

MARTA AVILA DE CASTILHO

**ANIMAIS *Il10^{-/-}* DESENVOLVEM COLITE PRECOCE E
LETAL APÓS CONVÍVIO COM ANIMAIS *Mif^{-/-}***



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO**

AGOSTO / 2023

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Dr. Marcelo Torres Bozza e coorientação de MSc Vinícius Mendes Vidal

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

d352a de Castilho, Marta Avila
ANIMAIS I110-/- DESENVOLVEM COLITE PRECOCE E
LETAL APÓS CONVÍVIO COM ANIMAIS Mif-/- / Marta Avila
de Castilho. -- Rio de Janeiro, 2023.
40 f.

Orientador: Marcelo Torres Bozza.
Coorientador: Vinicius Mendes Vidal.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Doença Inflamatória Intestinal (IBD). 2. MIF.
3. IL-10. 4. Microbioma. 5. Tolerância à Doença. I.
Bozza, Marcelo Torres, orient. II. Vidal, Vinicius
Mendes, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: Marta Avila de Castilho
 DRE: 116075412

BANCA EXAMINADORA: Profa. Eliane Oliveira Ferreira (Presidente da Banca)
 Profa. Alessandra Filardy (Membro da Banca)
 Prof. Claudio Canetti (Membro da Banca)
 Prof. Leandro Lobo (Suplente)

Título da Monografia: "ANIMAIS *Mif⁺* DESENVOLVEM COLITE PRECOCE E LETAL APÓS CONVÍVIO COM ANIMAIS *Mif⁻*"

Local: Sala D-27 / IMPG / CCS / UFRJ
 Data e hora de início: 4 de agosto de 2023 às 15 horas

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 4 de B de 2023.

<p>NOTA</p> <p><u>9,0</u></p> <p><u>9,0</u></p> <p><u>9,0</u></p> <p><u>9,0</u></p>	<p>Banca Examinadora:</p> <p><u><i>Eliane Oliveira Ferreira</i></u> Profa. Eliane de Oliveira Ferreira</p> <p><u><i>Alessandra Filardy</i></u> Profa. Alessandra Filardy</p> <p><u><i>Claudio Canetti</i></u> Prof. Claudio Canetti</p> <p><u>—</u> Prof. Leandro Lobo</p>
<p>Aluno:</p>	<p><u>MARTA CASTILHO</u> Marta Avila de Castilho</p>
<p>Orientador:</p>	<p><u><i>Marcelo Torres Bozza</i></u> Prof. Marcelo Torres Bozza / Coorientador: Vinicius Mendes Vidal</p>
<p>Coordenador de TCC</p>	<p><u><i>Marinella Silva Laport</i></u> Profa. Marinella Silva Laport</p>

Vinicius Mendes Vidal

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta monografia.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha imensa gratidão aos meus queridos pais, cujo amor, incentivo e apoio incondicional foram fundamentais para que eu pudesse concluir esta jornada acadêmica.

Ao meu estimado orientador, Marcelo Bozza, agradeço por sua orientação, paciência e conhecimento compartilhado ao longo desses 6 anos em seu laboratório. Seu apoio sempre foi muito importante para mim.

Também quero estender meus agradecimentos ao meu co-orientador, Vinícius Mendes Vidal, pela sua valiosa ajuda e suporte. Seu conhecimento, disponibilidade e disposição em responder minhas dúvidas foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria também de agradecer a todos os professores e docentes do curso de graduação de Microbiologia e Imunologia da UFRJ. O conhecimento adquirido de forma tão dedicada ao longo desses anos de estudo foi de extrema importância para minha formação.

Á minha parceira, pelo seu apoio, amparo, e encorajamento diários, te agradeço profundamente. Essa caminhada é mais bonita com você ao meu lado.

Por fim, agradeço a todos os amigos e colegas que estiveram ao meu lado durante essa jornada, proporcionando momentos de descontração, encorajamento e apoio mútuo. Suas amizades tornaram essa experiência acadêmica ainda mais significativa e enriquecedora.

Agradeço o apoio do órgão de fomento (CAPES) pelo apoio recebido durante a realização deste trabalho.

A todos vocês, meu mais profundo agradecimento.

RESUMO**MARTA AVILA DE CASTILHO****ANIMAIS *Il10*^{-/-} DESENVOLVEM COLITE PRECOCE E LETAL APÓS CONVÍVIO COM ANIMAIS *Mif*^{-/-}****Orientador: Marcelo Torres Bozza
Coorientador: Vinícius Mendes Vidal****Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) é uma citocina pleiotrópica secretada por diferentes tipos celulares e com funções pró-inflamatórias como a indução da produção de mediadores pró-inflamatórios, retenção e manutenção de fagócitos no tecido, e promoção da ativação e proliferação de linfócitos T e B. MIF possui papel importante nas respostas inflamatórias infecciosas, alérgicas e tumorais, sendo também relevante no contexto de condições inflamatórias crônicas, como nas Doenças Inflamatórias Intestinais (IBDs). Apesar da etiologia desconhecida, a doença apresenta um caráter multifatorial baseado em gatilhos ambientais - como infecções e alterações na microbiota - em indivíduos geneticamente permissivos. Humanos deficientes na sinalização por IL-10 desenvolvem formas precoces e graves de IBD. Camundongos *Il10*^{-/-} também desenvolvem inflamação intestinal espontânea de maneira dependente da presença da microbiota. Em contrapartida, em diferentes modelos experimentais de IBDs, camundongos selvagens (WT) tratados com anticorpo anti-MIF ou camundongos *Mif*^{-/-} são menos suscetíveis à indução de inflamação intestinal. Como a ausência de IL-10 atua aumentando a susceptibilidade à colite enquanto a ausência de MIF protege nos modelos experimentais, nos perguntamos qual seria o fenótipo de um camundongo duplo deficiente *Mif*^{-/-}*Il10*^{-/-}. Porém, durante o cruzamento, notamos que todos os camundongos *Il10*^{-/-} mantidos em convívio com camundongos *Mif*^{-/-} morriam precocemente. Essa observação nos fez elaborar a seguinte hipótese: camundongos *Mif*^{-/-}, por serem menos suscetíveis à inflamação intestinal, abrigam uma microbiota patogênica capaz de gerar doença em camundongos *Il10*^{-/-}. Para testar essa hipótese, camundongos *Il10*^{-/-} foram submetidos ao *co-housing* de maneira sistemática com camundongos *Mif*^{-/-} ou selvagens, e parâmetros como peso, sobrevida, análise macroscópica e microscópica do cólon foram analisados. De fato, camundongos *Il10*^{-/-} apresentaram acentuada perda de peso e morreram em cerca de duas semanas após convívio com camundongos *Mif*^{-/-}. Os camundongos também apresentaram encurtamento do cólon e a análise histológica evidenciou colite focal grave, com intenso infiltrado inflamatório, erosão do epitélio de superfície e destruição da arquitetura tecidual. Experimentos de transferência de fezes entre caixas e por gavagem demonstraram que a microbiota fecal de camundongos *Mif*^{-/-} é suficiente para desencadear doença precoce e letal nos camundongos *Il10*^{-/-}. A transferência fecal filtrada não é capaz de causar doença, sugerindo que são os microrganismos presentes nas fezes dos camundongos *Mif*^{-/-}, e não toxinas, os prováveis responsáveis pela morte dos camundongos *Il10*^{-/-}. Esses dados sugerem que a ausência da citocina MIF permite que hospedeiro albergue uma microbiota enriquecida de patógenos e/ou patobiontes capazes de elicitar doença letal em animais suscetíveis à inflamação intestinal, como os camundongos *Il10*^{-/-}.

Palavras-chave: IBD; MIF; IL-10; Microbiota; Tolerância à Doença

ABSTRACT**MARTA AVILA DE CASTILHO*****Il10*^{-/-} MICE DEVELOP EARLY AND LETHAL COLITIS AFTER CO-HOUSING WITH *Mif*^{-/-} MICE****Orientador: Marcelo Torres Bozza****Coorientador: Vinícius Mendes Vidal**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine secreted by many types of cells. Among its functions are the induction or increase in the production of pro-inflammatory mediators, retention and maintenance of phagocytes in the tissue, and promotion of activation and proliferation of T and B cells. MIF plays an important role in infectious, allergic, and tumoral inflammatory responses and is also relevant in the context of chronic inflammatory conditions, such as Inflammatory Bowel Diseases (IBDs). Despite the unknown etiology, IBDs are multifactorial disorders dependent on the interplay of environmental triggers - such as infections and alterations in the microbiota - in genetically permissive individuals. Humans deficient in IL-10 signaling develop early and severe forms of IBD. *Il10*^{-/-} animals also develop spontaneous intestinal inflammation dependent on the presence of the microbiota. In contrast, in different experimental models of IBDs, WT mice treated with anti-MIF antibodies or *Mif*^{-/-} mice are less susceptible to intestinal inflammation induction. Since the absence of IL-10 increases susceptibility to colitis while the absence of MIF confers protection in experimental models, we wondered which phenotype a double deficient (*Mif*^{-/-}*Il10*^{-/-}) mouse would display. However, during breeding, we noticed that all *Il10*^{-/-} mice co-housed with *Mif*^{-/-} mice died prematurely. This observation led us to formulate the following hypothesis: *Mif*^{-/-} mice, by being less susceptible to intestinal inflammation, harbor a pathogenic microbiota capable of causing disease in *Il10*^{-/-} mice. To test this hypothesis, *Il10*^{-/-} mice were systematically co-housed with *Mif*^{-/-} or wild-type mice, and parameters such as weight, survival, macroscopic and microscopic analysis of the colon were analyzed. Indeed, *Il10*^{-/-} mice showed pronounced weight loss and died about two weeks after cohabitation with *Mif*^{-/-} mice. The mice also presented colon shortening, and histological analysis revealed severe focal colitis with intense inflammatory infiltration, surface epithelium erosion, and tissue architecture destruction. Fecal transfer experiments between cages and gavage experiments demonstrated that the fecal microbiota of *Mif*^{-/-} mice is sufficient to trigger early and lethal disease in *Il10*^{-/-} mice. Filtered fecal transfer, however, is not capable of causing disease, suggesting that microorganisms present in the feces of *Mif*^{-/-} mice, and not toxins, are likely responsible for the death of *Il10*^{-/-} mice. This data suggests that the absence of the cytokine MIF allows the host to harbor a microbiota enriched with pathogens and/or pathobionts capable of eliciting lethal disease in animals susceptible to intestinal inflammation, such as *Il10*^{-/-} mice.

Keywords: IBD; MIF; IL-10; Microbiome; Disease Tolerance

RESUMO PARA LEIGOS**MARTA AVILA DE CASTILHO****Convívio letal: animais deficientes na proteína IL-10 desenvolvem inflamação letal no intestino após convívio com animais deficientes na proteína MIF****Orientador: Marcelo Torres Bozza
Coorientador: Vinícius Mendes Vidal****Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

MIF é uma proteína mensageira entre as células do sistema imunológico que aumenta a inflamação. Apesar de ser uma proteína importante para os indivíduos, sua produção desregulada está associada com inúmeras doenças, como as Doenças Inflamatórias Intestinais (IBDs). As IBDs são caracterizadas por inflamações crônicas do intestino, pouco compreendidas e ainda incuráveis. Pacientes com IBDs apresentam muito da proteína MIF no sangue e nos tecidos. Em animais de laboratório, existem diferentes maneiras de induzir artificialmente inflamação no intestino. Quando usamos um animal geneticamente modificado incapaz de produzir a proteína MIF, esse animal se mostra resistente à indução de colite, ficando saudável. Nesse cenário, existe uma segunda proteína mensageira importante, chamada IL-10, que tem efeito oposto ao do MIF. IL-10 é uma proteína anti-inflamatória, e crianças com deficiências genéticas para produzir essa proteína apresentam formas precoces e graves de IBDs. Animais de laboratório geneticamente alterados incapazes de produzir IL-10 apresentam a mesma doença, indicando que sem a proteína IL-10, os indivíduos ficam altamente suscetíveis a desenvolver inflamação no intestino. Como essas proteínas apresentam efeitos opostos em termos de susceptibilidade à inflamação intestinal, nós nos perguntamos o que aconteceria com um animal geneticamente modificado incapaz de produzir ambas as proteínas. Para fazer isso no laboratório, é preciso cruzar os camundongos deficientes em IL-10 com os camundongos deficientes em MIF. Contudo, durante os cruzamentos, notamos que os camundongos deficientes em IL-10 morriam após poucos dias de convívio. Essa observação nos fez considerar a possibilidade dos camundongos deficientes em MIF, por serem pouco suscetíveis à inflamação intestinal, estarem colonizados no intestino de maneira assintomática por diferentes microrganismos infecciosos. Para testar isso, animais deficientes em IL-10 foram colocados para conviver com animais deficientes em MIF e camundongos normais como controle. Os camundongos deficientes em IL-10 que convivem especificamente com os camundongos deficientes em MIF perdem peso ao longo dos dias e morrem em cerca de duas semanas. Quando observamos o intestino dos animais no microscópio, notamos muita inflamação e destruição do tecido. Em seguida, foram feitos dois experimentos baseados na transferência de fezes e, novamente, apenas os camundongos deficientes em IL-10 expostos às fezes dos camundongos deficientes em MIF que desenvolveram doença, sugerindo que os microrganismos presentes nas fezes dos camundongos deficientes em MIF são suficientes para desencadear doença precoce e letal nos camundongos deficientes em IL-10. Mais que isso, esses experimentos revelam que na ausência da proteína MIF, um indivíduo se torna capaz de hospedar microrganismos infecciosos de maneira assintomática, e que esses agentes infecciosos podem ser transmitidos pelo convívio, desencadeando doença em indivíduos mais suscetíveis à inflamação intestinal.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	10
Doenças Inflamatórias Intestinais	10
Epidemiologia.....	10
Sinais e Sintomas.....	11
Manejo Clínico	12
Microbiota	13
Resposta Imunitária às Doenças Inflamatórias Intestinais	14
Sistema Imunitário das Mucosas Intestinais	14
Principais Marcadores da Resposta Inflamatória Intestinal	18
Modelos de IBDs	19
Fator Inibidor da Migração de Macrófagos	20
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
Animais	22
<i>Co-housing</i>	22
Histologia	22
Transferência de fezes	23
Análise Estatística	23
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais, (do inglês *Inflammatory Bowel Disease* - IBD) compreendem um conjunto de patologias crônicas, imuno-mediadas, e de caráter progressivo, que acometem o trato gastrointestinal (GI), sendo clinicamente divididas em Doença de Crohn e Colite Ulcerativa. Essas patologias de elevada morbidade e causas multifatoriais surgem de uma resposta desregulada à microbiota do trato intestinal de indivíduos geneticamente suscetíveis, com elementos do hospedeiro e do ambiente impactando no estabelecimento, progressão e gravidade da doença (Ashwin, 2015). A natureza prolongada das doenças inflamatórias intestinais exerce um peso enorme na qualidade de vida de pacientes em terapia, hospitalização, cirurgias, além de também afetar a produtividade econômica e desempenho social.

A patogênese das IBDs é complexa e pouco entendida, mas vários fatores que contribuem para a patogênese da doença já foram identificados; estes se enquadram em três categorias: fatores genéticos, sistema imunitário do hospedeiro e fatores ambientais, como a microbiota intestinal (Souza e Fiocchi, 2016).

1.2 Epidemiologia

As IBDs têm sido esporadicamente observadas desde a antiguidade, mas têm surgido como um problema crescente em nações industrializadas. Desde a metade do século 20, a incidência da colite ulcerativa e a doença de Crohn têm aumentado no Ocidente. As IBDs afetam estimados 1.5 milhões de americanos, 2.2 milhões de pessoas na Europa, e centenas de milhares de outros pelo resto do mundo. A incidência anual de colite ulcerativa é de 0-19,2 em cada 100,000 na América do Norte, e 0,6-24.3 a cada 100,000 na Europa, correspondendo a uma prevalência de 37.5-248.6 por 100,000 e 4.9-505 por 100,000, respectivamente. A incidência da Doença de Crohn é semelhante. Atualmente, a incidência chega a 0,5% da população geral do mundo Ocidental (Kaplan, 2015).

A incidência em populações estabelecidas é similar entre homens e mulheres, mas é influenciada por raça e etnia. A população judia tem 3 vezes mais chance de desenvolver a patologia, enquanto a ocorrência é menor entre indivíduos de etnia afro-americana ou hispânica do que caucasiana, mas essa diferença está em declínio (Ashwin, 2015).

Nos últimos anos, a alta incidência e prevalência das IBDs em países do ocidente vêm atingindo um platô. A crescente conscientização sobre as IBDs, além da modernização das técnicas de diagnóstico, pode ter contribuído para esse fenômeno. Os primeiros relatórios

epidemiológicos sobre IBDs mostraram alta incidência e prevalência em países industrializados na América do Norte, norte e oeste europeu e na Austrália, sugerindo que a colite ulcerativa e a doença de Crohn eram doenças do “mundo ocidental”. Porém, nas últimas décadas, estudos feitos no leste europeu e na Ásia mostraram um aumento na incidência das doenças no mundo oriental (Molodecky *et al*, 2012). O motivo exato da crescente incidência e prevalência nesses países é desconhecido, mas pode estar relacionado às mudanças ambientais, principalmente as consequentes da globalização, como a ‘americanização’ da dieta e do estilo de vida. (Vegh, Kurti, 2017).

1.3 Sinais e Sintomas

As IBDs compreendem dois tipos clínicos: A doença de Crohn (CD, do inglês “Crohn’s disease”), que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, e a colite ulcerativa (UC, do inglês “ulcerative colitis”), onde somente a mucosa do cólon é afetada. (Souza e Fiocchi, 2016). Apesar de algumas características semelhantes, essas duas formas podem ser distinguidas quanto à diferenças na predisposição genética, fatores de risco, e características clínicas, endoscópicas e histológicas (Ordas e Echmann, 2012) Quando a IBD é identificada, sobreposições de características endoscópicas e histológicas podem trazer dificuldades na distinção entre Doença de Crohn e a colite ulcerativa, levando a uma frequência de diagnósticos de colite intermediária ou IBD não-especificado (Yu e Rodrigues, 2017).

A Doença de Crohn pode afetar qualquer região do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus. Os sinais clássicos da doença de Crohn incluem dor abdominal, diarreia aquosa, e perda de peso, que ocorre tanto em virtude da má absorção de nutrientes quanto pela anorexia (Flynn e Einstein, 2019; Sawczenk e Sandhu, 2003). A dor abdominal se assemelha à cólica e muitas vezes persiste por anos sem diagnóstico. Devido à alta propensão ao envolvimento do íleo terminal, a dor frequentemente se concentra no quadrante inferior direito do abdômen, e muitas vezes é confundida com apendicite devido à natureza aguda e a região da dor (Flynn e Einstein, 2019).

A inflamação na colite ulcerativa é limitada à mucosa do cólon, resultando em sintomas menos heterogêneos. No entanto, a doença abrange um largo espectro de apresentações clínicas devido à correlação entre severidade dos sintomas e a extensão do processo inflamatório (Sairenji *et al*, 2017). O período entre o início dos sintomas e o diagnóstico é mais curto na UC, normalmente levando semanas ou meses, em oposição à CD, que muitas vezes demora meses ou anos para ser diagnosticada (Flynn e Einstein, 2019).

A característica mais marcante da UC é diarreia decorrente da passagem rápida do conteúdo intestinal pelo cólon inflamado. Os indivíduos frequentemente apresentam sangue e muco nas fezes, além de sintomas como tenesmo, dor abdominal, fadiga e manifestações extra intestinais, como estenoses, abscessos, fístulas, neoplasias associadas à colite e câncer. O sangramento ocorre com a maioria dos pacientes, sendo relacionado à extensão do envolvimento do cólon. Aproximadamente 15% dos pacientes apresentam colite fulminante ou megacólon tóxico, que podem resultar em hemorragia ou na perfuração do cólon, necessitando intervenção cirúrgica de emergência. Outras características comuns da UC incluem tenesmo retal (vontade intensa de evacuar, mas a sensação é de não ocorrer esvaziamento completo ou nem ocorrer a evacuação) e dor abdominal (Flynn e Einstein, 2019).

1.4 Manejo Clínico

Diante da natureza destrutiva, progressiva e crônica da sua patologia, abordagens terapêuticas eficazes são de grande relevância clínica para pacientes com IBDs. O número de estratégias terapêuticas alternativas ao uso de corticoide para o IBD vêm aumentando na última década, mas os resultados ainda deixam a desejar. O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória secretada por diversos tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células T, fibroblastos e adipócitos. Em pacientes com IBDs, o TNF é uma citocina chave na promoção da inflamação da mucosa gastrointestinal, e estratégias imunoterápicas para o seu bloqueio (ex: Infiximab- anticorpo monoclonal anti-TNF; ustekinumab- anticorpo monoclonal para a subunidade p40 de Il-12 e Il-23; natalizumab- atua bloqueando a ação da integrina $\alpha 4$) têm sido progressivamente introduzidos mais cedo no tratamento, com o intuito de minimizar a exposição e dependência a esteroides e maximizar o controle da doença e a qualidade de vida (Danese, Vuitton, Peyrin-Biroulet, 2015). Terapias em vigor incluem anti-inflamatórios clássicos como aminossalicilatos (ex: mesalazima), corticosteróides na fase de ativação da doença (ex: prednisona), antibióticos em algumas complicações como abscessos (ex: metronidazol, ciprofloxacino), agentes que atuam na proliferação de linfócitos (ex: ciclosporina, mercaptopurina, azatioprina, metotrexato), terapia com agentes anti-integrina (ex: natalizumab), probióticos, e imunoterapia com anticorpos monoclonais, especialmente anti-TNF.

2. Microbiota

A microbiota intestinal é uma comunidade microbiana grande e diversificada que habita o intestino, contendo cerca de 100 trilhões de bactérias de 500 a 1000 espécies distintas que, coletivamente, proporcionam benefícios ao hospedeiro (Dollé *et al*, 2016). Historicamente, nossa visão sobre a microbiologia humana era formada quase que exclusivamente por estudos de microrganismos individuais (bactéria, archaea, fungos e vírus) e dependentes de cultivo. Avanços nas tecnologias independentes de cultivo tem mostrado a enorme diversidade e capacidade funcional e dinâmica do microbioma humano. Experimentos moleculares que detectam e classificam microrganismos e analisam seus genes e produtos gênicos, mostraram que microrganismos raramente existem isoladamente – subsistem em comunidades microbianas multiespécies complexas e interativas dentro de um habitat. (Lynch e Pedersen, 2016). A partir de trabalhos recentes em epidemiologia e fisiologia, utilizando tecnologias *ômicas*, complementados por estudos *in vitro* com cultivo celular e *in vivo* com modelos animais, foi possível descobrir que grande parte da influência ambiental na saúde e doença humana pode ser mediada ou modificada pelas comunidades microbianas (Fan e Pedersen, 2021).

O trato gastrointestinal é colonizado por centenas de espécies de microrganismos que existem em uma relação mutualística com o hospedeiro (Ivanov *et al*, 2009). Além da exposição constante a antígenos alimentares e ambientais, o intestino humano abriga bactérias comensais, que formam as comunidades microbianas mais densamente povoadas conhecidas na biologia (Gill *et al*, 2006). A microbiota tem um papel importante no treinamento, maturação e desenvolvimento do sistema imunitário do hospedeiro. Por sua vez, o sistema imunitário evoluiu amplamente como um meio de manter a relação simbiótica do hospedeiro com estes organismos altamente diversificados e em constante evolução (Belkaid e Hand, 2014).

Apesar dos membros mais estudados do microbioma serem as bactérias, existem outras comunidades de microrganismos presentes no corpo humano, como vírus (viroma), fungos (micobioma), arqueas (arqueoma), protozoários e helmintos (Wang *et al*, 2022). O viroma humano é dominado por bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), e acredita-se que estes possuem papel crucial na formação das comunidades microbianas através de predação e transferência de genes horizontal (De Sordi *et al*, 2019). Devido a sua capacidade de se ligar e eliminar bactérias com altíssima especificidade, os fagos podem ter potencial como agentes terapêuticos nas IBDs, além de possivelmente desempenharem uma função chave na manutenção da diversidade microbiana no ecossistema intestinal (Sheehan e Shanahan, 2016).

3. Resposta Imunitária Associada às IBDs

“As condições de saúde ou doença são uma expressão do sucesso ou do fracasso experienciado pelo organismo na sua tentativa de responder adaptativamente a desafios ambientais” – Rene Dubos, 1965

O sistema imunitário dos mamíferos engloba uma rede complexa de componentes inatos e adaptativos em todos os tecidos, além de desempenhar um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra vários agentes externos potencialmente nocivos e perturbações endógenas da homeostase. Do ponto de vista ecológico, os mamíferos e seus microrganismos comensais co-evoluíram no sentido do mutualismo e da homeostase (Dethlefsen *et al*, 2007). Além da exposição constante a antígenos alimentares e ambientais, o intestino humano abriga as comunidades microbianas mais densamente povoadas conhecidas na biologia (Gill *et al*, 2006). A homeostase intestinal depende de interações complexas entre a microbiota, metabólitos, epitélio intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro. Diversos mecanismos de regulação cooperam para manter a homeostase (Souza e Fiocchi, 2016).

A resposta imunitária e patogênese das IBDs são mediadas por vários fatores, sendo eles genéticos, imunitários e inflamatórios (como citocinas, quimiocinas, e peptídeos antimicrobianos), além de fatores ambientais como presença de microrganismos, dieta, infecções, estresse e uso de antibióticos. Embora o pouco conhecimento sobre a etiologia das IBDs, algumas hipóteses são consideradas, como: i) reação a uma infecção intestinal persistente; ii) uma mucosa de barreira defeituosa contra antígenos do lúmen; e iii) uma resposta imune desregulada á antígenos ubíquos do hospedeiro (Sartor, 1997; Souza e Fiocchi, 2016; Caruso, Lo e Núñez, 2020). Apesar do foco em genética nas últimas duas décadas, duas linhas de evidência confirmam o ambiente como um fator de risco para o IBD: o grau de concordância em gêmeos geneticamente idênticos (40-50% para Doença de Crohn e aproximadamente 10% para colite ulcerativa), e o aumento da frequência de ambas as condições ter ocorrido em um período curto demais para ser devido a mudanças no ‘*pool*’ genético de fatores de risco. Evidências como essas demonstram a importância dos fatores ambientais no desenvolvimento das IBDs, indicando um possível papel da microbiota (Sheehan e Shanahan, 2016).

3.1 Sistema Imunitário das Mucosas Intestinais

A mucosa intestinal é um ambiente particularmente dinâmico e um importante local de interação antigênica, uma vez que o hospedeiro interage constantemente com trilhões de microrganismos comensais, e periodicamente com patógenos de diversas naturezas (López *et*

al., 2016). O intestino e seu sistema imunitário têm evoluído para cumprir a extraordinária tarefa de manter uma tolerância ao maior e mais complexo habitat microbiano comensal, enquanto simultaneamente ataca e contém até quantidades pequenas de patógenos ocasionais. Ao mesmo tempo, o sistema imunitário intestinal deve evitar reações exageradas que podem danificar tecidos intestinais ou alterar as importantes funções metabólicas da microbiota (Cader e Kaser, 2013).

O epitélio intestinal representa uma enorme área de superfície de aproximadamente 100m² revestida por uma camada única de IECs (células epiteliais intestinais) de diversas linhagens, que formam uma barreira robusta (Maloy e Powrie, 2011). No intestino delgado, a camada de IECs formam vilosidades e criptas, sob as quais se localizam as células Paneth. No entanto, as IECs fazem muito mais do que formar uma simples barreira física, desempenham múltiplas outras funções cruciais para a homeostase intestinal (Artis, 2008). Um elemento-chave da estratégia intestinal dos mamíferos para manutenção da homeostase é minimizar o contato entre a superfície epitelial intestinal e os microrganismos do lúmen. Isso é feito pelo aprimoramento da barreira física através de uma série de mecanismos, como a produção de uma espessa camada de muco, proteínas antimicrobianas e de IgA (Hooper e Macpherson, 2010; Caruso, Lo e Núñez, 2020). O epitélio intestinal possui várias adaptações físicas para separar o tecido conjuntivo do hospedeiro do ambiente externo, como as junções oclusivas, que restringem a permeabilidade transepitelial (Bansal *et al.*, 2010). A barreira física é reforçada por uma série de adaptações bioquímicas, como a densa camada de muco que separa o epitélio intestinal dos microrganismos residentes (Belkaid e Naik, 2013). O muco é produzido majoritariamente por células epiteliais, em especial as chamadas células caliciformes, que secretam glicoproteínas denominadas mucinas. As mucinas formam uma camada viscosa semelhante a um gel, que se estende até 150 µm da superfície epitelial intestinal e se divide em duas camadas distintas no cólon. A observação das relações espaciais entre muco, bactéria e epitélio indicam que a camada de muco mais interna delimita uma zona protegida na superfície apical do epitélio, enquanto a camada mais externa contém uma grande quantidade de bactérias (Burgueño e Abreu, 2015). O sistema imunitário das mucosas é a primeira linha de defesa contra patógenos intestinais, tendo assim um papel essencial na manutenção da homeostase intestinal.

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) consiste tanto em tecidos linfóides multi-foliculares como as placas de Peyer, quanto numerosos folículos linfóides isolados distribuídos ao longo do intestino grosso e do intestino delgado (Morbe *et al.*, 2021). As placas de Peyer são estruturas linfóides secundárias, multi-foliculares e visíveis ao olho nu, presentes

apenas no intestino delgado. Localizadas na superfície apical das placas de Peyer ficam as células M, células epiteliais sem vilosidades especializadas em fagocitose e transcitose de macromoléculas, antígenos particulados e microrganismos (comensais ou patogênicos) do intestino (Mabbott *et al*, 2013). Acredita-se que uma das principais funções das células M seja a captação (em vesículas) e transporte e apresentação de antígenos do lúmen intestinal para o tecido linfóide subjacente. A membrana basolateral das células M é invaginada, formando “bolsos” que abrigam linfócitos infiltrados, formação que reduz muito a distância intracelular que os antígenos precisam percorrer e permite que as células M transportem rapidamente materiais antigênicos para a membrana basolateral. Em humanos, os principais tipos de linfócitos encontrados nos “bolsos” das células M são do tipo B e T CD4⁺ de memória (Miller *et al* 2007).

Outro mecanismo imune que restringe o contato entre bactérias e o epitélio é a secreção de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais do intestino. As principais células produtoras destes peptídeos são as células de Paneth, mas os enterócitos e células caliciformes também produzem uma quantidade menor de peptídeos antimicrobianos, agentes que auxiliam na eliminação de bactérias que penetram a camada de muco. Plasmócitos secretam IgA que atravessa a camada de células epiteliais por transcitose e é secretada na superfície apical das células, limitando o número de bactérias associadas ao muco e evitando a penetração bacteriana dos tecidos do hospedeiro (Macpherson e Uhr, 2004). IgA específico para bactérias intestinais é produzido com auxílio das células dendríticas que fazem *sampling* das bactérias que penetram no epitélio sobrejacente localizadas sob a “cúpula” epitelial das placas de Peyer e também pelos linfonodos mesentéricos. Outra população células dendríticas estão presentes na lâmina própria, fazendo *sampling* das poucas bactérias presentes na superfície apical das células epiteliais através da extensão de seus dendritos entre as junções oclusivas das células epiteliais ou das próprias células M, permitindo o monitoramento direto das bactérias que se associam com a superfície da mucosa (Artis, 2008; Macpherson *et al*, 2000; Burgueño e Abreu, 2015). Medições bioquímicas da atividade antimicrobiana indicam que as proteínas antimicrobianas ficam retidas no muco, e são virtualmente ausentes no conteúdo luminal (Meyer-Hoffert *et al*, 2008). Sugere-se, então, que a camada de muco protege a superfície de células epiteliais em pelo menos duas maneiras: primeiro, limitando o acesso das bactérias do lúmen ao epitélio, e segundo, formando uma barreira de difusão que concentra proteínas antimicrobianas perto da superfície das células epiteliais (Hooper e Macpherson, 2010; Burgueño e Abreu, 2015; Caruso, Lo e Núñez, 2020).

Mesmo com o muco, proteínas antimicrobianas e IgA trabalhando juntos na defesa da barreira epitelial, é inevitável que em um habitat tão denso em bactérias ocorra a violação dessa barreira. Uma segunda camada muito importante de proteção imune depende da rápida detecção e morte de bactérias que penetram para além das células epiteliais. Isso ocorre através de diversos mecanismos imunitários distintos, incluindo a absorção e fagocitose bacteriana por células imunes inatas e respostas mediadas por células T (Hooper e Macpherson, 2010). Microrganismos que conseguem violar a barreira epitelial normalmente sucumbem rapidamente a fagocitose e eliminação por macrófagos da lâmina própria (Lee *et al*, 1985).

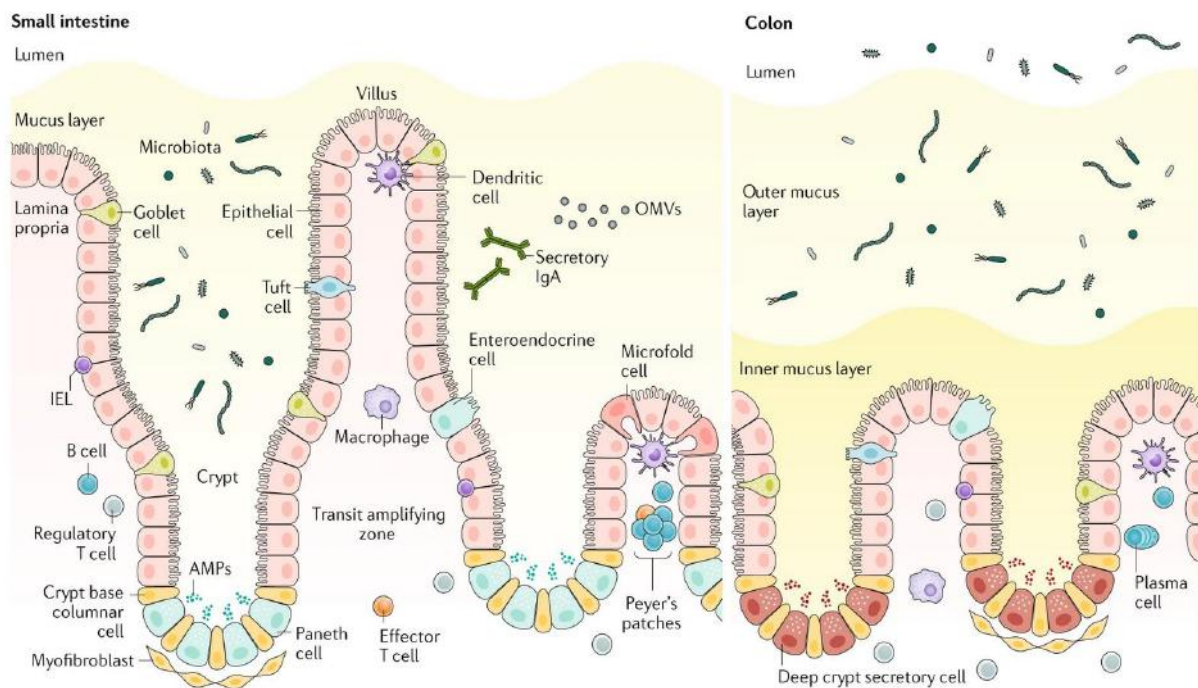


Figura 1.0 – Anatomia do sistema imunitário intestinal. A mucosa gastrointestinal é separada do ambiente externo por uma única camada de células epiteliais intestinais (IECs) que proporcionam uma barreira física e funcional. Todas as linhagens de IECs originam-se das células-tronco colunares da base da cripta, que se dividem para dar origem a células filhas mais proliferativas, as células amplificadoras de trânsito. À medida que as células amplificadoras de trânsito se proliferam, a maioria das IECs filhas sobem à região apical da cripta e se diferenciam. As IECs que alcançam a ponta da cripta (côlon) ou a vilosidade (intestino delgado) passam por apoptose e são então eliminadas no lúmen. Durante essa migração, as IECs se diferenciam em enterócitos absorventes, células caliciformes produtoras de muco, células enteroendócrinas secretoras de hormônios, células de “tuft” antiparasitárias e células de Paneth (intestino delgado) ou células secretoras de cripta profunda (cólon). As células de Paneth migram para a base da cripta para fornecer fatores de crescimento às células-tronco. Intercalados com as IECs, os linfócitos intraepiteliais (IELs) produzem peptídeos antimicrobianos (AMPs) e têm atividade citolítica. Abaixo das IECs, as células estromais (miofibroblastos), células B, plasmócitos produtores de IgA, macrófagos, células dendríticas e células T residem na lâmina própria, reforçando a barreira epitelial ao amostrar o conteúdo luminal e mantendo um estado de hiporresponsividade. Estruturas linfoides regionais, como placas de Peyer (intestino delgado), ceco e aglomerados de células no cólon (*colon patches*), e tecidos linfoides isolados são revestidos por um epitélio especializado, conhecido como epitélio associado ao folículo, onde as células “microfold” ou M capturam antígenos e os liberam para o domo subepitelial. No cólon, a presença de uma camada interna de muco firme reduz a exposição aos microrganismos. (Adaptado de Burgueño e Abreu, 2015).

3.2 Principais Marcadores da Resposta Inflamatória Intestinal

Falhas em imunorregulação são frequentemente percebidas nas IBDs, destacadamente a proporção entre citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras, como também a ativação seletiva de subconjuntos de linfócitos Thelper (Th) CD4+ e falhas na apresentação de antígenos epiteliais. Quando ativados no início do processo inflamatório, macrófagos, células epiteliais e células linfóides inatas secretam uma série de citocinas, que por sua vez recrutam outros tipos celulares inflamatórios, dando continuidade ao processo (Sartor, 1997). A produção de citocinas por diferentes tipos celulares controla múltiplos aspectos da resposta inflamatória intestinal. As principais subpopulações produtoras de citocinas na mucosa intestinal incluem 1) células Th1 que produzem interferon- γ , 2) células Th17 que produzem Il-17 e Il-22, 3) diversas células linfóides com características efectoras para produção de citocinas Th1 e Th17 e 4) células T reguladoras (Treg) Foxp3⁺, produtoras de IL-10, que desempenham papel protetor central na colite (Ivanov *et al*, 2009., Zhang *et al*, 2018).

As respostas de IgA específicas para comensais são feitas com auxílio das células dendríticas intestinais, que são capazes de fazer *sampling* dos microrganismos comensais associados ao epitélio intestinal e interagir com células B e T nas placas de Peyer para produzir IgA específico para antígenos oriundos de microrganismos comensais. (Belkaid e Harrison, 2017). As células dendríticas (DCs) desempenham um papel importante tanto na geração da resposta imunitária, quanto na manutenção da homeostase intestinal - medeiam a tolerância a antígenos alimentares, limitam a reatividade à microbiota intestinal e são necessários para uma resposta ideal a patógenos intestinais (Stagg, 2018). DCs fazem *sampling* constante do conteúdo intestinal, monitorando a presença de possíveis patógenos, e estabelecendo uma resposta regulatória a antígenos da dieta e da microbiota (Liu e Macpherson, 1993; Stagg, 2018). Durante a homeostase, a mucosa intestinal favorece a ativação das células ao perfil regulador através de mecanismos reguladores e a geração de respostas imunes de baixo nível, destinadas a controlar a microbiota normal sem causar patologia (Coombes e Powrie, 2008). As células epiteliais ao interagirem com a microbiota secretam mediadores que induzem a diferenciação das células dendríticas ao perfil de DC condicionada, um fenótipo tolerogênico que favorece a ativação de células ao perfil regulador através da expressão de vários mediadores, como por exemplo: Il-10, TGF- β e ácido retinóico (Bertolini *et al*, 2021). As respostas de IgA específicas para microrganismos comensais são feitas com auxílio das DCs intestinais que interagem com células B e T nas placas de Peyer a fim de produzir IgA específica para antígenos derivados de microrganismos comensais (Macpherson e Uhr, 2004). Nos centros

germinativos das placas de Peyer, as células B sofrem mudança de classe da produção de IgM para a de IgA. Essa produção preferencial ocorre devido ao microambiente único das placas de Peyer, ricas em quimiocinas e fatores dietéticos (como ácido retinóico derivado da vitamina A) necessários para a sobrevivência e proliferação das células B recém trocadas de classe (Belkaid e Harrison, 2017).

4. Modelos de IBDs

Em 1957, Dr. Kirsner e seus colegas inventaram pela primeira vez um modelo experimental de indução de colite em coelhos através da sensibilização à albumina de ovo cristalina, em combinação com instilação retal de formalina diluída (Kirsner, 1957; Baydi *et al.*, 2021). Desde então, muitos outros modelos de indução química de colite em outros animais, como roedores, têm sido desenvolvidos.

Hoje existem uma variedade de modelos de inflamação colônica que se assemelham a várias características da IBD. Modelos animais de colite variam desde aqueles que surgem espontaneamente em linhagens susceptíveis de certas espécies, até aqueles que requerem administração de concentrações específicas de compostos que induzem a colite, como por exemplo Dextran Sulfato de Sódio (DSS) (Kim *et al.*, 2012). Pacientes com IBDs apresentam um espectro diverso de características patológicas que refletem a participação de uma gama de efetores imunes inatos e adaptativos, de forma que cada modelo experimental permite a investigação de um aspecto distinto da doença (Maloy e Powrie, 2011).

A descoberta do desenvolvimento espontâneo da colite em camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-10 (*Il10*^{-/-}), IL-2 (*Il-2*^{-/-}) e na cadeia alfa do receptor de células T (TCR α ^{-/-}) foi um momento decisivo na pesquisa das IBDs. Desde então, já foram descobertas mais de 40 diferentes linhagens de camundongos geneticamente modificados capazes de desenvolver colite e/ou ileíte espontaneamente (Baydi *et al.*, 2021).

Camundongos *Il10*^{-/-} desenvolvem enterocolite crônica quando mantidos sob condições convencionais. Quando mantidos sob condições *specific-pathogen-free* (SPF), animais *Il10*^{-/-} apresentam colite tardia, e em condições *germ-free* (livre de germes), não desenvolvem colite. Estes resultados indicam uma complexa influência dos componentes microbianos na patogênese (Kullberg *et al.*, 1998) e que o *Il10* é um imunorregulador importante do trato intestinal (Kuhn *et al.*, 1993). Humanos com deficiências tanto na citocina *Il10* quanto no seu receptor manifestam uma forma mais grave e precoce de IBD, a VEO-IBD (*very early-onset* IBD), um subgrupo de pacientes pediátricos diagnosticados com IBD antes dos 6 anos de idade (Miller *et al.*, 2017).

5. Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF)

Nosso laboratório estuda há muitos anos o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) – uma citocina pleiotrópica multipotente liberada por macrófagos, células T, a hipófise e diversos outros tipos celulares na resposta inflamatória (Bozza *et al*, 1999). Entre suas diversas funções pró-inflamatórias e imunomodulatórias, há i) indução de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, NO, COX2 e PGE2; ii) retenção e manutenção de macrófagos e neutrófilos em processos inflamatórios; e iii) ativação e proliferação de linfócitos T (Calandra *et al*, 1994., Mitchell *et al*, 2002). Esse importante mediador proteico foi descrito há mais de 56 anos como um fator derivado de células T que inibia a migração aleatória de macrófagos (David, 1966).

O MIF desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Em razão dos seus fortes efeitos pró-inflamatórios, e em decorrência do envolvimento do MIF na patogênese de choque séptico, em 2001 De Jong *et al* especularam que esta citocina poderia estar envolvida na patogênese das IBDs. O grupo foi capaz de mostrar que o plasma de pacientes com doença de Crohn continha uma concentração de MIF seis vezes superior à dos controles saudáveis. Também foi mostrado que MIF é essencial para o desenvolvimento de colite no modelo de transferência adotiva de linfócitos T CD4+ CD45RBhi para animais *Rag2*^{-/-}, e que o tratamento com anti-MIF previne a progressão e severidade da colite (De Jong *et al*, 2001).

Em 2008, Ohkawara *et al* demonstrou a menor suscetibilidade de camundongos *Mif*^{-/-} em desenvolver colite em modelo químico de indução com Dextran Sulfato de Sódio (DSS). Os camundongos *Mif*^{-/-} que sobreviveram à colite mediada por DSS apresentam menor infiltrado de neutrófilos e menor escore histopatológico, sugerindo que o MIF afeta a acumulação e ativação de neutrófilos na doença inflamatória (Ohkawara *et al*, 2008).

Posteriormente, nosso grupo em 2011 demonstrou que camundongos *Mif*^{-/-} apresentaram maior tolerância à infecção em modelo de infecção por *Toxoplasma gondii* (Cavalcanti *et al*, 2011). A infecção por *T. gondii* é marcada pela intensa resposta inflamatória no íleo, que se assemelha em muitos aspectos à inflamação observada nas IBDs. Animais *Mif*^{-/-} exibem maior sobrevivência frente à infecção por *T. gondii*, mas também elevada carga parasitária.

Em 2018, dados semelhantes foram publicados em modelo de infecção intestinal por *Clostridium difficile* mostrando que a neutralização de MIF através de tratamento com anticorpos anti-MIF reduz a gravidade e duração da doença, diminui o dano tecidual e está associado a uma melhor sobrevivência do hospedeiro, não tendo efeito na carga parasitária (José *et al*, 2018).

6. JUSTIFICATIVA

Baseado no fato de que a deficiência em IL-10 aumenta a susceptibilidade a inflamação intestinal, e baseado no fato de que a deficiência em MIF diminui a suscetibilidade a inflamação intestinal, nosso grupo se perguntou qual seria o fenótipo dominante em um camundongo duplo deficiente $Il10^{-/-}Mif^{-/-}$. Sob outra perspectiva: seria possível reverter a alta susceptibilidade genética associada à deficiência em IL-10 a partir da deleção gênica de MIF? Tendo como hipótese que animais $Il10^{-/-}Mif^{-/-}$ exibiriam um fenótipo menos suscetível à inflamação intestinal em comparação com animais $Il10^{-/-}$, iniciamos o cruzamento entre animais $Il10^{-/-}$ e $Mif^{-/-}$.

Contudo, ao longo do cruzamento dos animais, observamos que os animais $Il10^{-/-}$ morriam precocemente. Essa observação nos apontou para um possível papel da microbiota e nos fez elaborar uma nova hipótese: camundongos $Mif^{-/-}$, por serem menos suscetíveis à inflamação intestinal, abrigam uma microbiota patogênica capaz de gerar doença em camundongos $Il10^{-/-}$.

7. OBJETIVOS

- Investigar se os animais $Il10^{-/-}$ desenvolvem doença letal após convívio com os animais $Mif^{-/-}$.
 - Através do *co-housing* nas combinações: $Il10^{-/-}$ com WT, $Il10^{-/-}$ com $Mif^{-/-}$ e $Il10^{-/-}$ com $Il10^{-/-}$. Avaliar o peso e a sobrevivência dos animais diariamente.
- Investigar se os animais $Il10^{-/-}$ desenvolvem colite após convívio com os animais $Mif^{-/-}$.
 - Através da análise macroscópica do cólon quanto ao comprimento e presença de sinais da inflamação.
 - Através da análise histopatológica do cólon em lâminas coradas com hematoxilina-eosina.
- Testar se a microbiota fecal dos animais $Mif^{-/-}$ é suficiente para desencadear doença nos animais $Il10^{-/-}$.
 - Através da transferência de *pellets* de fezes entre as caixas de animais $Il10^{-/-}$, $Mif^{-/-}$ ou WT para a caixa de animais $Il10^{-/-}$.
 - Através da transferência fecal por gavagem de fezes oriundas de animais $Mif^{-/-}$ ou WT para animais $Il10^{-/-}$.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem C57BL/6j, machos e fêmeas, de seis a dez semanas de vida, de genótipos selvagem (WT), deficiente para IL-10 (*Il10^{-/-}*), e deficiente para MIF (*Mif^{-/-}*). Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Inflamação e Imunidade, em caixas com no máximo cinco camundongos e em microisoladores (Alesco, Monte Mor, Brasil), sob condições controladas de temperatura (22±2°) e ciclos de claro/escuro de 12h cada. Os animais tiveram acesso livre à ração convencional irradiada e água. O projeto está sob o número 040/22 na Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFRJ.

8.2 Co-housing

Camundongos *Il10^{-/-}* foram mantidos em convívio nas mesmas gaiolas com animais WT ou *Mif^{-/-}* nas proporções 2:1 ou 3:2 (*Il10^{-/-}*: WT ou *Mif^{-/-}*). Os *co-housings* foram feitos no sistema macho:fêmea ou fêmea:fêmea, e os animais foram pesados diariamente ao longo de duas semanas. Após esse período, os animais foram pesados semanalmente.

8.3 Histologia

O cólon foi excisado e as fezes foram removidas gentilmente do lúmen intestinal com auxílio de pinça em tampão fosfato salina (PBS). A peça então foi dividida em três seções que foram lavadas com PBS, e fixadas por 3-7 dias em 15 mL Formalina tamponada (Formaldeído 4% em PBS). Após fixado, o tecido foi novamente lavado com PBS e armazenado em álcool 70% em cassete histológico. O processamento da peça foi realizado em três etapas: (i) desidratação - as peças foram imersas em diferentes soluções de etanol em frascos diferentes e sob agitação constante; uma imersão em etanol 70% por 40 min, seguida de 3 imersões de 40 min cada em solução de etanol absoluto; (ii) parafinização - as peças foram imersas duas vezes em parafina líquida a 58°C - 60°C por 30 min. Após o processamento, a peça seguiu para inclusão em bloco de parafina a 67°C. Após a inclusão, a peça foi incubada a -20°C por 2h, isso facilita a retirada da peça do suporte de metal. (iii) corte - cortes de 4 µm foram feitos com auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125RT) e transferidos para lâminas de vidro previamente limpas. (iv) coloração - os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes foram desparafinizados e hidratados em água destilada e corados com hematoxilina de Harris durante 5 minutos. O excesso de corante foi removido em água corrente e os cortes foram diferenciados com dois mergulhos rápidos em ácido clorídrico 0,1%, sendo depois lavados novamente em água corrente para oxidação (azular). Para retirar o restante do excesso das

lâminas, foram realizados mais dois mergulhos rápidos em Eosina 1% e água acética 0,1% e em seguida banhados rapidamente em água corrente e água destilada. A desidratação foi feita em bateria de álcool e a clarificação em bateria de xilol. Lâminas foram montadas com Entelan.

O escore histológico foi determinado conforme os seguintes parâmetros: ulceração, hiperplasia, e infiltrado inflamatório. Para ulceração, a escala considerada foi: 4, extensa e profunda; 3, focal e profunda; 2, extensa e superficial; 1, focal e superficial; 0, ausente. Para a hiperplasia e infiltrado inflamatório, a escala considerada foi: 3, grave; 2, moderado; 1, leve; 0, ausente (Hahm, 2001).

8.4 Transferência de Fezes

No primeiro grupo de experimentos, 20 pellets de fezes foram diariamente coletados das caixas de animais WT ou *Mif*^{-/-} e transferidos para as gaiolas de animais *Il10*^{-/-}. No segundo grupo de experimentos, 40 mg de fezes oriundas de animais WT, *Mif*^{-/-} foram maceradas em 1 mL PBS e mantidas na bancada por 1 min para decantação. O sobrenadante foi coletado e diluído em 9 mL de PBS. Foram administrados aos animais *Il10*^{-/-} 100 µL da suspensão de fezes diluídas em dose única por gavagem utilizando o suporte plástico de cateter BD Angiocath (BD #388336). Alternativamente, a suspensão de fezes diluídas foi filtrada em filtros celulares de 0.22 µm e então administrada aos animais *Il10*^{-/-} por gavagem.

8.5 Análise Estatística

Os testes estatísticos usados foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 8. Para os gráficos de peso, a variação foi calculada a partir da fórmula: Variação de Peso = $((P_n/P_0) - 1) * 100$, onde n = dia. Foi feito o teste Mixed-effects model (REML) com teste Post-Hoc Tukey para correção de múltiplas comparações. Para os gráficos de sobrevivência, foi feito o teste Log-rank (Mantel-Cox). Para o gráfico de comprimento do cólon e escore histológico foi feito One-Way ANOVA com teste Post-Hoc Tukey. Os gráficos representam a média +- desvio padrão médio (SEM). Valores de p ajustados. * = p<0.05, ** = p< 0.01, *** = p<0.001, **** = p<0.0001.

9. RESULTADOS

Através de diferentes combinações de *co-housing* entre camundongos $I110^{-/-}$, $Mif^{-/-}$ e WT, observamos que os camundongos $I110^{-/-}$ em convívio com camundongos $Mif^{-/-}$ apresentam perda de peso acentuada quando comparado aos outros grupos, e morrem precocemente (Figura 2A). É possível observar uma diferença significativa a partir do sexto dia, quando o grupo $I110^{-/-}$ em *co-housing* com $Mif^{-/-}$ perde uma média de 7% a mais que o grupo com apenas $I110^{-/-}$ ($p=0.01$). No nono dia, a perda de peso do grupo $I110^{-/-}$ com $Mif^{-/-}$ se torna significativa também em relação ao grupo $I110^{-/-}$ com WT, com uma diferença entre médias de 10,56% entre estes grupos ($p=0.003$). Este grupo perdeu peso consistentemente em relação a ambos os grupos de $I110^{-/-}$ com WT e apenas $I110^{-/-}$ até o final do experimento (Figura 2A), e em dez dias os camundongos já exibiam perda média de 20% do peso. Também no décimo dia que detectamos as primeiras mortes (mortalidade de 33%) e já no décimo quarto, todos os animais morreram (Figura 2B).

É importante ressaltar que no sétimo dia, também observamos a perda de peso do grupo $I110^{-/-}$ com WT quando comparado ao grupo com apenas $I110^{-/-}$, havendo uma diferença entre médias de 8,31% ($p=0.016$). Contudo, essa perda de peso não avança progressivamente, ela sequer passa de 5% na média (Figura 2A) e os camundongos não morrem (sobrevivência de 100%) (Figura 2B). Os camundongos mantêm o peso, não desenvolvem sinais de doença e, em tempos mais tardios, voltam a recuperar o peso (Figura 2C, 2D). Além disso, não observamos diferenças em relação ao sexo dos animais (Figura 2E). Em conjunto, os dados sugerem que camundongos $I110^{-/-}$ desenvolvem doença letal após convívio especificamente com camundongos $Mif^{-/-}$, mas não com camundongos WT.

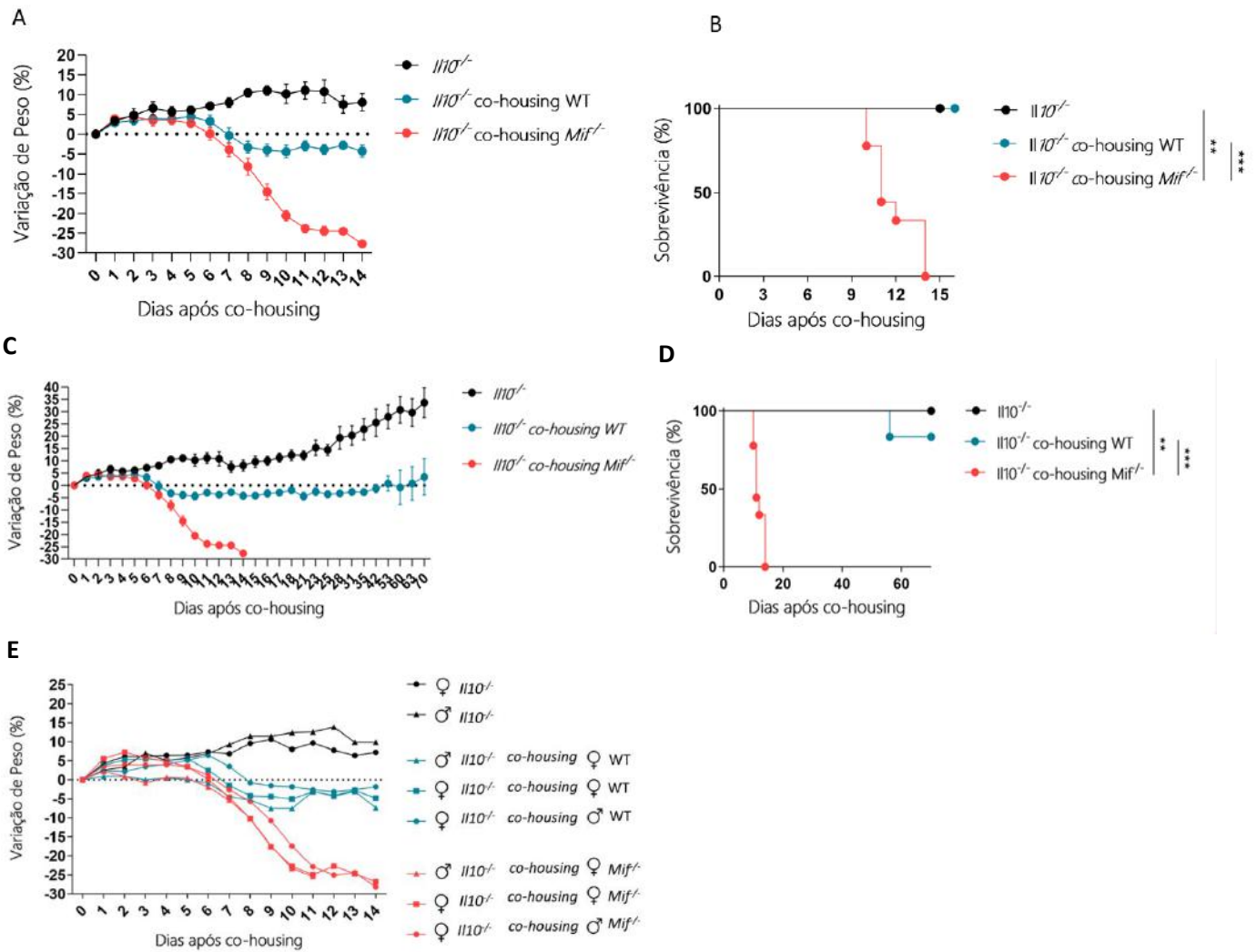


Figura 2.0 – Camundongos $Il10^{-/-}$ perdem peso e morrem após convívio com camundongos $Mif^{-/-}$. Análise da variação de peso (**A**) e sobrevivência (**B**) de camundongos $Il10^{-/-}$ ao longo do *co-housing* com camundongos $Mif^{-/-}$ (n=9), WT (n=6) e $Il10^{-/-}$ (n=4). Todos os gráficos são referentes a um mesmo experimento representativo de ao menos três experimentos independentes. **Superior:** gráficos de peso e sobrevivência ao longo de duas semanas. **Meio:** gráficos de peso e sobrevivência ao longo de 70 dias. **Inferior:** gráfico de peso separando os grupos experimentais por sexo. Para os gráficos de peso, a variação foi calculada a partir da fórmula: Variação de Peso = $((P_n/P_0) - 1) * 100$, onde n = dia. Foi feito o teste Mixed-effects model (REML) com teste Post-Hoc Tukey para correção de múltiplas comparações. Para os gráficos de sobrevivência, foi feito o teste Log-rank (Mantel-Cox). Os camundongos foram eutanasiados quando apresentavam perda maior que 25% do peso inicial. Os gráficos representam a média +- desvio padrão médio (SEM). Valores de p ajustados: ** = p< 0.01, *** = p<0.001.

Para investigar a causa da morte dos camundongos *Il10*^{-/-}, consideramos a possibilidade de eles desenvolverem colite em virtude da suscetibilidade conhecida desse genótipo à inflamação intestinal. De fato, após dez dias de *co-housing*, observamos macroscopicamente alterações dramáticas no cólon dos camundongos *Il10*^{-/-} em convívio com os camundongos *Mif*^{-/-}, como encurtamento do cólon, presença de sangue, vermelhidão e ausência de fezes (Figura 3A). Não observamos diferença significativa no comprimento do cólon dos camundongos *Il10*^{-/-} que foram submetidos ao *co-housing* com WT em relação ao grupo sem *co-housing* (Figura 3A).

Em seguida, fizemos o preparo de lâminas histológicas destes órgãos para examinar a extensão do dano tecidual microscopicamente. Nas imagens, vemos um avanço na perda da arquitetura tecidual dos camundongos *Il10*^{-/-} submetidos a *co-housing* com animais *Mif*^{-/-} em relação ao grupo de camundongos *Il10*^{-/-} sozinhos ou em convívio com WT (Figura 3B). Notamos o desaparecimento das células caliciformes (sinal típico de processos inflamatório extensos que induzem a essas células a extrusão de suas vesículas de muco), além da presença de úlceras e infiltrados inflamatórios na região da mucosa (Figura 3B).

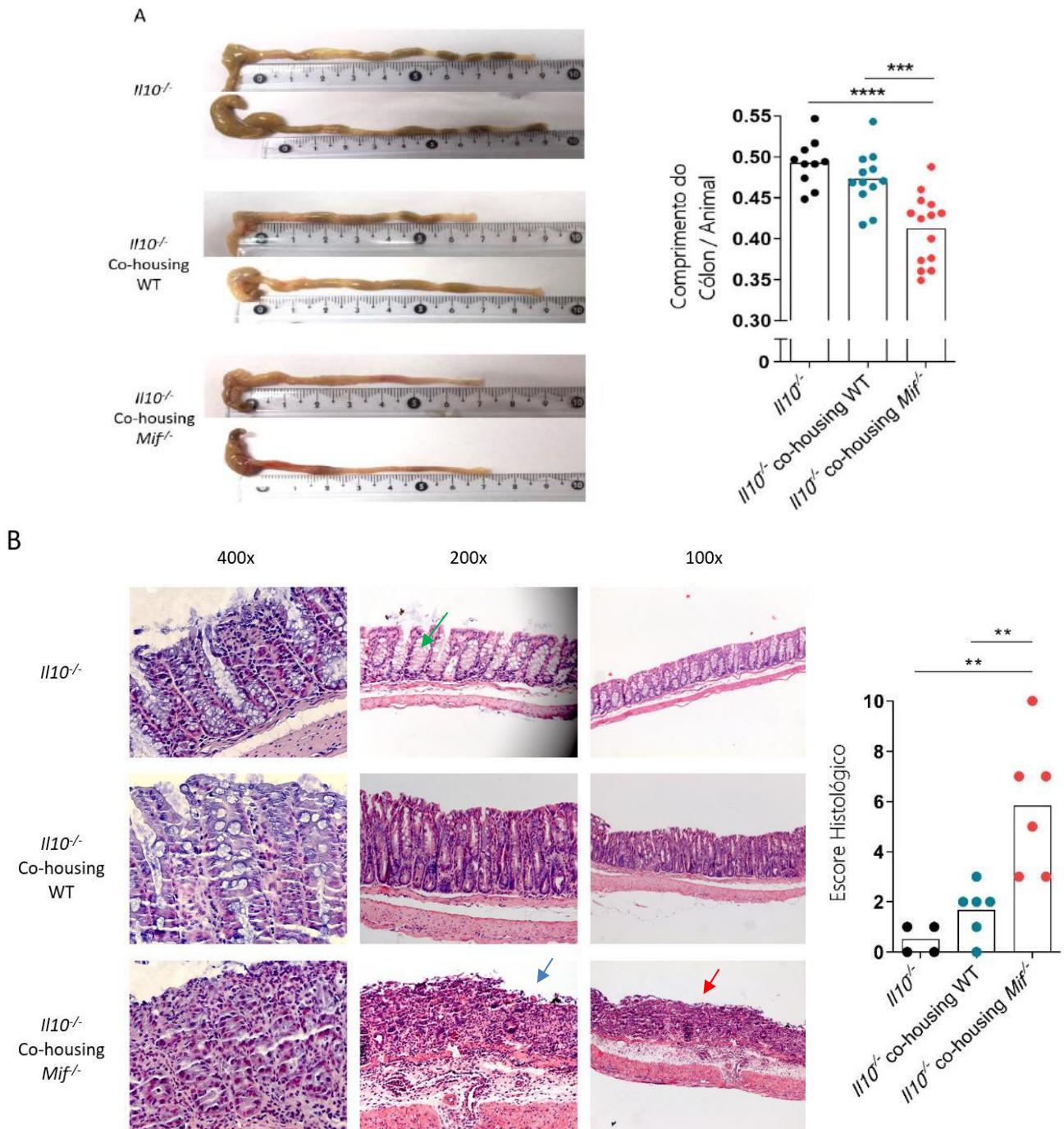


Figura 3.0 – Camundongos *Il10^{-/-}* desenvolvem colite aguda e precoce após convívio com camundongos *Mif^{-/-}*. **A.** Imagens macroscópicas dos cólons de camundongos *Il10^{-/-}* após 10 dias de *co-housing* com camundongos *Mif^{-/-}*, WT e *Il10^{-/-}*. À direita, quantificação do comprimento do cólon dos camundongos em relação ao comprimento total corporal. **B.** Fotomicrografia do cólon de camundongos *Il10^{-/-}* após 10 dias de *co-housing*. À direita, análise do escore histológico das peças. *Pool* de dois experimentos independentes. One-Way ANOVA com teste Post-Hoc Tukey. Valores de p ajustados: ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Seta Vermelha: Erosão do epitélio de superfície. Seta Azul: Úlcera. Seta Verde: vesículas das células caliciformes, presentes durante a homeostase e ausentes na inflamação.

Para testar se a microbiota fecal dos camundongos *Mif*^{-/-} é suficiente para desencadear doença nos camundongos *Il10*^{-/-}, fizemos duas estratégias de transferência fecal – transferência de pellets entre caixas (Figura 4A, 4C) e por gavagem fecal (Figura 4B, 4D).

No experimento de transferência de pellets fecais, observamos que os camundongos *Il10*^{-/-} expostos as fezes do *Mif*^{-/-} apresentam perda de peso a partir do oitavo dia quando comparados com camundongos *Il10*^{-/-} expostos as fezes dos camundongos WT (diferença entre médias de 5,45%, $p=0.01$) ou dos camundongos *Il10*^{-/-} (diferença entre médias de 4,77%, $p=0.04$). A perda de peso ocorre de maneira progressiva nesse grupo e, em duas semanas, os camundongos exibem perda média de 16% do peso, quando também foram identificadas as primeiras mortes (mortalidade = 20%) (Figura 4C). Após 16 dias, 60% dos camundongos no grupo exposto às fezes de *Mif*^{-/-} morreram e no dia 17 a mortalidade chegou a 100%. No décimo-segundo dia, também detectamos perda de peso dos camundongos *Il10*^{-/-} expostos as fezes dos camundongos WT em comparação com os que receberam fezes de *Il10*^{-/-} (diferença entre médias de 3,9%, $p=0.028$). Apesar disso, diferentemente do observado com os camundongos *Il10*^{-/-} expostos as fezes do *Mif*^{-/-}, no grupo exposto as fezes WT, a perda de peso não progride com o tempo (perda média máxima observada no dia 15 de 7%) e não culmina com a morte dos animais (sobrevivência 100% em 18 dias).

A transferência por gavagem foi feita em camundongos *Il10*^{-/-} usando PBS, fezes de camundongos WT, fezes de camundongos *Mif*^{-/-}, e fezes de camundongos *Mif*^{-/-} filtradas. A filtragem com o filtro celular de 0.22 μm elimina os microrganismos das fezes, mas não as toxinas e metabólitos produzidos por eles. De forma semelhante ao observado nos experimentos anteriores, os animais expostos especificamente às fezes dos camundongos *Mif*^{-/-} perdem peso e morrem (Figura 4B). Interessantemente, quando filtramos as fezes dos camundongos *Mif*^{-/-}, os camundongos *Il10*^{-/-} não desenvolvem doença, não perdem peso e não morrem (Figura 4B, D). No dia sete, a variação de peso passou a se tornar significativa entre o grupo que recebeu PBS comparado ao grupo que recebeu fezes de *Mif*^{-/-} ($p=0.02$) e do grupo que recebeu fezes de *Mif*^{-/-} em relação ao que recebeu fezes de *Mif*^{-/-} filtradas ($p=0.015$). No oitavo dia, a diferença na variação de peso do grupo que recebeu PBS em relação ao que recebeu fezes de WT também se torna significativa (diferença entre médias de 6,56%, $p=0.026$), e no nono dia passou a haver uma diferença significativa na variação de peso do grupo que recebeu fezes de WT em relação ao grupo que recebeu fezes de *Mif*^{-/-} (diferença entre médias de 10%, $p=0.02$).

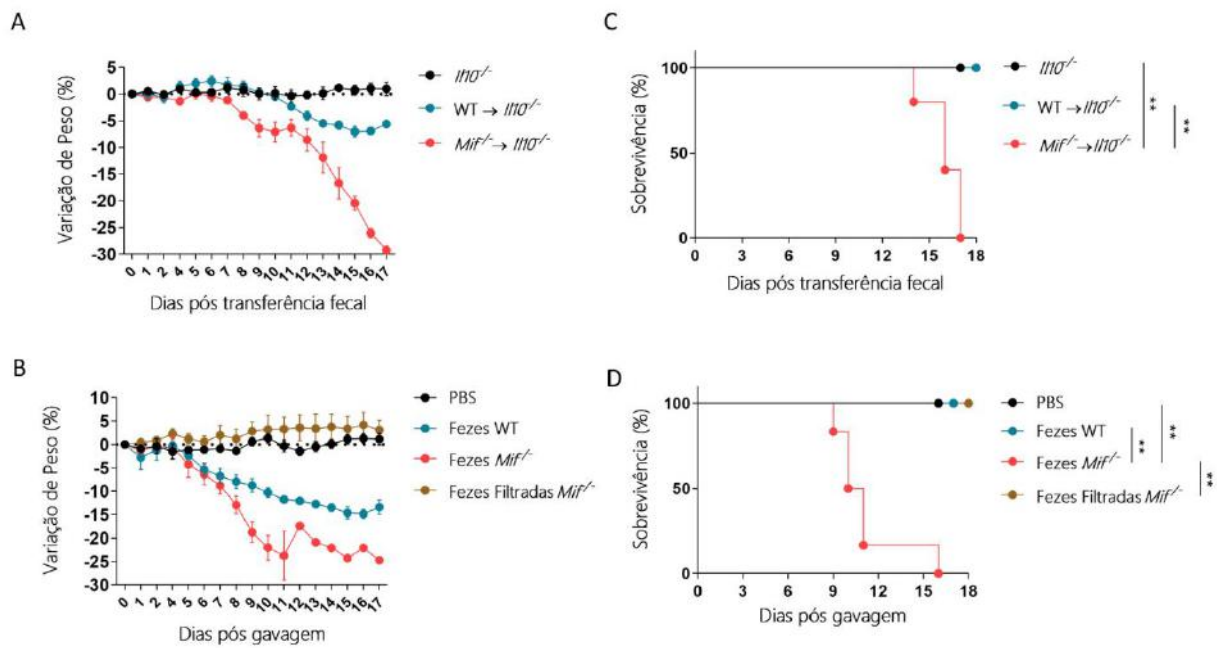


Figura 4.0 – A microbiota fecal de camundongos *Mif^{-/-}* é suficiente para desencadear doença letal em camundongos *Il10^{-/-}*. Análise da variação de peso e sobrevivência de camundongos *Il10^{-/-}* submetidos à transferência fecal por *pellets* entre caixas (**A,C**) e por gavagem (**B,D**). (**A,C**) *Il10^{-/-}* → *Il10^{-/-}* (n=4), WT → *Il10^{-/-}* (n=4), *Mif^{-/-}* → *Il10^{-/-}* (n=5). (**B, D**) PBS (n=4), fezes WT (n=5), fezes *Mif^{-/-}* (n=6), fezes *Mif^{-/-}* filtradas (n=5). Para os gráficos de peso, a variação foi calculada a partir da fórmula: Variação de Peso = ((Pn/P0) - 1)*100, onde n = dia. Foi feito o teste Mixed-effects model (REML) com teste Post-Hoc Tukey para correção de múltiplas comparações. Para os gráficos de sobrevivência, foi feito o teste Log-rank (Mantel-Cox). Os gráficos representam a média ± desvio padrão médio (SEM). Valores de p ajustados: ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001.

10. DISCUSSÃO

Inicialmente, este trabalho tinha como objetivo descrever o fenótipo de um animal duplo deficiente *Mif^{-/-}Il10^{-/-}*. Contudo, ao longo do cruzamento, observamos que a convivência com os camundongos *Mif^{-/-}* é letal aos camundongos *Il10^{-/-}*. Essa serendipidade nos levou a elaborar uma nova hipótese e uma nova linha de investigação. A partir dos resultados obtidos, observamos que de fato, camundongos *Il10^{-/-}* morrem especificamente ao conviver com camundongos *Mif^{-/-}*, mas não com camundongos selvagens. Outros convívios letais já foram descritos na literatura, como de camundongos *T-bet^{-/-} RAG2^{-/-}* (TRUC) que desenvolvem uma colite grave e altamente penetrante comparado a camundongos *T-bet^{-/-}* e *RAG2^{-/-}* (Garrett *et al*, 2007). A colite desenvolvida pelos animais TRUC é caracterizada pela ruptura precoce da barreira epitelial do cólon com características microscópicas fenotípicas muito semelhantes ao observado na colite ulcerativa em humanos, sendo transmissível para outros animais de forma vertical e horizontal (Garrett *et al*, 2007). Existem outros trabalhos que abordam ou convívios letais, ou transferência de susceptibilidade à doença pela microbiota (Elinav *et al*, 2011) (Gao *et al*, 2018), mas em todos que sabemos, a transmissão ocorre a partir de um animal doente/suscetível. Aqui, o camundongo *Mif^{-/-}* é saudável, se desenvolve naturalmente e não tem sinais de doença, mas desencadeia doença nos camundongos *Il10^{-/-}* a partir do convívio. Atribuímos isso ao fenômeno de tolerância à doença, sendo então o animal *Mif^{-/-}* altamente tolerante à doença na mucosa intestinal.

Existem duas estratégias de defesa pelas quais o hospedeiro consegue lidar com agentes infecciosos. Resistência diz respeito à capacidade do hospedeiro de aumentar seu *fitness* através do controle da carga dos microrganismos. A capacidade do hospedeiro em eliminar patógenos é em grande parte - mas não exclusivamente - exercida pelas células do sistema imunológico, como a fagocitose feita por macrófagos e neutrófilos, a citotoxicidade celular empregadas por células NK e T CD8+, e a produção de mediadores solúveis como anticorpos e proteínas do sistema complemento. Contudo, existe uma segunda estratégia que consiste na capacidade do hospedeiro em se manter saudável mesmo com a presença do patógeno, sem eliminá-lo, o que é chamado de Tolerância à Doença. Isso inclui a capacidade do hospedeiro em limitar o dano diretamente produzido pelo patógeno, além do dano gerado pela resposta inflamatória associada a ele, e assim conseguir manter as funções celulares e teciduais preservadas a despeito da infecção. Dentre os mecanismos de tolerância à doença, destacam-se vias de resposta a diferentes estresses celulares, como estresse oxidativo, metabólico, hipóxico, osmótico, xenobiótico, de retículo e de dano ao DNA. A ativação e expressão de fatores de transcrição

centrais dessas vias, como NRF2 e HIF estão associados com maior tolerância à doença e sobrevivência frente a diversos modelos experimentais de infecção (Martins *et al*, 2019). Assim como os dados prévios do nosso laboratório que demonstraram que camundongos deficientes em MIF sobrevivem à infecção com *T. gondii* (Cavalcanti *et al*, 2011), e que camundongos selvagens tratados com anti-MIF sobrevivem à infecção pelo *C. difficile* (José *et al*, 2018) pelo aumento da tolerância à doença, nossos dados apontam que a tolerância à doença associada a deficiência em MIF pode permitir uma colonização por uma microbiota distinta e enriquecida de patobiontes e patógenos.

Baseado nos dados, é natural supor que a composição microbiana dos camundongos *Mif*^{-/-} seja distinta daquela encontrada nos camundongos WT. De fato, os hospedeiros fazem uma seleção ativa dos microrganismos com os quais relações intrincadas de cooperação foram estabelecidas ao longo do processo evolutivo. Animais com genótipos distintos podem selecionar uma microbiota distinta ainda que eles vivam nas mesmas condições ambientais, no mesmo biotério, se alimentando da mesma dieta. Por exemplo, duas espécies do mesmo gênero de cnidário *Hydra* (*Hydra oligactis*, *Hydra vulgaris*) isoladas de um mesmo lago e mantidas em laboratório por mais de 30 anos apresentavam microbiotas muito distintas entre si (como ocorre na natureza), e muito similares às de pólipos das espécies isoladas diretamente do meio ambiente (Fraune e Bosch, 2007). Ou seja, apesar de ambas as espécies de hidras viverem por décadas nas mesmas condições ambientais laboratoriais, os microrganismos selecionados por cada uma eram diferentes.

Em camundongos, um exemplo seria dos camundongos deficientes em IL-1 α que desenvolvem colite moderada induzida por DSS, comparado aos camundongos WT cuja colite desenvolvida é muito grave (Nunberg *et al*, 2018). Porém, quando mantidos em *co-housing* com camundongos WT, sua microbiota muda se assemelhando à microbiota dos camundongos WT, causando uma piora significativa no quadro de colite. A análise da microbiota intestinal foi feita em ambos os camundongos WT e *Il1 α* ^{-/-} em homeostase, durante a fase aguda da colite induzida por DSS, e após a recuperação, usando sequenciamento de rRNA 16S de nova geração. Através dessa análise, foi constatado que os camundongos *Il1 α* ^{-/-} em homeostase apresentaram diferenças significativas em composição microbiana em todos os parâmetros analisados. Após 30 dias de *co-housing*, houve um “*shift*” na composição microbiana dos camundongos *Il1 α* ^{-/-} que passaram a apresentar uma microbiota mais parecida com o controle WT do que o controle do próprio *Il1 α* ^{-/-} (Nunberg *et al*, 2018). Esse resultado nos confirma que animais de genótipos diferentes vivendo sob as mesmas condições ambientais laboratoriais e se alimentando da

mesma dieta podem sim albergar microbiomas distintos, e que o convívio e a transferência de microbiota podem modular a susceptibilidade à indução de colite.

Com base em nossos achados, consideramos duas hipóteses em relação aos mecanismos pelos quais o MIF – ou a ausência dele – interferem com a composição microbiana. Primeiro, a sinalização por MIF em diferentes tipos celulares pode impactar na geração de peptídeos antimicrobianos, mucinas, anticorpos (IgA e IgM essencialmente) e na fucosilação de epitélio - mecanismos importantes empregados pelo hospedeiro para seleção da microbiota. Durante a homeostase, MIF é altamente sintetizado pelas células epiteliais do esôfago, estômago, intestino delgado e cólon (Maaser *et al*, 2002). Experimentos de microscopia confocal já demonstraram maior concentração de MIF na porção apical das células epiteliais (Maaser *et al*, 2002). Além disso, em experimentos *in vitro* usando um sistema de *transwell*, quando a célula epitelial é estimulada por determinadas citocinas, MIF é secretado preferencialmente para a câmara superior, diferentemente de outras citocinas como IL-8 e IP-10, que são secretados para a câmara inferior (Maaser *et al*, 2002). Esses dados sugerem que a síntese de MIF no intestino parece ser enviesada em direção ao lúmen e, por isso, consideramos também a possibilidade de um efeito direto da proteína MIF nos microrganismos.

Nós observamos que os camundongos *Il10*^{-/-} em convívio com os camundongos *Mif*^{-/-} desenvolvem colite e morrem precocemente. Contudo, é possível que essa morte seja em virtude de outros aspectos não avaliados até então, como inflamação no intestino delgado ou em outros órgãos, além de translocação de microrganismos do intestino - que poderiam culminar com sepse. Por isso, consideramos também fazer análise histopatológica no intestino delgado, coletar e macerar fígado e baço, e tentar fazer cultivo de microrganismos em anaerobiose e em meios ricos. Alternativamente, poderíamos fazer a extração de DNA de diferentes compartimentos e fazer uma identificação da presença de bactérias por PCR usando primers para o gene do rRNA 16S bacteriano.

Ao longo do experimento de *co-housing*, os camundongos *Il10*^{-/-} expostos aos camundongos WT perdem peso, mas não morrem e acabam por recuperar o peso perdido. Isso é indicativo de que a microbiota normal presente nos camundongos WT é pouco patogênica para os camundongos *Il10*^{-/-}, e ao longo do tempo o camundongo suscetível, através de vários mecanismos, consegue tolerar ou resistir aos microrganismos oriundos do camundongo WT. É possível que os camundongos WT sejam carreadores de alguns patobiontes, seja de maneira transitória, seja de maneira perene, mas esses microrganismos devem compor um grupo menos patogênico de espécies ou devem estar em uma carga mais baixa. Uma vez que a microbiota do

Mif^{-/-} e WT são distintas em relação a patogenicidade, seria interessante investigar em detalhes a composição através de um sequenciamento do microbioma fecal dos três genótipos, e assim tentar identificar grupos taxonômicos mais ou menos abundantes no *Mif*^{-/-}.

No experimento de transferência de fezes, os camundongos *Il10*^{-/-} que receberam fezes de *Mif*^{-/-} vieram a óbito. Já os que receberam fezes de *Mif*^{-/-} filtradas não morriam. A filtragem com o filtro celular de 0.22 µm elimina os microrganismos das fezes, mas não as toxinas e metabólitos produzidos por eles. Portanto, a não ocorrência da doença em animais que receberam fezes filtradas nos indica que seriam os microrganismos, e não as toxinas, os responsáveis pela geração da doença. Uma possível forma de confirmar essa suposição seria realizar um experimento de transferência fecal usando uma suspensão de fezes inativadas com calor oriundas de animais *Mif*^{-/-}. Considerando que o calor desnatura componentes do microrganismo, testaremos se a suspensão inativada por calor ainda será capaz de gerar doença. Saberemos então se o microrganismo vivo é necessário para a geração da doença.

Além disso, a fim de impedir o desenvolvimento de doença nos animais *Il10*^{-/-} durante o *co-housing*, consideramos a possibilidade de tratar os camundongos *Mif*^{-/-} com um coquetel de antibióticos de amplo espectro para eliminar a maior parte das bactérias, e, conseqüentemente, os possíveis patógenos e patobiontes. Pretendemos utilizar em experimentos futuros uma combinação previamente demonstrada como depletora de comunidades microbianas, uma associação de vancomicina, metronidazol, neomicina e ampicilina (Rakoff-Nahoum *et al*, 2004).

Por fim, consideramos a possibilidade de aumentar a tolerância à doença do animal *Il10*^{-/-} usando anticorpos anti-MIF, ou gerando camundongos geneticamente deficientes em MIF e IL-10. No modelo experimental de colite mediado pela transferência adotiva de células T CD4⁺ CD45RB High para o animal *Rag2*^{-/-}, animais *Rag2*^{-/-}*Mif*^{-/-} ou *Rag2*^{-/-} tratados com anticorpo anti-MIF ficam protegidos da indução de colite (De Jong *et al*, 2001). Com isso, seria interessante testar se no modelo experimental de colite baseado na deficiência em IL-10, se a ausência de MIF ou o bloqueio da sinalização de MIF também teriam efeito protetor.

11. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que camundongos *Mif*^{-/-} apresentam uma microbiota enriquecida de patógenos e/ou patobiontes, sendo capazes de elicitar doença letal em camundongos pouco tolerantes como *I110*^{-/-}.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Artis D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews Immunology*, 8, 411–420.
2. Ashwin, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Gastroenterology & hepatology* 12, 205-217.
3. Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7849–7854.
4. Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 228–233.
5. Baydi, Z., Limami, Y. (2021). An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *The Scientific World Journal*, 2021, 7479540.
6. Belkaid, Y., Naik, S. (2013). Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nature immunology*, 14, 646–653.
7. Belkaid, Y., Hand, W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, 157, 121–141.
8. Belkaid, Y., Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 46, 562–576.
9. Bertolini, T. B., Biswas, M., Terhorst, C., Daniell, H., Herzog, R. W., Piñeros, A. R. (2021). Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance. *Cellular immunology*, 359, 104251.
10. Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., David, J. R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*, 189, 341–346.
11. Bucala R. (1996). MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production. *Cytokine & growth factor reviews*, 7, 19–24.
12. Burgueño, J. F., Abreu, M. T. (2020). Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature reviews, Gastroenterology & Hepatology*, 17, 263–278.
13. Cader, M. Z., Kaser, A. (2013). Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*, 62, 1653–1664.
14. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R., Bucala, R. (1994). The Macrophage Is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of Experimental Medicine*, Rockefeller University Press, 179, 1895–1902.
15. Caruso, R., Lo, B. C., Núñez, G. (2020). Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology*, 20, 411–426.
16. Cavalcanti, M. G., Mesquita, J. S., Madi, K., Feijó, D. F., Assunção-Miranda, I., Souza, H. S., Bozza, M. T. (2011). MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. *PloS one*, 6, E25259.
17. Coombes, J. L., & Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews, Immunology*, 8, 435–446.
18. Danese, S., Vuitton, L., Peyrin-Biroulet, L. (2015). Biologic agents for IBD: practical insights. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12, 537–545.

19. David J. R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56, 72–77.
20. De Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K., Terhorst, C. (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nature immunology*, 2, 1061–1066.
21. De Sordi, L., Lourenço, M., Debarbieux, L. (2019). The Battle Within: Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract. *Cell Host Microbe* 25, 210-218,
22. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449, 811–818.
23. Dollé, L., Tran, H. Q., Etienne-Mesmin, L., Chassaing, B. (2016). Policing of gut microbiota by the adaptive immune system. *BMC Medicine*, 14, 27.
24. Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Peaper, D. R., Bertin, J., Eisenbarth, S. C., Gordon, J. I., Flavell, R. A. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145, 745–757.
25. Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature reviews Microbiology*, 19, 55–71.
26. Flynn, S., Eisenstein, S. (2019). Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *The Surgical clinics of North America*, 99, 1051–1062.
27. Fraune, S., Bosch, T. C. (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 13146–1315.
28. Gao, X., Cao, Q., Cheng, Y., Zhao, D., Wang, Z., Yang, H., Wu, Q., You, L., Wang, Y., Lin, Y., Li, X., Wang, Y., Bian, J. S., Sun, D., Kong, L., Birnbaumer, L., Yang, Y. (2018). Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E2960–E2969.
29. Garrett, W. S., Lord, G. M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S. K., Ito, S., Glickman, J. N., & Glimcher, L. H. (2007). Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*, 131, 33–45.
30. Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 1355–1359.
31. Hahm, K. B., Im, Y. H., Parks, T. W., Park, S. H., Markowitz, S. (2001). Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut*, 49, 190–198.
32. Hooper, L. V., Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews Immunology*, 10, 159–169.
33. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485–498.
34. Jose, S., Mukherjee, A., Abhyankar, M. M., Leng, L., Bucala, R., Sharma, D., Madan, R. (2018). Neutralization of macrophage migration inhibitory factor improves host survival after *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 53, 56–63.

35. Kaplan, G., G. (2015). The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterology & Hepatology*, 12, 720–727.
36. Kim, J., Shajib, M. S., Manocha, M. M., Khan, W. I. (2012). Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualized experiments*, 60, 3678.
37. Kirsner, J. B., Elchlepp J. (1957). The production of an experimental ulcerative colitis in rabbits. *Transactions of the Association of American Physicians*, 70, 102–119.
38. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 263–274.
39. Kullberg, M. C., Ward, J. M., Gorelick, P. L. (1998). *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infection and immunity*, 66, 5157–5166.
40. Lee, S. H., Starkey, P. M., Gordon, S. (1985). Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. The Journal of Experimental Medicine*, 161, 475–489
41. Liu, L. M., MacPherson, G. G. (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 177, 1299–1307.
42. Lynch, S. V., Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *The New England Journal of medicine*, 375, 2369–2379.
43. Maaser, C., Eckmann, L., Paesold, G., Kim, H. S. & Kagnoff, M. F. (2002). Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 122, 667–680.
44. Mabbott, N., Donaldson, D., Ohno, H. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*, 6, 666–677.
45. Macpherson, A. J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 288, 2222–2226.
46. Macpherson, A. J., Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 1662–1665.
47. Maloy KJ, Powrie F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 298–306.
48. Man, A. L., Lodi, F., Bertelli, E., Regoli, M., Pin, C., Mulholland, F., Satoskar, A. R., Taussig, M. J., Nicoletti, C. (2008). Macrophage migration inhibitory factor plays a role in the regulation of microfold (M) cell-mediated transport in the gut. *Journal of Immunology*, 181, 5673–5680.
49. Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S.T. (2016). Healthy human gut phageome. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 113, 10400–10405.
50. Martins, R., Carlos, A. R., Braza, F., Thompson, J. A., Bastos-Amador, P., Ramos, S., Soares, M. P. (2019). Disease Tolerance as an Inherent Component of Immunity. *Annual review of immunology*, 37, 405–437.
51. Meyer-Hoffert, U., Hornef, M. W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L. G., Midtvedt, T., Pütsep, K., Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut*, 57, 764–771.
52. Miller, H., Zhang, J., KuoLee, R., Patel, GB., Chen, W. (2007). Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World J Gastroenterology*, 13, 1477-1486.

53. Miller, T. L., Lee, D., Giefer, M., Wahbeh, G., Suskind, D. L. (2017). Nutritional Therapy in Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease: A Case Report. *Digestive diseases and sciences*, 62, 2196–2200.
54. Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 345–350.
55. Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142, 46–e30.
56. Mörbe, U. M., Jørgensen, P., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., Agace, W. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal immunology*, 14, 793–802.
57. Neurath M. F. (2017). Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14, 269–278.
58. Nunberg, M., Werbner, N., Neuman, H., Bersudsky, M., Braiman, A., Ben-Shoshan, M., Ben Izhak, M., Louzoun, Y., Apte, R. N., Voronov, E., Koren, O. (2018). Interleukin 1 α -Deficient Mice Have an Altered Gut Microbiota Leading to Protection from Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *mSystems*, 3, e00213-17.
59. Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Hige, S., Kato, M., Sugiyama, T., Iwanaga, T., Nakamura, H. (2002). Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology*, 123, 256–270.
60. Ohkawara, T., Mitsuyama, K., Takeda, H., Asaka, M., Fujiyama, Y. (2008). Lack of macrophage migration inhibitory factor suppresses innate immune response in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43, 1497–1504.
61. Ordas, I. Eckmann, L. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet*, 380, 1606-19.
62. Lucas López, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A., Pérez Pulido, R. (2017). The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125, 3–10.
63. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229–241.
64. Sairenji, T., Collins, K. L., Evans, D. V. (2017). An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Primary care*, 44, 673–692.
65. Sartor, R. B. (1997). Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *The American Journal of Gastroenterology*, 92, 5S–11S.
66. Sawczenk A, Sandhu BK. (2003). Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*, 88, 995–1000.
67. Sellon, R., Tonkonogy, S., Schultz, M., Grenther, W. (1998). Resident Enteric Bacteria Are Necessary for Development of Spontaneous Colitis and Immune System Activation in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infection and Immunity*, 5224-5231.
68. Sheehan, D., F, Shanahan. (2016). The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin N Am*, 46, 143-154.
69. Souza, H. S., Fiocchi, C. (2016). Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13, 13–27.

70. Stagg A. J. (2018). Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9, 2883.
71. Vegh, Z., Kurti Z. (2017). Epidemiology of inflammatory bowel diseases from west to east. *Journal of digestive diseases*, 18, 92–98.
72. Wang, Z., Guo, K., Liu, Y., Huang, C., Wu, M. (2022). Dynamic impact of virome on colitis and colorectal cancer: Immunity, inflammation, prevention and treatment. *Seminars in cancer biology*, 86, 943–954.
73. Yu, YR., Rodriguez, JR. (2017). Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, Extraintestinal Manifestations, and Disease Phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery* 26, 349-355.
74. Zhang, H., Xu, B., Wang, H., Wang, G., Jiang, M. (2018). IL-17 is a protection effector against the adherent-invasive *Escherichia coli* in murine colitis. *Mol Immunol* 93, 199-172.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 07 de outubro de 2022.

Prezado Prof. Marcelo Torres Bozza,

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **"Papel do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na tolerância ao dano intestinal", protocolo nº 040/22**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) 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 de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **21/09/2022**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 31/12/2025
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> C57Bl/6 C57Bl/6 Mif ^{-/-} C57Bl/6 Il10 ^{-/-}
Nº de animais	477 animais C57Bl/6 → 45 machos e 40 fêmeas C57Bl/6 Mif ^{+/+} → 53 machos e 62 fêmeas C57Bl/6 Il10 ^{+/+} → 145 machos 117 fêmeas C57Bl/6 Mif ^{+/+} Il10 ^{+/+} → 8 machos e 7 fêmeas
Peso/idade	15-25g / 6 a 16 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério do Laboratório de Inflamação e Imunidade – IMPG/UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS