



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA BmooMP-alfa-I, UMA
METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops moojeni*, EM
MODELO DE ILEÍTE INDUZIDA POR *Toxoplasma gondii***

Tamires Lopes Silva

Uberlândia - MG

Julho – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA BmooMP-alfa-I, UMA
METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops moojeni*, EM
MODELO DE ILEÍTE INDUZIDA POR *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas, como
requisito para a obtenção do título
de Mestre.

Mestranda: Tamires Lopes Silva

Orientador . Prof. Dr. José Roberto Mineo
Co-orientadora: Dra. Carolina Salomão Lopes

**Uberlândia – MG
Julho – 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- S586a
2017
- Silva, Tamires Lopes, 1991
Avaliação da atividade anti-inflamatória da BmooMP-alfa-I, uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, em modelo de ileite induzida por *Toxoplasma gondii* / Tamires Lopes Silva.
- 2017.
76 f. : il.
- Orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Crohn,
Doença de- Tratamento - Teses. 4. Intestinos - Doenças inflamatórias -
Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Tamires Lopes Silva

"Avaliação da atividade anti-inflamatória da BmooMP-alfa-I, uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, em modelo de ileíte induzida por *Toxoplasma gondii*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de julho de 2017.

Fernando R. Carvalho

Prof. Dr. Fernando dos Reis de Carvalho – IFG

Priscila Silva Franco

Dra. Priscila Silva Franco – PÓS-DOC/UFU

J. Roberto Mineo

Prof. Dr. José Roberto Mineo – ICBIM/UFU (orientador)

www.imunoparasito.ufu.br - E-mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034) 3225-8672
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Vanessa Lira e Edson Silva, que sempre me impulsionaram para que eu pudesse seguir em frente. E sempre me ensinaram a lutar pelo que desejo.

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha fortaleza e refúgio e por sempre me acalantar quando preciso.

Agradeço ao meu irmão Heitor pelo apoio!

Agradeço também ao meu orientador, Dr. José Roberto Mineo por ter aberto as portas do laboratório e por sempre estar disposto a me ajudar.

Agradeço à professora Dra. Neide Maria Silva por ter aceitado me auxiliar no trabalho.

Agradeço à Carolina Salomão por toda conversa e todo auxílio para elaboração do trabalho.

Agradeço à Flavinha por todo seu auxílio na histologia e disponibilidade em ajudar!

Agradeço à Maraisa por ter me auxiliado na obtenção da proteína, produto essencial para a elaboração do meu trabalho.

Agradeço ao professor Dr Fábio de Oliveira, por ter aberto seu laboratório para que eu pudesse fazer purificação da proteína, e a Mariana e Débora por terem me auxiliado na purificação.

Agradeço à Jacqueline, Vanessa Resende, Heber, Mari, Vanessa Miranda e Eliézer por toda ajuda para realização dos experimentos.

Agradeço à todos colegas de laboratório pela boa convivência, pelas risadas e assim fazer com que os dias ficassem mais leve.

Agradeço aos técnicos do laboratório, Ana Cláudia, Marley e Dona Zilda por todo apoio prestado.

Agradeço à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Obrigada a todos pela contribuição!

*Dúvidas nos tornam sábios,
nos impulsionam a novas descobertas!
Assim, enquanto estiver sobre dúvidas estarei feliz!*

RESUMO

Doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são doenças crônicas mediadas pela ativação da resposta imune. As DIIs são divididas em dois grupos principais, a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Além disso, as DIIs são extremamente debilitantes para os pacientes. A produção exacerbada do fator de necrose tumoral (TNF) está relacionada ao dano intestinal durante a doença de Crohn e a diminuição de seus efeitos é uma importante intervenção terapêutica. Sabe-se que a infecção oral por *Toxoplasma gondii* induz inflamação intestinal, que envolve uma produção aumentada de TNF e isso mimetiza a resposta inflamatória que ocorre na doença de Crohn. BmooP- α -I é uma metaloprotease de peçonha de serpente isolada de *Brothrops moojeni* capaz de hidrolisar o TNF. Considerando estas evidências, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se o tratamento com BmooP- α -I seria capaz de reduzir o efeito deletério da ileíte induzida em modelo murino de infecção oral por *T. gondii*. Para este propósito, induziu-se ileíte em camundongos C57BL/6 por meio da infecção oral com 50 cistos de *T. gondii* cepa Pru-GFP. Em seguida, os animais foram tratados com BmooPM- α -I ou inoculados com PBS como um grupo controle e amostras de baço, linfonodos mesentéricos e íleo foram coletadas no dia 7 pós-infecção para avaliação dos efeitos da metaloprotease nos animais infectados. Os índices de morbidade e mortalidade também foram determinados. Dentre os resultados obtidos, foi observado que o tratamento com BmooMP- α -I prolongou a sobrevivência e diminuiu os sinais clínicos da doença, especialmente em relação à perda de peso. Além disso, o tratamento foi capaz de melhorar os aspectos macroscópico e microscópico das amostras de tecido intestinal. O tratamento também reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a expressão de mediadores inflamatórios no linfonodo mesentérico. Em relação aos experimentos *ex-vivo*, observou-se uma redução da resposta dos esplenócitos das células dos linfonodos mesentéricos nos animais tratados. Em síntese, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que o tratamento com a metaloprotease BmooP- α -I é capaz de reduzir a inflamação ileal induzida pela infecção oral por *T. gondii*, podendo-se hipotetizar que este tipo de tratamento pode também ser útil em outras doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn.

Palavras-chaves: BmooMP- α -I, Metaloproteases, SVMs, Ileíte, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic immune mediated diseases. IBDs are divided into ulcerative colitis and Crohn's disease. Also, IBDs are extremely debilitating for patients. The exacerbated production of TNF cytokine is related to the intestinal damage during Crohn's disease and the neutralization of this cytokine has been suggested as a therapeutic intervention. Oral infection by *Toxoplasma gondii* induces intestinal inflammation through the overproduction of TNF, which is quite similar to the response during Crohn's disease. BmooMP- α -I is a snake venom metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni*, which is able to cleave TNF. Considering these pieces of information, we aimed to evaluate whether the treatment with BmooMP- α -I can reduce the deleterious effect of the *T. gondii*-induced ileitis. For this purpose, we induced ileitis in C57BL/6 mice by oral infection with 50 cysts of *T. gondii*. The animals were treated with BmooMP- α -I or inoculated with PBS as control and tissue samples were collected on day 7 post-infection to evaluate the metalloprotease effects on treated animals. Indices of morbidity and mortality were determined in addition to the cytokine profile production. It was observed that BmooMP- α -I treatment increased the survival rates of the infected animals, as well as reduced clinical signs of the survivals, particularly weight loss. Moreover, the metalloprotease treatment ameliorates the macroscopic and microscopic aspect of intestine. The treatment also reduced proinflammatory cytokine production and expression of inflammatory mediators by mesenteric lymph node cells. Additionally, occurred a reduction of ex vivo response of spleen and mesenteric lymph node cells. Overall, these findings constitute strong evidence that the BmooMP- α -I treatment is able to reduce ileal inflammation, making possible to hypothesize that this type of approach could be also helpful for treating of other inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease.

KEYWORDS: BmooMP- α -I, Metalloproteases, SVMPs, Ileitis, *Toxoplasma gondii*,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mortalidade e morbidade dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	46
Figura 2: Análise macroscópica dos intestinos dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	47
Figura 3: Fotomicrografias representativa do íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	49
Figura 4: Análise microscópica de lâminas do íleo coradas com H&E dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	50
Figura 5: Avaliação do infiltrado de macrófagos CD11b+ (PE) no íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	51
Figura 6: Avaliação da produção de citocinas no soro dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-a-I.....	51
Figura 7: Avaliação da produção de citocinas no íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	52
Figura 8: Análise da expressão gênica nos linfonodos mesentéricos dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	53
Figura 9: Avaliação ex vivo da produção de citocinas pelas células do baço e dos linfonodos mesentérico dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I.....	54
Figura 10: Análise da carga parasitária no íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM-a-I.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios do score de morbilidade.....	39
Tabela 2: Critérios do score para avaliação macroscópica do intestino delgado.....	39
Tabela 3: Lista de mediadores e primers utilizados na qPCR.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-MP - 6-mercaptopurina

ADAMs - Adamalisina

ADAM-TSs - ADAM com domínio parecido com trombospondina

AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides

AMPs - Antimicrobial peptides (Peptídeos antimicrobiais)

APA-1- Fator ativador de proteína - 1

AR - Artrite reumatoide

ATG16L1 - Autophagy-related protein 16-1(Proteína relacionada à autofagia 16-1)

AZA - Azatioprina

CU - Colite Ulcerativa

DC - Células dendríticas

DC - Doença de Crohn

DII - Doença inflamatória do intestino

DIIs - Doenças Inflamatórias Intestinais

ECM - Matriz celular extracelular

IECs - Células epiteliais intestinais

IFN- γ - Interferon γ

ILC - Células linfóides inatas

ILs - Interleucinas

LAM - Lipoarabinomanano

Lti - Células indutoras do tecido linfóide

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenosa

MDP - Muramil dipeptídeo

MMPs - Metaloproteases de matriz

mRNA - RNA mensageiro

MTX - Metotrexato

MUC2 - Mucin 2 (Mucina 2)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B - Factor nuclear Kappa B

NFAT - Fator nuclear associado a células-T

NiMOS - Nanopartículas em microesferas de sistema oral

NK - Célula *natural killer*

NKT - Célula T *natural killer*

NOD2 - Proteína 2 contendo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos

PEI - Polietilenoimina

PTPN22 - Proteína tirosina fosfatase, não receptor tipo 22

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RIPK1 - Receptor de interação à proteína quinase 1

ROR - Receptor de ácido retinóico relacionado ao receptor órfão

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

SiRNA - pequeno RNA de interferência

STAg – *Soluble Toxoplasma gondii antigen*

SVMPs - Metaloproteases de veneno de cobra

Th - T-helper cells (células auxiliares)

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR1 - Receptor de TNF tipo 1

TNFR2 - Receptor de TNF tipo 2

Tregs - células T reguladoras

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Doenças inflamatórias intestinais.....	16
1.1.1 <i>Apresentando as doenças inflamatórias intestinais</i>	<i>16</i>
✓ Epidemiologia	16
✓ Etiologia	18
✓ Patogenia	19
1.1.2 <i>Resposta imune nas DIIs.....</i>	<i>20</i>
1.1.3 <i>TNF e seu papel central nas DIIs.....</i>	<i>22</i>
✓ Um pouco sobre TNF	22
✓ Como é a atuação do TNF nas DIIs?	23
1.1.4 <i>Tratamento das DIIs, como é feito e o que esperar?</i>	<i>23</i>
1.2 Toxoplasma gondii como desencadeador de DIIs.....	25
1.2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	<i>25</i>
1.2.2 <i>Ciclo de vida do parasito</i>	<i>26</i>
1.2.3 <i>Como a infecção por Toxoplasma gondii pode mimetizar uma doença intestinal inflamatória?</i>	<i>27</i>
1.3 Metaloproteases	28
1.3.1 <i>Um pouco sobre metaloproteases</i>	<i>28</i>
1.3.2 <i>Metaloproteases e seu papel na inflamação</i>	<i>28</i>
1.3.3 <i>BmooMP-α-I: uma recente metaloprotease capaz de regular inflamação</i>	<i>29</i>
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Metaloprotease.....	36
4.1.1 <i>Obtenção da peçonha.....</i>	<i>36</i>
4.1.2 <i>Purificação da enzima BmooMP-α-I.....</i>	<i>36</i>
4.1.3 <i>Dosagem de proteínas.....</i>	<i>36</i>
4.1.4 <i>Eletroforese unidimensional (1D. SDS-PAGE).....</i>	<i>37</i>
4.2 Animais.....	37

4.3 Obtenção da cepa Pru-GFP de <i>Toxoplasma gondii</i>	37
4.4 Infecção e tratamento dos camundongos.....	38
4.5 Obtenção das amostras para análise.....	38
4.6 Análise de sobrevivência e morbidade	38
4.7 Análise macroscópica do intestino delgado	39
4.8 Análise histopatológica.....	39
4.9 Quantificação das células calciformes	40
4.10 Quantificação do infiltrado de macrófagos no íleo.....	40
4.11 Avaliação da produção de citocinas <i>ex vivo</i> por células do baço e linfonodo mesentérico.....	40
4.12 Dosagem de citocinas.....	41
4.13 Determinação da expressão gênica de citocinas no linfonodo mesentérico.....	41
4.14 Análise do parasitismo	42
4.15 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1 O efeito do tratamento com BmooPM- α -I nos parâmetros de mortalidade e morbidade	45
5.2 Aspecto macroscópico e microscópico dos intestinos após tratamento com BmooPM- α -I.	47
5.3 BmooPM- α -I e sua atuação na resposta inflamatória.....	50
6. DISCUSSÃO	57
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXO - Termo de aprovação do comitê de ética.....	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças inflamatórias intestinais

1.1.1 Apresentando as doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são desordens crônicas imune-mediadas, que se alternam entre períodos de baixa inflamação do tecido intestinal e de inflamação grave com ulcerações ao longo do trato gastrointestinal (CHU et al., 2016; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017; CHU et al., 2017). A doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) são classificadas como doenças inflamatórias intestinais (COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN XAVIER; PODOLSKY, 2017). Acredita-se que a ocorrência das DIIs se deve a uma combinação de fatores, como susceptibilidade genética e fatores ambientais (COSNES et al., 2011; GEREMIA et al., 2014). Atualmente tem sido relatado um aumento no número de casos de DIIs, representando altos custos para o tratamento do indivíduo afetado e para o sistema de saúde, principalmente por se caracterizar por um início relativamente cedo, um curso de doença variável e ainda sem contar com uma cura consistente (COSNES et al., 2011; GEREMIA et al., 2014).

✓ Epidemiologia

As DIIs possuem alta prevalência e incidência na América do Norte e Norte da Europa, atingindo cerca de 1,5 milhões e 2,2 milhões de pessoas, consecutivamente (HOU, EL-SERAG e THIRUMURTHI, 2009; COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017), sendo que existe uma maior incidência de CU e DC, com exceção do Canadá e algumas regiões da Europa. Ocorre uma distribuição bastante heterogênea, principalmente nos países de alta prevalência. Isso é demonstrado por uma incidência bastante variada especialmente na América do Norte e Europa, onde a incidência de CU varia de 0 a 19,2 por 100.000 pessoas (HOU; EL-SERAG; THIRUMURTHI, 2009; COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017). Da mesma forma, a DC tem incidência semelhante, variando entre 0,3 e 12,7 por 100.000 pessoas na Europa e entre 0 e 20,2 por 100.000 pessoas na América do Norte. Atualmente tem se notado um crescimento das DIIs

especialmente na Ásia e alguns países da África, onde não havia muitos relatos (NG et al., 2013).

A ocorrência de DIIs em homens e mulheres é diferente. A CU é relatada mais em homens, com 60% dos casos. Em contrapartida, na DC cerca de 70-80% de casos são relatados nas mulheres. Entretanto, esta distribuição não é observada em áreas de baixa incidência. Nesses lugares, a incidência em homens com DC chega a ser superior do que em mulheres. A doença é diagnosticada geralmente em indivíduos entre 20-30 anos para DC e entre 30-40 anos para CU, contudo pode ocorrer um pico de ambas doença entre 60-70 anos (MOLINIE et al., 2004; GEARRY et al., 2006; KELSEN; BALDASSANO, 2008). Em pacientes pediátricos, existe um maior número de casos de DC entre meninos e de CU em meninas, sendo que a inversão ocorre entre 14-17 anos (AUVIN et al., 2005; COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017). Os casos pediátricos de CU e DC variam entre 7-20% dos casos totais de DIIs, em especial a DC vem aumentando recentemente, segundo estudos de populações realizados em diferentes países (AUVIN et al., 2005; KELSEN e BALDASSANO, 2008; ABRAMSON et al., 2010). No Brasil e América do sul a prevalência das DIIs é considerada baixa cerca de 4/ 100000 (COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017).

A incidência das DIIs é também afetada por fatores étnicos. A população de judeus é a que possui maior ocorrência, cerca de 3-8 vezes maior do que o restante população mundial (ZVIDI et al., 2009). Estudos reportam uma maior incidência em caucasianos do que em afro-americanos, entretanto existem relatos de aumento no número de casos entre afro-americanos, o que pode igualar a ocorrência entre ambas as etnias (HOU; EL-SERAG; THIRUMURTHI, 2009; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017). Além disso, algumas subpopulações em áreas de alta incidência não apresentam casos relatados de DIIs, por exemplo, a população nativa do Canadá e a população aborígine na Austrália (HOU, EL-SERAG; THIRUMURTHI, 2009; NG et al., 2013).

✓ Etiologia

A etiologia das DIIs pode ser multifatorial e geralmente envolve a combinação de fatores genéticos associado com uma resposta imune desregulada (BERNSTEIN, WAJDA; BLANCHARD, 2005; WALLACE et al., 2014).

Condições hereditárias foram relatadas e atualmente mutações em 163 loci gênicos estão relacionadas com DIIs. Assim, crianças de pais afetados possuem de 2 a 13 vezes mais chances de desenvolver a doença. Dentre as mutações gênicas identificadas, apenas 30 são associado à DC, enquanto 23 possuem associação somente com CU. Alguns desses loci gênicos estão associados com doenças como psoríase e doença celíaca, o que sugere um compartilhamento considerável de vias genéticas em doenças autoimunes ou inflamatórias (ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017).

Polimorfismos relacionados à proteína com domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos 2 (NOD2) e proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22 (PTPN22), parecem divergir entre DC e CU, sendo que para a primeira doença está estritamente relacionada, enquanto que para a segunda não aparenta existir relação. Este polimorfismo é importante uma vez que a estimulação de NOD2 por muramil dipéptido (MDP) resulta em ativação de uma cascata de sinalização das vias inflamatórias relacionadas ao fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases), levando à produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e Interleucina 1 β (IL-1 β). Outro componente importante associado ao mecanismo descrito é a ATG16L1 (proteína relacionada à autofagia 16-1), responsável pelo reconhecimento dos microrganismos da microbiota e ativação de resposta imune (OGURA et al., 2001; RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2017).

A microbiota intestinal é um fator importante relacionado à ocorrência das DIIs, e é composta por cerca de 10^{13} – 10^{14} células bacterianas, as quais estão divididas em 1000 diferentes espécies. As principais espécies são as pertencentes ao filo Bacteroidetes, e uma menor proporção do filo Firmicutes. Além desses grupos, as Proteobactérias, Actinobactérias, Fusobacteria e Verrucomicrobia são igualmente importantes. Em pacientes com DII, essa diversidade está comprometida, pois existe um número reduzido de bactérias que conferem proteção contra inflamação intestinal, como a *Faecalibacterium prausnitzii*, a qual pertence à família Clostridiales, e um aumento de

microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* enteroaderente, especialmente em lesões no íleo de pacientes com DC (SOKOL et al., 2009; SEPEHRI et al., 2011; MANICHANH et al., 2012; SHEEHAN; SHANAHAN, 2017). Foi demonstrado em modelo animal que a recolonização intestinal por *F. prausnitzii* melhora a colite e reduz o risco de recidivas, especialmente da DC (SOKOL et al., 2008).

Os fatores demonstrados anteriormente são importantes para desenvolvimento das DIIs, contudo, os fatores ambientais são de suma importância para o desencadeamento e desenvolvimento das DIIs. Por exemplo o hábito de fumar aumenta a persistência da CU em pelo menos 20 anos (BIRRENBACH; BÖCKER, 2004). Além disso, a DC se torna mais agressiva em pacientes fumantes, aumentando a necessidade de imunossupressão, com uma maior probabilidade de cirurgia e aumento do risco de recorrência após ressecção (HIGUCHI et al., 2012). Em adição, a dieta alimentar exerce significativa influência na patogenia das DIIs. Na DC, por exemplo, a ingestão de frutas, vegetais e alimentos ricos em fibras reduz o risco da doença (JOSTINS et al., 2012). Ademais, uma dieta hiperlipídica aumenta o risco e gravidade da CU. Em modelo animal, foi demonstrado que uma dieta rica em leite gorduroso resultou no aumento de patobiontes e uma colite mais grave (KNIGHTS, LASSEN e XAVIER, 2013). Existe ainda outros fatores correlacionados com o risco de DIIs, como exposição à antibióticos, baixos níveis de vitamina D, distúrbios do sono, estresse e depressão, atividade física, níveis hormonais aberrantes, uso de antiinflamatórios não esteróides (AINEs) e aspirina, falta de aleitamento materno e contato com animais na infância (COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017).

Apesar de se saber que estes fatores apresentam influência sobre a patogenia da doença, ainda não existem estudos contundentes sobre a extensão dessas influências, exceto pelo fim do hábito de fumar (COSNES et al., 2011; ANANTHAKRISHNAN; XAVIER; PODOLSKY, 2017).

✓ **Patogenia**

Durante a progressão da DC, o íleo distal e o cólon são as partes mais afetadas, embora o processo inflamatório possa envolver qualquer parte do trato digestivo. Assim, a DC pode ser classificada em doença do íleo, do cólon e do íleo e cólon. Já na CU, somente o reto e o cólon são afetados com as lesões, se estendendo de um modo

retrógrado contínuo (MOUM et al., 1999; SILVERBERG et al., 2005). Normalmente, em ambas as doenças, ocorre uma sequência de episódios graves seguidos de remissão com lesões geralmente difusas e superficiais, e apenas em pacientes com manifestações graves são observadas ulcerações profundas (BYEON et al., 2005; PEYRIN-BIROULET et al., 2011). No geral, pacientes com UC estão sujeitos a uma atividade menos contínua da doença, quando comparados com pacientes que apresentam DC. Ainda, em ambas as doenças a remissão geralmente está associada com cura da mucosa. Entretanto, na DC não ocorre uma remissão espontânea como a que ocorre na CU (GÜNTHER et al., 2011).

Durante períodos de gravidade da doença, cerca de 75% dos pacientes precisam se submeter a cirurgia na DC. Esse número decai para 25% quando falamos da CU (HOIE et al., 2007; PEYRIN-BIROULET et al., 2011). Ainda, é mais difícil determinar o prognóstico dos pacientes que possuem CU do que os apresentam com DC, devido a grande variabilidade da CU (COSNES et al., 2011).

1.1.2 Resposta imune nas DIIs

As interações do tecido linfóide com microrganismos são muito importantes para a modulação da resposta imune, sendo que essa modulação encontra-se desbalanceada durante a DII (WALLACE et al., 2014; YADAV et al., 2016). Um dos motivos que gera esse desbalanço é a ocorrência de defeitos na barreira da mucosa intestinal (OKAMURA et al., 2014; YADAV et al., 2016). Na CU, observa-se uma camada de muco menos espessa e contínua, em parte pela baixa de Mucina 2 (MUC2), com sulfatação reduzida, bem como uma baixa produção de fosfatidilcolina (ROEDIGER; NANCE, 1986), o que facilita a permeação bacteriana na mucosa interna, favorecendo um contato direto com as células epiteliais mais profundas das criptas (JOHANSSON et al., 2013). Já na DC, existe uma baixa produção de α -defensina e peptídeos antimicrobianos (AMPs) bem como um sistema de autofagia reduzido (WEHKAMP et al., 2005). Essas mudanças acarretam numa baixa proteção do epitélio intestinal, levando a um aumento tanto de adesão quanto de invasão bacteriana, sendo crucial para indução da inflamação.

Nas DIIs, a resposta inata funciona como um desencadeador da resposta imune, principalmente pela secreção de citocinas, quimiocinas e agentes antimicrobianos. A resposta imune adaptativa é a principal contribuinte para a patogênese da doença, seja

pelo aumento de citocinas inflamatórias e células T-auxiliares (Th) ou por células T reguladoras anti-inflamatórias ineficazes (Tregs) (WALLACE et al., 2014).

As DIIs possuem respostas imunes adaptativas divergentes entre si, enquanto DC apresenta um padrão de resposta Th1 com produção elevada de IFN- γ e IL-2, a CU é determinada por um padrão Th2, com altos níveis de IL-5 e presença de células T *natural killer* (NKT) atípicas, as quais secretam maiores quantidades de IL-13 (BREESE et al., 1993; NEURATH, 2014). Recentemente foi descrito a importância das células Th17 na manutenção da DIIs, estas células são produtoras de IL-17, IL-21 e IL-22, o que resulta em um aumento de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-8, principalmente pela via de ativação do NF- κ B e MAPK, culminando no recrutamento de neutrófilos e secreção de metaloproteases por fibroblastos intestinais e, conseqüentemente, induzindo a inflamação intestinal (DONG, 2008; SAKURABA et al., 2009).

Por outro lado, as células do sistema imune inato também desempenham papel importante na patogenia destas doenças e recentemente vem se destacando um subconjunto de células NK, denominadas células linfóides inatas, que são classificadas em três grupos. O primeiro grupo é composto por células ILC1 e NK, as quais expressam T-box nas células Tbet positivas e produzem citocinas relacionadas ao perfil Th1, especialmente IFN- γ (HURST et al., 2002). O segundo grupo é formado pelas ILC2, as quais apresentam dependência de expressão da proteína 3 de ligação ao fator GATA e do receptor de ácido retinóico relacionado ao receptor órfão (ROR) (NEILL et al., 2010) e secretam principalmente IL-5 e a IL-13, sendo então relacionadas a um perfil Th2 e apresentando um papel importante na defesa contra parasitas em reações alérgicas e asma (CHANG et al., 2011; MONTICELLI et al., 2011). Por fim, o grupo 3 é formado pelas ILC3 e células indutoras do tecido linfóide (LTi) e são ROR γ t dependentes. As ILCs do grupo 3 possuem relação com um perfil Th17, secretando IL-17 e IL-22, estão particularmente relacionadas com doenças auto-imunes e tem sido relacionado como mediador de colite em um modelo murino de DII (TAKATORI et al., 2009). Como primeira evidência, células LTi foram consideradas colitogênicas e requeridas no centro da inflamação, sugerindo um papel importante na patogenia das DIIs (EBERL et al., 2004). Corroborando com essa evidência animais ROR γ t^{-/-} não desenvolveram colite mediada por DC40L (BUONOCORE et al., 2010).

Há uma série de eventos no sistema imunológico que levam ao desencadeamento das DIIs e avanços recentes tem esclarecido a importância das vias relacionadas tanto ao sistema imune inato quanto ao adaptativo. Embora essas vias se apresentem de maneiras diferentes, o TNF aparece com fator central em todas.

1.1.3 TNF e seu papel central nas DIIs

✓ **Um pouco sobre TNF**

O TNF é uma citocina de 26 kDa, expressa na forma transmembrana denominada proTNF. Essa forma transmembrana é clivada pela TACE (enzima conversora do TNF), liberando assim um trímero solúvel do TNF de 17KDa. Essa forma solúvel do TNF atingirá a circulação sanguínea, o que lhe confere uma habilidade para agir em sítios distantes de sua produção e, por consequência, uma potente função endócrina. O TNF será ativado pela ligação do fator de transcrição NF- κ B, ou do c-Jun, ou do Fator Ativador de Proteína - 1 (AP-1), ou do Fator Nuclear Associado a Células-T (NFAT) à região promotora do gene TNF. A sua expressão ocorre em macrófagos ativados, células NK e linfócitos ativados. No entanto, células não imunes como fibroblastos e células endoteliais podem produzir TNF (SEDGER e MCDERMOTT, 2014).

O TNF interage principalmente com dois receptores transmembranas denominados Receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) e Receptor de TNF tipo 2 (TNFR2), sendo que a expressão de ambos os receptores é regulada por citocinas como interferon, explicando assim o sinergismo existente entre TNF e Interferon. Enquanto o TNFR1 é expresso constitutivamente em baixas quantidades na maioria das células, o TNFR2 é expresso em poucas células (SEDGER e MCDERMOTT, 2014).

A interação que ocorre entre TNF e TNFRs é complexa e se traduz em diversas cascatas de sinalização, culminando em coestimulação ou ativação celular, apoptose ou processos inflamatórios. Por essa variedade de sinalização, o TNF se relaciona com diversos processos fisiológicos como o desenvolvimento, organização e homeostase dos tecidos linfoides, mamários, neuronais e ectodermis. O TNF também apresenta um papel importante em diversas patologias (CROFT; SIEGEL, 2017), como na formação de granulomas durante a infecção por *Listeria* sp. e *Mycobacterium* (PINCH, 2001; BRADLEY, 2008). Em contrapartida, sua produção exacerbada contribui para o

aparecimento de desordens pró-inflamatórias, por uma intensa inflamação e injúria tecidual. Esse processo é relatado em inúmeras doenças, como a artrite reumatóide (AR), DIIs e asma (BRADLEY, 2008).

✓ Como é a atuação do TNF nas DIIs?

Nas DIIs a produção de TNF está elevada, o que resulta no aumento do recrutamento de células mononucleares do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas (DC), células T efectoras e ainda adipócitos e fibroblastos. O aumento de TNF é responsável por exercer inúmeras atividades pró-inflamatórias na mucosa através da ligação com seus receptores TNFR1 e TNFR2 (NEURATH, 2014; CROFT; SIEGEL, 2017; KIM e CHEON, 2017). Esta citocina atua induzindo a hipervascularização, alterando as barreiras epiteliais, promovendo a morte de células do epitélio intestinal (IECs) e células de Paneth e também induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002; CROFT; SIEGEL, 2017). A morte celular ocorre através da sinalização mediada por TNFR1, que ativa a via do receptor de interação à proteína quinase 1 (RIPK1) e caspase 3, bem como a produção de metaloproteases de matriz (MMPs) por miofibroblastos e células T, propiciando uma destruição exacerbada do epitélio intestinal (MEIJER et al., 2007; GÜNTHER et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que a ativação do TNFR2 promove a piora da colite (HOLTMANN et al., 2002; KIM; CHEON, 2017) e que a neutralização do TNF reduz a ativação de células T, levando a uma diminuição dos efeitos deletérios em modelo murino de colite (PERRIER et al., 2012). Ademais, o tratamento de DII com anticorpos que neutralizam o TNF apresenta eficácia significativa, principalmente na indução de apoptose de células T (DANESE; FIOCCHI 2011; BAUMGART; SANDBORN, 2012). Esses estudos evidenciam o importante papel do TNF na patogenia das DIIs e a redução da interação de TNF-TNFR tem se demonstrado eficiente para o tratamento das DIIs.

1.1.4 Tratamento das DIIs, como é feito e o que esperar?

O tratamento das DIIs ainda é uma questão problemática e requer atenção especial, uma vez que nenhuma terapia é totalmente eficaz e muitos pacientes não respondem ao tratamento (YADAV et al., 2016; HANAUER, 2017). Nestes casos, o que se tem preconizado é a prescrição de analgésicos e anti-inflamatórios esteroides.

Entretanto, quando a medicação não tem o efeito desejado, inicia-se uma terapia imunossupressora alternativa utilizando tiopurina, inibidores da calcineurina ou metotrexato (MTX) e seus análogos. Os análogos de tiopurina consistem em 6-mercaptopurina (6-MP) ou pro-droga azatioprina (AZA) que exercem efeito por atuar em metabólitos ativos de nucleotídeos de 6-tioguanina e assim inibir a proliferação de linfócitos (SAHASRANAMAN; HOWARD; ROY, 2008). O MTX possui um espectro maior de ação, tornando-o eficaz em condições como a artrite reumatóide, especialmente por sua capacidade de aumentar o acúmulo de adenosina, a qual é um poderoso agente anti-inflamatório (CHAN; CRONSTEIN, 2002). Já os inibidores da calcineurina são a ciclosporina e tacrolimus, cujo mecanismo de ação é a inibição da secreção de citocinas, através da ligação com a proteína fosfatase calcineurina dependente de Ca^{2+} (BENTIN, 1995). Apesar de serem amplamente utilizados, estes imunossupressores não são eficientes em induzir a remissão das DIIs e requerem monitoramento cuidadoso dos possíveis efeitos adversos, como a anemia, neutropenia, toxicidade hepática e pancreatite (KATZ, 2004; HINDRYCKX et al., 2017).

Novos agentes terapêuticos tem sido utilizados, entre eles estão os anticorpos monoclonais que atuam inibindo a ação do TNF e seus receptores, como o infliximab (Remicade, Janssen), o adalimumab (Humira, AbbVie), o certolizumab pegol (Cimzia, UCB), o golimumab (Simponi, Janssen), o natalizumab (Tysabri, Biogen), o vedolizumab (Entyvio, Takeda) e, mais recentemente, o ustekinumab (UDALOVA et al., 2016; HANAUER, 2017). Embora o tratamento com estes agentes seja eficiente, especialmente em conter recidivas da doença, alguns efeitos adversos foram observados, como um risco maior de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin, câncer de pele e de doenças auto-imunes (KALTSONOUDIS et al., 2014; UDALOVA et al., 2016; YADAV et al., 2016). Além disso, 50% dos pacientes deixam de responder ao longo do tratamento (KLOTZ; TEML; SCHWAB, 2007; YADAV et al., 2016; HANAUER, 2017).

Buscando minimizar os efeitos adversos existentes, tem se utilizado a combinação dos monoclonais e imunossupressores e, com isso, tem-se obtido bons resultados, como demonstrado no tratamento de pacientes que receberam terapia combinada, quando comparados com pacientes que receberam infliximab em monoterapia (JONES et al., 2015; TORRES et al., 2015). Também foi relatada uma menor quantidade de anticorpos contra a droga (anti-infliximab), resultando no aumento dos níveis do infliximab em

pacientes que receberam terapia combinada. Com os achados destes estudos, grande parte dos gastroenterologistas tem adotado a combinação de um monoclonal e um agente imunossupressor, principalmente tiopurina, buscando uma melhora no quadro clínico (JONES et al., 2015; TORRES et al., 2015).

Como perspectiva futura para o tratamento das DIIs, existem inúmeros estudos com o enfoque em descobrir novos fármacos. Entre eles, a terapia com siRNA (pequeno RNA de interferência) para silenciamento de genes vem recebendo bastante atenção devido à possibilidade de atuação específica e utilização de vários sistemas de entrega oral, tais como nanopartículas em microesferas de sistema oral (NiMOS), thoketal-nanopartículas, ciclodextrina catiônica e polietilenoimina (PEI) vetores. Estes estudos mostraram que o siRNA encapsulado, quando usado para o bloqueio de TNF na colite murina, reduziu os níveis de RNA mensageiro (mRNA) dessa citocina, bem como outros mediadores pró-inflamatórios (IL-6, IL-1 β , IL-5 e IFN- γ) (WILSON et al., 2010; KRIEGEL e AMIJI, 2011; MCCARTHY et al., 2013). Ainda, estratégias buscando a inibição de IL-18 vem sendo utilizadas e já foi demonstrado que essa intervenção possui potencial efeito anti-inflamatório pela redução do TNF (SIEGMUND et al., 2001). Por fim, estudos buscando explorar o papel protetor da microbiota intestinal vem sendo realizados. Yan e colaboradores (2007) mostraram que proteínas purificadas da bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG foram capaz de induzir o crescimento celular e inibir apoptose das células epiteliais induzidas por TNF *in vivo*. Considerando os estudos analisados, podemos concluir que o tratamento e manejo das DIIs é complexo e que, apesar das várias estratégias que podem ser adotadas, ainda é necessário desenvolver tratamentos mais eficazes.

1.2 *Toxoplasma gondii* como desencadeador de DIIs.

1.2.1 Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, amplamente distribuído na natureza e pertencente ao filo Apicomplexa. Este protozoário é o agente causador da toxoplasmose e pode infectar inúmeros hospedeiros, sendo incluídos todos os animais de sangue quente (DEBIERRE-GROCKIEGO, 2010; ROBERT-GANGNEUX et al., 2015). A infecção em indivíduos imunocompetentes é normalmente

assintomática ou se apresenta com sintomas inespecíficos. No entanto, para indivíduos imunossuprimidos, como aqueles com câncer ou com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a toxoplasmose pode ser extremamente deletéria, podendo levar a cegueira ou encefalite. Ainda, caso a infecção primária ocorra durante a gravidez, existe um risco maior de que ocorra aborto ou má formação fetal e danos neurológicos (JONES, PARISE e FIORE, 2014).

1.2.2 Ciclo de vida do parasito

O parasita *T. gondii* apresenta um ciclo heteroxeno, com um ciclo sexuado ocorrendo intestino de seu hospedeiro definitivo, que é composto pelos membros da família Felidae, como os gatos domésticos. Já o ciclo assexuado pode ocorrer em diversos animais devido à capacidade do parasita infectar diferentes espécies (GAZZINELLI et al., 2014).

A infecção dos hospedeiros intermediários ocorre quando há o consumo de alimentos ou água contaminados com oocisto esporulado ou de carne malcozida que contenha cistos. Ao entrar em contato com o conteúdo estomacal, os esporozoítos (oocistos) ou bradizoítas (cistos) são liberados e penetram nas células intestinais dos hospedeiros, levando à sua diferenciação em taquizoítos, iniciando uma replicação assexuada por endodigenia, com consequente aumento da carga parasitária. Finalizado esse ciclo de replicação inicial, as células hospedeiras irão se romper liberando parasitas que infectam outras células. Uma vez que a fase aguda seja controlada, taquizoítas sobreviventes se diferenciam em bradizoítas, formando cistos intracelulares, preferencialmente nos tecido muscular e nervoso. Uma vez que os cistos tenham sido formados, o hospedeiro estará na fase crônica da toxoplasmose, que perdura até o fim da vida. Essa fase será de suma importância para a continuidade do ciclo, visto que os felídeos podem preda os animais que contenham esses cistos. Com o contato dos cistos com o conteúdo estomacal dos felinos, ocorre a liberação dos bradizoítos, que irão invadir as células epiteliais do intestino e se replicar de forma assexuada. Posteriormente, os bradizoítos se transformam em merozoítos por esquizogonia e, ao romper as células hospedeiras, os merozoítos se transformam em gametas masculinos e femininos por gamogonia. Os gametas se fundem, formando os oocistos não esporulados que serão expelidos com as fezes dos felídeos. Uma vez em contato com o ambiente externo, os

oocistos tornam-se esporulados, podendo reiniciar o ciclo (DUBEY, 1998; GAZZINELLI et al., 2014; ROUGIER; MONTOYA; PEYRON, 2016).

1.2.3 Como a infecção por Toxoplasma gondii pode mimetizar uma doença intestinal inflamatória?

A infecção por *T. gondii* ocorre pela ingestão oral de cistos teciduais contendo bradizoítas ou pela ingestão de oocistos contendo esporozoítos. Quando se encontram no intestino, os bradizoítas se converterão em taquizoítas, os quais invadem células nucleadas por penetração ativa estabelecendo um vacúolo aonde eles se multiplicam rapidamente por replicação. Como consequência dessa infecção, um forte processo inflamatório será estabelecido, reduzindo a carga parasitária (HARKER; UENO; LODOEN, 2015). A resposta Th1 desencadeada é responsável pelo controle da infecção. Entretanto, a ativação exacerbada da resposta Th1 na infecção pode ser um dos fatores predominantes na patogenia da toxoplasmose.

Estudos utilizando camundongos C57BL/6 demonstraram que estes possuem uma alta susceptibilidade frente a infecção oral por cepa do tipo II de *T. gondii*, principalmente devido ao desenvolvimento de necrose intestinal (HARKER; UENO; LODOEN, 2015). A resposta imune estabelecida durante a infecção por este parasita é principalmente do tipo Th1, com a produção intensa de IL-12 e IFN- γ pelas células dendríticas e células T, em resposta ao estímulo fornecido por moléculas secretadas pelo protozoário. Devido à produção de IFN- γ , macrófagos e outras células do sistema imune são recrutados e ocorre ainda a produção de outras citocinas como TNF, proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1), óxido nítrico (NO) e IL-6 (HEIMESAAT, M. M. et al., 2015; OLGUIN et al., 2015). Este modelo de infecção retrata fidedignamente a morfopatologia de episódios agudo de DIIs em humanos (LIDAR et al., 2009; DIAS et al., 2014). Deste modo, sugere-se que *T. gondii* possui envolvimento na etiopatogenia dessas doenças, especialmente na doença de Crohn humana (LIDAR et al., 2009). Neste contexto, trabalhos estão sendo desenvolvidos para avaliar substâncias que modulem a inflamação desencadeada por este parasita. Heimesaat e colaboradores (2015) determinaram que NAP, um peptídeo ativo derivado da proteína ADNP (proteína de atividade neuroprotetora), reduz os efeitos deletérios da ileíte desencadeada por *T. gondii*.

1.3 Metaloproteases

1.3.1 *Um pouco sobre metaloproteases*

Metaloproteases são proteínas pertencentes à superfamília Metzincin, a qual é caracterizada por ter um domínio de ligação ao zinco e ser dependente de interações com este íon. Além disso, contém um *motif* bem conservado, com três resíduos de histidina. Dentro desta superfamília, encontra-se a família de adamalissinas (ADAMs), ADAM-TSs (ADAM com domínio semelhante a trombospondina), astacinas e serralicinas. As metaloproteases podem ser solúveis ou ancoradas às membranas e atuam sobre substratos específicos, dentre eles estão os componentes da matriz celular extracelular (ECM - extracellular matrix), citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento e receptores de adesão da superfície celular (de PAULA et al, 2014; FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND; SWENSON, 2013).

Metaloproteases de peçonha de serpente (SVMPs) tem sido relacionadas com as metaloproteases de matriz já citadas, apresentando um domínio de ligação conservado com todas as ADAMs, indicando uma evolução em comum (PORTES-JUNIOR et al., 2014). Considerando essas características, as SVMPs vem sendo estudadas como possíveis agentes terapêuticos (CASEWELL et al., 2015), com potencial atividade antimicrobiana, cicatrizante, antitumoral ou analgésica (CALDERON et al., 2014; CARLSON; ROURK; DESAI, 2014; CHELLAPANDI, 2014).

1.3.2 *Metaloproteases e seu papel na inflamação*

Metaloproteases possuem um papel modulador nos vários aspectos da inflamação, devido à capacidade que possuem de regular a transmigração dos leucócitos a partir de tecido vascular para os tecidos e modular a atividade e a disponibilidade dos mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. Para exemplificar, metaloproteases de matriz de mamíferos MMP-1, MMP-2, MMP-13 e MMP-14 são capazes de degradar a MCP-3, que é primordial no recrutamento de leucócitos. Ainda, MMP-1 e MMP-3 são capazes de inativar as proteínas quimiotáticas de monócitos-1,2 e 4 (MCP-1, MCP-2, e MCP-4). Por fim, pode ocorrer a degradação do fator derivado de células do estroma (SDF-1 alfa) por MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, e MMP-14. (MENDES et al., 2013).

As SVMPS também apresentam uma capacidade de modular a inflamação (FOX; SERRANO, 2008). Estudos demonstraram que a Jararagina, uma metaloprotease isolada de *Bothrops jararaca*, é capaz de exercer atividade pró-inflamatória e pró-apoptótica em células de melanoma humano, induzindo ainda mudanças morfológicas e na sua viabilidade (GALLAGHER et al., 2005). Outro exemplo é a neuwiedase, uma SVMPS de classe P-I isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, a qual é capaz de exercer uma forte atividade pró-inflamatória quando inoculada no músculo gastrocnêmio de camundongo, resultando na formação de um infiltrado inflamatório e aumento de MMP-9 e das citocinas IL-1 β e IL-6 (AKAO et al., 2009). Por fim, a rF II, uma fibrinogenase recombinante produzida a partir do protótipo da FII, uma metaloprotease com ação fibrinolítica sobre a cadeia β da fibrina isolada da peçonha da serpente *Agkistrodon acutus*, foi capaz de diminuir os níveis de TNF no plasma sanguíneo de coelhos estimulados previamente com LPS, sendo que esta proteólise do TNF é sugerida como um possível mecanismo de proteção à coagulação intravascular disseminada (DIC) induzida por LPS (KIM et al., 2017). Ademais, esta metaloprotease recombinante FII exerceu proteção na pancreatite aguda severa (SAP) induzida por taurocolato de sódio 5%, a qual é dependente da degradação de TNF (COOPER et al., 2011). Com tudo isso, o estudo do papel das metaloproteases na inflamação vem se tornando cada vez mais importante.

1.3.3 BmooMP- α -I: uma recente metaloprotease capaz de regular inflamação

BmooMP- α -I é uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops moojeni*, que apresenta peso molecular de 24.5 kDa e possui atividade fibrin(ogen)lítica, anticoagulante, porém não exerce ação hemorrágica ou fosfolipásica (AKAO et al., 2010). A BmooMP- α -I possui 200 resíduos de aminoácidos, 151 moléculas de H₂O e um íon de zinco e um de cálcio, e apresenta coordenação octaédrica do sítio de ligação ao zinco, contrariamente às outras metaloproteases, que apresentam coordenação tetraédrica (AKAO et al., 2010). Acredita-se que esta metaloprotease possui uma atividade anti-inflamatória, uma vez que é capaz de degradar TNF (SILVA et al., 2016). Além disso, apresenta alta afinidade por ligações prolina-prolina, o que lhe confere alta especificidade (OKAMOTO et al., 2014).

Considerando o atual conhecimento disponível na literatura científica, neste projeto conjecturamos que os efeitos deletérios da ileíte induzida pela infecção oral de *T. gondii* seriam amenizados pelo tratamento com a BmooMP- α -I, devido a sua capacidade de inibir a atividade do TNF.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As DIIs são doenças relativamente frequentes na população e não apresentam tratamentos totalmente eficazes. Essas doenças possuem uma alternância entre períodos de melhoras e recidivas promovendo efeitos deletérios nos pacientes. Assim, é necessário o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. Neste contexto, a utilização de metaloproteases poderia ser uma alternativa válida, uma vez que regulam os processos inflamatórios atuando como mediadores pró-inflamatórios, ou anti-inflamatórios, dependendo do contexto por meio de sua atividade proteolítica. Dentre as metaloproteases, encontra-se a BmooMP- α -I, a qual foi isolada recentemente e muitas de suas propriedades biológicas ainda necessitam ser elucidadas. Recentemente, foi demonstrada que esta metaloprotease desenvolve uma possível atividade anti-inflamatória através da degradação do TNF. Assim acredita-se que a BmooMP- α -I possa atuar no controle das manifestações inflamatórias no intestino que ocorrem de forma exarcebada durante a infecção por *T. gondii*, e em outras desordens inflamatórias, como na toxoplasmose que embora seja assintomática e sem maiores complicações pode ser extremamente deletéria para indivíduos com déficits de resposta imune.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se a metaloprotease BmooMP- α -I é capaz de amenizar os efeitos da ileíte em modelo murino induzido pela infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o índice de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados e tratados com BmooMP- α -I em comparação com animais não tratados;
- b) Avaliar a capacidade da BmooMP- α -I de reduzir os efeitos deletérios causados pelo processo inflamatório induzido por esta infecção experimental;
- c) Caracterizar a resposta imune de camundongos C57BL/6 tratados com BmooMP- α -I, avaliando a capacidade da BmooMP- α -I de interferir na produção das diferentes citocinas secretadas;
- d) Avaliar se a BmooMP- α -I é capaz de interferir tanto na resposta imune inata como na adaptativa, através da atividade *ex vivo* de células do baço e do linfonodo mesentérico.

METODOLOGIA

4. Metodologia

4.1 Metaloprotease

4.1.1 Obtenção da peçonha

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi obtida do Serpentário Bioagents, em Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin.

4.1.2 Purificação da enzima BmooMP- α -I

A enzima BmooMP- α -I foi purificada de acordo com a metodologia estabelecida por Silva e colaboradores (2016), com modificações. Cerca de 400 mg de peçonha bruta de *B. moojeni* foi dissolvida em 4 mL de tampão bicarbonato de amônio (Sigma Chem. Co) a 50 mM (pH 7,8) e centrifugado a 10,000 x g por 10 min. O sobrenadante foi então passado em coluna DEAE – Sephacel (Sigma Chem. Co) (1,7 x 15 cm), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio a 50 mM (pH 7,8) e eluída com um gradiente convexo/crescente de concentração (0,05-0,3 M) do mesmo tampão. A fração resultante da cromatografia anterior, denominada E2, foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio a 50 mM, pH 7,8 e aplicada em uma coluna Sephadex – G75 (Amersham Pharmacia Ltda) (1 x 100cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A segunda fração obtida da cromatografia por exclusão molecular (Sephadex G-75), denominada E2G2, também foi ressuspensa em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 e passada na resina de Benzamidina Sepharose (Amersham Pharmacia Ltda) (20 X 15 cm). As amostras foram eluídas com tampão glicina 50 mM pH=3,0. Em todas as cromatografias foram feitas coletas de 3,0 mL de cada coluna, com um fluxo de 20 mL/hora. A absorbância de cada fração foi medida em 280 nm no espectrofotômetro (*Eppendorf Biophotometer plus*). As amostras selecionadas foram reunidas em “pools”, dosadas, liofilizadas e armazenadas a - 20°C até o momento de uso.

4.1.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas da peçonha bruta e das frações isoladas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo que a soroalbumina bovina (Sigma Chem. Co) foi utilizada como padrão.

4.1.4 Eletroforese unidimensional (1D. SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada para delimitar e avaliar o grau de pureza das frações resultantes. A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 ou 18% foi feita conforme descrito por Laemmli (1970). Para isso, gel de empilhamento a 5% em pH 6,8 contendo 0,125M de Tris-HCl e 0,1% de SDS e um gel de separação a 14% em pH 8,8 e 0,1% de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m) foi utilizado. De 5 a 50 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8; glicerol 20%; SDS 4% e azul de bromofenol 0,2% como corante, na ausência de agente redutor). Feito isso, as amostras com proteínas foram colocadas em água fervente durante 3 a 5 minutos e completamente dissociadas por imersão. Posteriormente, essas amostras proteicas foram aplicadas no gel com um volume de 5 a 30 µL dissolvidas no mesmo tampão. As amostras foram então separadas pela utilização de um sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Por fim, o gel foi corado por 15 minutos numa solução de Coomassie Blue e descorado em solução de água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v). O padrão de massa molecular do kit da “BenchMarck™ Protein Ladder” foi utilizado.

4.2 Animais

Camundongos C57BL/6, de seis a dez semanas de idade, foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em condições padronizadas de criação. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), que foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob Protocolo CEUA-UFU No. 109/16.

4.3 Obtenção da cepa Pru-GFP de *Toxoplasma gondii*

O parasita *Toxoplasma gondii* da cepa Pru-GFP foi mantida como descrito anteriormente (TENORIO et al, 2010). Camundongos foram inoculados com 10^4 taquizoítas de *Toxoplasma gondii* da cepa Pru-GFP por via intraperitoneal. No estágio crônico da infecção os camundongos foram eutanasiados e os cérebros recolhidos e

homogeneizados em 1ml de PBS para obtenção dos cistos. Os cistos foram identificados e quantificados em microscópio de luz.

4.4 Infecção e tratamento dos camundongos

Camundongos C57BL/6, de 6 a 8 semanas de idade, foram utilizados para infecção e posterior tratamento. Foram formados 3 grupos com 5 animais cada. O grupo I, denominado BmooMP- α -I, foi composto por camundongos infectados com 50 cistos de *T. gondii* por via oral e tratados com BmooMP- α -I (2 μ g/g de peso corporal). No segundo grupo, o qual foi nomeado de PBS, os camundongos foram inoculados com 50 cistos por via oral e tratados com placebo (0,3 ml de tampão salino fosfato (PBS)). O terceiro grupo, foi composto por animais não infectados e não tratados e denominado de NINT. Os 3 grupos foram avaliados durante o processo agudo de ileíte e foram eutanasiados no sétimo dia. No terceiro dia pós-infecção, os animais tiveram seu tratamento iniciado e mantido por 3 dias consecutivos com a BmooMP- α -I ou placebo (somente PBS) por via intraperitoneal com volume total de 0,1 – 0,2 mL.

4.5 Obtenção das amostras para análise

A obtenção das amostras foi realizada no sétimo dia pós-infecção. Os animais sofreram sangria total para obtenção do soro. Posteriormente, baço, linfonodos mesentéricos e íleo de cada animal foram removidos em condições estéreis. Os baços e linfonodos mesentéricos foram colocados em meio de cultura para análise *ex vivo*. Para análise da expressão gênica, os linfonodos mesentéricos foram armazenados em Trizol e submetidos a um congelamento rápido em nitrogênio líquido. Ainda, para análise histológica, uma porção do íleo foi armazenado em formalina ou em meio de inclusão para congelamento e a outra submetida a um congelamento rápido em nitrogênio líquido para posterior análise de citocinas.

4.6 Análise de sobrevida e morbidade

Para análise de sobrevida e morbidade grupos como descrito no item 4.4 foram montados. Os animais então foram acompanhados e pesados para análise do *score* de morbidade como previamente descrito (BARTLEY *et al.*, 2006) e demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Critérios do *score* de morbidade. A tabela demonstra como foi feita a pontuação dos itens analisados para a elaboração do *score* de morbidade de acordo com as diretrizes do Ministério do Interior do Reino Unido. O valor do *score* de cada categoria foi somado para a composição do *score* final

Categoria	Descrição	Score
A Resposta febril	Normal	0
	Pelo arrepiado	1
	Rígido	2
B Desidratação	Manutenção/ ganho de peso	0
	10% de perda de peso	1
	20% de perda de peso	2
C Comportamento	Ativo	0
	Arqueado	1
	Arqueado + Mover com toque	2
	Arqueado + Relutante em mover	3

4.7 Análise macroscópica do intestino delgado

A análise macroscópica do intestino delgado foi realizada durante a coleta dos órgãos, e avaliada segundo os parâmetros demonstrados da tabela 2, os quais haviam sido descritos anteriormente por O'Hara e colaboradores (2007). Além disso, o intestino delgado foi medido para verificação do possível encurtamento do intestino.

Tabela 2: Critérios do *score* para avaliação macroscópica do intestino delgado. A tabela indica como foi composta a pontuação dos itens avaliados para estabelecimento do *score* macroscópico. A pontuação de cada item analisado foi somada para a composição do *score* final.

Descrição	Score
Preseça e gravidade de aderências	0 - 1
Espessura do intestino (mm)	0 - 1
Presença de diarreia	0 - 1
Extensão de úlceras e hiperemias	0 - 10

4.8 Análise histopatológica

A análise histológica foi realizada conforme descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2009). Amostras do íleo foram fixadas em 10% de formalina, posteriormente foram embebidos em parafina e cortadas em secções de 5µm. Os cortes foram corados com

hematoxilina e eosina (H&E) e examinados por microscopia de luz. *Scores* inflamatórios foram representados como unidades arbitrárias: 0-2: leve; 2-4: moderada; 4-6 grave e >6: muito grave. Para a indicação desses *scores*, foi analisada a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, redução das vilosidades e presença de necrose. Foram realizadas análises duplo-cegas por dois pesquisadores utilizando o microscópio Olympus FSX100 com objetiva de 40 ×.

4.9 Quantificação das células caliciformes

Para a quantificação das células caliciformes, os cortes histológicos em parafina foram corados utilizando a coloração de *Alcian Blue*. Posteriormente, os cortes do íleo foram divididos em quatro quadrantes e duas imagens em objetiva 10x foram adquiridas de cada quadrante usando o microscópio Olympus FSX100 foram adquiridas e utilizadas para uma contagem automática utilizando o programa *Image J*.

4.10 Quantificação do infiltrado de macrófagos no íleo

Para quantificação do infiltrado de macrófagos no íleo foram utilizados cortes obtidos no Criostato de tecido congelados previamente. Em seguida foi realizado imunofluorescência dos cortes. Primeiro, os cortes foram lavados com PBS 1X durante 5 min por 3 vezes e incubadas com anticorpo anti-CD11b PE (BD Pharmingen™; número de catálogo: 561689) na concentração 1:200 durante 30 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e então montadas com *prolonged gold antifade with DAPI* (Invitrogen™; número do catálogo: P36931).

4.11 Avaliação da produção de citocinas *ex vivo* por células do baço e linfonodo mesentérico

Para avaliação da atividade *ex vivo* do baço e linfonodo mesentérico, os mesmos foram coletados e suas células isoladas e quantificadas. Em seguida, 1×10^5 células/poço em 100 µl de meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (FBS, Sigma) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 12 h, em estufa de CO₂ a 37° C. Posteriormente, as células plaqueadas foram submetidas ao estímulo antigênico pela adição de STAg (50 µg/ml), antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* durante 48 horas de incubação. Finalmente, os sobrenadantes da cultura celular foram coletados e armazenados em freezer -70°C para mensurar citocinas.

4.12 Dosagem de citocinas

Para a dosagem de citocinas os métodos de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e CBA (*cytometric beads array*) foram empregados. A dosagem de TNF no sobrenadante das células dos linfonodos mesentéricos cultivadas *ex vivo* e IFN- γ no sobrenadante das células do baço cultivadas *ex vivo* foram realizadas pelo método de ELISA utilizando o kit de dosagem de TNF da R&D (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) R&D e o kit de dosagem de IFN- γ da BD (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) segundo as normas dos fabricantes.

A dosagem de IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10 and TNF no soro e homogenato do íleo foi realizada pelo método de CBA utilizando o *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17* (Catalog No. 560485) conforme o sugerido pelo fabricante. Em ambos os métodos, a concentração de cada citocina foi estimada por meio da Logística de Quatro Parâmetros (4-PL), baseando-se em uma curva de diluição seriada da respectiva proteína recombinante a qual é expressa em pg/ml.

4.13 Determinação da expressão gênica de citocinas no linfonodo mesentérico

Para a análise da expressão gênica de mediadores inflamatórios no linfonodo mesentérico foi realizado RT-PCR seguido de qPCR. Primeiramente, extraiu-se o RNA pelo método de Trizol. Esse RNA foi tratado com DNase e em seguida, foi feita a obtenção do cDNA pelo uso do Kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). A quantificação foi realizada pelo sistema de detecção SYBR *green*, como anteriormente descrito (WAHAB et al., 2010). A expressão do gene de interesse foi normalizada de acordo com a expressão do gene de referência GAPDH (RENSHAW et al., 2002). Os *primers* iniciadores utilizados para a quantificação dos mediadores inflamatórios estão listados na tabela 3. A análise do resultado da expressão gênica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 3: Lista de mediadores e *primers* utilizados na qPCR. Representação dos mediadores inflamatórios avaliados e os *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (qPCR)

<i>Primer</i>	Sequência
IL-6 Forward:	CACAGAGGATACCACTCCCA
IL-6 Reverse:	CCACGATTTCCAGAGAACAT
IL-1b Forward:	GCAACTGTTCTGAACTCAACTG
IL-1b Reverse:	GCCCTTCATCTTTTGGGGTCC
MCP-1 Forward:	CTCACCTGCTGCTACTCATTC
MCP-1 Reverse:	GCTTCTTTGGGACACCTGC
CD206 Forward:	GCAGATGGGTTATTTAC
CD206 Reverse:	CTTCTTGCAAAATGCTCGCG
IL-4R Forward:	TGGAATAACCTGTACCCACG
IL-4R Reverse:	TGAATTCTGCAGGGTTGTCC
IL-10 Forward:	CACATGCTCCTAGAGCTGCG
IL-10 Reverse:	CTGCATTAAGGAGTCGGTTAGC
TAK 1 Forward	CAAGGAGTGGCTTACCTGC
TAK 1 Reverse	CTGTCCCTCCTGCAACCAGCAGC
Arg-1 Forward:	GCACTGAGGAAAGCTGGTC
Arg-1 Reverse:	CATTAGGGACATCAACAAAGGC

4.14 Análise do parasitismo

O parasitismo dos intestinos dos camundongos foi avaliado pela técnica de imunohistoquímica como anteriormente descrito (SILVA *et al.*, 2010). Primeiramente, foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos cortes parafinizados. Em seguida, foi realizado o resgate antigênico em tampão citrato (pH 6,0) aquecido em forno microondas durante 5 min. Feito isso, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS acrescido de leite desnatado a 3% durante 3 min e então os cortes foram incubados *overnight* com soro de coelho anti *T. gondii* produzido no nosso laboratório, o qual foi diluído em saponina 0,01%. O anticorpo IgG de cabra biotilado anti-camundongo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação foi amplificada pela utilização do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories,

Inc., Burlingame, CA, EUA) e revelada com 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co., St . Louis, MO, EUA). Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e montados com lâminulas para avaliação em microscópio de luz. As lâminas foram avaliadas para a presença de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cisto em 50 campos diferentes utilizando objetiva de 40x.

4.15 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os testes foram selecionados de acordo com a sua aplicabilidade. O teste *T de student* para avaliação dos *scores* de morbidade e parâmetros macroscópico, da variação do peso corporal, da medida da área do infiltrado de macrófago e da produção de citocinas no íleo. O teste de Man-Whitney foi aplicado para a análise comparativa do *score* inflamatório, da produção de citocinas *ex vivo* pelas células do baço e linfonodo mesentérico e análise do parasitismo. O teste *one-way* ANOVA seguido do pós teste de comparação múltipla *Bonferroni* foi utilizado para a análise comparativa do comprimento do intestino e da contagem do número de células caliciformes. O teste de Kruskal-Wallis acrescido do pós teste de comparação múltipla *Dunn's* foi utilizado para análise do produção de citocinas no soro. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 O efeito do tratamento com BmooPM- α -I nos parâmetros de mortalidade e morbidade.

Para indução de ileíte, os animais foram infectados oralmente por gavagem com 50 cistos da cepa de *T. gondii* Pru-GFP. Os animais foram então tratados por três dias, a partir do 3º dia após infecção. Os sinais clínicos da ileíte foram então avaliados bem como a mortalidade dos animais. Em relação à mortalidade, embora não se tenha observado nenhum animal sobrevivente, o grupo tratado com BmooPM- α -I teve uma sobrevida aumentada em relação aos animais não tratados (figura 1A). Além do aumento da sobrevida, os animais que receberam tratamento também apresentaram uma melhora nos sinais clínicos. Um aumento no *score* de morbidade foi observado a partir 4º pós – infecção em ambos os grupos, entretanto, esse aumento foi menos acentuado nos animais tratados com a metaloproteinase (figura 1B). Ainda, foi verificado que ambos os grupos apresentaram uma manutenção no peso até o 3º dia após a infecção, e após esse período os animais submetidos ao tratamento com BmooPM- α -I apresentaram uma perda de peso menos acentuada em relação aos animais não tratados (figura 1C).

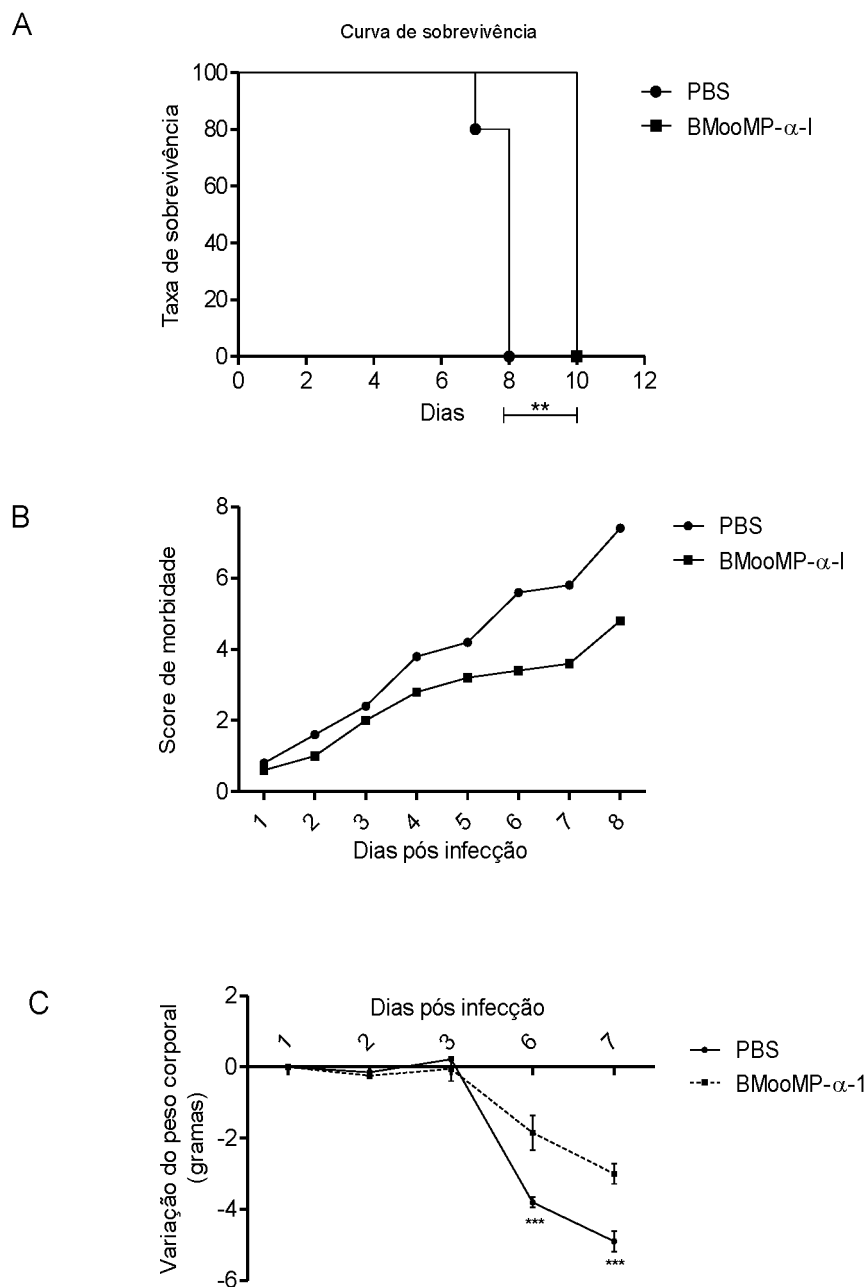


Figura 1: Mortalidade e morbidade dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I. (A) – Índices de sobrevivência dos animais tratados com BmooPM- α -I ou PBS. (B) Determinação dos *scores* de morbidade do grupo tratado em relação ao não tratado. (C) Determinação da variação da perda de massa corporal do grupo tratado em relação ao não tratado ao longo do tempo. Significâncias estatísticas determinadas pelo teste T de *Student* (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$).**

5.2 Aspecto macroscópico e microscópico dos intestinos após tratamento com BmooPM- α -I.

Os efeitos de BmooMP- α -I no aspecto macroscópico do intestino foram avaliados no momento do sacrifício dos animais. Assim, amostras dos intestinos foram coletadas de todos os grupos e analisadas comparativamente. Foi possível observar que os intestinos de animais não tratados apresentaram danos graves, como presença de úlceras evidenciadas pela presença de hiperemia e dilatação com encurtamento dos intestinos e em contrapartida o intestino dos animais tratados estavam menos danificados com uma certa similaridade aos intestinos de um animal saudável (figura 2A). O encurtamento do intestino observado nos animais não tratados foi significativo em relação aos animais sem indução de ileíte, enquanto os animais tratados com BmooMP- α -I preservaram seu comprimento intestinal e não foi observada nenhuma diferença no tamanho do intestino do grupo tratado e dos animais sem infecção (figura 2B). Ainda, o *score* macroscópico de inflamação foi significativamente menor para os animais tratados com a metaloprotease em comparação com o grupo PBS ($p < 0,05$) (figura 2 C).

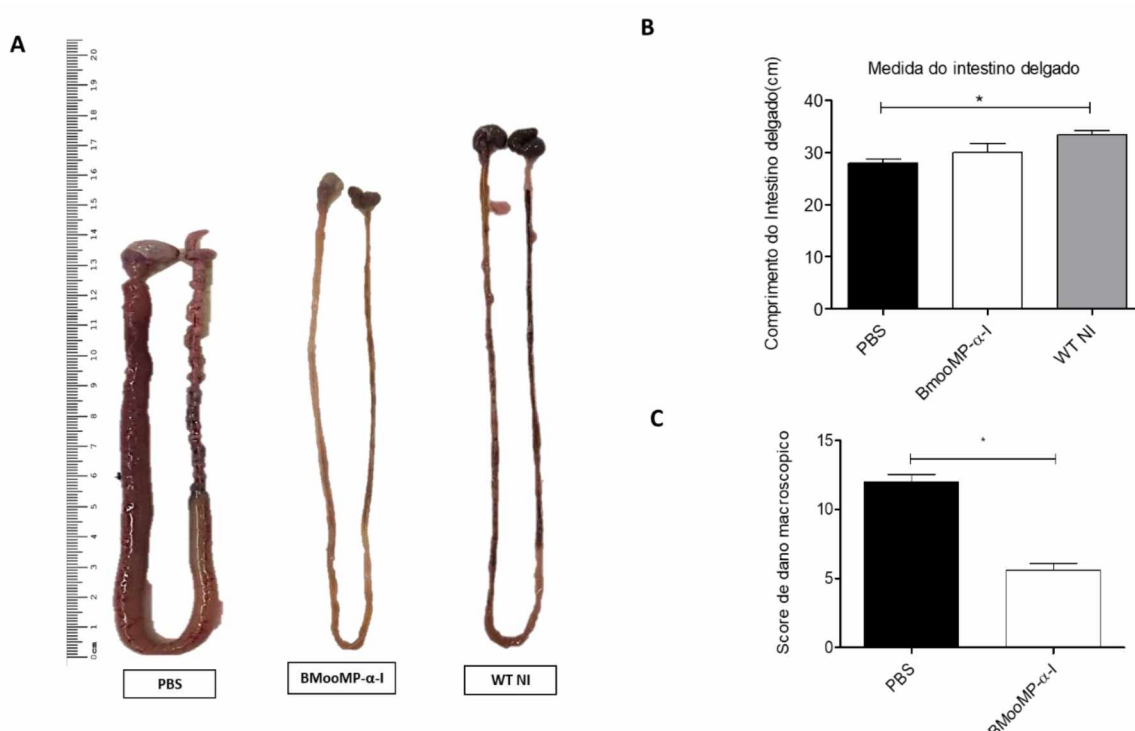


Figura 2: Análise macroscópica dos intestinos dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I. (A) Representação do aspecto macroscópico do intestino delgado após eutanásia dos animais dos grupos tratado, não tratado e sem indução de ileíte. **(B)** Medida do comprimento do intestino delgado dos animais com ileíte submetidos ou não ao tratamento com a proteína BmooPM- α -I e sem ileíte. O teste estatístico *One-way* ANOVA com pós teste de comparação múltipla Bonferroni foi utilizado. **(C)** Índice de pontuação macroscópica do intestino dos animais. O teste *T* de *Student* foi aplicado para análise estatística (* $p < 0,05$)

Com intuito de examinar o efeito da proteína na arquitetura do intestino delgado, os cortes intestinais foram corados com H&E ou *Alcian Blue* e analisados por meio de microscopia óptica. Alterações histopatológicas na mucosa ileal, como o aumento da espessura dos vilos intestinais, a perda da barreira epitelial e em alguns casos presença de necrose bem como a presença de infiltrado de células mononucleares na mucosa e lâmina própria foram observadas em ambos os grupos. Entretanto, essas alterações apresentaram-se diminuídas e com menor gravidade nos animais tratados com BmoMP- α -I, quando comparado ao grupo sem tratamento (figura 3). Uma redução no *score* morfológico também foi demonstrado, sendo representado como uma mudança de escala no grau de gravidade da doença (figura 4A). Em relação ao número de células caliciformes, identificamos uma redução substancial no número de células caliciformes no grupo não tratado em comparação com animais tratados e sem infecção e tratamento ($p < 0,05$) (figura 4B).

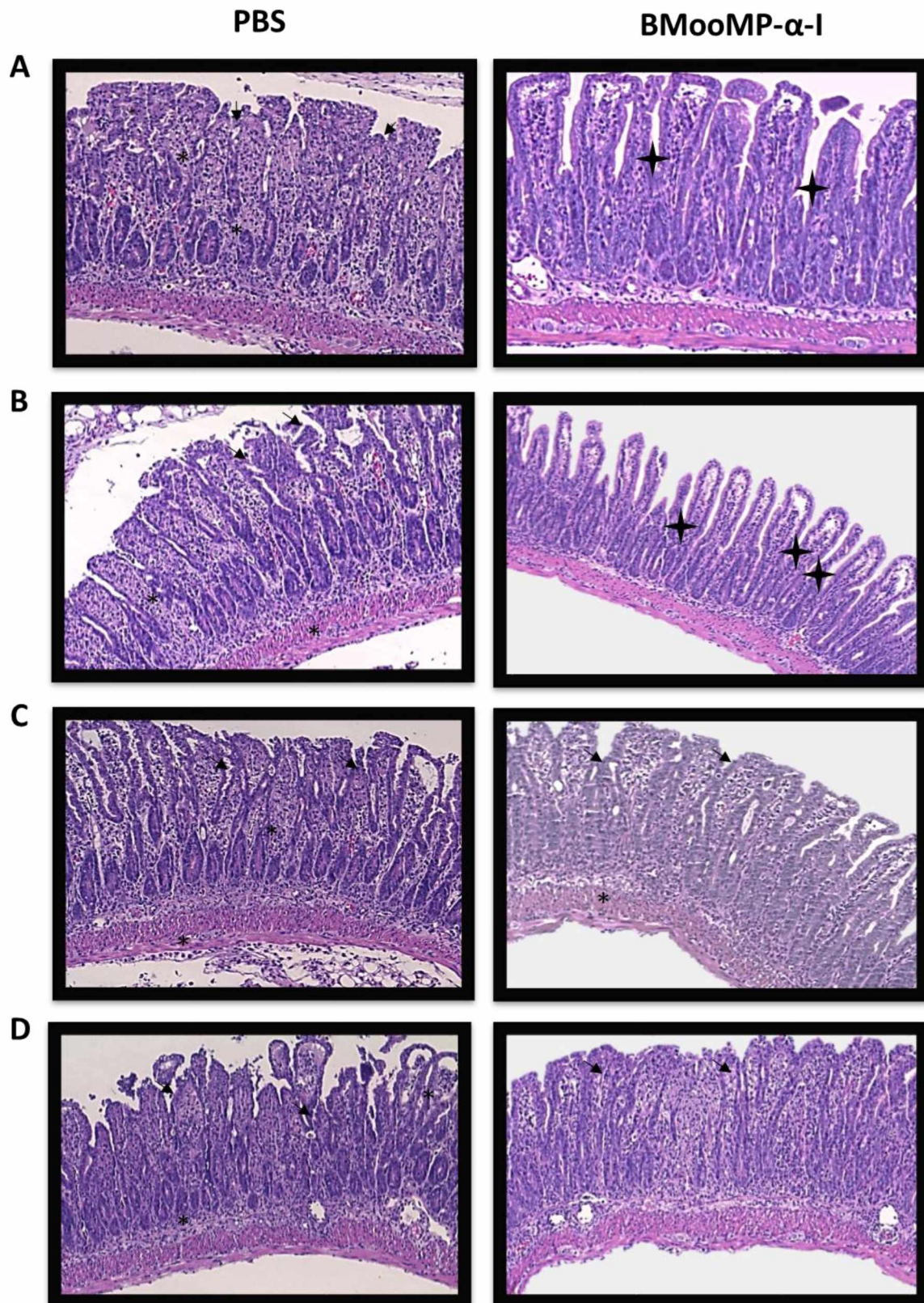


Figura 1: Fotomicrografias representativa do íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I. Cortes histológicos em aumento de 10x corados com hematoxilina-eosina representando alterações nos aspectos morfológicos do íleo dos animais do grupos PBS e BmooPM- α -I. **(A-D)** Representação de diferentes porções do íleo dos animais com ileíte que receberam o tratamento e que não receberam tratamento. As setas indicam o aumento da espessura dos vilos intestinais e a perda da barreira epitelial e os asteriscos mostram a presença de infiltrado de células mononucleares na mucosa e lâmina própria. As estrelas indicam a preservação dos vilos intestinais e da barreira epitelial nos animais que receberam tratamento

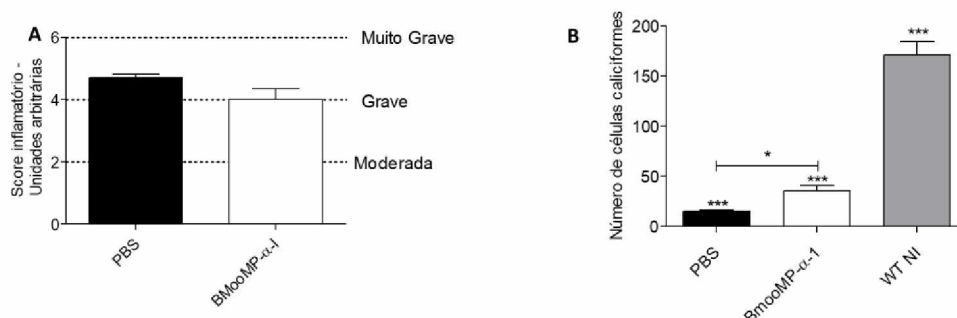


Figura 4: Análise microscópica de lâminas do íleo coradas com H&E dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I. (A) *Score* microscópico das lesões intestinais dos animais que sofreram indução de ileíte por infecção oral por *T. gondii* e foram tratados ou não tratados com BmooPM- α -I. A estatística utilizada foi o teste de Mann Whitney. (B) Representação do número total de células caliciformes dos animais que tiveram ileíte induzida por infecção oral por *T. gondii* e foram tratados ou não tratados com BmooPM- α -I. O teste *One-way* ANOVA foram aplicados (* $p < 0,05$) e (** $p < 0,0001$).

5.3 BmooPM- α -I e sua atuação na resposta inflamatória.

Para iniciar a investigação do papel da metaloproteinase na modulação da inflamação, a presença de infiltrados de macrófagos foi avaliada em cortes congelados do íleo usando anticorpo anti-CD11b PE foi avaliada. A partir disso, observou-se uma redução do infiltrado de macrófagos no grupo tratado com BmooMP- α -I em comparação com os animais não tratados, com uma redução significativa ($p < 0,05$) (figura 5).

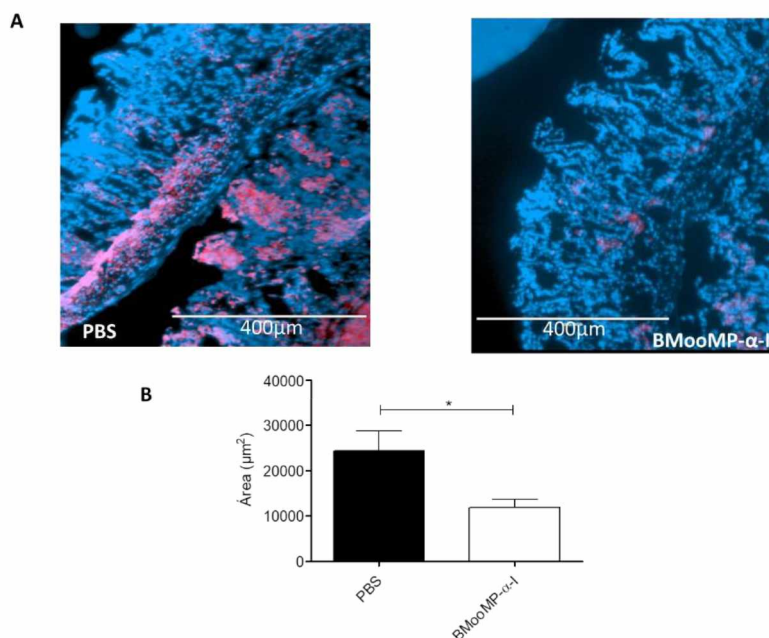


Figura 5: Avaliação do infiltrado de macrófagos CD11b+ (PE) no íleo dos animais com ileíte tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I. (A) Representação histológica do infiltrado de macrófagos corado em vermelho com anti-CD11b PE e os núcleos celulares corados em azul com DAPI. (B) Medida da área dos infiltrados de macrófagos determinadas no Imagem J. Foi aplicado o teste T de *Student* para análise estatística (* $p < 0,05$)

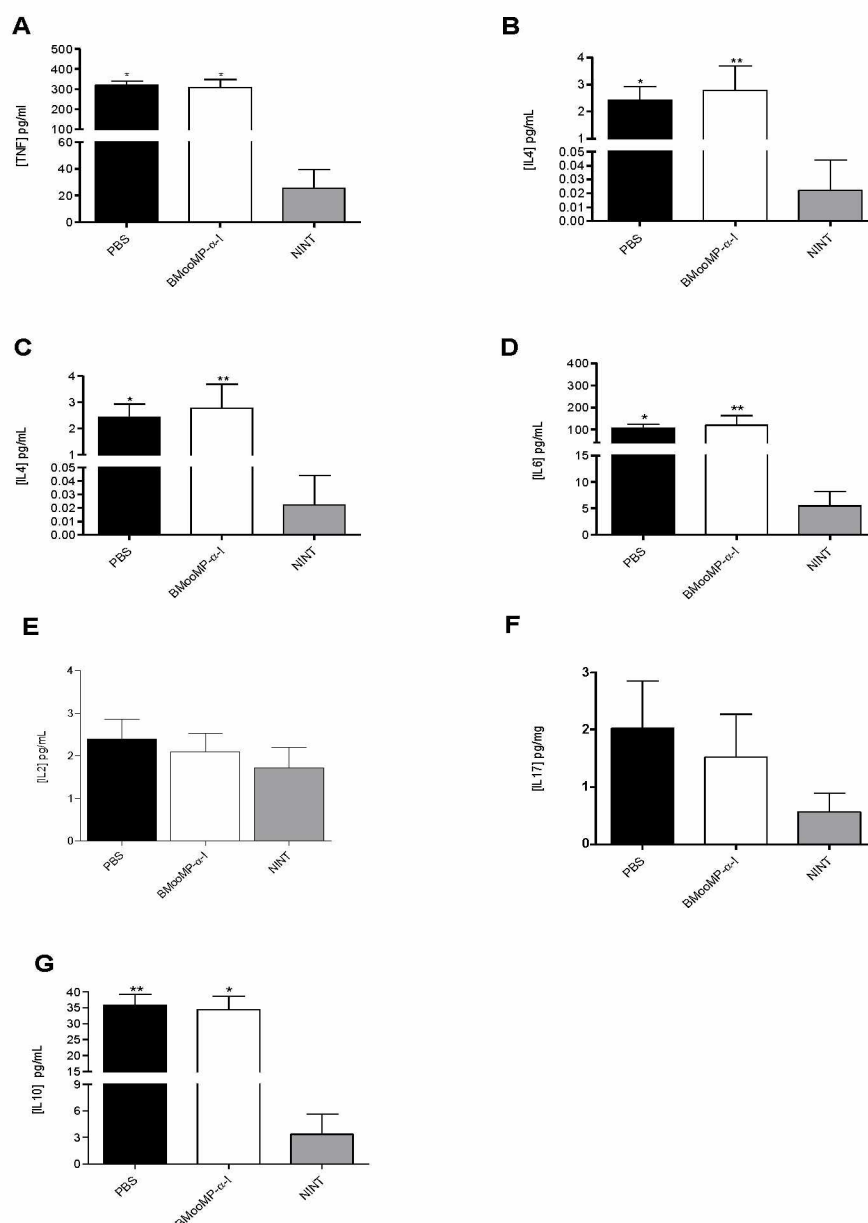


Figura 6: Avaliação da produção de citocinas no soro dos animais com leite tratado ou não com a proteína BmooPM-α-I. Efeito do tratamento com a proteína BmooMP-α-I nos níveis de secreção de citocinas avaliados no soro por CBA. Produção de (A) TNF (B) IFN-γ (C) IL-4 (D) IL-6 (E) IL-2 (F) IL-17 (G) IL-10. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis acrescido do pós teste de comparação múltipla Dunn's para análise estatística. Diferença estatística apresentado em relação ao grupo NINT (* p <0,05 e ** p <0,01)

Em um segundo momento, a detecção de citocinas no soro e íleo foi realizada para verificar a influência da metaloprotease na produção desses mediadores inflamatórios. Primeiramente, nas amostras de soro, não foram observadas diferenças significativas entre animais tratados e não tratados como foi observado no íleo (figura 6A-G). No íleo dos animais expostos a BmooMP-α-I, foi observada uma redução significativa dos níveis de TNF. Além disso, a IL-10 foi significativamente diminuída em animais tratados com

a metaloprotease (figura 7). Entretanto nas citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-17 e IL-4 não observou-se uma redução estatística (figura 7).

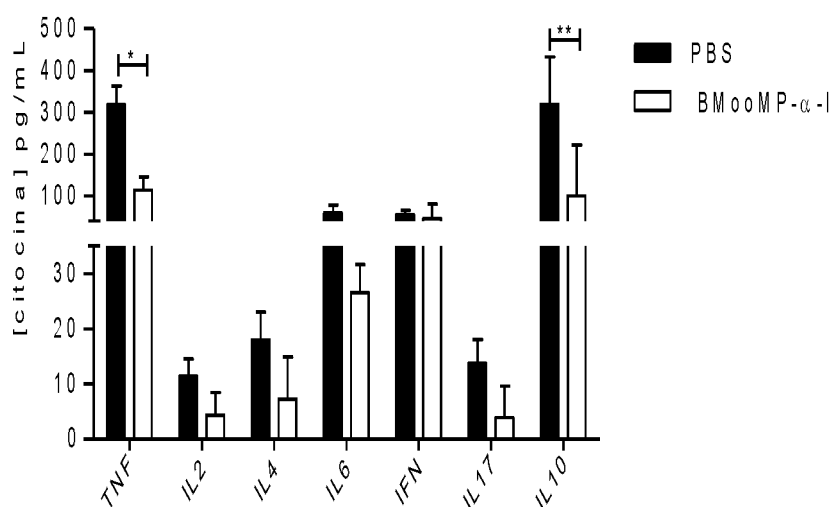


Figura 7: Avaliação da produção de citocinas no íleo dos animais com leite tratados ou não com a proteína BMooPM- α -I: Efeito do tratamento com a proteína BMooMP- α -I nos níveis de secreção de citocinas do homogenato do íleo por CBA. Para análise estatística foi utilizado o teste de Man-Whitney (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Ademais, para verificar se a BmooPM- α -I atua sobre a expressão de mediadores imunes, a transcrição gênica no íleo foi avaliada. Como resultado, constatamos uma redução na expressão de mRNA de IL-6, MCP-1, CD206 e IL-10 nos animais tratados, e que os níveis de expressão de mRNA arginase, IL4 e TAK1 além de estarem reduzidos em relação ao grupo não tratado foram similares aos animais saudáveis (figura 8). Contrariamente, não houve uma diferença nos níveis expressão de mRNA de IL-1 β (figura 8).

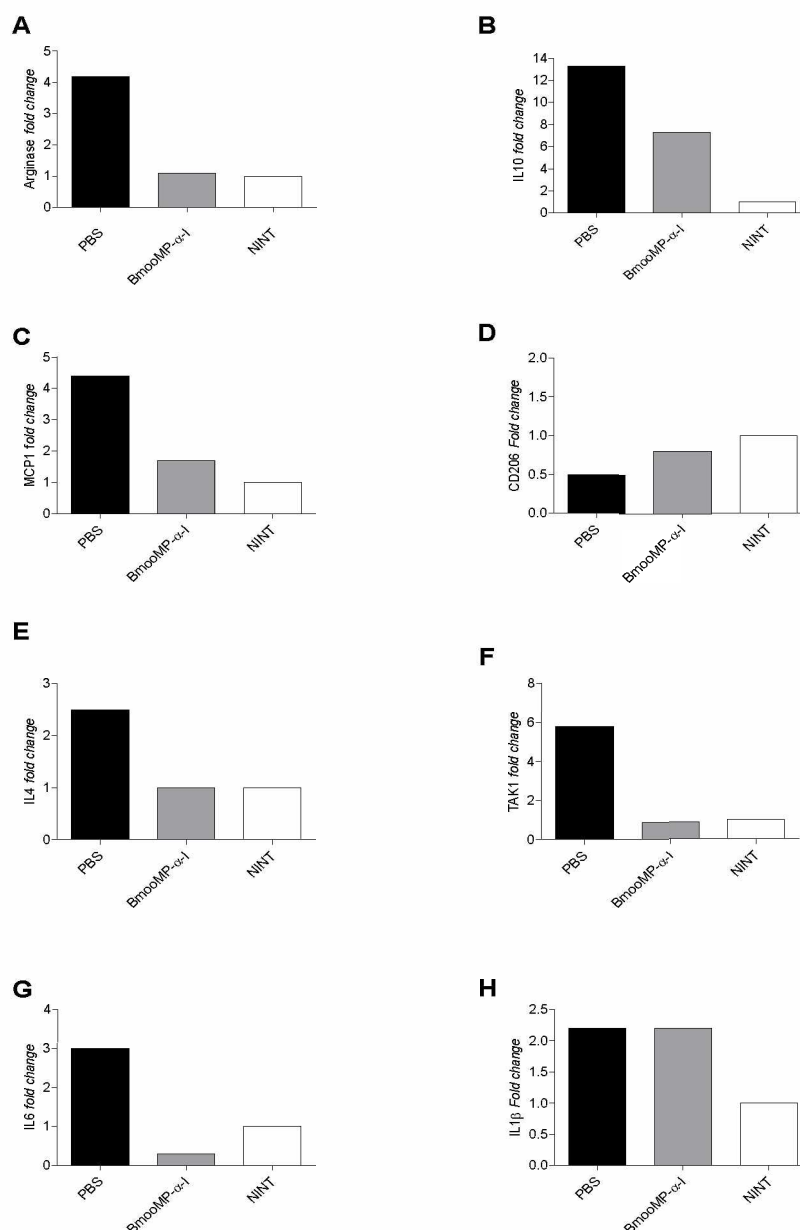


Figura 8: Análise da expressão gênica nos linfonodos mesentéricos dos animais com leite tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I. Representação dos resultados obtidos pela análise da expressão gênica de mRNA dos mediadores inflamatórios IL-6 (A), IL-1β (B), MCP-1 (C), CD206 (D), IL-4R (E), IL-10 (F), TAK 1 (G) e arginase (H) nos linfonodos mesentéricos por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Os resultados foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para avaliar o efeito de BmooMP-α-I sobre o sistema imune inato, células do linfonodo mesentérico (MLN) e baço foram coletadas e plaqueadas e posteriormente estimuladas com STAg. Sendo assim, células do baço de animais tratados ao serem estimuladas com STAg tiveram uma produção reduzida de INF-γ, ainda que sem significância estatística (figura 9A). Além disso, foi possível observar uma redução importante na produção de

TNF por células MLN de animais tratadas quando estimuladas STAg em relação às células não tratadas (figura 9B).

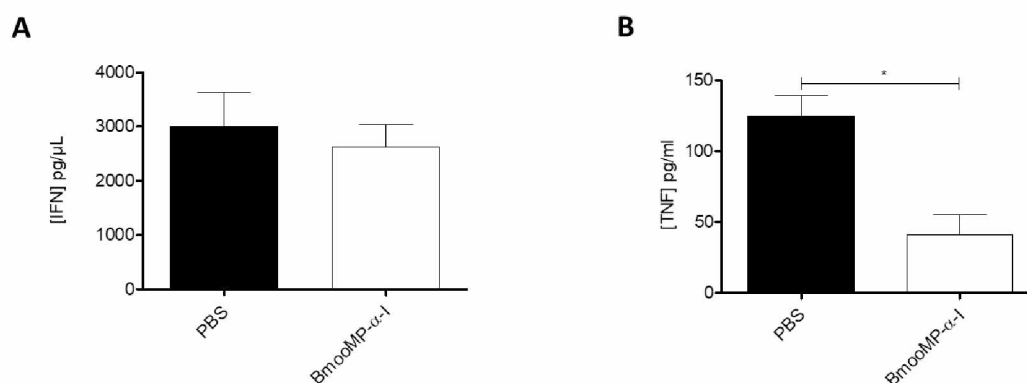


Figura 9: Avaliação *ex vivo* da produção de citocinas pelas células do baço e dos linfonodos mesentérico dos animais com leite tratados ou não com a proteína BmooPM-α-I: (A) Avaliação da produção de IFN- γ pelas células do baço 48h após estímulo com STAg. **(B)** Avaliação da produção de TNF pelas células do linfonodo mesentérico 48h após estímulo com STAg. Teste estatístico de Kruskal-Wallis foi utilizado para análise estatística (** p < 0,01)

Com intuito de avaliar a carga parasitária no íleo, foi realizado o teste de imunohistoquímica em cortes de parafina. Como resultado, foi observada uma redução não significativa da carga parasitária dos animais tratados em relação aos animais não tratados (figura 10 A-C).

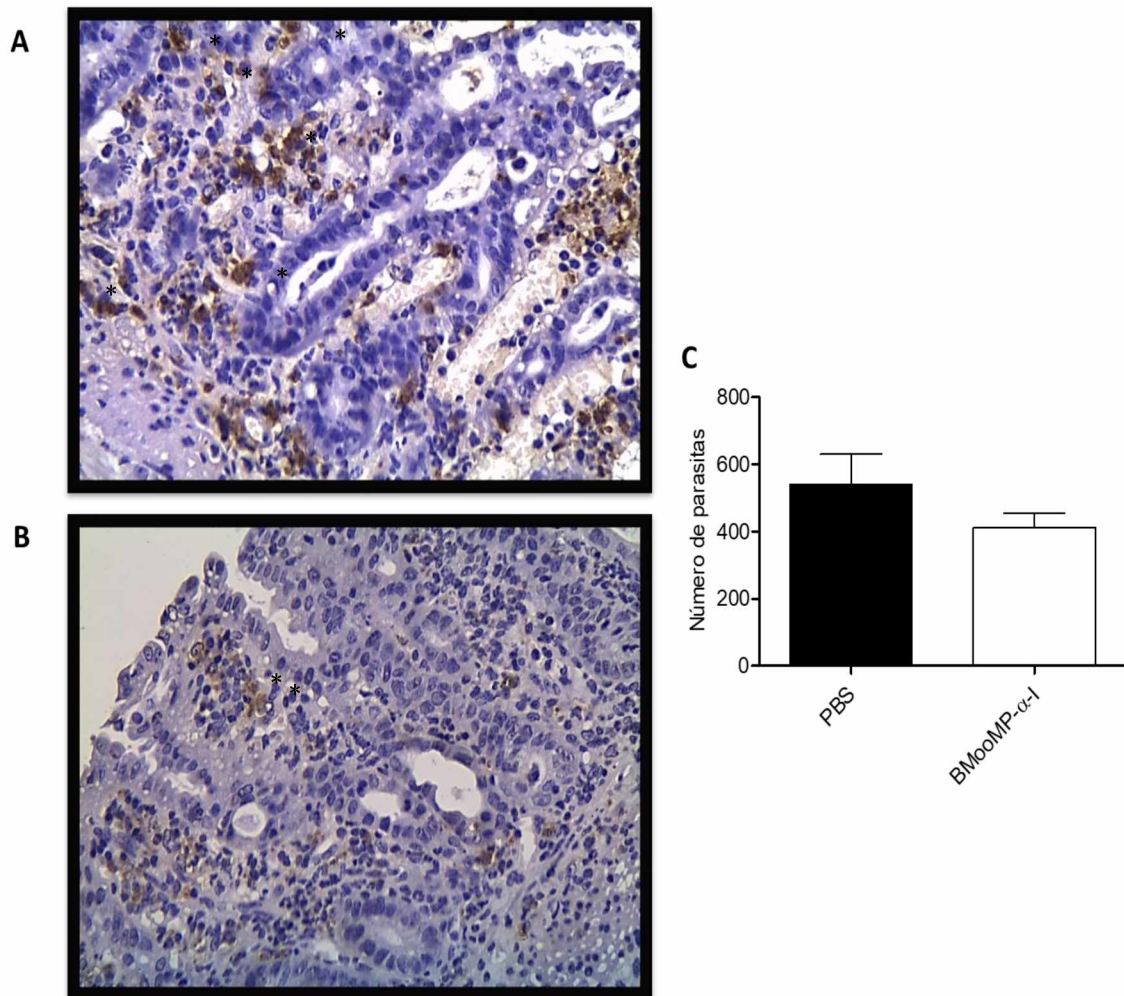


Figura 10: Análise da carga parasitária no íleo dos animais com ileite tratados ou não com a proteína BmooPM- α -I: Representação imunohistoquímica para quantificação de *Toxoplasma gondii* nos animais tratados não tratados (A) e tratados com BmooMP- α -I (B). Quantificação do número de parasitas em ambos os grupos (C). Os asteriscos representam vacúolos parasitóforos formado pelos parasitas. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para análise estatística.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Doenças intestinais inflamatórias são desordens inflamatórias crônicas que afetam o trato gastrointestinal e que não apresentam cura. Os pacientes com DIIs alternam entre períodos de melhora e piora clínica. Assim, estudos que buscam entender o mecanismo da doença bem como novos fármacos tornaram-se frequentes. Nosso estudo utilizou o modelo de ileíte induzida por *Toxoplasma gondii* para avaliar o potencial terapêutico da BmooMP- α -I no tratamento de DII. Vários estudos demonstram que a infecção de camundongos com alto inóculo de cistos de *T. gondii* promove uma resposta imune de perfil Th1 exacerbada com recrutamento de neutrófilos, e superprodução de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-12, IL-6 e TNF), de MCP-1 e NO, culminando no desenvolvimento de ileíte grave que resulta na morte dos animais (HEIMESAAT et al., 2015; OLGUIN et al., 2015). De fato, a doença inflamatória do intestino (DII) em humanos está bem representada por este modelo de infecção uma vez que em ambos os casos a participação do TNF no desenvolvimento e evolução da ileíte é crucial (LIESENFELD, 2002; COHEN e DENKERS, 2014).

Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que os animais que superexpressam o TNF são mais suscetíveis à indução espontânea de ileíte (BAMIAS et al., 2013; SCHAUBECK et al., 2015), comprovando assim que a presença de TNF é determinante na indução e desenvolvimento da doença. Neste estudo, observamos que a BmooMP- α -I conseguiu reduzir a perda de peso e aumentar a sobrevida dos animais, melhorando os sinais clínicos. Essa melhora pode ser relacionada com a capacidade da BmooMP- α -I interagir com TNF promovendo sua clivagem e consequente inativação (SILVA et al., 2016). Dessa forma, nossos resultados corroboram com a literatura e demonstram que a redução da atividade do TNF pode controlar a inflamação intestinal. Por exemplo, pacientes com DII que receberam terapia anti-TNF reduziram a gravidade da doença (FORD et al., 2011; UDALOVA et al., 2016). Além disso, os animais que não expressam o receptor de TNF são mais resistentes à indução de ileíte (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012).

Os dados disponíveis na literatura relatam que a ileíte induzida por *T. gondii* promove encurtamento intestinal (HEIMESAAT et al., 2014; KLITZING et al., 2017), e no presente estudo foi possível observar a preservação do aspecto macroscópico, principalmente a manutenção do tamanho do intestino comprovando a eficácia da

BmooMP- α -I em diminuir o processo inflamatório nos animais submetidos ao tratamento. O encurtamento do intestino nos animais com ileíte sem tratamento pode estar relacionado com a indução de apoptose pelo TNF, e pelo edema tecidual resultante da inflamação. Nas DIIs, a indução de apoptose pela via TNF-TNFR e Fas-Fas ligante é crucial para patogênese dessas doenças (NEURATH et al., 2001). Ainda, o ambiente inflamatório no intestino de pacientes com DIIs acarretará em destruição generalizada do tecido em consequência de uma indução desregulada de apoptose pelas células T (BRUNNER; MUELLER, 2003). Em modelo de ileíte induzida por indometacina, foi relatado que o tratamento com lipoarabinomanano (LAM), um agonista de TLR2, foi capaz de reduzir o dano inflamatório preservando o tamanho das vilosidades e das criptas do intestino (NARIMATSU et al., 2015), assim estes estudos demonstram que tratamentos que visam o controle da inflamação promovem a manutenção da morfologia e do tamanho intestinal.

Outro fato importante observado no presente estudo foi que a morfologia intestinal dos animais apresentou uma melhora microscópica com preservação das células caliciformes no íleo. Estes resultados são de extrema importância, uma vez que um dos grandes problemas das DIIs é a ruptura da homeostasia da barreira intestinal (ANTONI *et al.*, 2014). Em modelo murino de CU também ocorre a redução de células caliciformes (HEAZLEWOOD *et al.*, 2008). Além disso, a disfunção das células de Paneth diminui a produção de defensinas em pacientes com DC (WEHKAMP et al., 2007). Esse desequilíbrio nos mecanismos protetores permitem que patógenos entrem em contato direto com o epitélio e com células imunes da mucosa induzindo processos inflamatórios que resultam na cronificação da inflamação (KLEESSEN et al., 2002; SWIDSINSKI, LOENING-BAUCKE e HERBER, 2009).

A redução significativa dos níveis de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-17 e IL-10 bem como a expressão de outros mediadores relacionados à inflamação também foi demonstrada em nosso estudo. Em conformidade com a redução de todos esses mediadores, relatamos uma redução do recrutamento de macrófagos em animais submetidos ao tratamento com BmooMP- α -I. Em estudos de tratamentos para DII relatou-se a importância do controle dessas citocinas. Por exemplo, a administração de Alpha1-antitripsina reduz os níveis de IL-17 e TNF melhorando a ileite crônica e aguda (COLLINS et al., 2013). Em outro estudo, a transferência adotada de células T reguladoras de CD4 + Foxp3 + em ratos com

ileíte induzida por *T. gondii*, regulou a produção de IFN- γ , IL-6 e TNF com diminuição do processo inflamatório (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2015). Ainda, Villeret e colaboradores (2013) apontaram que a redução do recrutamento de neutrófilos e monócitos/macrófagos foi importante para amortizar a ileíte induzida por *T. gondii*. Sendo assim, confirmamos que a redução do infiltrado de macrófagos observada no íleo foi relacionada à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tratamento com BmooMP- α -I.

No presente estudo, demonstramos que as células provenientes de MLN dos animais tratados produziram menos TNF em resposta ao STAg no teste ex vivo. Além disso, as células do baço de animais tratados produziram menos IFN- γ , indicando que ocorreu uma redução na resposta de células T e B. Este fato está de acordo com estudos anteriores em que foi possível observar que o bloqueio do TNF reduz o número de células dendríticas foliculares interferindo na formação dos centros germinativos (GCs), diminuindo a produção de anticorpos e, conseqüentemente, comprometendo a resposta de *recall* antigênico dependente de células T (PASPARAKIS et al., 1996; APOSTOLAKI et al., 2010). A atuação da metaloprotease em células do sistema imune adaptativo é importante, visto que parte da eficiência da terapia anti-TNF na artrite reumatóide ocorre pela redução de células B produtoras de auto-anticorpos (COHEN et al., 2006).

A carga parasitária nos animais tratados e não tratados foi quantificada neste trabalho, demonstrando uma redução no número de parasitas nos animais tratados com a metaloprotease. Um ambiente inflamatório é importante para a replicação desse parasita, especialmente os da cepa tipo II (YAROVINSKY, 2014). Isso vem sendo comprovado em diferentes publicações, como a que verificou que NAP, um peptídeo ativo derivado da proteína ADNP, reduziu a quantidade de *T. gondii* em modelo murino de ileíte induzida por este parasita (HEIMESAAT, Markus M et al., 2015). Em um outro trabalho, o bloqueio do receptor de citocina IL1 (IL-1R) após infecção oral por *T. gondii* também reduziu carga parasitária (VILLERET et al., 2013).

De maneira geral, nossos resultados demonstraram o potencial terapêutico da BmooMP- α -I como um novo fármaco para tratar a ileíte. De fato, as metaloproteases são conhecidas por modular a resposta imune e o principal exemplo é a ADAM17, conhecida como TACE (enzima TNF convertase), capaz de converter o TNF de sua forma transmembrana para forma solúvel (ROSE-JOHN, 2013). Sendo assim, terapias

alternativas para o tratamento de ileíte utilizando metaloproteases como moduladores de processo inflamatório vem sendo relatadas. Por exemplo, o uso de TIMP-3 (inibidor de tecido da metaloproteinase-3) é capaz de regular a doença do Crohn devido à sua capacidade de inibir a ADAM17 (MONTELEONE et al., 2012). Da mesma forma que as metaloproteases de mamífero vêm sendo avaliadas, as metaloproteases provenientes de veneno de cobra estão sendo estudadas, e a análise proteômica indica alta semelhança entre elas. Além disso, o veneno de cobra é capaz de atuar sobre o sistema imune, por exemplo, Batroxase, uma metaloproteinase identificada a partir da peçonha de *Bothrops atrox* foi capaz de promover a indução de mediadores inflamatórios (DE TONI et al., 2015). Ademais, foi relatado o efeito benéfico de uma fibrinogenase II recombinante (rF II) de *Agkistrodon acutus* no choque séptico em modelo animal inibindo a ação do TNF (WANG et al., 2008).

O presente estudo propõe que a BmooMP- α -I poderia ser utilizada na terapia das DIIs, uma vez que os outros tratamentos disponíveis não são eficazes e também não apresentam evidências de segurança total na sua administração, embora sejam amplamente utilizados. É demonstrado que a utilização de imunossupressores pode apresentar bons resultados inicialmente, entretanto pode agravar a doença com manifestações de efeitos adversos (FAUBION et al., 2001; KHAN et al., 2011; KUENZIG et al., 2014). Além disso, cerca de 30% dos pacientes com DII desenvolvem resistência à medicação (HO et al., 2006; FORD et al., 2011; PATEL et al., 2014). Embora a terapia anti-TNF tenha demonstrado melhora dos pacientes com DII, sendo mais eficientes durante o processo de remissão da doença, ainda são relatados diversos problemas (PATEL et al., 2014; HINDRYCKX et al., 2017). Em primeiro lugar, existe a formação de altos níveis de anticorpos contra os agentes anti-TNF comprometendo sua eficácia (KLOTZ; TEML; SCHWAB, 2007). Outro fator a ser considerado é que a droga possui uma distribuição limitada devido à sua natureza de alto peso molecular e hidrofobicidade (MOULD; GREEN, 2010). Além disso, a produção destes agentes é dispendiosa devido às suas características moleculares (GRAUMANN; PREMSTALLER, 2006). Por fim, os bloqueadores de TNF podem induzir resposta auto-imune por ativação e resistência de células T específicas a antígenos próprios (KALTSONOUDIS et al., 2014). Considerando estas desvantagens, a utilização de BmooMP- α -I torna-se atrativa porque poderia solucionar o problema de biodisponibilidade tecidual, pois esta é uma proteína de baixo peso molecular, reduziria

os feitos adversos mencionados, e também apresenta baixos custos de produção. Nossos resultados também demonstram que a BmooMP- α -I possui ação localizada no sítio da inflamação, promovendo melhora tecidual na ileíte desencadeada pela infecção por *T. gondii*, e com isso sugerimos que a aplicação de BmooMP- α -I como novo agente terapêutico poderia melhorar a qualidade de pacientes com DII.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- ❖ O tratamento com BmooMP- α -I é capaz de melhorar a ileíte induzida por *T. gondii*.
- ❖ O tratamento com BmooMP- α -I melhora a manifestação clínica da ileíte e prolonga a sobrevivência dos animais.
- ❖ O tratamento com BmooMP- α -I preserva o aspecto macroscópico do intestino delgado.
- ❖ O tratamento com BmooMP- α -I reduz a produção de mediadores inflamatórios.
- ❖ O tratamento com BmooMP- α -I reduz a resposta celular adaptativa.
- ❖ A BmooPM- α -I pode ser considerada um potencial agente terapêutico para o tratamento das DIIs, especialmente na doença de Crohn.

BIBLIOGRAFIA

**Referências elaboradas de acordo com
a norma da ABNT NBR 6023/2002**

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMSON, O.; DURANT, M.; MOW, W.; FINLEY, A.; KODALI, P.; WONG, A.; TAVARES, V.; MCCROSKEY, E.; LIU, L.; LEWIS, J. D. Incidence, prevalence, and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. **The Journal of Pediatrics**, v. 157, n. 2, p. 233-239. e1, 2010.
- AKAO, P. K.; TONOLI, C. C. C.; NAVARRO, M. S.; CINTRA, A. C. O.; NETO, J. R.; ARNI, R. K.; MURAKAMI, M. T. Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni venom. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 2-3, p. 361-368, 2009.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N.; XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. **Inflammatory Bowel Diseases: A Clinician's Guide**, p. 1-15, 2017.
- ANTONI, L.; NUDING, S.; WEHKAMP, J.; STANGE, E. F. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 5, p. 1165, 2014.
- APOSTOLAKI, M.; ARMAKA, M.; VICTORATOS, P.; KOLLIAS, G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. In: (Ed.). **TNF Pathophysiology**: Karger Publishers, v.11, p.1-26, 2010.
- AUVIN, S.; MOLINIÉ, F.; GOWER-ROUSSEAU, C.; BRAZIER, F.; MERLE, V.; GRANDBASTIEN, B.; MARTI, R.; LEREBOURS, E.; DUPAS, J.-L.; COLOMBEL, J.F. Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in Northern France (1988-1999). **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 49-55, 2005.
- BAMIAS, G.; DAHMAN, M. I.; ARSENEAU, K. O.; GUANZON, M.; GRUSKA, D.; PIZARRO, T. T.; COMINELLI, F. Intestinal-specific TNF α overexpression induces Crohn's-like ileitis in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72594, 2013.
- BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 4, p. 421-432, 2006.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1590-1605, 2012.
- BENTIN, J. Mechanism of action of cyclosporin in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 14, n. 2, p. 22-25, 1995.
- BERNSTEIN, C. N.; WAJDA, A.; BLANCHARD, J. F. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. **Gastroenterology**, v. 129, n. 3, p. 827-836, 2005.
- BIRRENBACH, T.; BÖCKER, U. Inflammatory bowel disease and smoking. A review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 10, n. 6, p. 848-859, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.
- BREESE, E.; BRAEGGER, C.; CORRIGAN, C.; WALKER-SMITH, J.; MACDONALD, T. Interleukin-2 and interferon-gamma secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. **Immunology**, v. 78, n. 1, p. 127, 1993.

- BRUNNER, T.; MUELLER, C. Apoptosis in disease: about shortage and excess. **Essays in Biochemistry**, v. 39, p. 119-130, 2003.
- BUONOCORE, S.; AHERN, P. P.; UHLIG, H. H.; IVANOV, I. I.; LITTMAN, D. R.; MALOY, K. J.; POWRIE, F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1371-1375, 2010.
- BYEON, J. S.; YANG, S. K.; MYUNG, S. J.; PYO, S. I.; PARK, H. J.; KIM, Y. M.; LEE, Y. J.; HONG, S. S.; KIM, K. J.; LEE, G. H. Clinical course of distal ulcerative colitis in relation to appendiceal orifice inflammation status. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 4, p. 366-371, 2005.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CARLSON, B.; ROURK, M. J.; DESAI, H. E. C. **Analgesics Based on Snake Venoms**: Google Patents 2014.
- CASEWELL, N.; SUNAGAR, K.; TAKACS, Z.; CALVETE, J.; JACKSON, T.; FRY, B. Snake venom metalloprotease enzymes. **Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery**, Fry, BG, Ed, p. 347-363, 2015.
- CHAN, E. S.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 4, n. 4, p. 266, 2002.
- CHANG, Y.-J.; KIM, H. Y.; ALBACKER, L. A.; BAUMGARTH, N.; MCKENZIE, A. N.; SMITH, D. E.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 631-638, 2011.
- CHELLAPANDI, P. Structural, functional and therapeutic aspects of snake venom metalloproteinases. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 28-44, 2014.
- CHU, F.-F.; ESWORTHY, R. S.; DOROSHOW, J. H.; GRASBERGER, H.; DONKO, A.; LETO, T. L.; GAO, Q.; SHEN, B. Deficiency in Duox2 activity alleviates ileitis in GPx1-and GPx2-knockout mice without affecting apoptosis incidence in the crypt epithelium. **Redox Biology**, v. 11, p. 144-156, 2017.
- CHU, H.; KHOSRAVI, A.; KUSUMAWARDHANI, I. P.; KWON, A. H.; VASCONCELOS, A. C.; CUNHA, L. D.; MAYER, A. E.; SHEN, Y.; WU, W. L.; KAMBAL, A.; TARGAN, S. R.; XAVIER, R. J.; ERNST, P. B.; GREEN, D. R.; MCGOVERN, D. P.; VIRGIN, H. W.; MAZMANIAN, S. K. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Science**, v. 352, n. 6289, p. 1116-1120, 2016.
- COHEN, S.; DENKERS, E. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 744-752, 2014.
- COHEN, S. B.; EMERY, P.; GREENWALD, M. W.; DOUGADOS, M.; FURIE, R. A.; GENOVESE, M. C.; KEYSTONE, E. C.; LOVELESS, J. E.; BURMESTER, G. R.; CRAVETS, M. W. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. **Arthritis & Rheumatology**, v. 54, n. 9, p. 2793-2806, 2006.
- COLLINS, C. B.; AHERNE, C. M.; EHRENTAUT, S. F.; GERICH, M. E.; MCNAMEE, E. N.; MCMANUS, M. C.; LEBACK, M. D.; JEDLICKA, P.; AZAM, T.; DE ZOETEN, E. F. Alpha1-antitrypsin therapy ameliorates acute colitis and chronic murine ileitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1964-1973, 2013.

- COOPER, T. W.; PASS, S. E.; BROUSE, S. D.; HALL, R. G., 2ND. Can pharmacokinetic and pharmacodynamic principles be applied to the treatment of multidrug-resistant acinetobacter? **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 45, n. 2, p. 229-240, 2011.
- COSNES, J.; GOWER-ROUSSEAU, C.; SEKSIK, P.; CORTOT, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-1794. e4, 2011.
- CROFT, M.; SIEGEL, R. M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 217-233, 2017.
- DANESE, S.; FIOCCCHI, C. Ulcerative Colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 18, p. 1713-1725, 2011.
- DE PAULA, F. F. P.; RIBEIRO, J. U.; SANTOS, L. M.; DE SOUZA, D. H. F.; LEONARDECZ, E.; HENRIQUE-SILVA, F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.. Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: **Genomics and Proteomics**, v. 12, n. 0, p. 74-83, 2014.
- DE TONI, L. G.; MENALDO, D. L.; CINTRA, A. C.; FIGUEIREDO, M. J.; DE SOUZA, A. R.; MAXIMIANO, W. M.; JAMUR, M. C.; SOUZA, G. E.; SAMPAIO, S. V. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 199-207, 2015.
- DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Glycolipids are potential targets for protozoan parasite diseases. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 404-411, 2010.
- DIAS, R. R.; CARVALHO, E. C.; LEITE, C. C.; TEDESCO, R. C.; CALABRESE KDA, S.; SILVA, A. C.; DAMATTA, R. A.; DE FATIMA SARRO-SILVA, M. *Toxoplasma gondii* oral infection induces intestinal inflammation and retinochoroiditis in mice genetically selected for immune oral tolerance resistance. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e113374, 2014.
- DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 337-348, 2008.
- DUBEY, J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal For Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.
- EBERL, G.; MARMON, S.; SUNSHINE, M.-J.; RENNERT, P. D.; CHOI, Y.; LITTMAN, D. R. An essential function for the nuclear receptor ROR γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. **Nature Immunology**, v. 5, n. 1, p. 64-73, 2004.
- EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 7, p. 668-675, 2012.
- FAUBION, W. A.; LOFTUS, E. V.; HARMSSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R.; SANDBORN, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. **Gastroenterology**, v. 121, n. 2, p. 255-260, 2001.
- FORD, A. C.; SANDBORN, W. J.; KHAN, K. J.; HANAUER, S. B.; TALLEY, N. J.; MOAYYEDI, P. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 644-659, 2011.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 909-920, 2008.
- GALLAGHER, P.; BAO, Y.; SERRANO, S. M. T.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; ZIGRINO, P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; NISCHT, R.; MAUCH, C.; MOSKALUK, C.; FOX, J. W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, n. 1, p. 1-15, 2005.

- GAZZINELLI, R. T.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014.
- GEARRY, R. B.; RICHARDSON, A.; FRAMPTON, C.; COLLETT, J. A.; BURT, M. J.; CHAPMAN, B. A.; BARCLAY, M. L. High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 10, p. 936-943, 2006.
- GEREMIA, A.; BIANCHERI, P.; ALLAN, P.; CORAZZA, G. R.; DI SABATINO, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3-10, 2014.
- GRAUMANN, K.; PREMSTALLER, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 164-186, 2006.
- GÜNTHER, C.; MARTINI, E.; WITTKOPF, N.; AMANN, K.; WEIGMANN, B.; NEUMANN, H.; WALDNER, M. J.; HEDRICK, S. M.; TENZER, S.; NEURATH, M. F. Caspase-8 regulates TNF induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 335-339, 2011.
- HANAUER, S. B. Combination Therapy For Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 5, 2017.
- HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 141-9, 2015.
- HEAZLEWOOD, C. K.; COOK, M. C.; ERI, R.; PRICE, G. R.; TAURO, S. B.; TAUPIN, D.; THORNTON, D. J.; PNG, C. W.; CROCKFORD, T. L.; CORNALL, R. J. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. e54, 2008.
- HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H. K.; DUNAY, I. R.; MOTER, A.; GESCHER, D. M.; SCHUMANN, R. R.; GOBEL, U. B.; LIESENFELD, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8785-8795, 2006.
- HEIMESAAT, M. M.; DUNAY, I. R.; ALUTIS, M.; FISCHER, A.; MÖHLE, L.; GÖBEL, U. B.; KÜHL, A. A.; BERESWILL, S. Nucleotide-oligomerization-domain-2 affects commensal gut microbiota composition and intracerebral immunopathology in acute *Toxoplasma gondii* induced murine ileitis. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105120, 2014.
- HEIMESAAT, M. M.; FISCHER, A.; KUHL, A. A.; GOBEL, U. B.; GOZES, I.; BERESWILL, S. Anti-Inflammatory Properties of NAP in acute *Toxoplasma gondii*-induced ileitis in mice. **European Journal of Microbiology and Immunology (Bp)**, v. 5, n. 3, p. 210-220, 2015.
- HIGUCHI, L. M.; KHALILI, H.; CHAN, A. T.; RICHTER, J. M.; BOUSVAROS, A.; FUCHS, C. S. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 107, n. 9, p. 1399-1406, 2012.
- HINDRYCKX, P.; NOVAK, G.; CASTEELE, N. V.; KHANNA, R.; LAUKENS, D.; VIPUL, J.; FEAGAN, B. G. Incidence, prevention and management of anti-drug antibodies against therapeutic antibodies in inflammatory bowel disease: A practical overview. **Drugs**, p. 1-15, 2017.
- HO, G. T.; CHIAM, P.; DRUMMOND, H.; LOANE, J.; ARNOTT, I.; SATSANGI, J. The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5 year UK inception cohort. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 2, p. 319-330, 2006.
- HOIE, O.; WOLTERS, F. L.; RIIS, L.; BERNKLEV, T.; AAMODT, G.; CLOFENT, J.; TSIANOS, E.; BELTRAMI, M.; ODES, S.; MUNKHOLM, P. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 507-515, 2007.

- HOLTMANN, M. H.; DOUNI, E.; SCHÜTZ, M.; ZELLER, G.; MUDTER, J.; LEHR, H. A.; GERSPACH, J.; SCHEURICH, P.; GALLE, P. R.; KOLLIAS, G. Tumor necrosis factor receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 11, p. 3142-3151, 2002.
- HOU, J. K.; EL-SERAG, H.; THIRUMURTHI, S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 8, p. 2100-2109, 2009.
- HURST, S. D.; MUCHAMUEL, T.; GORMAN, D. M.; GILBERT, J. M.; CLIFFORD, T.; KWAN, S.; MENON, S.; SEYMOUR, B.; JACKSON, C.; KUNG, T. T. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 443-453, 2002.
- JOHANSSON, M. E.; GUSTAFSSON, J. K.; HOLMÉN-LARSSON, J.; JABBAR, K. S.; XIA, L.; XU, H.; GHISHAN, F. K.; CARVALHO, F. A.; GEWIRTZ, A. T.; SJÖVALL, H. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. **Gut**, n. 63, p. 216-217, 2013.
- JONES, J. L.; KAPLAN, G. G.; PEYRIN-BIROULET, L.; BAIDOO, L.; DEVLIN, S.; MELMED, G. Y.; TANYINGOH, D.; RAFFALS, L.; IRVING, P.; KOZUCH, P. Effects of concomitant immunomodulator therapy on efficacy and safety of anti-tumor necrosis factor therapy for Crohn's disease: a meta-analysis of placebo-controlled trials. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 13, p. 2233-2240. e2, 2015.
- JONES, J. L.; PARISE, M. E.; FIORE, A. E. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 794-799, 2014.
- JOSTINS, L.; RIPKE, S.; WEERSMA, R. K.; DUERR, R. H.; MCGOVERN, D. P.; HUI, K. Y.; LEE, J. C.; SCHUMM, L. P.; SHARMA, Y.; ANDERSON, C. A. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 119-124, 2012.
- KALTSOUNOUDIS, E.; VOULGARI, P. V.; KONITSIOTIS, S.; DROSOS, A. A. Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 54-58, 2014.
- KATZ, J. A. Treatment of inflammatory bowel disease with corticosteroids. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 171-189, 2004.
- KELSEN, J.; BALDASSANO, R. N. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. S2, p. S9-S11, 2008.
- KHAN, K. J.; DUBINSKY, M. C.; FORD, A. C.; ULLMAN, T. A.; TALLEY, N. J.; MOAYYEDI, P. Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 4, p. 630-642, 2011.
- KIM, D. H.; CHEON, J. H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. **Immune Network**, v. 17, n. 1, p. 25-40, 2017.
- KIM, M.; CHOI, K. H.; HWANG, S. W.; LEE, Y. B.; PARK, H. J.; BAE, J. M. Inflammatory bowel disease is associated with an increased risk of inflammatory skin diseases: A population-based cross-sectional study. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 1, p. 40-48, 2017.
- KLEESSEN, B.; KROESEN, A.; BUHR, H.; BLAUT, M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 9, p. 1034-1041, 2002.
- KLITZING, E.; EKMEKCIU, I.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Acute ileitis facilitates infection with multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in human microbiota-associated mice. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 4, 2017.

- KLOTZ, U.; TEML, A.; SCHWAB, M. Clinical pharmacokinetics and use of infliximab. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 46, n. 8, p. 645-660, 2007.
- KNIGHTS, D.; LASSEN, K. G.; XAVIER, R. J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**, v. 62, n. 10, p. 1505-1510, 2013.
- KRIEGEL, C.; AMIJI, M. Oral TNF- α gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 77-86, 2011.
- KUENZIG, M. E.; REZAIE, A.; SEOW, C. H.; OTLEY, A. R.; STEINHART, A. H.; GRIFFITHS, A. M.; KAPLAN, G. G.; BENCHIMOL, E. I. Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. **The Cochrane Library**, v. 8, 2014.
- LAEMMLI, U. K. SDS-page Laemmli method. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIDAR, M.; LANGEVITZ, P.; BARZILAI, O.; RAM, M.; PORAT-KATZ, B. S.; BIZZARO, N.; TONUTTI, E.; MAIERON, R.; CHOWERS, Y.; BAR-MEIR, S.; SHOENFELD, Y. Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 640-8, 2009.
- LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. Supplement_1, p. S96-S101, 2002.
- MANICHANH, C.; BORRUEL, N.; CASELLAS, F.; GUARNER, F. The gut microbiota in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 10, p. 599-608, 2012.
- MARKLAND JR, F. S.; SWENSON, S.. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.
- MCCARTHY, J.; O'NEILL, M.; BOURRE, L.; WALSH, D.; QUINLAN, A.; HURLEY, G.; OGIER, J.; SHANAHAN, F.; MELGAR, S.; DARCY, R. Gene silencing of TNF- α in a murine model of acute colitis using a modified cyclodextrin delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 1, p. 28-34, 2013.
- MEIJER, M. J.; MIEREMET-OOMS, M. A.; VAN DUIJN, W.; VAN DER ZON, A. M.; HANEMAAIJER, R.; VERHEIJEN, J. H.; VAN HOGEZAND, R. A.; LAMERS, C. B.; VERSPAGET, H. W. Effect of the anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase–proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 2, p. 200-210, 2007.
- MENDES, M.; VIEIRA, S.; GOMES, M.; PAULA, V.; ALCÂNTARA, T.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.; DOS SANTOS, J.; MAGRO, A.; FONTES, M.; RODRIGUES, V. Triacetyl p-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. **Phytochemistry**, v. 86, p. 72-82, 2013.
- WARDLE, J. Mind-made disease: a clinician's guide to recent research. Proceedings of the 24th annual conference of the Society for Psychosomatic Research. London, 24-25 November 1980. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 25, n. 5, p. 323-475, 1981.
- MOLINIE, F.; GOWER-ROUSSEAU, C.; YZET, T.; MERLE, V.; GRANDBASTIEN, B.; MARTI, R.; LEREBOURS, E.; DUPAS, J.; COLOMBEL, J.; SALOMEZ, J. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988–1999). **Gut**, v. 53, n. 6, p. 843-848, 2004.
- MONTELEONE, I.; FEDERICI, M.; SARRA, M.; FRANZÈ, E.; CASAGRANDE, V.; ZORZI, F.; CAVALERA, M.; RIZZO, A.; LAURO, R.; PALLONE, F. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 regulates inflammation in human and mouse intestine. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1277-1287.e4, 2012.
- MONTICELLI, L. A.; SONNENBERG, G. F.; ABT, M. C.; ALENGHAT, T.; ZIEGLER, C. G.; DOERING, T. A.; ANGELOSANTO, J. M.; LAIDLAW, B. J.; YANG, C. Y.;

- SATHALIYAWALA, T. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. **Nature Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1045-1054, 2011.
- MOULD, D. R.; GREEN, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies. **BioDrugs**, v. 24, n. 1, p. 23-39, 2010.
- MOUM, B.; EKBOM, A.; VATN, M. H.; ELGJO, K. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1564-1569, 1999.
- NARIMATSU, K.; HIGASHIYAMA, M.; KURIHARA, C.; TAKAJO, T.; MARUTA, K.; YASUTAKE, Y.; SATO, H.; OKADA, Y.; WATANABE, C.; KOMOTO, S. Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 30, n. 11, p. 1610-1617, 2015.
- NEILL, D. R.; WONG, S. H.; BELLOSI, A.; FLYNN, R. J.; DALY, M.; LANGFORD, T. K.; BUCKS, C.; KANE, C. M.; FALLON, P. G.; PANNELL, R. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367-1370, 2010.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-342, 2014.
- NEURATH, M. F.; FINOTTO, S.; FUSS, I.; BOIRIVANT, M.; GALLE, P. R.; STROBER, W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 1, p. 21-26, 2001.
- NG, S. C.; TANG, W.; CHING, J. Y.; WONG, M.; CHOW, C. M.; HUI, A.; WONG, T.; LEUNG, V. K.; TSANG, S. W.; YU, H. H. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. **Gastroenterology**, v. 145, n. 1, p. 158-165, 2013.
- O'HARA, J. R.; LOMAX, A. E.; MAWE, G. M.; SHARKEY, K. A. Ileitis alters neuronal and enteroendocrine signalling in guinea pig distal colon. **Gut**, v. 56, n. 2, p. 186-194, 2007.
- OGURA, Y.; BONEN, D. K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D. L.; CHEN, F. F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 603-606, 2001.
- OKAMOTO, D. N.; KONDO, M. Y.; OLIVEIRA, L. C.; HONORATO, R. V.; ZANPHORLIN, L. M.; CORONADO, M. A.; ARAÚJO, M. S.; DA MOTTA, G.; VERONEZ, C. L.; ANDRADE, S. S. PI class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom is a post-proline cleaving peptidase with kininogenase activity: Insights into substrate selectivity and kinetic behavior. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 3, p. 545-552, 2014.
- OKAMURA, M.; YOH, K.; OJIMA, M.; MORITO, N.; TAKAHASHI, S. Overexpression of GATA-3 in T cells accelerates dextran sulfate sodium-induced colitis. **Experimental animals**, v. 63, n. 2, p. 133-140, 2014.
- OLGUIN, J. E.; FERNANDEZ, J.; SALINAS, N.; JUAREZ, I.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; CAMPUZANO, J.; CASTELLANOS, C.; SAAVEDRA, R. Adoptive transfer of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 8, p. 586-95, 2015.
- PASPARAKIS, M.; ALEXOPOULOU, L.; EPISKOPOU, V.; KOLLIAS, G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1397-1411, 1996.
- PATEL, V.; WANG, Y.; MACDONALD, J. K.; MCDONALD, J. W.; CHANDE, N. Methotrexate for maintenance of remission in Crohn's disease. **The Cochrane Library**, 2014.

PERRIER, C.; DE HERTOOGH, G.; CREMER, J.; VERMEIRE, S.; RUTGEERTS, P.; VAN ASSCHE, G.; SZYMKOWSKI, D. E.; CEUPPENS, J. L. Neutralization of membrane TNF, but not soluble TNF, is crucial for the treatment of experimental colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2012.

PEYRIN-BIROULET, L.; LOFTUS, E. V.; COLOMBEL, J. F.; SANDBORN, W. J. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 1, p. 471-478, 2011.

PINCH, W. J. Improving patient care through the use of research. **Orthopedic Nursing**, v. 20, n. 4, p. 75-81, 2001.

PORTES-JUNIOR, J. A.; YAMANOUYE, N.; CARNEIRO, S. M.; KNITTEL, P. S.; SANT'ANNA, S. V. S.; NOGUEIRA, F. C.; JUNQUEIRA, M.; MAGALHÃES, G. S.; DOMONT, G. B.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 7, p. 3338-3348, 2014.

RENSHAW, M.; ROCKWELL, J.; ENGLEMAN, C.; GEWIRTZ, A.; KATZ, J.; SAMBHARA, S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. **Journal Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4697-4701, 2002.

ROBERT-GANGNEUX, F.; STERKERS, Y.; YERA, H.; ACCOCEBERRY, I.; MENOTTI, J.; CASSAING, S.; BRENIER-PINCHART, M. P.; HENNEQUIN, C.; DELHAES, L.; BONHOMME, J.; VILLENA, I.; SCHERER, E.; DALLE, F.; TOUAFEK, F.; FILISETTI, D.; VARLET-MARIE, E.; PELLOUX, H.; BASTIEN, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1677-1684, 2015.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; CORRIDONI, D.; DI STEFANO, G.; DI MARTINO, L.; ANTONOPOULOS, D.; CHANG, E.; PIZARRO, T.; COMINELLI, F. O-014 Bacterial Sensor NOD2 Deletion causes Th2-inflammatory bowel disease improvement without inducing acute metatranscriptomic dysbiosis in mice. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 23, p. S5, 2017.

RODRIGUEZ-SOSA, M.; CAMPUZANO, J.; CASTELLANOS, C.; SAAVEDRA, R. Adoptive transfer of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response. **Microbes and Infection**, v. 20, p. 1e10, 2015.

ROEDIGER, W.; NANCE, S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 67, n. 6, p. 773, 1986.

ROSE-JOHN, S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. **Pharmacological Research**, v. 71, p. 19-22, 2013.

ROUGIER, S.; MONTOYA, J. G.; PEYRON, F. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: A questionable dogma? **Trends in Parasitology**, 2016.

SAHASRANAMAN, S.; HOWARD, D.; ROY, S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 8, p. 753-767, 2008.

SAKURABA, A.; SATO, T.; KAMADA, N.; KITAZUME, M.; SUGITA, A.; HIBI, T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1736-1745, 2009.

SCHAUBECK, M.; CLAVEL, T.; CALASAN, J.; LAGKOUVARDOS, I.; HAANGE, S. B.; JEHLICH, N.; BASIC, M.; DUPONT, A.; HORNEF, M.; VON BERGEN, M. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. **Gut**, p. 309-333, 2015.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 25, n. 4, p. 453-472, 2014.

- SEPEHRI, S.; KHAFIPOUR, E.; BERNSTEIN, C. N.; COOMBES, B. K.; PILAR, A. V.; KARMALI, M.; ZIEBELL, K.; KRAUSE, D. O. Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1451-1463, 2011.
- SHEEHAN, D.; SHANAHAN, F. The gut microbiota in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, p. 143-154, 2017.
- SIEGMUND, B.; FANTUZZI, G.; RIEDER, F.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; LEHR, H.-A.; HARTMANN, G.; DINARELLO, C. A.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- γ and TNF- α production. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 4, p. R1264-R1273, 2001.
- SILVA, M. C.; LOPES SILVA, T.; SILVA, M. V.; MOTA, C. M.; SANTIAGO, F. M.; FONSECA, K. C.; OLIVEIRA, F.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Interaction between TNF and BmooMP-Alpha-I, a zinc metalloprotease derived from *Bothrops moojeni* snake venom, promotes direct proteolysis of this cytokine: molecular modeling and docking at a glance. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 223-243, 2016.
- SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C. M.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 65-72, 2009.
- SILVERBERG, M. S.; SATSANGI, J.; AHMAD, T.; ARNOTT, I. D.; BERNSTEIN, C. N.; BRANT, S. R.; CAPRILLI, R.; COLOMBEL, J.-F.; GASCHÉ, C.; GEBOES, K. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. Suppl A, p. 5A-36A, 2005.
- SOKOL, H.; PIGNEUR, B.; WATTERLOT, L.; LAKHDARI, O.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; GRATADOUX, J.-J.; BLUGEON, S.; BRIDONNEAU, C.; FURET, J.-P.; CORTHER, G. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731-16736, 2008.
- SOKOL, H.; SEKSIK, P.; FURET, J.; FIRMESSE, O.; NION-LARMURIER, I.; BEAUGERIE, L.; COSNES, J.; CORTHER, G.; MARTEAU, P.; DORÉ, J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1183-1189, 2009.
- STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 495-549, 2002.
- SWIDSINSKI, A.; LOENING-BAUCKE, V.; HERBER, A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis-an overview. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. Suppl 6, p. 61-71, 2009.
- TAKATORI, H.; KANNO, Y.; WATFORD, W. T.; TATO, C. M.; WEISS, G.; IVANOV, I. I.; LITTMAN, D. R.; O'SHEA, J. J. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 35-41, 2009.
- TORRES, J.; BOYAPATI, R. K.; KENNEDY, N. A.; LOUIS, E.; COLOMBEL, J.-F.; SATSANGI, J. Systematic review of effects of withdrawal of immunomodulators or biologic agents from patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1716-1730, 2015.
- UDALOVA, I.; MONACO, C.; NANCHAHAL, J.; FELDMANN, M. Anti-TNF Therapy. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.
- VILLERET, B.; BRAULT, L.; COUTURIER-MAILLARD, A.; ROBINET, P.; VASSEUR, V.; SECHER, T.; DIMIER-POISSON, I.; JACOBS, M.; ZHENG, S.-G.; QUESNIAUX, V. F. Blockade of IL-1R signaling diminishes Paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 2, n. 1, p. 107, 2013.

- WAHAB, Tara et al. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 591-592, 2010.
- WALLACE, K. L.; ZHENG, L.-B.; KANAZAWA, Y.; SHIH, D. Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 1, p. 6, 2014.
- WANG, R.; QIU, P.; JIANG, W.; CAI, X.; OU, Y.; SU, X.; CAI, J.; CHEN, J.; YIN, W.; YAN, G. Recombinant fibrinogenase from *Agkistrodon acutus* venom protects against sepsis via direct degradation of fibrin and TNF- α . **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 620-630, 2008.
- WEHKAMP, J.; SALZMAN, N. H.; PORTER, E.; NUDING, S.; WEICHENTHAL, M.; PETRAS, R. E.; SHEN, B.; SCHAEFFELER, E.; SCHWAB, M.; LINZMEIER, R. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18129-18134, 2005.
- WEHKAMP, J.; WANG, G.; KÜBLER, I.; NUDING, S.; GREGORIEFF, A.; SCHNABEL, A.; KAYS, R. J.; FELLERMANN, K.; BURK, O.; SCHWAB, M. The Paneth cell α -defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3109-3118, 2007.
- WILSON, D. S.; DALMASSO, G.; WANG, L.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D.; MURTHY, N. Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. **Nature Materials**, v. 9, n. 11, p. 923-928, 2010.
- YADAV, V.; VARUM, F.; BRAVO, R.; FURRER, E.; BOJIC, D.; BASIT, A. W. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. **Translational Research**, v. 176, p. 38-68, 2016.
- YAN, F.; CAO, H.; COVER, T. L.; WHITEHEAD, R.; WASHINGTON, M. K.; POLK, D. B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 562-575, 2007.
- YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109, 2014.
- ZVIDI, I.; HAZAZI, R.; BIRKENFELD, S.; NIV, Y. The prevalence of Crohn's disease in Israel: a 20-year survey. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 4, p. 848-852, 2009.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocolo nº 109/16, sob a responsabilidade de **Tiago Wilson Patriarca Mineo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **30 de setembro de 2016**.

(We certify that the project entitled “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocol 109/16, under the responsibility of Tiago Wilson Patriarca Mineo - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 30th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico e camundongo <i>Knockout</i>
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal CBEA - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU