



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DOUTORADO – 2015

Aluno: **Patrícia Reis de Souza**

Orientador: Profa. Dra: Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Defesa: 06/08/2015

Título: Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente

Title: Participation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in experimentally induced inflammatory bowel disease

Resumo: As doenças inflamatórias intestinais (DII) são causadas por desequilíbrio entre as respostas imunes efectoras e reguladoras na mucosa intestinal e podem ser moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) por meio de interações neuroimunoendócrinas e secreção de cortisol. Embora os glicocorticóides (GC) sejam utilizados para tratar a DII, o cortisol produzido pelas glândulas supra-renais também está envolvido na resposta ao estresse, que pode levar a doenças inflamatórias descontroladas. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a participação do eixo HPA na modulação da resposta imune de mucosa intestinal. Para tal, camundongos C57BL/6 foram submetidos à remoção das glândulas adrenais seguida por indução de colite pela administração de água contendo 3% de dextran sulfato de sódio (DSS). Os resultados demonstraram que a ausência das adrenais levou à maior suscetibilidade à doença e mortalidade precoce, fenômeno que não foi prevenido pela reposição de GC. Os animais adrenalectomizados com colite apresentaram níveis significativamente menores de LPS, concomitantemente ao aumento de IL-6 no soro quando comparados aos camundongos não adrenalectomizados. Além disso, os animais adrenalectomizados apresentaram menor celularidade na lâmina própria (LP), menos áreas de erosão e menor escore histopatológico associado ao aumento de IFN- γ e FasL, no intestino, sem produção local compensatória de corticosterona. Houve aumento na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e eosinófilo-peroxidase (EPO) no intestino dos animais expostos ao DSS quando comparados ao grupo de camundongos controles saudáveis, independentemente da presença do eixo HPA intacto e o tratamento com GC nos animais adrenalectomizados levou à redução significativa da atividade de MPO. Também foi observado na LP dos camundongos adrenalectomizados aumento significativo na frequência de células dendríticas tolerogênicas CD11b+CD11c+CD103+, T auxiliares (CD3+CD4+), T citolíticas (CD3+CD8+) e NKT (CD3+CD49b+), além de redução significativa da população de células dendríticas pró-inflamatórias CD11b+CD11c+CD103-, leucócitos CD11b+ e linfócitos intra-epiteliais, de maneira dependente de GC. A ausência do eixo HPA intacto levou à diminuição de leucócitos totais no baço quando comparados ao grupo com colite, relacionada principalmente à redução significativa na frequência de células NKT (CD3+CD49b+), as quais foram restauradas nos camundongos tratados com GC exógenos. Durante a exposição ao DSS houve aumento de células Th2 e Th1 no baço dos camundongos não adrenalectomizados, enquanto que a remoção das adrenais levou a notável redução na população de células T CD4 produtoras de IL-4, IL-10, IFN- γ ou IL-17, com aumento de células Th17 e diminuição significativa de células Th1 no baço dos camundongos adrenalectomizados e tratados com GC. De forma interessante, houve menor acúmulo de células T reguladoras juntamente à redução na intensidade média de fluorescência (MFI) de FOXP3 em células T CD4+CD25+ do baço dos camundongos adrenalectomizados expostos ao DSS, de maneira geral dependente de GC. Por fim, esta diminuição de mecanismos reguladores foi acompanhada de menor índice de proliferação e aumento de IL-10 no

sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos com o eixo HPA não funcional, indicando que a ausência de GC endógenos pode alterar significativamente a homeostase do sistema imunológico. Juntos, nossos resultados demonstram que o eixo HPA é importante na modulação da resposta imunológica durante a colite induzida experimentalmente.

Abstract: Inflammatory bowel diseases (IBD) are caused by imbalance between regulatory and effector immune responses in the intestinal mucosa and can be modulated by the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis via neuroimmune endocrine interactions and secretion of cortisol. Although glucocorticoids (GC) are used to treat IBD, cortisol produced by the adrenals glands is also involved in the stress response, which can lead to uncontrolled inflammatory diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the HPA axis in the modulation of the immune response of intestinal mucosa. C57BL/6 mice were subjected to removal of the adrenal glands followed by induction of colitis by administration of water containing 3% dextran sulfate sodium (DSS). The results showed that the absence of adrenals led to increased susceptibility to disease and early mortality, a phenomenon that was not prevented by GC replacement. Adrenalectomized animals exposed to DSS had significantly lower levels of LPS, concomitantly to increased IL-6 in the serum when compared to non-adrenalectomized mice. In addition, adrenalectomized animals had lower cellularity in the lamina propria (LP), less erosion areas and less histopathologic score associated with increased IFN- γ and FasL in the intestine, without compensatory local production of corticosterone. There was an increase in the activity of the myeloperoxidase (MPO) enzyme, N-acetylglucosaminidase (NAG) and eosinophil-peroxidase (EPO) in the intestines of DSS-exposed animals when compared to the healthy control group of mice, regardless of the presence of intact HPA axis, while treatment with GC led to significantly reduced MPO activity. It was also observed in the LP of adrenalectomized mice significant increase in the frequency of tolerogenic dendritic cells CD11b+CD11c+CD103+, helper T (CD3+ CD4+), cytolytic T (CD3+ CD8+) and NKT (CD3+ CD49b+) besides significant reduction in the population of pro-inflammatory dendritic cells CD11c+ CD11b+ CD103-, leukocyte CD11b+ and intraepithelial lymphocytes, GC-dependent manner. The absence HPA intact carried decrease in total leukocytes in spleen when compared to the group with colitis, related mainly to significant reduction in the frequency of NKT cells (CD3+CD49b+), which were restored in the GC treated mice. During exposure to DSS there was increased Th2 and Th1 cells in the spleen of non-adrenalectomized mice, while the removal of the adrenals was associated to a marked reduction in the population of CD4 T cells producing IL-4, IL-10, IFN- γ or IL-17 with increased Th17 cells and significant decrease in Th1 cells in the spleen of adrenalectomized mice treated with GC. Interestingly there was less accumulation of regulatory T cells together to a reduction in mean fluorescence intensity (MFI) of FOXP3 in CD4+CD25+ T cells in the spleen of mice exposed to DSS after adrenalectomy, most dependent on GC. Finally, the decline of regulatory mechanisms was accompanied by lower rates of proliferation and increased IL-10 in the supernatant culture of splenocytes of mice with disrupted HPA axis, indicating that the absence of endogenous GC altered significantly the homeostasis of the immune system. Together, our results demonstrate that the HPA axis is important in modulating the immune response during experimentally induced colitis.

Comissão: Cristina Ribeiro de Barros Cardoso
Profs. Drs. Jose Clovis do Prado Junior
Marcelo Dias Baruffi
Rafael Simone Saia
José Carlos Farias Alves Filho