhante àquelas que ocorre na doença de Crohn, a qual foi associada com o infiltrado de células inflamatórias em todas as lâminas intestinais, causando espessamento da parede intestinal, hiperplasia do epitélio e ulcerações intestinais (Neurath *et al.*, 1995). Os eventos inflamatórios que ocorrem no tecido após a administração do TNBS desencadeiam uma série de alterações no TGI, como diarreia e má absorção dos alimentos, contribuindo assim para a perda de peso corporal (Kawada *et al.*, 2007; Neurath *et al.*, 1995). Confirmando achados prévios, neste trabalho também foi observado que uma única administração de TNBS é capaz de induzir severa inflamação intestinal, caracterizada por marcada perda de peso corporal, destruição da integridade tecidual e aumento nos níveis da atividade da MPO (Sugimoto *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). O tratamento sistêmico com a MaR1 atenuou significativamente os parâmetros inflamatórios avaliados após a indução da colite pelo TNBS, destacando-se: a recuperação da perda de peso corporal dos animais e a manutenção da integridade tecidual do

intestino. Os resultados do presente trabalho corroboram com dados descritos na literatura os quais demonstraram que uma dieta baseada em óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, bem como o tratamento com a RvE1 ou RvD2 previnem a severidade e a progressão da inflamação intestinal induzida pelo TNBS em camundongos (Arita *et al.*, 2005b; Bento *et al.*, 2011), indicando que, assim como outros mediadores lipídicos derivados do EPA e DHA, a MaR1 também apresenta efeito protetor em modelos experimentais que se assemelham à colite ulcerativa e à doença de Crohn.

Existem na literatura vários estudos demonstrando os efeitos benéficos da administração de óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (EPA e DHA) sobre as inflamações intestinais em humanos. O óleo de peixe administrado diariamente melhorou de forma significativa o quadro clínico de pacientes com colite ulcerativa, e o tratamento com a mistura de DHA e EPA, foi efetivo em manter a remissão em pacientes com doença de Crohn (Aslan *et al.*, 1992; Lorenz *et al.*, 1989). Belluzzi e colaboradores (1996) demonstraram que após um ano da ingestão diária de cápsulas de óleo de peixe, 59% dos pacientes com doença de Crohn permaneceram em remissão em comparação com 26% do grupo placebo. Os benefícios da administração diária de óleo de peixe em pacientes com IBD foi observado pela significativa melhora nos sinais clínicos da doença, baixa taxa de surtos e pela diminuição na utilização de corticóides (Calder, 2008). O efeito benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (DHA e EPA) parece depender diretamente das células epiteliais intestinais, uma vez que pacientes com IBD que receberam suplementação com óleo de peixe apresentaram altos níveis de EPA e DHA na mucosa intestinal (Hawthorne *et al.*, 1992; Hillier *et al.*, 1991), efeito este que estava associado à redução da inflamação (Hawthorne *et al.*, 1992; McCall *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 2003).

As células epiteliais intestinais as quais integram a barreira epitelial parecem ser fundamentais para que o DSS induza inflamação intestinal, uma vez que o mesmo causa a ruptura da barreira epitelial (Cooper *et al.*, 1993; Wirtz *et al.*, 2007a). Uma consequência possível ou provável da alteração na função da barreira epitelial intestinal é o contato direto de microrganismos da microbiota intestinal com células residentes, como por exemplo, macrófagos, células dendríticas e mastócitos, induzindo assim a liberação não específica de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β (Hamilton *et al.*, 2011; Kitajima *et al.*, 1999). O rompimento da barreira epitelial intestinal tem sido proposto como um mecanismo de indução de colite pelo DSS, sugerindo

assim sua relativa independência de uma resposta mediada por linfócitos, principalmente na fase aguda da doença. De fato, as principais células do sistema imune responsáveis pela inicialização e a perpetuação da resposta inflamatória aguda induzida pelo DSS são de origem mielóide, como as células dendríticas, macrófagos, mastócitos e neutrófilos (Perse *et al.*, 2012), além do fato do DSS induzir inflamação aguda em animais deficientes em linfócitos T e linfócitos B (Dieleman *et al.*, 1994). Entretanto, há relatos indicando a efetiva participação de linfócitos T CD4⁺ ativados em períodos crônicos da colite induzida pelo DSS (Bento *et al.*, 2012b; Perse *et al.*, 2012).

Diante dessas evidências, investigamos o papel da migração de células PMN/neutrófilos na fase aguda da colite induzida pelo DSS ou TNBS em camundongos. Corroborando dados da literatura, observamos que a administração de DSS por 5 dias ou de TNBS por 3 dias, correspondendo à fase aguda da inflamação intestinal, induziu intensa migração de células PMN/neutrófilos para o intestino (Neurath *et al.*, 1995; Perse *et al.*, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que diferentes mediadores lipídicos derivados do EPA e DHA, incluindo a MaR1 atuam no controle da migração de neutrófilos, sendo este efeito observado em distintos modelos inflamatórios, como no edema de pata induzido pela carragenina (Xu *et al.*, 2010), na peritonite induzida por zimozano (Krishnamoorthy *et al.*, 2010; Serhan *et al.*, 2009; Spite *et al.*, 2009), na lesão pulmonar induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) (Wang *et al.*, 2011a), na colite experimental induzida pelo DSS (Bento *et al.*, 2011) e na colite induzida pelo TNBS (Arita *et al.*, 2005b). Neste sentido, demonstramos que a MaR1 também foi efetiva em reduzir a migração de PMN/neutrófilos no tecido inflamado na fase aguda da colite induzida pelo DSS ou pelo TNBS em camundongos. De fato, foi previamente demonstrado que a MaR1 controla a quimiotaxia (Serhan *et al.*, 2012b) e migração (Serhan *et al.*, 2009) de neutrófilos, sugerindo seu papel na transmigração celular, embora este pareça ser apenas um dos mecanismos pró-resolução exercidos pela MaR1, uma vez que ela também aumenta a atividade fagocítica de macrófagos contra neutrófilos apoptóticos, demonstrando ser mais potente que a RvD1 para esta atividade (Krishnamoorthy *et al.*, 2010; Serhan *et al.*, 2012b). Sendo assim, parece haver efeitos similares e/ou sinérgicos dos derivados dos ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA em mecanismos que compreendem a resolução do processo inflamatório.

Como já descrito anteriormente, o recrutamento excessivo de leucócitos em direção ao tecido colônico é um fenômeno comum nas IBD, e estas células, por apresentarem características pró-inflamatórias,

parecem desempenhar um papel importante na progressão da inflamação intestinal (Danese *et al.*, 2006; MacDermott *et al.*, 2008). Tem sido relatado que as células do sistema imune presentes no intestino, juntamente com as células epiteliais, são as principais responsáveis pela produção e/ou liberação de uma combinação de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais se destacam a IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-12, além da expressão de moléculas de adesão celular, que incluem a ICAM-1, VCAM-1 e β 2-integrina (LFA-1) durante a inflamação intestinal (Danese *et al.*, 2005; Papadakis *et al.*, 2000; Podolsky, 2002b; Rogler *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1992). Corroborando dados prévios, foi observado neste trabalho que o DSS induziu aumento significativo das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ tanto na fase aguda quanto na fase crônica da colite. De maneira relevante, a MaR1 foi efetiva em reduzir os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ na fase aguda, porém não houve diminuição nos níveis das citocinas TNF- α e INF- γ na fase crônica da colite induzida pelo DSS.

Trabalhos recentes descritos na literatura sugerem que a cinética de liberação dos mediadores inflamatórios é diferente durante os estágios agudo e crônico da colite induzida pelo DSS, sendo descritos elevados níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-17 na fase aguda (Bento *et al.*, 2012b; Dieleman *et al.*, 1998; Perse *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2009), as quais participam ativamente do recrutamento de novas células dos vasos para o tecido, principalmente por induzirem a expressão de moléculas de adesão (Moreno *et al.*, 2006; Papadakis *et al.*, 2000; Rogler *et al.*, 1998; Smart *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1992). Por outro lado, durante os estágios mais crônicos da inflamação intestinal há um progressivo aumento na expressão de IL-1 β , IL-5, IL-12 e IFN- γ (Bento *et al.*, 2012b; Dieleman *et al.*, 1998; Perse *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2009). O perfil de liberação das citocinas na fase crônica sugere um papel importante dos linfócitos T no decorrer do processo inflamatório, uma vez que a citocina IL-12 é determinante sobre a diferenciação de linfócitos T naive para o fenótipo Th1 (Kennedy *et al.*, 1994). De fato, foi observado que durante a fase crônica da colite induzida pelo DSS há um aumento na população de linfócitos T CD4⁺ ativados (Bento *et al.*, 2012b), associado com níveis elevados das citocinas IFN- γ e IL-5 (Dieleman *et al.*, 1998; Perse *et al.*, 2012), sugerindo um aumento na quantidade de linfócitos Th 1 e de linfócitos B na fase crônica da doença.

O IFN- γ liberado em estágios iniciais do processo inflamatório parece ser proveniente principalmente de macrófagos, e tem a função principal de controlar a proliferação de microorganismos (Bastos *et al.*,

2007; Munder *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1985; Schroder *et al.*, 2004). Além disso, o IFN- γ parece atuar como um mediador **crônico**, estimulando os macrófagos e as células dendríticas a produzirem e liberarem IL-12, a qual parece induzir a diferenciação celular em estágios avançados do processo inflamatório (Kennedy *et al.*, 1994). Pelo fato da MaR1 apresentar efeito inibitório sobre a liberação de IFN- γ somente na fase aguda da doença, pode ser sugerido que o aumento dos níveis de IFN- γ observado na fase aguda de inflamação intestinal por DSS pode ser proveniente de macrófagos ativados, uma vez que este estágio da doença parece depender exclusivamente de células da linhagem mielóide (Dieleman *et al.*, 1994). De outra forma, os elevados níveis de IFN- γ observados na fase crônica do modelo de DSS sugerem ser provenientes também de linfócitos Th1, os quais parecem não sofrer modulação pela MaR1.

Nos últimos anos vários estudos mostraram claramente a importância das citocinas pró-inflamatórias nas IBD, uma vez que há significativa melhora de pacientes após a utilização de anticorpos monoclonais anti-TNF- α e anti-IL-12 (Mannon *et al.*, 2004; Strober *et al.*, 2011). Os derivados do DHA e do EPA parecem interferir na liberação e/ou ação destes mediadores inflamatórios, o que poderia explicar os efeitos benéficos dos mesmos sobre a inflamação intestinal. De fato, a RvE1, RvD2 e AT-RvD1 em baixas doses foram efetivas em reduzir a expressão do RNAm colônico das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 na colite aguda (um ciclo) induzida tanto pelo DSS como pelo TNBS em camundongos (Arita *et al.*, 2005b; Bento *et al.*, 2011; Ishida *et al.*, 2010). A RvD1 apresentou efeito farmacológico bastante semelhante ao observado no modelo de lesão pulmonar aguda (Wang *et al.*, 2011a), com inibição na liberação de TNF- α e IL-6, sendo que estes efeitos foram relacionados à ativação do receptor de lipoxina A4, sugerindo um efeito sinérgico dos mediadores pró-resolução sobre a liberação de citocinas e quimiocinas.

A expressão e a exposição de moléculas de adesão na superfície celular de leucócitos e no endotélio vascular são cruciais para promover a adesão e a migração de células inflamatórias em direção ao tecido (Danese *et al.*, 2005) e evidências experimentais têm indicado que fatores quimiotáticos, como o LPS, um componente de bactérias gram-negativas, e citocinas como o TNF- α e a IL-1 β são capazes de estimular a expressão destas moléculas de adesão (Essani *et al.*, 1995; Stocker *et al.*, 2000). Vários estudos têm mostrado aumento na expressão de LFA-1, ICAM-1 e E-selectinas na mucosa intestinal de pacientes com IBD (Panés *et al.*, 1998; Vainer, 1997). A molécula de adesão ICAM-1 se

liga a uma integrina denominada LFA-1, a qual é encontrada em leucócitos (Rothlein *et al.*, 1986), e na molécula de adesão Mac, encontrada em macrófagos e neutrófilos (Hartwig *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 1982; Hughes *et al.*, 1992), sendo um componente fundamental para a migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o tecido inflamado. De fato, o extravasamento de leucócitos foi inibido pela utilização do anticorpo anti-ICAM-1, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da colite induzida pelo DSS (Farkas *et al.*, 2001), e o mesmo tratamento melhorou, de forma significativa, a severidade da inflamação intestinal (Taniguchi *et al.*, 1998). Dessa forma, o efeito da MaR1 sobre a migração celular e a liberação de mediadores inflamatórios na inflamação intestinal induzida pelo DSS pode estar diretamente relacionado com a significativa redução na expressão do RNAm da ICAM-1 tanto na fase aguda como na fase crônica da doença.

O DHA e o EPA, bem como seus derivados lipídicos têm apresentado efeitos interessantes sobre a migração celular e a expressão de moléculas de adesão em distintos modelos experimentais de inflamação. Existem vários relatos na literatura sugerindo que o DHA e o EPA modulam a expressão do ICAM-1 por inibir a liberação de TNF- α e atenuar a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 *in vivo* e *in vitro* (Chen *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2011b; Yamada *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). A expressão do RNAm para a ICAM-1 e a VCAM-1 também foram significativamente diminuídas pelo tratamento com a RvD1 no modelo de lesão pulmonar experimental (Wang *et al.*, 2011a), efeito semelhante àquele apresentado pela RvD2, a qual foi eficaz em diminuir a expressão de VCAM-1 e de ICAM-1 no modelo de sepse induzido por ligação e perfuração cecal (Spite *et al.*, 2009), bem como na colite induzida pelo DSS (Bento *et al.*, 2011), caracterizada por redução na migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estes dados sugerem que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e seus derivados lipídicos pró-resolução possam reduzir a migração celular por modular a expressão de moléculas de adesão.

A expressão das moléculas de adesão como a ICAM-1, VCAM-1 e LFA-1, bem como os mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF- α são regulados principalmente pelo fator de transcrição NF- κ B (Fichtner-Feigl *et al.*, 2005; Xiang *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória denominada de I κ B. O complexo NF- κ B-I κ B impede a translocação do NF- κ B para o núcleo, assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra sua translocação para o núcleo da célula e em consequência a transcrição gênica (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*,

1998). Os estímulos que podem levar à ativação do NF- κ B são muitos, como por exemplo, fragmentos de bactérias e vírus, citocinas como IL-1 β e TNF- α , produtos da COX e da NOS (O'Neill *et al.*, 1997). Estudos prévios demonstraram que o TNF- α induz a expressão de ICAM -1 através da ativação do NF- κ B, a qual foi abolida pela utilização de um inibidor da degradação do I κ B em células epiteliais intestinais (Jobin *et al.*, 1998).

O NF- κ B parece desempenhar um importante papel para a progressão da inflamação intestinal, uma vez que tanto a fosforilação do NF- κ B, quanto a do I κ B aumentam gradualmente da fase aguda para a crônica na colite induzida pelo DSS em camundongos (Bento *et al.*, 2012b), sugerindo que o aumento na expressão dos mediadores inflamatórios na fase crônica pode ser decorrente da ativação exacerbada do NF- κ B. Nossos resultados demonstraram que tanto na fase aguda quanto na fase crônica da colite induzida pelo DSS ocorreu significativa ativação do NF- κ B, efeito este que foi marcadamente inibido pela administração sistêmica de MaR1 em ambas as fases da inflamação intestinal.

Assim como a MaR1, os ácidos graxos poliinsaturados derivados do ômega-3 (EPA e DHA) também parecem exercer ação inibitória sobre a ativação do NF- κ B, ocorrendo principalmente através da redução na fosforilação do I κ B (Draper *et al.*, 2011; Novak *et al.*, 2003). A inibição do NF- κ B parece ocorrer de maneira direta ou indireta, uma vez que o EPA e o DHA bloqueiam a atividade do TLR4 e o receptor de TNF- α , prevenindo assim a fosforilação do I κ B, o que converge na inibição da transcrição gênica pelo NF- κ B (Wong *et al.*, 2009). Além disso, os mediadores pró-resolução como a DHA, EPA e a PGD₂/J₂ também exercem seus efeitos antiinflamatórios por ativar o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) (; Scher *et al.*, 2009; Zaki *et al.*, 2011), o qual participa ativamente do processo de resolução da inflamação (Calder, 2012), principalmente por modular a ativação do NF- κ B (Rodriguez *et al.*, 1994; Vanden Berghe *et al.*, 2003). Da mesma forma, os mediadores pró-resolução como as resolvinas e protectinas também regulam a atividade do NF- κ B e assim controlam a expressão de genes pró-inflamatórios, tanto durante a inflamação aguda quanto na crônica (Ariel *et al.*, 2007; Bento *et al.*, 2011; Ishida *et al.*, 2010), sugerindo que os mediadores lipídicos possam inibir a cascata de síntese de genes pró-inflamatórios por modular fatores de transcrição.

O NF- κ B também parece estar ligado à expressão de proteínas relacionadas à clivagem e liberação da forma biologicamente ativa da

citocina IL-1 β (Segovia *et al.*, 2012). De fato, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e associados ao dano (DAMP), que ativam a via de sinalização TLR2/MyD88 induzem a translocação da forma ativa do NF- κ B ao núcleo, o que parece ser fundamental para a expressão de genes relacionados ao inflamassoma e clivagem da IL-1 β inativa em ativa (Bauernfeind *et al.*, 2009; Kummer *et al.*, 2007; Petterson *et al.*, 2011; Segovia *et al.*, 2012). O inflamassoma é composto por um complexo de proteínas citoplasmáticas da família NALP, que medeiam à ativação de caspases (Davis *et al.*, 2011; Henao-Mejia *et al.*, 2012). Evidências recentes sugerem que o inflamassoma é um importante regulador da homeostase intestinal e participa ativamente na patogênese das IBD (Bauer *et al.*, 2010; Kim, 2011; Nanau *et al.*, 2012). A principal proteína que compõe a família do NALP na colite induzida pelo DSS é a que contém o domínio 3 (NALP3) (Bauer *et al.*, 2010). O inflamassoma NALP3 é constituído pela própria proteína NALP3, pela proteína adaptadora associada a apoptose (ASC) e pela enzima caspase-1 (Davis *et al.*, 2011; Henao-Mejia *et al.*, 2012).

O NALP3 exerce um papel dual no processo inflamatório, uma vez que ele é importante para o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (Allen *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009), e por outro lado, a deleção gênica do NALP3 pode aumentar a mortalidade de camundongos durante a infecção pelo vírus influenza A, sendo associado ao aumento da necrose e deposição de colágeno (Thomas *et al.*, 2009). Neste contexto, nossos resultados demonstraram que durante a inflamação aguda causada pelo DSS há significativo aumento na expressão de NALP3, efeito que não foi observado na fase crônica do modelo. No entanto, o tratamento sistêmico com a MaR1 foi efetivo em diminuir a expressão de NALP3 na fase aguda, mas ao contrário, aumentou significativamente sua expressão na fase crônica do modelo do DSS. Corroborando nossos resultados, Bauer e colaboradores (2010) demonstraram que animais com deleção gênica para o NALP3 (NALP3^{-/-}) apresentaram melhora no escore histológico no sexto dia após a colite induzida pelo DSS, o que não ocorreu após um período mais prolongado de inflamação intestinal. Por outro lado, foi demonstrado também que a sinalização celular induzida pelo NALP3 é crucial para a proteção contra a colite induzida pelo DSS (Zaki *et al.*, 2010), e que animais NALP3^{-/-} apresentaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento de colite induzida pelo DSS e TNBS (; Zaki *et al.*, 2010), o que reforça o papel dual do NALP3 na inflamação intestinal.

O PAMP dipeptídico de muramil (MDP) é um constituinte da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas, capaz de

ativar o NALP3 via estimulação do receptor intracelular NOD2 (Inohara *et al.*, 2003; Martinon *et al.*, 2004). De fato, macrófagos derivados de animais NALP3^{-/-} falharam em responder à estimulação com MDP (). A ativação do NALP3 e o NOD2 pelo MDP podem induzir a expressão e a secreção de peptídeos antimicrobianos, como a β -defensina colônica, a qual é importante para a defesa contra microorganismos intestinais (Gutierrez *et al.*, 2011; Hirota *et al.*, 2011; Martinon *et al.*, 2004; Voss *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que animais NALP3^{-/-} apresentaram significativa redução na expressão de β -defensina após a indução de infecção fúngica (), bem como na colite experimental induzida pelo DSS ou pelo TNBS (Hirota *et al.*, 2011). Esses dados poderiam explicar, pelo menos em parte, a maior suscetibilidade à inflamação intestinal em animais NALP3^{-/-}. Em conjunto com os dados da literatura, podemos sugerir que a alteração na expressão de NALP3 na fase aguda e crônica do modelo de colite por DSS após o tratamento com MaR1 pode estar relacionado diretamente ao processo de resolução da inflamação, sendo que o aumento da expressão de NALP3 na fase crônica da doença após o tratamento com MaR1 parece causar maior benefício sobre o escore clínico experimental da doença.

A ativação do inflamossoma NALP3 também culmina na clivagem da protease intracelular caspase-1, tornando-a ativada. Esta última por sua vez, cliva um precursor citoplasmático inativo denominado pro-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa IL-1 β (Bauernfeind *et al.*, 2009; Dinarello, 2009; Martinon *et al.*, 2002; Tschopp *et al.*, 2010). A caspase-1 parece desempenhar um papel importante na inflamação intestinal, uma vez que sua deleção gênica induz a melhora nos parâmetros inflamatórios da colite induzida pelo DSS em camundongos (Siegmond *et al.*, 2001), e macrófagos derivados de animais com colite por DSS apresentaram aumento na expressão da pró-caspase-1 (45 kDa) e também sua forma ativa (10-20 kDa) via inflamossoma NALP3, induzindo a liberação de IL-1 β (Bauer *et al.*, 2010). Assim como descrito previamente, nossos resultados demonstraram que tanto na fase aguda como na fase crônica da inflamação intestinal induzida pelo DSS, ocorre aumento na expressão da pró-caspase-1 (45 kDa), já o tratamento com a MaR1 reduziu significativamente os níveis de pró-caspase-1 (45 kDa) em ambas as fases da inflamação intestinal causada pelo DSS, indicando que a redução da citocina IL-1 β após o tratamento com MaR1 parece ser dependente da inibição caspase-1.

O papel da IL-1 β na inflamação intestinal foi caracterizado e parece haver significativo aumento nas fases agudas e crônicas da colite experimental por DSS (Bento *et al.*, 2012b), na mucosa intestinal e em macrófagos peritoneais após a indução de colite por DSS (Kwon *et al.*, 2005) e também nas IBD em humanos (Mahida *et al.*, 1989). A IL-1 β parece alterar as junções intracelulares e consequentemente a permeabilidade intestinal (Al-Sadi *et al.*, 2007), induzindo o contato direto de microorganismos com as células da mucosa intestinal, indicando que o aumento da IL-1 β possa representar um gatilho inicial para a inflamação intestinal. A clivagem da caspase-1 e posterior ativação de IL-1 β também ocorre por mecanismos distintos do inflamossoma NALP3, uma vez que animais NALP3^{-/-} não apresentaram redução significativa nos níveis de IL-1 β no cólon após a inflamação intestinal induzida pelo DSS (Bauer *et al.*, 2010). De fato, a ativação de outros inflamassomas, como NALP1 e NALP4 também induzem a clivagem da caspase-1 à sua forma ativa e consequente ativação da IL-1 β (Mariathasan *et al.*, 2007). Evidências têm indicado que o ácido graxo poliinsaturado DHA parece inibir a clivagem da pro-IL-1 β a IL-1 β ativa por modular o inflamossoma NALP4 (Luo *et al.*, 2012). Neste contexto, podemos sugerir que os níveis reduzidos de IL-1 β após o tratamento com MaR1 poderia ser através de sua ação também sobre outros inflamassomas, uma vez que não houve redução da expressão de NALP3 na fase crônica da colite por DSS, mas a diminuição na liberação de IL-1 β tecidual neste mesmo período foi significativa.

O inflamassoma também parece sofrer modulação pela característica fenotípica das células nas quais está presente. Um exemplo disso é a inibição do inflamossoma NALP3 por macrófagos polarizados para o fenótipo M2 (Pelegri *et al.*, 2009). Os macrófagos podem ser induzidos para o fenótipo M2 através da exposição às citocinas IL-4, IL-10 e IL-13. Estes macrófagos são caracterizados pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β , também associados com a baixa liberação de IL-12 e IL-23, além de aumentarem a expressão das enzimas 12/15-LOX, responsáveis pela metabolização dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 para seus produtos ativos, como resolvinas, protectinas e maresina (Freire-de-Lima *et al.*, 2006; Schif-Zuck *et al.*, 2011). Os macrófagos-M2 parecem desempenhar um papel importante no processo de reparo e no restabelecimento da homeostase tecidual, contribuindo significativamente para a resolução do processo inflamatório (Goerd *et al.*, 1999; Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2002).

Os macrófagos que apresentam características pró-inflamatórias foram classificados como macrófagos-M1, sendo que a polarização para o fenótipo M1 pode ser induzida por citocinas como o TNF- α e o INF- γ e também através da estimulação com LPS (Gordon, 2003). Os macrófagos M1 apresentam baixa liberação de IL-10 e alta produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23, espécies reativas de oxigênio, e também contribuem para a polarização de linfócitos T naive para o fenótipo Th1 (Dalton *et al.*, 1993; Laskin *et al.*, 2011; Mosser, 2003). Os macrófagos-M1 ativam o inflamossoma NALP3 e a caspase-1 (Pelegriin *et al.*, 2009), induzindo a liberação de altos níveis de IL-1 β (Dinarello, 1996), enquanto que níveis insignificantes de IL-1 β foram observados em macrófagos polarizados para o fenótipo M2 (Martinez *et al.*, 2006; Scotton *et al.*, 2005).

Os macrófagos parecem estar diretamente relacionados ao efeito antiinflamatório e pró-resolução da MaR1, uma vez que este mediador lipídico é um autacóide produzido por macrófagos na fase de resolução do processo inflamatório, e seus efeitos benéficos estão diretamente relacionados à atividade do macrófago, como a estimulação da fagocitose de corpos apoptóticos (Serhan *et al.*, 2009). Corroborando dados da literatura, demonstramos que a incubação de macrófagos com LPS induziu a liberação de mediadores pró-inflamatórios incluindo a IL-1 β , TNF- α , IL-6 e INF- γ , os quais são diretamente relacionados à polarização de macrófagos ao fenótipo M1 (Gordon, 2003). Por outro lado, a pré-incubação com MaR1 foi efetiva em reduzir a liberação destas citocinas inflamatórias.

Os macrófagos-M2 parecem apresentar algumas características em comum, como a baixa liberação de IL-12 e IL-23, bem como a expressão do receptor de manose do tipo-1 (MCR1) (Martinez *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 1992). Os receptores MCR1 contribuem para o reconhecimento de patógenos que apresentam manose em sua superfície e induzem a fagocitose destes microorganismos (Stein *et al.*, 1992). Por outro lado, em macrófagos-M1 há um aumento na expressão da isoforma induzida da enzima NOS, responsável pela produção de óxido nítrico (NO) (Hesse *et al.*, 2000; MacMicking *et al.*, 1997; Misson *et al.*, 2004). De fato, observamos que macrófagos derivados da medula óssea, ao serem estimulados com LPS apresentaram aumento da expressão de NOS2 e diminuição da expressão de MCR1, sugerindo que há uma polarização para o fenótipo M1. Entretanto, foi observado que a pré-incubação com MaR1 não foi suficiente para reverter esta polarização induzida pelo LPS, indicando que a inibição das citocinas pró-inflamatórias induzida pela MaR1, a qual foi previamente descrita,

parece não estar relacionada ao fenótipo do macrófago. Por outro lado, macrófagos que foram incubados com a MaR1 na ausência de LPS apresentaram significativo aumento na expressão de MCR1, sugerindo que a MaR1 poderia induzir a polarização de macrófagos naive para o perfil antiinflamatório M2.

A noção de que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 apresentam ação sobre a polarização de macrófagos foi apoiada por trabalhos que, através da utilização de modelos experimentais de obesidade e inflamação no tecido adiposo, demonstraram que tanto o DHA como a RvD1 induzem a polarização para macrófagos-M2 (Oliver *et al.*, 2012; Schif-Zuck *et al.*, 2011; Titos *et al.*, 2011). De forma interessante, Schif-Zuck e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade pró-resolutiva dos macrófagos é proeminente quando estes apresentam o marcador de superfície CD11b^{low} a qual foi relacionado com aumento na expressão das enzimas 12/15-LOX, em relação aos macrófagos CD11b^{high}, e a RvE1 foi capaz de induzir a expressão de CD11b^{low}, contribuindo para a atividade pró-resolução *in vivo* (Schif-Zuck *et al.*, 2011). Neste sentido, Titos e colaboradores (2011) demonstraram aumento no número de macrófagos (F4/80^{low}/CD11b^{low}) no tecido adiposo de animais obesos após o tratamento com DHA, sendo esse efeito relacionado com a expressão de IL-10, arginase-1 e proteína quitinase-3, os quais também são marcadores de macrófagos-M2. Adicionalmente, o DHA e o EPA parecem apresentar um perfil de ação semelhante na redução de macrófagos-M1 (F4/80^{high}/CD11c^{high}) e na indução da polarização para o fenótipo M2 (F4/80^{low}/CD11c^{low}) em cultura de macrófagos da linhagem J774.2 estimulados com LPS (Oliver *et al.*, 2012).

A incubação de macrófagos *in vitro* com os derivados lipídicos dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6, 17-HDPA, 10,17-HDPA e 17-HDHA também parece promover a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, uma vez que foi observada a supressão na expressão de TNF- α e NOS2, e aumento na expressão de marcadores para o fenótipo M2 (Chiu *et al.*, 2012). Aquele estudo, os autores também demonstram que o tratamento sistêmico em camundongos com 17-HDPA, 10,17-HDPA ou 17-HDHA suprimiu a colite experimental induzida pelo DSS, sugerindo um papel importante dos ácidos graxos poliinsaturados na atividade dos macrófagos e na colite experimental. De fato, trabalhos recentes têm mostrado que a administração de macrófagos previamente polarizados para o fenótipo M2 protegem animais da colite experimental induzida pelo DSS ou pelo TNBS em camundongos (Hunter *et al.*, 2010; Weisser *et al.*, 2011). Sendo assim,

em conjunto com nossos resultados, é possível sugerir que a MaR1 assim como outros derivados do DHA poderiam, ao menos em parte, proteger a colite experimental induzida pelo DSS ou pelo TNBS através da polarização de macrófagos para o fenótipo M2.

Analisados em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho (Figura 20), fortalecem o conhecimento popular e científico sobre os efeitos benéficos para a saúde humana de uma dieta rica em ácido graxo poliinsaturado ômega-3 e contribuem para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos nas ações dos mesmos sobre a resolução do processo inflamatório. O benefício da MaR1 sobre os dois modelos de inflamação intestinal estudados, os quais são fisiopatologicamente semelhantes à colite ulcerativa e à doença de Crohn, propõe uma nova abordagem terapêutica baseada principalmente no processo de resolução da inflamação.

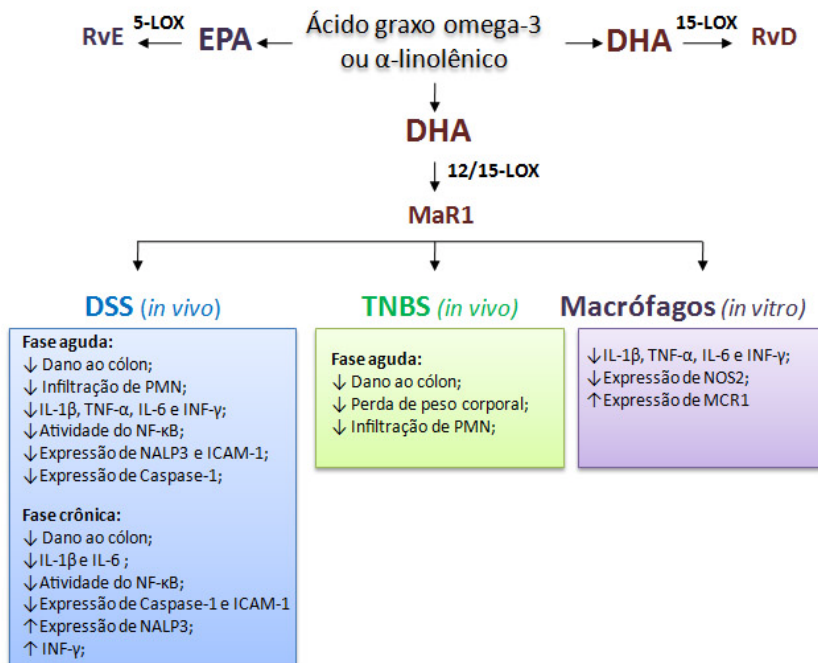


Figura 20: Esquema ilustrativo sobre a síntese dos mediadores lipídicos derivados do ácido graxo poliinsaturado ômega-3 e o efeitos da MaR1 *in vivo* e *in vitro*. O ácido graxo ômega-3 ou α-linolênico pode dar origem aos ácidos graxos eicosapentaenóicos (EPA) e docosahexanoenóico (DHA). O EPA através da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) da origem as resolvinas da serie E (RvE). O DHA através da ação da enzima 15-lipoxigenase (15-LOX) origina as resolvinas da série D e pela ação da 12-15-LOX à maresina 1 (MaR1). A MaR1 apresentou efeitos benéficos *in vivo* e *in vitro*. Na fase aguda do modelo de inflamação intestinal induzido pelo DSS a MaR1 reduziu o dano ao cólon, infiltração de polimorfonucleares/neutrófilos (PMN), as citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6 e INF-γ, reduziu a atividade do NF-κB, a expressão de NALP3, ICAM-1 e pró-caspase-1. Na fase crônica do modelo de colite por DSS, a MaR1 reduziu o dano ao cólon, os níveis teciduais de IL-1β e IL-6, a atividade do NF-κB e a expressão ICAM-1 e pró-caspase-1, aumentou a expressão de NALP3 e os níveis de INF-γ. No modelo de inflamação intestinal induzido pelo TNBS, a MaR1 protegeu do dano ao cólon, perda de peso corporal e diminuiu a infiltração de PMN. Em macrófagos estimulado com LPS e pré-incubados com MaR1 houve redução na liberação de IL-1β, TNF-α, IL-6 e INF-γ e a expressão de NOS2, e macrófagos pré-incubados com MaR1 sem LPS houve aumento na expressão de MCR1.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos no presente estudo, foi demonstrado o potencial efeito antiinflamatório da MaR1, um mediador lipídico derivado do ácido graxo poliinsaturado ômega-3, quando avaliado nos modelos experimentais de inflamação intestinal induzido pelo DSS ou pelo TNBS e também em cultura de macrófagos. Os resultados aqui apresentados demonstram ainda que a inibição do NF- κ B, NALP3 e pró-caspase-1 no intestino parece contribuir em parte para o efeito antiinflamatório da MaR1 na fase aguda da colite por DSS. A MaR1 também inibiu os eventos de transmigração celular para o intestino, podendo esse efeito ocorrer em decorrência da inibição na expressão do RNAm de ICAM-1 e da liberação de citocinas inflamatórias.

Considerando os parâmetros inflamatórios relacionados às IBD e o efeito da MaR1 em reduzir os sinais clínicos experimentais, sugere-se a MaR1 como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento das IBD.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**(6603): 787-793.
- Abraham C, Cho JH (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**(21): 2066-2078.
- Adam B, Liebrechts T, Holtmann G (2006). [Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine]. *Z Gastroenterol* **44**(3): 267-269.
- Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, *et al.* (2002). Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* **46**(9): 2445-2452.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**(3): 319-325.
- Ahuja V, Tandon RK (2010). Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *J Dig Dis* **11**(3): 134-147.
- Al-Sadi RM, Ma TY (2007). IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* **178**(7): 4641-4649.
- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, *et al.* (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* **30**(4): 556-565.
- Arend P, Martini GA (1970). Ulcerative colitis. Etiologic unity or polyetiologic syndrome? *Am J Proctol* **21**(5): 331-336.
- Ariel A, Serhan CN (2007). Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* **28**(4): 176-183.

Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, *et al.* (2005a). Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* **201**(5): 713-722.

Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, *et al.* (2005b). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7671-7676.

Aslan A, Triadafilopoulos G (1992). Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Am J Gastroenterol* **87**(4): 432-437.

Baldwin AS, Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649-683.

Bang HO, Dyerberg J, Hjoorne N (1976). The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand* **200**(1-2): 69-73.

Baron JH (2000). Inflammatory bowel disease up to 1932. *Mt Sinai J Med* **67**(3): 174-189.

Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, Lima MR (2007). Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **27**(5): 399-410.

Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, *et al.* (2010). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* **59**(9): 1192-1199.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, *et al.* (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* **183**(2): 787-791.

Baumgart DC, Carding SR (2007a). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**(9573): 1627-1640.

Baumgart DC, Sandborn WJ (2007b). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**(9573): 1641-1657.

Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M (1996). Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* **334**(24): 1557-1560.

Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol* **187**(4): 1957-1969.

Bento AF, Leite DF, Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Cola M, *et al.* (2012a). Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem Pharmacol*.

Bento AF, Leite DF, Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Cola M, *et al.* (2012b). Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem Pharmacol* **84**(11): 1459-1469.

Berg DF, Bahadursingh AM, Kaminski DL, Longo WE (2002). Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease. *Am J Surg* **184**(1): 45-51.

Berndt BE, Zhang M, Chen GH, Huffnagle GB, Kao JY (2007). The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J Immunol* **179**(9): 6255-6262.

Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, *et al.* (2010). World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* **16**(1): 112-124.

Birrenbach T, Bocker U (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* **10**(6): 848-859.

Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS (1988). Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **23**(9): 1147-1152.

Brooke BN (1959). Granulomatous diseases of the intestine. *Lancet* **2**(7106): 745-749.

Brooke BN (1953). What is ulcerative colitis? *Lancet* **1**(6773): 1220-1225.

Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, *et al.* (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* **55**(3): 342-347.

Calder PC (1998). Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* **31**(4): 467-490.

Calder PC (2012). Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *The Journal of nutrition* **142**(3): 592S-599S.

Calder PC (2008). Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* **52**(8): 885-897.

Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, *et al.* (2007). Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J* **21**(12): 3162-3170.

Camuesco D, Comalada M, Concha A, Nieto A, Sierra S, Xaus J, *et al.* (2006). Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr* **25**(3): 466-476.

Cario E, Podolsky DK (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**(12): 7010-7017.

Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **53 Suppl 5**: V1-16.

Chen W, Esselman WJ, Jump DB, Busik JV (2005). Anti-inflammatory effect of docosahexaenoic acid on cytokine-induced adhesion molecule expression in human retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(11): 4342-4347.

Chiang N, Fredman G, Backhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, *et al.* (2012a). Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature* **484**(7395): 524-528.

Chiang YL, Haddad E, Rajaram S, Shavlik D, Sabate J (2012b). The effect of dietary walnuts compared to fatty fish on eicosanoids, cytokines, soluble endothelial adhesion molecules and lymphocyte subsets: a randomized, controlled crossover trial. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **87**(4-5): 111-117.

Chiu CY, Gomolka B, Dierkes C, Huang NR, Schroeder M, Purschke M, *et al.* (2012). Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. *Inflamm Res* **61**(9): 967-976.

Cho JY, Chi SG, Chun HS (2011). Oral administration of docosahexaenoic acid attenuates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Mol Nutr Food Res* **55**(2): 239-246.

Clapper ML, Cooper HS, Chang WC (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* **28**(9): 1450-1459.

Claria J, Lee MH, Serhan CN (1996). Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol Med* **2**(5): 583-596.

Connor WE, Connor SL (2007). The importance of fish and docosahexaenoic acid in Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* **85**(4): 929-930.

Consolaro A (2009). *Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações*. edn. Dental Press: Maringá.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **69**(2): 238-249.

Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, *et al.* (1994). Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology* **106**(3): 643-648.

Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Magyari L, Farago B, *et al.* (2010). Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol* **16**(2): 176-183.

D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, Geboes K, Hanauer SB, Irvine EJ, *et al.* (2007). A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **132**(2): 763-786.

Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, *et al.* (1981). Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(6): 3887-3891.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**(5102): 1739-1742.

Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, *et al.* (2006). Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* **130**(7): 2060-2073.

Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, *et al.* (2005). Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* **37**(11): 811-818.

Davis BK, Wen H, Ting JP (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* **29**: 707-735.

Delves PJ, Roitt IM (2000). The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**(1): 37-49.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, *et al.* (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* **114**(3): 385-391.

Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **107**(6): 1643-1652.

Dinareello CA (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**(6): 2095-2147.

Dinareello CA (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.

Draper E, Reynolds CM, Canavan M, Mills KH, Loscher CE, Roche HM (2011). Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF-kappaB independent of PPARgamma. *J Nutr Biochem* **22**(8): 784-790.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**(5804): 1461-1463.

Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, *et al.* (2006). Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol* **177**(9): 5902-5911.

Dyerberg J, Bang HO, Hjorne N (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* **28**(9): 958-966.

Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, *et al.* (1996). Hapten-induced model of murine

inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* **157**(5): 2174-2185.

Farkas S, Herfarth H, Rossle M, Schroeder J, Steinbauer M, Guba M, *et al.* (2001). Quantification of mucosal leucocyte endothelial cell interaction by in vivo fluorescence microscopy in experimental colitis in mice. *Clin Exp Immunol* **126**(2): 250-258.

Feagan B (2002). Review: one tenth of patients with Crohn disease have prolonged remission. *ACP J Club* **137**(3): 115.

Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F (1994). Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* **94**(1): 449-453.

Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A (2005). Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* **115**(11): 3057-3071.

Fiocchi C (2009). Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? *Dig Dis* **27**(3): 226-235.

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, *et al.* (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**(7): 987-992.

Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem* **281**(50): 38376-38384.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, *et al.* (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**(1): 65-70.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* **19**(5): 2092-2100.

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, *et al.* (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **113**(10): 1490-1497.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, *et al.* (1996). Disparate CD4+ 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* **157**(3): 1261-1270.

Ghia JE, Blennerhassett P, Collins SM (2008). Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *J Clin Invest* **118**(6): 2209-2218.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.

Ghosh S, Shand A, Ferguson A (2000). Ulcerative colitis. *BMJ* **320**(7242): 1119-1123.

Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **3**(5): 401-416.

Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, *et al.* (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* **124**(5): 1202-1209.

Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR (2000). Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **164**(4): 1663-1667.

Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, *et al.* (1999). Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* **67**(5-6): 222-226.

Gordon S (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**(1): 23-35.

Gorelik L, Flavell RA (2000). Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**(2): 171-181.

Goyette P, Labbe C, Trinh TT, Xavier RJ, Rioux JD (2007). Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Ann Med* **39**(3): 177-199.

Gutierrez A, Holler E, Zapater P, Sempere L, Jover R, Perez-Mateo M, *et al.* (2011). Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype. *Inflamm Bowel Dis* **17**(8): 1641-1650.

Hamilton MJ, Sinnamon MJ, Lyng GD, Glickman JN, Wang X, Xing W, *et al.* (2011). Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 290-295.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, *et al.* (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**(9272): 1925-1928.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, *et al.* (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**(2): 207-211.

Hanauer SB, Sandborn W (2001). Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* **96**(3): 635-643.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, *et al.* (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **129**(1): 50-65.

- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, *et al.* (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* **53**(11): 1602-1609.
- Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL (2001). Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Annals of surgery* **233**(3): 371-378.
- Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, *et al.* (1992). Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* **33**(7): 922-928.
- Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA (2012). Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol* **13**(4): 321-324.
- Hesse M, Cheever AW, Jankovic D, Wynn TA (2000). NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol* **157**(3): 945-955.
- Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL (1991). Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut* **32**(10): 1151-1155.
- Hilmi I, Singh R, Ganesanathan S, Yatim I, Radzi M, Chua AB, *et al.* (2009). Demography and clinical course of ulcerative colitis in a multiracial Asian population: a nationwide study from Malaysia. *J Dig Dis* **10**(1): 15-20.
- Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, *et al.* (2011). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* **17**(6): 1359-1372.
- Ho MK, Springer TA (1982). Mac-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localization in spleen. *J Immunol* **128**(5): 2281-2286.

Hoffman HM, Brydges SD (2011). Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *J Biol Chem* **286**(13): 10889-10896.

Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* **278**(17): 14677-14687.

Hughes BJ, Hollers JC, Crockett-Torabi E, Smith CW (1992). Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest* **90**(5): 1687-1696.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, *et al.* (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 599-603.

Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ, Van Rooijen N, Beck PL, *et al.* (2010). In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* **138**(4): 1395-1405.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, *et al.* (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**(8): 5509-5512.

Irvine EJ, Marshall JK (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* **119**(6): 1740-1744.

Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, *et al.* (2010). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* **16**(1): 87-95.

Isobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, *et al.* (2012). Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. *J Biol Chem* **287**(13): 10525-10534.

- Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* **156**(Pt 11): 3216-3223.
- Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB (1998). Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* **42**(6): 779-787.
- Jozsef L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13266-13271.
- Kastner DL (2005). Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*: 74-81.
- Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E (2007). Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **13**(42): 5581-5593.
- Kennedy MK, Picha KS, Shanebeck KD, Anderson DM, Grabstein KH (1994). Interleukin-12 regulates the proliferation of Th1, but not Th2 or Th0, clones. *Eur J Immunol* **24**(10): 2271-2278.
- Kim JM (2011). [Inflammatory bowel diseases and inflammasome]. *Korean J Gastroenterol* **58**(6): 300-310.
- Kimball ES, Schneider CR, Wallace NH, Hornby PJ (2006). Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(2): G364-371.
- Kimball ES, Wallace NH, Schneider CR, D'Andrea MR, Hornby PJ (2004). Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Neurogastroenterol Motil* **16**(6): 811-818.

Kinsella JE, Lokesh B, Stone RA (1990). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J Clin Nutr* **52**(1): 1-28.

Kirsner JB (1988). Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* **10**(3): 286-297.

Kitajima S, Takuma S, Morimoto M (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* **48**(3): 137-143.

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, *et al.* (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**(12): 1682-1689.

Kohli P, Levy BD (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol* **158**(4): 960-971.

Kolls JK, Linden A (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**(4): 467-476.

Kornbluth A, Sachar DB (2010). Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* **105**(3): 501-523; quiz 524.

Korzenik JR (2005). Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J Clin Gastroenterol* **39**(4 Suppl 2): S59-65.

Korzenik JR, Podolsky DK (2006). Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**(3): 197-209.

Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, *et al.* (2010). Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4): 1660-1665.

Kromann N, Green A (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* **208**(5): 401-406.

- Kucharzik T, Gewirtz AT, Merlin D, Madara JL, Williams IR (2003). Lateral membrane LXA4 receptors mediate LXA4's anti-inflammatory actions on intestinal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(4): C888-896.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**(2): 263-274.
- Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, *et al.* (2007). Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* **55**(5): 443-452.
- Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H (2005). Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* **337**(2): 647-654.
- Lakatos PL (2006). Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* **12**(38): 6102-6108.
- Larsen GL, Henson PM (1983). Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol* **1**: 335-359.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD (2011). Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**: 267-288.
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* **7**(12): 1291-1297.
- Leaf A, Weber PC (1988). Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med* **318**(9): 549-557.
- Ledeboer A, Gamanos M, Lai W, Martin D, Maier SF, Watkins LR, *et al.* (2005). Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci* **22**(8): 1977-1986.

Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, 3rd, Spur BW, *et al.* (1985). Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* **312**(19): 1217-1224.

Leitzmann MF, Stampfer MJ, Michaud DS, Augustsson K, Colditz GC, Willett WC, *et al.* (2004). Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. *Am J Clin Nutr* **80**(1): 204-216.

Levy BD, Serhan CN (2003). Exploring new approaches to the treatment of asthma: potential roles for lipoxins and aspirin-triggered lipid mediators. *Drugs Today (Barc)* **39**(5): 373-384.

Li D, Mann NJ, Sinclair AJ (1999). Comparison of n-3 polyunsaturated fatty acids from vegetable oils, meat, and fish in raising platelet eicosapentaenoic acid levels in humans. *Lipids* **34 Suppl**: S309.

Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W (2006). American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **130**(3): 940-987.

Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB (2011). The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* **164**(2): 278-293.

Loftus EV, Jr. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**(6): 1504-1517.

Loftus EV, Jr., Schoenfeld P, Sandborn WJ (2002). The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* **16**(1): 51-60.

Lopez-Serrano P, Perez-Calle JL, Perez-Fernandez MT, Fernandez-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernandez-Rodriguez CM (2010). Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases.

Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol* **45**(12): 1464-1471.

Lorenz R, Weber PC, Szimnau P, Heldwein W, Strasser T, Loeschke K (1989). Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease--a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial. *Journal of internal medicine. Supplement* **731**: 225-232.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.

Luo X, Yang Y, Shen T, Tang X, Xiao Y, Zou T, *et al.* (2012). Docosahexaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipid accumulation and inflammation through repressing NLRC4 inflammasome activation in HepG2 cells. *Nutr Metab (Lond)* **9**(1): 34.

MacDermott RP, Green JA, Ashley CC (2008). What is the optimal therapy for severe ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis* **14 Suppl 2**: S228-231.

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **69**(5): 1035S-1045S.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP (1989). Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* **30**(6): 835-838.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, *et al.* (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **351**(20): 2069-2079.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**(11): 549-555.

Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, *et al.* (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* **278**(44): 43807-43817.

Mariathasan S, Monack DM (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**(1): 31-40.

Marshall JK, Irvine EJ (1997). Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **40**(6): 775-781.

Martin AR, Villegas I, Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA (2006). The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol* **147**(8): 873-885.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**(10): 7303-7311.

Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current biology : CB* **14**(21): 1929-1934.

Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**(2): 417-426.

Martinon F, Tschopp J (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**(8): 447-454.

McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P (1999a). Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in mice. *Gut* **45**(6): 864-873.

McCafferty DM, Smith CW, Granger DN, Kubes P (1999b). Intestinal inflammation in adhesion molecule-deficient mice: an assessment of P-

selectin alone and in combination with ICAM-1 or E-selectin. *J Leukoc Biol* **66**(1): 67-74.

McCall TB, O'Leary D, Bloomfield J, O'Morain CA (1989). Therapeutic potential of fish oil in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **3**(5): 415-424.

Misson P, van den Brule S, Barbarin V, Lison D, Huaux F (2004). Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J Leukoc Biol* **76**(5): 926-932.

Mizoguchi A, Mizoguchi E (2010). Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol* **10**(5): 578-587.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, *et al.* (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**(Pt 9): 1679-1688.

Moalem G, Tracey DJ (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* **51**(2): 240-264.

Morelli L (2008). Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J Nutr* **138**(9): 1791S-1795S.

Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, da Silva JS, Ferreira SH, Liew FY (2006). IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol* **177**(5): 3218-3224.

Mosser DM (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**(2): 209-212.

Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, *et al.* (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* **332**(6032): 970-974.

Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with

interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* **187**(12): 2103-2108.

Nanau RM, Neuman MG (2012). Metabolome and inflammasome in inflammatory bowel disease. *Transl Res* **160**(1): 1-28.

Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, *et al.* (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol* **18**(5): 412-424.

Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature* **420**(6917): 846-852.

Nettleton JA (1991). Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* **91**(3): 331-337.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* **182**(5): 1281-1290.

Neurath MF, Pettersson S (1997). Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* **198**(1-3): 91-98.

Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ (2003). NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(1): L84-89.

Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Stange EF (2007). Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut* **56**(9): 1240-1247.

O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **20**(6): 252-258.

Ogawa S, Urabe D, Yokokura Y, Arai H, Arita M, Inoue M (2009). Total synthesis and bioactivity of resolvin E2. *Org Lett* **11**(16): 3602-3605.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 603-606.

Ohkusa T (1985). [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **82**(5): 1327-1336.

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

Oliver E, McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Phillips CM, Ferguson JF, *et al.* (2012). Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA. *J Nutr Biochem* **23**(9): 1192-1200.

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, *et al.* (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **336**(6080): 489-493.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **324**(2): 84-88.

Panes J, Granger DN (1998). Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* **114**(5): 1066-1090.

Papadakis KA, Targan SR (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* **51**: 289-298.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, *et al.* (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* **150**(3): 823-832.

Pelegrin P, Surprenant A (2009). Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates. *Embo J* **28**(14): 2114-2127.

Perse M, Cerar A (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**: 718617.

Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Fokin VV, Bernasconi G, Keledjian R, Yang R, *et al.* (2005). Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**(3-4): 301-321.

Petterson T, Mansson A, Riesbeck K, Cardell LO (2011). Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors and retinoic acid inducible gene-like receptors in human tonsillar T lymphocytes. *Immunology* **133**(1): 84-93.

Podolsky DK (2002a). The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**(6): 933-943.

Podolsky DK (2002b). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347**(6): 417-429.

Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* **179**(2): 589-600.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* **5**(11): 1461-1471.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**(6662): 79-82.

Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG (1985). Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T

lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* **75**(5): 1488-1495.

Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* **269**(29): 18767-18772.

Rogério AP, Haworth O, Croze R, Oh SF, Uddin M, Carlo T, *et al.* (2012). Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses. *J Immunol* **189**(4): 1983-1991.

Rogler G, Andus T (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* **22**(4): 382-389.

Rosenbaum JT, Planck SR, Davey MP, Iwanaga Y, Kurz DE, Martin TM (2003). With a mere nod, uveitis enters a new era. *Am J Ophthalmol* **136**(4): 729-732.

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* **137**(4): 1270-1274.

Ryan GB, Majno G (1977). Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* **86**(1): 183-276.

Sachar DB (2002). Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification. *Gut* **51**(4): 614; author reply 614-615.

Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, *et al.* (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* **11**(1): 76-83.

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**(4819): 1171-1176.

Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, *et al.* (2002). A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**(2): 512-530.

Sans M, Panes J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, *et al.* (1999). VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* **116**(4): 874-883.

Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, *et al.* (2007). Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* **125**(3): 281-290.

Scher JU, Pillinger MH (2009). The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* **57**(6): 703-708.

Schif-Zuck S, Gross N, Assi S, Rostoker R, Serhan CN, Ariel A (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol* **41**(2): 366-379.

Schmid-Schonbein GW (2006). Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 93-131.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189.

Scotton CJ, Martinez FO, Smelt MJ, Sironi M, Locati M, Mantovani A, *et al.* (2005). Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13. *J Immunol* **174**(2): 834-845.

Segovia J, Sabbah A, Mgbemena V, Tsai SY, Chang TH, Berton MT, *et al.* (2012). TLR2/MyD88/NF-kappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One* **7**(1): e29695.

Seki H, Tani Y, Arita M (2009). Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**(3-4): 126-130.

Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ (1992). Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* **118**(4): 929-936.

Serhan CN (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* **25**: 101-137.

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, *et al.* (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *Faseb J* **21**(2): 325-332.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**(5): 349-361.

Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, *et al.* (2012a). Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* **26**(4): 1755-1765.

Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, *et al.* (2012b). Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *Faseb J*.

Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **73**(3-4): 155-172.

Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, *et al.* (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* **196**(8): 1025-1037.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, *et al.* (1995). Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* **34**(44): 14609-14615.

Serhan CN, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* **6**(12): 1191-1197.

Serhan CN, Takano T, Chiang N, Gronert K, Clish CB (2000). Formation of endogenous "antiinflammatory" lipid mediators by

transcellular biosynthesis. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins inhibit neutrophil recruitment and vascular permeability. *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2 Pt 2): S95-S101.

Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, *et al.* (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* **206**(1): 15-23.

Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C (2011). Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *J Inflamm (Lond)* **8**: 9.

Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN (2011). Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **106**(12): 2133-2142.

Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN (2010). Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**(12): 2687-2692.

Shimizu T, Fujii T, Suzuki R, Igarashi J, Ohtsuka Y, Nagata S, *et al.* (2003). Effects of highly purified eicosapentaenoic acid on erythrocyte fatty acid composition and leukocyte and colonic mucosa leukotriene B₄ production in children with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **37**(5): 581-585.

Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N (1995). Therapeutic efficacy of N-3 polyunsaturated fatty acid in experimental Crohn's disease. *J Gastroenterol* **30 Suppl 8**: 98-101.

Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA (2001). IL-1 beta - converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13249-13254.

Simopoulos AP (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**(3 Suppl): 560S-569S.

Smart SJ, Casale TB (1994). TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *Am J Physiol* **266**(3 Pt 1): L238-245.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* **69**: 145-182.

Sobotta J, Putz R, Pabst R (2006). *Atlas de anatomia humana*. edn, vol. 2. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.

Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, *et al.* (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* **50**(3): 307-313.

Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CF, Onofre PH, Monteiro RA, *et al.* (2002). [Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil]. *Arquivos de gastroenterologia* **39**(2): 98-105.

Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, *et al.* (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* **461**(7268): 1287-1291.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**(1): 287-292.

Steinman RM, Banchereau J (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**(7161): 419-426.

Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF (2001). The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol* **1**(1): 3.

Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, *et al.* (1992). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **37**(6): 818-826.

Strober W, Fuss IJ (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**(6): 1756-1767.

Strober W, Kelsall B, Marth T (1998). Oral tolerance. *J Clin Immunol* **18**(1): 1-30.

Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, *et al.* (2002). Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology* **123**(6): 1912-1922.

Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, *et al.* (2007). Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem* **282**(13): 9323-9334.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, *et al.* (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**(1): 44-54.

Tabas I (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* **10**(1): 36-46.

Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, *et al.* (2006). An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* **51**(4): 677-686.

Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN (1998). Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest* **101**(4): 819-826.

Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN (1997). Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J Exp Med* **185**(9): 1693-1704.

Tanaka F, Tominaga K, Ochi M, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, *et al.* (2008). Exogenous administration of mesenchymal stem cells

ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci* **83**(23-24): 771-779.

Taniguchi T, Tsukada H, Nakamura H, Kodama M, Fukuda K, Saito T, *et al.* (1998). Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **13**(9): 945-949.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, *et al.* (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**(15): 1029-1035.

Thiebaut R, Kotti S, Jung C, Merlin F, Colombel JF, Lemann M, *et al.* (2009). TNFSF15 polymorphisms are associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in a new European cohort. *Am J Gastroenterol* **104**(2): 384-391.

Thomas GA, Rhodes J, Green JT, Richardson C (2000). Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J* **76**(895): 273-279.

Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Jr., Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, *et al.* (2009). The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* **30**(4): 566-575.

Titos E, Rius B, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Moran-Salvador E, Martinez-Clemente M, *et al.* (2011). Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol* **187**(10): 5408-5418.

Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, *et al.* (2006). Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chem Biol* **13**(11): 1193-1202.

Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, *et al.* (2011). A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses

against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **7**(12): e1002379.

Torres MI, Rios A (2008). Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* **14**(13): 1972-1980.

Tschopp J, Schroder K (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* **10**(3): 210-215.

Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, *et al.* (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* **177**(9): 5852-5860.

Vainer B (1997). Role of cell adhesion molecules in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* **32**(5): 401-410.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, *et al.* (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**(1): 117-129.

Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B, Haegeman G (2003). A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* **544**: 181-196.

Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR (2009). Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arquivos de gastroenterologia* **46**(1): 20-25.

Vieira P, O'Garra A (2007). Regula'ten' the gut. *Nat Immunol* **8**(9): 905-907.

Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR (1990). Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* **31**(5): 539-544.

- Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, *et al.* (2009a). Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics* **41**(1): 71-76.
- Villani AC, Lemire M, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Fortin G, *et al.* (2009b). Genetic variation in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) and risk for Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS One* **4**(9): e7154.
- Vivier E, Malissen B (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* **6**(1): 17-21.
- von Mutius E (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* **212**(6): 433-439.
- Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **281**(4): 2005-2011.
- Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **96**(1): 29-36.
- Wang B, Gong X, Wan JY, Zhang L, Zhang Z, Li HZ, *et al.* (2011a). Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* **24**(4): 434-441.
- Wang TM, Chen CJ, Lee TS, Chao HY, Wu WH, Hsieh SC, *et al.* (2011b). Docosahexaenoic acid attenuates VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in TNF-alpha-treated human aortic endothelial cells. *J Nutr Biochem* **22**(2): 187-194.
- Wang YF, Ouyang Q, Hu RW (2010). Progression of inflammatory bowel disease in China. *J Dig Dis* **11**(2): 76-82.
- Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, *et al.* (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18129-18134.
- Weinstock JV (2012). Autoimmunity: The worm returns. *Nature* **491**(7423): 183-185.

Weisser SB, Brugger HK, Voglmaier NS, McLaren KW, van Rooijen N, Sly LM (2011). SHIP-deficient, alternatively activated macrophages protect mice during DSS-induced colitis. *J Leukoc Biol* **90**(3): 483-492.

Wilks S (1859). Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Medical Times & Gazette* **2**: 264.

Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF (2007a). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* **2**(3): 541-546.

Wirtz S, Neurath MF (2000). Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* **15**(3): 144-160.

Wirtz S, Neurath MF (2007b). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* **59**(11): 1073-1083.

Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH (2009). Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* **284**(40): 27384-27392.

Xavier RJ, Podolsky DK (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**(7152): 427-434.

Xiang JY, Wu LG, Huang XL, Zhang M, Pen L, Ouyan Q, *et al.* (2009). Amelioration of murine dextran sulfate sodium-induced colitis by nuclear factor-kappaB decoy oligonucleotides. *Am J Surg* **197**(6): 797-805.

Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, *et al.* (2010). Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med* **16**(5): 592-597, 591p following 597.

Yamada H, Yoshida M, Nakano Y, Suganami T, Satoh N, Mita T, *et al.* (2008). In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by

eicosapentaenoic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(12): 2173-2179.

Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D, *et al.* (2005). Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet* **14**(22): 3499-3506.

Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, *et al.* (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* **4**(6): e6073.

Yang YC, Lii CK, Wei YL, Li CC, Lu CY, Liu KL, *et al.* (2012). Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-kappaB pathways. *J Nutr Biochem*.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**(5): 1310-1316.

Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* **32**(3): 379-391.

Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* **32**(4): 171-179.

Zhang M, Deng C, Zheng J, Xia J, Sheng D (2006). Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Int Immunopharmacol* **6**(8): 1233-1242.

Zhao X, Li F, Town JR, Zhang X, Wang W, Gordon JR (2007). 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* **7**(13): 1723-1731.

Zheng H, Ji C, Li J, Jiang H, Ren M, Lu Q, *et al.* (2004). Cloning and analysis of human Apg16L. *DNA Seq* **15**(4): 303-305.