



CILENE BICCA DIAS

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE NA MUCOSA INTESTINAL E
TECIDO ADIPOSE MESENTERIAL DE PACIENTES COM
DOENÇA DE CROHN**

***APOPTOSIS EVALUATION IN INTESTINAL MUCOSA AND
MESENTERIC ADIPOSE TISSUE OF CROHN'S DISEASE
PATIENTS***

**Campinas
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CILENE BICCA DIAS

**AVALIAÇÃO DA APOPTOSE NA MUCOSA INTESTINAL E TECIDO
ADIPOSO MESENTERIAL DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN**

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Franco Leal

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Rodrigues de Meirelles

***APOPTOSIS EVALUATION IN INTESTINAL MUCOSA AND
MESENTERIC ADIPOSE TISSUE OF CROHN'S DISEASE PATIENTS***

*Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Ciências.*

Doctoral Thesis submitted to the Faculty of Medical Sciences, State
University of Campinas - UNICAMP to obtain the title of Doctor of Science.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA CILENE BICCA DIAS E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL.



Assinatura da Orientadora

Campinas
2014

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos- CRB 8/8402

D543a	Dias, Cilene Bicca, 1982- Avaliação da apoptose na mucosa intestinal e tecido adiposo mesenterial de pacientes com doença de Crohn / Cilene Bicca Dias. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014. Orientador : Raquel Franco Leal. Coorientador : Luciana Rodrigues de Meirelles. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Doença de Crohn. 2. Apoptose. I. Leal, Raquel Franco. II. Meirelles, Luciana Rodrigues de, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Apoptosis evaluation in mucosa intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn disease patients

Palavras-chave em inglês:

Crohn disease

Apoptosis

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Raquel Franco Leal [Orientador]

Fabio Guilherme Caserta Maryssael de Campos

Omar Feres

Ciro Garcia Montes

Fábio Rogério

Data de defesa: 08-10-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CILENE BICCA DIAS

Orientadora PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL

Raquel Franco Leal

2. PROF. DR. FÁBIO GUILHERME CASERTA MARYSSAEL DE CAMPOS

Fábio Caserta Maryssael de Campos

3. PROF. DR. OMAR FERES

Omar Feres

4. PROF.DR. CIRO GARCIA MONTES

Ciro Garcia Montes

5. PROF.DR. FÁBIO ROGÉRIO

Fábio Rogério

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 08 de outubro de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, esposo e pais, por todo apoio, respeito, paciência, dedicação, incentivo aos estudos, e amor incondicional.

À Deus pela oportunidade e por colocar as pessoas certas na hora certa em meu caminho.

Aos meus filhos, amor maior de minha vida, a quem peço desculpas pelas horas de convívio familiar subtraídos durante minha formação acadêmica.

Ao meu esposo, meu grande amor, pela compreensão, respeito, incentivo aos estudos, pelos esforços incessantes ao longo dos anos e amor incondicional.

Aos meus amados pais: vocês cantaram para eu dormir, me apoiaram quando eu caí, me abraçaram por estar feliz. Vocês repetiram tudo isso cuidando com amor e ternura do maior tesouro que tenho (meus filhos), tornando a conquista deste sonho possível, a vocês muito mais do que um muito obrigada.

Aos meus irmãos Anderson e Patricia, pela amizade, compreensão. Amo vocês.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Raquel Franco Leal que me acolheu, e abrilhantou meu caminho a luz dos seus vastos conhecimentos. A você grande mestre, minha eterna gratidão e amizade.

À Profa. Dra. Luciana Meirelles, minha co-orientadora, obrigada pela acolhida, apoio a pesquisa, amizade, e as inúmeras horas dedicadas aos estudos e análise das imagens.

Às Profas. Marciane Milanski e Rozângela Bezerra que contribuíram para minha formação profissional me apoiando, orientando. Obrigada além de tudo pela amizade.

À doutoranda Mariana Portovedo e à pós doutoranda Andressa Coope, que me auxiliaram incansavelmente nas análises laboratoriais e estatísticas. Além da amizade conquistada.

Ao Prof. Dr. Lício Velloso pelo imenso prazer em conhecê-lo, por permitir que eu participasse do seu grupo de estudo, e por desenvolver minha pesquisa no Laboratório de Sinalização Celular.

Ao Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (GASTROCENTRO- UNICAMP), por ter a oportunidade de acompanhar seus ensinamentos.

À Claudia, Luzia e Adilson, muito obrigada por toda ajuda e paciência.

Ao Fábio e Icléia, pela ajuda e trocas de experiências.

À Dra. Juliana Contin pela assistência no ensaio TUNEL.

À Núria Planell pelo auxílio com a análise estatística. **Aos alunos do Laboratório de Sinalização Celular**, pela amizade, estímulo e aprendizado.

Aos pacientes do Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais “Dr Juvenal Ricardo Navarro Góes” que participaram do estudo, pela inestimável colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Azucena Salas e ao Dr. Julián Panés pela revisão de nosso manuscrito.

À Dra. Nicola Conran pela revisão do Inglês.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado.

*"A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Considerações Gerais	1
1.2 - Dados da Literatura	3
1.2.1 - Vias de Apoptose.....	3
1.2.2 - Apoptose e doença inflamatória intestinal.....	9
1.2.3 - Tecido adiposo mesenterial na doença de Crohn	10
2-OBJETIVOS.....	12
2.1 - Objetivo geral	12
2.2 - Objetivos específicos.....	12
3-CASUÍSTICA E MÉTODO	13
3.1 – Casuística	13
3.1.1 - Fatores de Exclusão	14
3.1.2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	14
3.2 - Método.....	14
3.2.1 - Ensaio de TUNEL para detecção de apoptose.....	16
3.2.2 - Análise histológica e morfométrica (Hematoxilina e Eosina).....	16
3.2.3 - Imunoistoquímica para Bax, Bcl-2 e Ki67	17
3.2.4 - Imunofluorescência para Caspase 3	19
3.2.5 - Análise transcripcional por RT-PCR.....	19
3.2.6 - Extração de proteínas e Immunoblot	21
3.2.7 - Análise estatística	23
4-RESULTADOS	25
4.1 - TUNEL e Análise morfométrica	25
4.2 - Análise transcripcional de genes relacionados à apoptose	29
4.3 - Imunoistoquímica para Bax e Bcl-2	31
4.4 – Immunoblot para Bax e Bcl-2	34
4.5 – Imunofluorescência para Caspase 3.....	36
5-DISSCUSSÃO.....	38
6-CONCLUSÕES	43
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8-ANEXOS	55
8.1 - Questionário específico	55
8.2 - Índice de Atividade da doença de Crohn.....	56
8.3 - Aprovação pelo Comitê de Ética	57
8.4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (doentes com doença de Crohn)....	58
8.5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle 1).....	59
8.6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle 2).....	60
8.7 - Artigo aceito para publicação na revista PLoS One (próximas páginas).....	61

Figura 1: Vias de apoptose e sobrevivência celular.....	4
Figura 2: Mecanismos de apoptose: via extrínseca e intrínseca.	4
Figura 3: Aspecto cirúrgico do TAM espessado em paciente com DC.....	15
Figura 4: Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%.....	18
Figura 5: Aplicação do anticorpo primário.....	18
Figura 6: Incubação das lâminas durante a noite com anticorpo primário.....	18
Figura 7: Amostras de tecido sendo homogeneizadas com Polytron.....	21
Figura 8: Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.....	22
Figura 9: Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 6.1”, por meio de densitometria óptica.	23
Figura 10: Ensaio de TUNEL mostra diferenças de apoptose na mucosa intestinal (DCI) e no TAM (DCA) de pacientes com DC, em comparação com as respectivas amostras de controles (CI e CA).....	26
Figura 11: Coloração para hematoxilina-eosina (H&E) e parâmetros morfométricos..	27
Figura 12: Imunohistoquímica para Ki67 no TAM.....	28
Figura 13: Níveis transcricionais de Bax e Bcl2, determinados por <i>RT-PCR</i>	30
Figura 14: Imunohistoquímica para Bax no tecido intestinal (epitélio e lâmina própria) e no TAM na DC, em comparação com as respectivas amostras controles.....	31
Figura 15: Imunohistoquímica para Bcl-2 no tecido intestinal (epitélio e lâmina própria) do grupo DCI e do grupo DCA, em comparação com os respectivos controles.....	33

Figura 16: Análise por Imunoblot e determinação de Bax e Bcl-2 no tecido intestinal (mucosa) do grupo DCI e no TAM do grupo DCA, em comparação com os respectivos controles	35
--	----

Figura 17: Imunofluorescência para Caspase3 no TAM do grupo DCA em comparação com o grupo controle (CA).....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementar
DAB: Diaminobenzidina
DAPI: 4'6- *diamidino-2 phenilindol*
DC: Doença de Crohn
DNase: desoxiribonuclease
EROS: Espécies reativas de oxigênio
FITC: do inglês; *Fluorescein isothiocynate*
GAPDH: do inglês; *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
IADC: índice de atividade da doença de Crohn
IP: Iodeto de propídio
IMC: índice de massa corporal
NF-K β : Factor nuclear kappa B
PCR: Proteína C reativa
RCU: Retocolite ulcerativa
RNA: Acido ribonucleico
RNase: Ribonuclease
RT-PCR: Transcrição reversa de reação em cadeia de polimerase.
r: coeficiente de regressão de Pearson
SD-PAGE: separação por eletroforese
TAM: tecido adiposo mesenterial
TNF α : fator de necrose tumoral
TUNEL: do inglês; *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labelling*
UV: Ultra violeta

RESUMO

A doença de Crohn (DC) está associada com as vias patogênicas complexas envolvendo alterações nos mecanismos de apoptose. Recentemente, o tecido adiposo mesenterial (TAM) tem sido associado com a etiopatogenia DC, uma vez que é verificado aumento da espessura do tecido adiposo mesenterial, que envolve quase toda a circunferência da alça intestinal afetada. Entretanto, não há estudos do mecanismo de apoptose no TAM na DC. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar apoptose na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC, além de correlacionar estes achados com o estudo morfométrico dos adipócitos neste tecido. Casuística e Métodos: Foram estudadas amostras de mucosa intestinal e TAM de 10 pacientes com DC ileocecal e de 16 pacientes sem doenças inflamatórias intestinais (controles). A apoptose foi avaliada pelo ensaio de TUNEL e correlacionada com a análise histológica e morfométrica dos adipócitos. Determinou-se a análise transcripcional e protéica de uma seleção de genes e proteínas relacionadas com o mecanismo de apoptose. Resultados: O ensaio de TUNEL mostrou menor número de células em apoptose na DC, quando comparado com os grupos controles, tanto na mucosa intestinal quanto no TAM. Além disso, o número de adipócitos em apoptose (TUNEL) correlacionou significativamente com a área e perímetro destas células. A análise transcripcional e protéica revelaram níveis de transcritos e de proteína Bax significativamente mais baixos na mucosa intestinal de DC, em comparação com os respectivos controles; sendo que os baixos níveis de Bax foram encontrados na lâmina própria e não no epitélio intestinal; não houve diferença na expressão de Bax no TAM. Além disso, maior nível de Bcl-2 e baixo nível de Caspase 3 foram vistos no TAM de pacientes com DC. Conclusão: A alteração da apoptose no TAM pode explicar as características morfológicas singulares deste tecido na DC, que podem estar implicadas na fisiopatologia da doença.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is associated with complex pathogenic pathways involving defects in apoptosis mechanisms. Recently, mesenteric adipose tissue (MAT) has been associated with CD ethiopathology, since there is adipose thickening, which can wrap the affected intestinal area. However, there are no studies concern apoptosis pathways in MAT of CD. Therefore, the aim of this study was to evaluate apoptosis in the intestinal mucosa and MAT of patients with CD, besides to correlate these findings with the morphometric study of the adipocytes from MAT. Patients and Methods: Samples of intestinal mucosa and MAT from 10 patients with ileocecal CD and from 16 non-inflammatory bowel diseases patients (controls) were studied. Apoptosis was assessed by TUNEL assay and correlated with the adipocytes histological morphometric analysis. The transcriptional and protein analysis of selected genes and proteins related to apoptosis were determined. Results: TUNEL assay showed fewer apoptotic cells in CD, when compared to the control groups, both in the intestinal mucosa and in MAT. In addition, the number of apoptotic cells (TUNEL) correlated significantly with the area and perimeter of the adipose cells in MAT. Transcriptomic and proteomic analysis revealed a significantly lower transcript and protein levels of Bax in the intestinal mucosa of CD, compared to the controls; low protein levels of Bax were found localized in the lamina propria and not in the epithelium of this tissue; there were no differences of Bax in MAT of CD and controls. Furthermore, higher level of Bcl-2 and low level of Caspase 3 were seen in the MAT of CD patients. Conclusion: The defective apoptosis in MAT may explain the singular morphological characteristics of this tissue in CD, which may be implicated in the pathophysiology of the disease.

1-INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

A doença de Crohn (DC) foi definida em 1932 como uma doença do íleo terminal, afetando principalmente adultos jovens, caracterizada por inflamação crônica¹. A formação de úlceras na mucosa é acompanhada por uma reação do tecido conjuntivo, processo que, frequentemente, leva à estenose do lúmen intestinal, associada com a formação de múltiplas fístulas. Evidencia-se inflamação transmural granulomatosa que afeta mais frequentemente o íleo terminal e o cólon, porém pode afetar qualquer parte do trato digestório. A DC é caracterizada por períodos de remissão e atividade da doença, e se desenvolve por meio de uma resposta inapropriada do sistema imune inato e resposta exacerbada do sistema imune adaptativo. Ocorre aumento da permeabilidade intestinal, alterações nas junções epiteliais, deficiência de oligoelementos até desnutrição grave, e também podem ocorrer alterações extaintestinais².

A doença é clinicamente caracterizada por sintomas como diarreia, febre e emagrecimento, levando, eventualmente, à obstrução do intestino delgado. A desnutrição também é uma desordem muito frequente, ocorre aproximadamente em 25 a 80% dos casos. A resposta inflamatória sistêmica, ao lado da baixa ingestão oral, é a principal causa da elevada taxa de desnutrição. A deficiência de vitaminas e de micronutrientes é comum especialmente na fase aguda da DC ou após cirurgias extensas. Especial atenção deve ser dada à deficiência de cálcio e vitamina D, em razão da alta prevalência de osteopenia, e aos distúrbios hidroeletrolíticos, principalmente nos casos que evoluem para síndrome do intestino curto. Além das manifestações no sistema digestório e da desnutrição, a DC pode

ter manifestações extra-intestinais, sendo as mais frequentes as oftalmológicas, as dermatológicas e as reumatológicas³.

A caracterização da atividade inflamatória na DC pode ser realizada por meio do Índice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) que leva em consideração critérios clínicos e laboratoriais. As variáveis analisadas são: média do número de evacuações líquidas ou pastosas; dor abdominal; sensação de bem estar; número de complicações (artrite ou artralgia, irite ou uveíte; eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide; fissura, fístula ou abscesso anal; outras fístulas; febre), uso de antidiarreico, presença de massa abdominal, valores deficientes de hematócritos, alterações na composição corporal habitual. Considera-se valores de referência para a classificação da doença em remissão (abaixo de 150), doença leve a moderada (150-219), doença moderada a grave (220-450), doença grave a fulminante (acima de 450)³. Até o momento a DC não pode ser curada por medicamentos ou cirurgicamente. A terapêutica visa minimizar e controlar sintomas, promover qualidade de vida e evitar complicações. O tratamento medicamentoso disponível se fundamenta no uso dos aminosalicilatos, imunossupressores e terapia biológica; os corticosteróides devem ser utilizados apenas nas fases de exacerbação da atividade da doença. A terapia biológica constituiu um grande avanço no tratamento da DC e a primeira droga disponível foi o anti-fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF- α). Um dos mecanismos desta classe de medicamentos é estimular apoptose das células imunes.³

A fisiopatologia da DC ainda não está completamente elucidada, mas os fatores ambientais e as respostas inadequadas do sistema imune em indivíduos geneticamente suscetíveis têm sido propostos como possíveis causas da doença⁴⁻⁶. Uma característica comum na DC crônica com inflamação transmural é o espessamento do tecido adiposo mesentérico (TAM), próximo à área intestinal afetada. Esta alteração se estende desde o

mesentério, cobre parcialmente a circunferência da alça intestinal, e pode acometer tanto o intestino delgado como o intestino grosso⁷. A expressão diferencial de adipocitocinas e citocinas pró-inflamatórias, bem como, alterações histológicas foram descritas anteriormente no TAM de indivíduos com DC⁸⁻¹¹. No entanto, ainda não foram reportados estudos sobre as vias de apoptose neste tecido.

1.2 - Dados da Literatura

1.2.1 - Vias de Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico de morte programada de células, sendo essencial para o desenvolvimento e homeostasia dos tecidos e órgãos, bem como a eliminação de células potencialmente cancerígenas^{12,13}. Nos últimos 30 anos, devido à importância deste mecanismo celular em muitas doenças, têm sido desenvolvidos métodos para a detecção de apoptose e de proteínas envolvidas neste processo. A apoptose pode ser induzida por duas vias principais: a via intrínseca (mitocondrial), em que Bax é uma das proteínas pró-apoptóticas mais relevantes, e a via extrínseca¹⁴. Além disso, existe uma relação estreita entre estas vias de apoptose relacionadas e vias inflamatórias. TNF- α , é uma importante citocina pro-inflamatória, está envolvida na ativação de apoptose, enquanto que o NF-kB, fator de transcrição nuclear do TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias, tem uma função anti- apoptótica, ativando a expressão de outros membros da família Bcl-2, tais como Bcl-2, o qual previne a morte das células^{15,16}.

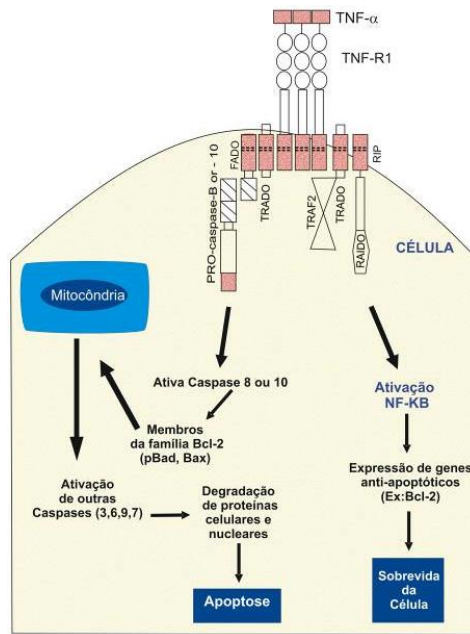


Figura 1: Vias de apoptose e sobrevivência celular. (Apoio Didático – Unicamp)

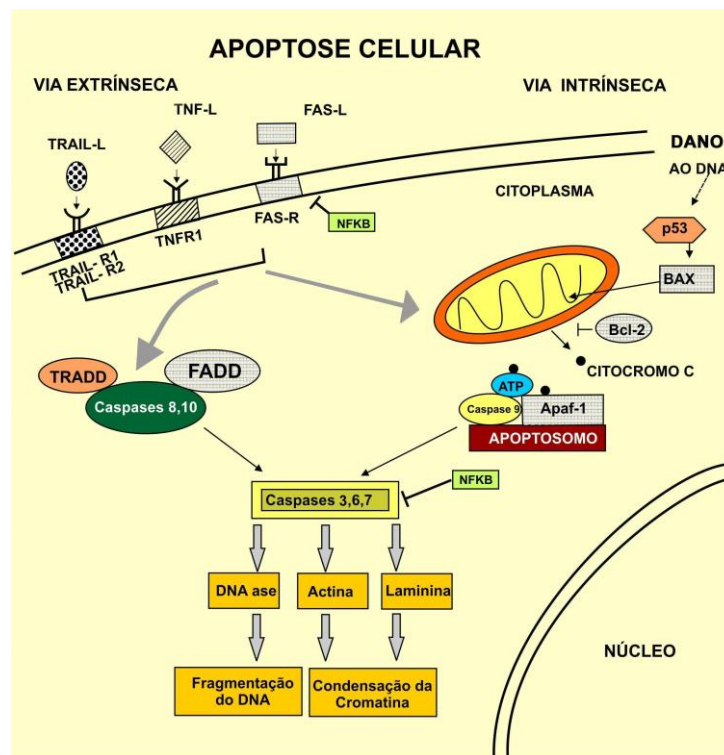


Figura 2: Mecanismos de apoptose: via extrínseca e intrínseca. (Apoio Didático – Unicamp)

A apoptose pode ser iniciada por uma variedade de sinais e fatores de estresse. Sua importância fisiológica e patológica é destacada pelo fato de que a desregulação da apoptose está presente em muitos cânceres e neoplasias. Alguns estudos atribuem a persistência patológica do estado inflamatório em um órgão ou tecido alvo, ao defeito na modulação da apoptose de neutrófilos, levando a produção exacerbada e descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, em um mecanismo de retroalimentação contínua. Apoptose de neutrófilos é o mecanismo habitual para o impedimento da liberação de mediadores tóxicos, em contraste com o que ocorre na necrose tecidual. A resolução da inflamação ocorre por meio da eliminação fagocitária dos neutrófilos do tecido inflamado. No entanto, a apoptose restringe várias atividades dos neutrófilos, e se não bem regulada, pode prejudicar a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases, promovendo o desenvolvimento de doença inflamatória crônica. Quando os neutrófilos são recrutados para o local infectado ou inflamado eles sobrevivem por mais tempo e a indução de apoptose por mediadores locais pode ser importante no controle da inflamação¹⁷.

A apoptose foi originalmente descrita por Kerr et al (1972), que observaram por meio de microscopia eletrônica as alterações morfológicas das células em apoptose, finalizando em fragmentação nuclear. A apoptose apresenta características bem distintas da necrose, tanto pelas mudanças bioquímicas quanto pelas alterações morfológicas que sofrem sendo a apoptose caracterizada por uma morte celular programada, e a extinção controlada das células durante o desenvolvimento normal. Em contraste com a necrose, que é um processo passivo e descontrolado, afetando grandes campos celulares. As células apoptóticas sofrem alterações caracterizadas morfolologicamente pela compactação da cromatina nuclear, contração do citoplasma e produção de corpúsculos apoptóticos nos limites da membrana¹⁸ que são, então, rapidamente fagocitados por células vizinhas,

incluindo macrófagos e células parenquimatosas¹⁹. Bioquimicamente, a apoptose é diferenciada pela fragmentação do genoma e degradação de diversas proteínas celulares sem desencadear resposta inflamatória in vivo²⁰. Estima-se que a duração de uma apoptose in vivo seja entre 6 e 24 horas, dependendo do tipo celular²¹.

A alteração da apoptose resulta em doenças, incluindo câncer, infecções virais e desordens neurodegenerativas. Em particular, o desenvolvimento da autoimunidade é decorrente de um déficit na apoptose das células T, fenômeno reportado em inúmeras doenças imunes como artrite reumatóide e asma²¹.

Dentre os vários fatores responsáveis pela regulação da apoptose, encontra-se a família das proteínas Bcl-2, que é relatada com um papel fundamental neste processo. Esta família contém inúmeras proteínas com atividades opostas como as Bcl-2 and Bcl-xL que inibem a apoptose, e Bax que promove apoptose. Sabe-se que o que dita a relativa sensibilidade ou resistência a apoptose não é o nível absoluto, mas o relativo balanço entre a concentração destas proteínas antagonistas e agonistas^{21,22}.

As vias de ativação da morte celular por apoptose compreendem os seguintes mecanismos moleculares:

1. A primeira via envolve os receptores de membrana:

Esta via é iniciada pela ligação do receptor Fas (CD95), presente na membrana celular, ao seu ligante FasL, resultando na ativação de caspases e morte celular. O aumento da expressão de Fas pode causar apoptose mediada pela regulação do gene p53, embora sem mecanismos conhecidos. Outros exemplos de ligantes indutores de morte celular são o TNF e o TRAIL²³.

2. A segunda via envolve ativação mitocondrial. :

A via pela qual o gene p53 sinaliza a via mitocondrial e induz a apoptose é pelo aumento de EROS. O gene p53 induz os genes que codificam proteínas que catalisam reações óxido-redutoras e, conseqüentemente, geram EROS, os quais promovem a liberação do citocromo-c pela mitocôndria e, então, a morte celular ^{24,25}.

Um desses genes induzidos pelo p53 que desencadeia a geração de EROS e a apoptose é a prolina oxidase ou PIG6 ²⁶. Interessante notar que as EROS por si só são reguladoras do p53 e possuem um papel importante na regulação da mitocôndria durante a destruição dos componentes celulares mediados pela ativação das caspases^{27,28}. A interrupção deste controle exercido pelas EROS está envolvida na fisiopatologia do câncer²⁹.

3. A terceira via envolve a família Bcl-2:

A família Bcl-2 contém membros tanto pró quanto anti-apoptóticos. Há, pelo menos, 16 proteínas da família Bcl-2, que são divididas em três grupos: o primeiro grupo é formado pelas proteínas anti-apoptóticas (exemplos Bcl-xl e Bcl-2), já os grupos dois e três são membros pró-apoptóticos (exemplos: Bax e Bik)³⁰. Estas proteínas permanecem em harmonia, já que uma proteína anti-apoptótica é capaz de se heterodimizar com sua respectiva proteína pró-apoptótica, indicando que a concentração de cada uma é importante na determinação do sinal predominante que a célula deve receber. Com isso, uma célula com maiores níveis de proteínas anti-apoptóticas exibe maior resistência a apoptose, mas se houver predomínio da proteína Bax, por exemplo, a célula morrerá rapidamente ³¹.

Todas as proteínas da família Bcl-2 formam canais iônicos na membrana mitocondrial. As proteínas anti-apoptóticas formam canais pequenos e estão usualmente fechadas, mas as pró-apoptóticas tendem a formar grandes canais nesses locais. Com o aumento de proteínas pró-apoptóticas, ocorre formação de grandes canais, perda do

potencial de membrana da mitocôndria e a liberação do citocromo-c ao citosol. O citocromo-c associa-se a APAF-1 e à pró-caspase 9 para formar a caspase 9 ativada. O complexo enzimático formado é chamado de apoptossomo e, uma vez formado, torna-se inevitável a morte celular ³²⁻³⁴.

Finalizando a proposta de expor os mecanismos da apoptose encontramos a participação das caspases, responsáveis pela quebra proteolítica de uma série de proteínas-chaves que resulta nas alterações morfológicas das células em processo de apoptose ³⁵. Estas caspases participam em uma cascata que é ativada em resposta a sinais pró-apoptóticos³⁶. Elas são tipicamente sintetizadas como precursores inativos. Inibidores ou a ligação de cofatores ativam as caspases através da quebra de aspartatos internos através de autocatálise ou pela ação de outra protease³⁷.

As caspases compartilham similaridades em aminoácidos, estrutura e substratos. Até o momento, 14 caspases foram identificadas e são agrupadas, de acordo com a sequência de homologia, em três subclasses: a subfamília da caspase 1 (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 13); a subfamília da caspase 3 (caspases 3, 6, 7, 8 e 10) e a subfamília da caspase 2 (caspases 2 e 9). Funcionalmente, algumas caspases (como as 2, 8 e 9) atuam como proteínas iniciadoras ou sinalizadoras, enquanto outras, como as 3, 6 e 7, atuam como proteínas executoras³⁸.

Estudos que se propõem a avaliar os mediadores de morte e proliferação celular são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos alvos potenciais para medicamentos e para o esclarecimento do modo de ação das terapêuticas existentes⁷.

1.2.2 - Apoptose e doença inflamatória intestinal

Embora a apoptose no TAM na DC ainda não tenha sido investigada, estudos sobre a apoptose no tecido intestinal de pacientes com DC, e em outras doenças inflamatórias do intestino, tais como, retocolite ulcerativa (RCU) e na ileíte do reservatório (bolsite), já foram descritas anteriormente^{21,22,39}. Estudos mostraram que as células T da mucosa intestinal de pacientes com DC exibem resistência a uma variedade de sinais que induzem a apoptose, incluindo a expressão diferencial de proteínas da família Bcl-2 e diferenças na razão entre proteínas pró e anti-apoptóticas^{13,40}, sugerindo que a apoptose pode ser um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DC. Além disso, a alteração da apoptose em células imunes, tais como macrófagos e neutrófilos, já foram descritas^{2,40}. Boirivant e colaboradores (1999)⁴¹ reportaram que células T da lâmina própria na DC e na RCU são resistentes ao mediador da apoptose CD2.

Além disso, Bennett et al. (1998)⁴², verificaram expressão aumentada da proteína pró-apoptótica FasL, da família TNF, em áreas de mucosa intestinal comprometidas por RCU ou DC. Ueyama et al. (1998)³⁹, da mesma forma, encontraram expressão aumentada de FasL em mucosa afetada por RCU, mas não em DC.

Sabatino et al. (2003)²¹, demonstraram apoptose via aumento de metaloproteinases na DC ativa, mas não conseguiram estabelecer correlação com os níveis de expressão da proteína FasL.

1.2.3 - Tecido adiposo mesentérico na doença de Crohn

Apesar de haver variação fenotípica na DC, são comuns alguns aspectos macroscópicos, principalmente no que se refere ao espessamento do TAM próximo à área intestinal afetada. A análise histológica revela anormalidades neste tecido adiposo, incluindo infiltrado de macrófagos e de células T, fibrose e inflamação perivascular, além do aumento do número de adipócitos, quatro vezes maior na DC comparados aos controles, sendo estas células de pequeno tamanho¹⁰. Leal e colaboradores (2012) demonstraram que a redução da autofagia no TAM de pacientes com DC pode ser um fator na manutenção da resposta inflamatória⁴³.

Embora o acúmulo de gordura intra-abdominal esteja diretamente envolvido no desenvolvimento de desordens metabólicas, como: diabetes mellitus tipo 2 e doença arterial coronariana, na DC a presença de gordura mesentérica espessada próxima à área intestinal acometida pela doença se faz presente independente do índice de massa corporal ou da presença de desordens metabólicas⁴⁴. Contudo, alterações decorrentes da inflamação do tecido adiposo de obesos são similares as alterações que ocorrem na DC^{45,46}. TAM apresenta estruturas metabólicas que possibilitam a conexão com outros tecidos e órgãos distantes, como também participam do metabolismo energético, função neuroendócrina e imune⁴⁷.

Diferentes tipos celulares compõem este tecido: adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e leucócitos^{48,49}. Em indivíduos normais estes tipos celulares são capazes de sintetizar várias citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e adipocitocinas⁵⁰.

Os adipócitos são as células que predominam no tecido adiposo, sendo 95% de seu volume composto de uma única organela central com vacúolo preenchido com gotículas de

triglicerídeos. Os outros 5% do volume, como citoplasma, é metabolicamente ativo, produzindo diferentes adipocinas. Adiponectina, leptina, resistina, grelina e visfatina são exemplos de adipocinas sintetizadas pelos adipócitos⁴⁹. Diminuição dos níveis de adiponectina, potencialmente anti-inflamatória, foi identificada no TAM de pacientes com DC quando comparados a controles saudáveis, com reflexo na dosagem plasmática que mostrou-se também diminuída⁵¹.

Se o espessamento do TAM funciona como uma barreira para o processo inflamatório, ou se é um fator secundário que mantém o processo inflamatório, resultando no aspecto transmural da DC, ainda permanece não esclarecido^{7,45,5}. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial papel da apoptose no desenvolvimento das características macroscópicas e microscópicas singulares do TAM na DC, bem como a caracterização do mecanismo de morte celular no tecido intestinal envolvido pela DC

2-OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar os mecanismos de apoptose na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC, comparando-se aos respectivos controles.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1- Avaliar o índice apoptótico (TUNEL) na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC e em controles.

2.2.2- Correlacionar o índice apoptótico (TUNEL) no TAM (DC e controles) com achados morfométricos e histológicos dos adipócitos. Além de avaliar proliferação celular no TAM (DC e controles).

2.2.3- Complementar o estudo do mecanismo de apoptose na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC e em controles utilizando expressão de transcritos gênicos e proteínas relacionadas com apoptose.

3-CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 – Casuística

Amostras da mucosa intestinal ileal e do TAM localizado próximo à área intestinal afetada por DC foram obtidas de 10 pacientes com doença ileocecal ou ileal que foram submetidos à ressecção cirúrgica. Os pacientes com DC apresentavam diagnóstico histológico e endoscópico da doença, sendo acompanhados no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais “Dr. Juvenal Ricardo Navarro Góes”, pertencente ao Serviço de Coloproctologia, Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A média de idade foi de 34,5 (14-60) anos, sendo 50% do gênero masculino. Definiu-se o grupo DCI como amostra de mucosa intestinal de pacientes com DC e DCA para TAM desses pacientes. Realizou-se preenchimento de um questionário de inclusão (Anexo 8.1). A presença de atividade da doença foi avaliada por ileocolonosopia antes da cirurgia e todos os pacientes tiveram um índice de atividade da doença de Crohn (IADC)⁵² superior a 250 pontos (Anexo 8.2).

O grupo controle de TAM foi composto por oito pacientes submetidos à ressecção intestinal (retosigmoidectomia) por doença intestinal não inflamatória, sendo coletada biópsia do TAM próximo ao íleo distal normal (grupo CA) [média de idade 55,6 (39-70) anos; 62,5% do sexo masculino]. O grupo controle de mucosa ileal foi composto por 8 pacientes com ileocolonosopia normal (grupo CI) [média de idade 50,4 (33-60) anos; 37,5% do sexo masculino].

Todos os pacientes com DC e controles tinham índice de massa corporal (peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado) (IMC) menor que 25 kg/m².

3.1.1 - Fatores de Exclusão

Excluíram-se os pacientes com outras doenças no trato digestório, ostomizados, e pacientes com outras doenças inflamatórias.

3.1.2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, registrado sob nº 356/2009 (Anexo 8.3). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexos 8.4, 8.5 e 8.6).

3.2 - Método

A detecção de células em apoptose nos grupos DCI, DCA e controles (CI e CA) foi realizada por meio do ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*). As análises transcripcional e proteica de genes e proteínas relacionadas às vias de apoptose nos grupos acima citados foram determinadas por *RT-PCR*, imunoblot de extrato protéico total, imunoistoquímica e imunofluorescência. A determinação dos achados morfométricos dos adipócitos foi realizada por meio de estudo histológico (hematoxilina e eosina) e posterior quantificação utilizando método computacional. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia Experimental do Gastrocentro e no Laboratório de Sinalização Celular FCM, UNICAMP.

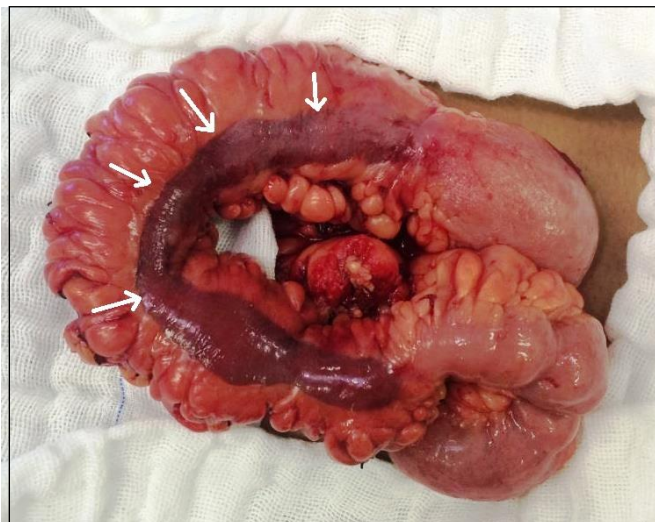


Figura 3: Aspecto cirúrgico do TAM espessado em paciente com DC. As setas mostram a alça intestinal quase completamente envolta pelo TAM. Arquivos do Serviço de Coloproctologia, Unicamp.

As amostras de mucosa ileal (DCI) e de TAM (DCA) dos pacientes com DC foram obtidas durante o procedimento cirúrgico, após a retirada do espécimen cirúrgico. As amostras de TAM controle (grupo CA) próximo ao íleo terminal foram obtidas durante procedimento cirúrgico de ressecção de cólon esquerdo ou retossigmoidectomia por doença intestinal não inflamatória. Os aparelhos utilizados para realização de íleo colonoscopia no Serviço de Colonoscopia (Gastrocentro - Unicamp) para obtenção de amostras de íleo distal normal (grupo CI) foram videocolonoscópios das marcas Fujinon® e Olympus®.

3.2.1 - Ensaio de TUNEL para detecção de apoptose

O ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*) foi realizado para detecção e quantificação de células em apoptose nas amostras de mucosa ileal e de TAM ⁵³, utilizando o kit da Millipore® (Billerica, MA). Este ensaio se fundamenta na marcação de quebras na cadeia de DNA (ácido desoxiribonucléico) pela técnica de marcação de DNA com dUTP, conjugado com *fluorescein isothiocyanate* (FITC) cuja coloração é verde.. Foi utilizado o protocolo recomendado pelo fabricante. A coloração nuclear foi realizada com iodeto de propídio (IP), cuja coloração é avermelhada. Fotomicrografias foram feitas usando microscópio Leica DM 4500B e o sistema de câmera digital Leica DFC 290 com programa computacional *Leica Application Suite* versão 3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar). Qualquer tipo de célula mostrando co-marcação nuclear (FITC+IP), cuja coloração foi representada pelo tom alaranjado, foi considerado positivo para a análise quantitativa, que foi realizada de maneira cega por um observador. Foram capturados três campos aleatórios de maior ampliação de 40X (modo pancromático) para cada amostra.

3.2.2 - Análise histológica e morfométrica (Hematoxilina e Eosina)

As amostras foram embebidas em blocos de parafina para análise histológica. Realizaram-se secções de 5µm e coradas com hematoxilina e eosina ⁵⁴. As fotomicrografias foram feitas usando microscópio Zeiss Axiophot e sistema de câmera digital Cannon Power Shot G5 (Cannon Inc., Tokyo). Cinquenta campos de maior aumento (40X) foram digitalizados para cada amostra e 10 campos aleatórios foram analisados. O número de

adipócitos foi mensurado e a área e perímetro dos mesmos foram obtidos. Os resultados morfométricos foram quantificados por um observador cego, utilizando o programa computacional *Image J* (Processamento de Imagem e Análise em Java, domínios públicos, rsbweb.nih.gov/ij/21). Também avaliou-se a presença de fibrose, infiltrado inflamatório, presença de área ulcerada, etc.

3.2.3 - Imunoistoquímica para Bax, Bcl-2 e Ki67

Cortes histológicos de 5µm de amostras incluídas em blocos de parafina também foram realizados para análise histológica por imunoistoquímica. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio 10 mM, PBS, pH 6,0 durante 15 minutos. Em seguida, os cortes histológicos foram aquecidos no microondas em tampão de leite a 3% durante 30 minutos e incubados durante a noite com os anticorpos primários: anti-Bax (DAKO A/S, Denmark; N-20 5c493, rabbit policlonal), anti-Bcl-2 (DAKO A/S, Denmark; N-19 5c492, mouse policlonal), anti-Ki67 (DAKO A/S, Denmark; F0788, mouse policlonal) com diluições de 1:600, 1:150 e 1:500 respectivamente, a 20°C. As lâminas foram incubadas com solução de bloqueio, seguida dos anticorpos secundários (Novocastra™ Laboratories Ltd; Novolink RE 7260-K) durante 1 hora, e processadas usando a reação com DAB (diaminobenzidina) (0,5 mg/ml, Sigma, EUA, St. Louis). Qualquer célula com coloração citoplasmática (Bax e Bcl-2) e nuclear (KI67) foi considerada positiva para a análise quantitativa ^{14,55}, a qual foi realizada por um observador cego. O microscópio e o programa computacional utilizado para capturar as imagens para a análise quantitativa foram os mesmos que os utilizados para o estudo histológico com hematoxilina e eosina.



Figura 4: Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%.



Figura 5: Aplicação do anticorpo primário.



Figura 6: Incubação das lâminas *overnight* com anticorpo primário.

3.2.4 - Imunofluorescência para Caspase 3

Cortes histológicos de 5µm de amostras incluídas em blocos de parafina também foram realizados para a análise histológica por imunofluorescência. A preparação inicial das lâminas foi realizada (desparafinização e hidratação), seguida por recuperação de antígenos. O tecido foi incubado em anticorpo primário anti-Caspase 3 (Santa Cruz CA , H-277: sc-7148, rabbit policlonal), com diluição de 1:200, a 4°C durante à noite e depois com anticorpo secundário conjugado com FITC (goat anti-rabbit IgG-FITC: sc-2012), cuja coloração é verde, com a mesma concentração durante 1 hora. DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol), cuja cor é expressa em azul foi utilizado para coloração nuclear. Qualquer célula mostrando marcação no citosol para FITC foram consideradas positivas para a análise quantitativa¹⁴, a qual foi realizada de maneira cega por um observador. Foram analisados 10 campos aleatórios em campo de maior aumento (40x). O microscópio e o programa computacional utilizado para capturar as imagens para análise quantitativa foram os mesmos que os utilizados para o estudo de TUNEL.

3.2.5 - Análise transcripcional por RT-PCR

As amostras de mucosa ileal e do TAM localizado próximo à área intestinal acometida pela DC foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até à sua utilização. O RNA (ácido ribonucleico) total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a concentração de RNA foram determinadas por espectrofotometria UV à 260nm. O RNA foi tratado com DNase

(desoxiribonuclease) isenta de RNase (ribonuclease) (RQ1 RNase Dnase, Promega) e, em seguida, procedeu-se à transcrição reversa utilizando oligo (dT) *primers* e transcriptase reversa (Kit RevertAid™, Fermentas). O conjunto de reagentes contendo a amostra (20 ul) foi incubado a 42°C durante 60 min, e em seguida, durante 10 minutos a 70°C, e resfriado em gelo. *RT-PCR* foi realizada com o cDNA (ácido desoxiribonucleico complementar) resultante, utilizando o protocolo do fabricante, em um volume reacional de 25ul por capilar. Os *primers* gene-específicos (Applied Biosystems™) foram: Hs00180269_m1 (Bax); Hs00608023_m1 (Bcl2); NM_002046.3 (GAPDH). A amplificação por *RT-PCR* consistiu de um passo inicial de desnaturação (50°C durante 2 min e 95°C durante 10 min), 40 ciclos de desnaturação (95°C durante 15s), hibridização (53°C durante 20s) e extensão (72°C durante 20s), seguida de uma última incubação a 60°C durante 1 min. Todas as medições foram normalizadas pela expressão do gene GAPDH, considerado como um gene endógeno estável. A expressão transcricional foi determinada utilizando o método delta-delta Ct: $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($\Delta\Delta CT = [Ct(\text{gene alvo}) - Ct(GAPDH)]_{\text{paciente}} - [Ct(\text{gene alvo}) - Ct(GAPDH)]_{\text{controle}}$).

A quantificação dos níveis de transcritos foi realizada por meio do sistema de detecção de sequência 7500 SDS (Applied Biosystems). A concentração ótima de cDNA e *primers*, assim como a máxima eficiência de amplificação, foram obtidas por uma curva de cinco pontos de diluições 2 para 1 sequenciais, para cada gene. Dados em tempo real foram analisados utilizando o Sistema Detector de Sequência versão 1.7 (Applied Biosystems).

3.2.6 - Extração de proteínas e Imunoblot

Fragmentos de mucosa intestinal e de TAM foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C em freezer para posterior homogeneização em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1mg/ml de aprotinina a 4°C , com Polytron PTA 20S em velocidade máxima por 30 segundos (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY).



Figura 7: Amostras de tecido sendo homogeneizadas com Polytron.

O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos a 4°C . No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford⁵⁶ e posteriormente preparou-se amostra contendo 50 μg de proteína total para ser utilizado nos experimentos de imunoblot e separação por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida para separação por eletroforese), BIO-RAD Laboratories[®] (Richmond, CA). As amostras foram

diluídas em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicadas em SDS-PAGE. As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, em aparelho de transferência da BIO-RAD®. Os pesos moleculares das proteínas foram avaliados usando o PageRuler™ de Fermentas® (Glenburnie, MD). As membranas de nitrocelulose foram incubadas “overnight” com anticorpo específico: anti-Bax (sc-493, rabbit policlonal, Santa Cruz, CA), anti-Bcl-2 (sc-492, rabbit policlonal, Santa Cruz, CA) na proporção de 1:100. A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (albumina 5%) por 90 minutos⁵⁷.

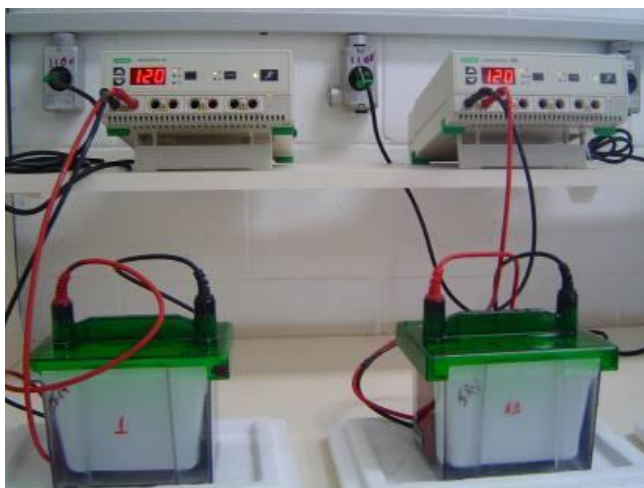


Figura 8: Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.

Após incubação com anticorpo primário específico, foi realizada incubação com anticorpo secundário, que possui em sua porção Fc uma peroxidase, que é uma enzima que se ligará ao reagente da reação de quimioluminescência (SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce Biothecnology, Inc. Rockford) que contém

luminol, produzindo luz, que foi captada através do fotodocumentador Syngene® e programa computacional *Gene snap* versão 7.12 (Syngene®).

A expressão da proteína estudada foi comparada com a expressão da β -actina (sc-47778, mouse policlonal, Santa Cruz, CA).

Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias, como comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias obtidas pelo fotodocumentador, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa “Gel-Pro Analyzer 6.0” (Exon-Intron Inc., Farrell, MD).

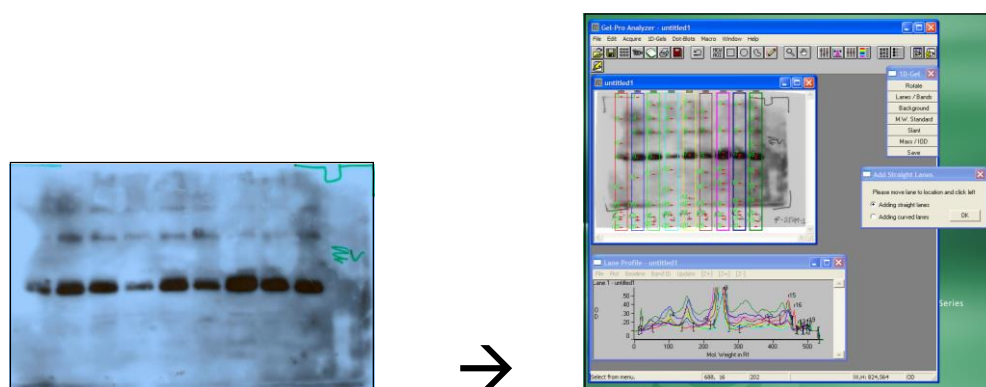


Figura 9: Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 6.1”, por meio de densitometria óptica.

3.2.7 - Análise estatística

O coeficiente de regressão de Pearson (r) foi utilizado para as correlações entre os resultados do TUNEL e dados morfométricos. Teste não-paramétrico (Mann-Whitney U, não pareado) foi realizado utilizando *R Statistics* Software (versão 2.15.0) para análises estatísticas para comparar o grupo DCA e seu respectivo grupo controle (CA), e comparar o

grupo DCI com seu respectivo grupo controle (CI). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4-RESULTADOS

4.1 - TUNEL e Análise morfométrica

O aumento macroscópico do TAM próximo à área intestinal acometida é uma característica comum na DC, em contraste com observações em outras doenças inflamatórias do intestino. Portanto, o primeiro objetivo foi determinar o índice global de células em apoptose na mucosa intestinal e no TAM na DC usando o ensaio de TUNEL, e comparar com seus respectivos controles. Esta análise mostrou um número significativamente menor de células apoptóticas nos grupos DCI e DCA, quando comparados com os respectivos grupos controles (CI e CA) ($p < 0,05$). Uma imagem representativa do ensaio TUNEL é mostrada na Figura 10 (A e C), em que as células em apoptose são bem identificadas em laranja nos diferentes grupos. A Figura 10 (B e D) mostra a análise quantitativa para todas as amostras avaliadas.

Uma vez que alteração no mecanismo de apoptose foi evidenciado no TAM do grupo DCA em relação aos controles, um dos objetivos foi também analisar as características morfométricas do TAM próximo à área intestinal afetada, e correlacionar esses achados com o índice apoptótico (TUNEL). A Figura 11 (A e B) demonstra o aspecto histológico (hematoxilina e eosina) e a média do perímetro e da área das células adiposas dos grupos CA e DCA. Os adipócitos do grupo DCA apresentaram a área e o perímetro com média inferior, quando comparados com os controles (grupo CA) ($p < 0,05$). Houve correlação positiva entre a área e o perímetro do adipócito com o índice apoptótico, tal como mostrado na Figura 11C. Além disso, a imunoistoquímica para Ki67 foi realizada em todas as amostras de grupos DCA e CA para acessar o índice de proliferação dos adipócitos

e verificar se isso poderia estar relacionado com as características morfométricas do TAM. No entanto, não foi verificada nenhuma evidência de proliferação no TAM de ambos os grupos (Figura 12).

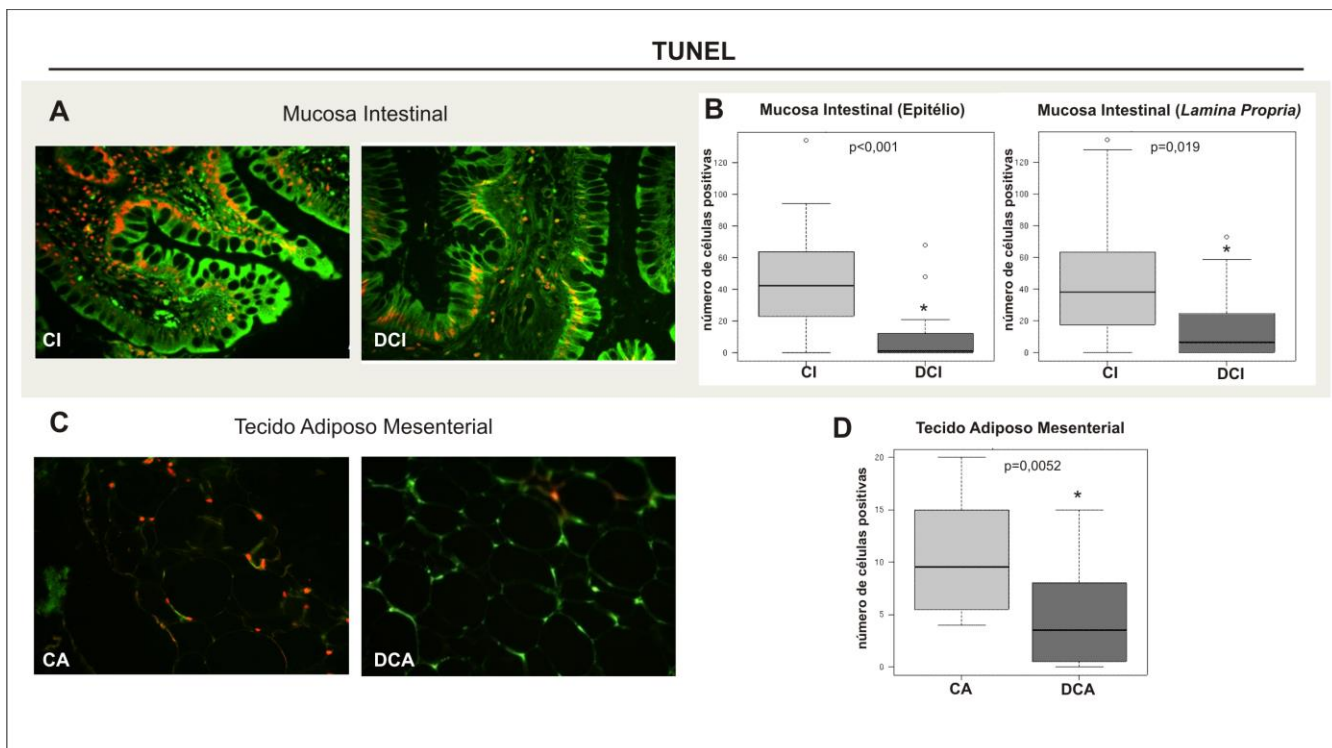


Figura 10 - Ensaio de TUNEL mostra diferenças de apoptose na mucosa intestinal (DCI) e no TAM (DCA) de pacientes com DC, em comparação com as respectivas amostras de controles (CI e CA). (A) Apoptose no epitélio intestinal e na lâmina própria por imunofluorescência (sobreposição de imagens); células TUNEL+ são mostradas em laranja (co-marcação por IP e FITC). Verificou-se menor número de células TUNEL+ tanto no epitélio intestinal quanto nas células da lâmina própria do grupo DCI em comparação com CI. (C) Apoptose no TAM por imunofluorescência (sobreposição de imagens); células TUNEL+ são mostradas em laranja (co-marcação por IP e FITC). Verificou-se menor número de adipócitos TUNEL+ no grupo DCA comparado ao grupo CA. Destaca-se alta

densidade de adipócitos TUNEL+, em laranja, no controle (CA). As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. (B) e (D) Análise quantitativa de células TUNEL+ nos grupos DCI e DCA, em comparação com os respectivos controles (CI e CA). Os gráficos relativos à mucosa intestinal mostram de modo separado a análise quantitativa no epitélio e na *lâmina própria*. Para DCI, n=10; para DCA, n=10; para CI, n = 8; e, para a CA, n = 8, *p<0,05 vs controle.

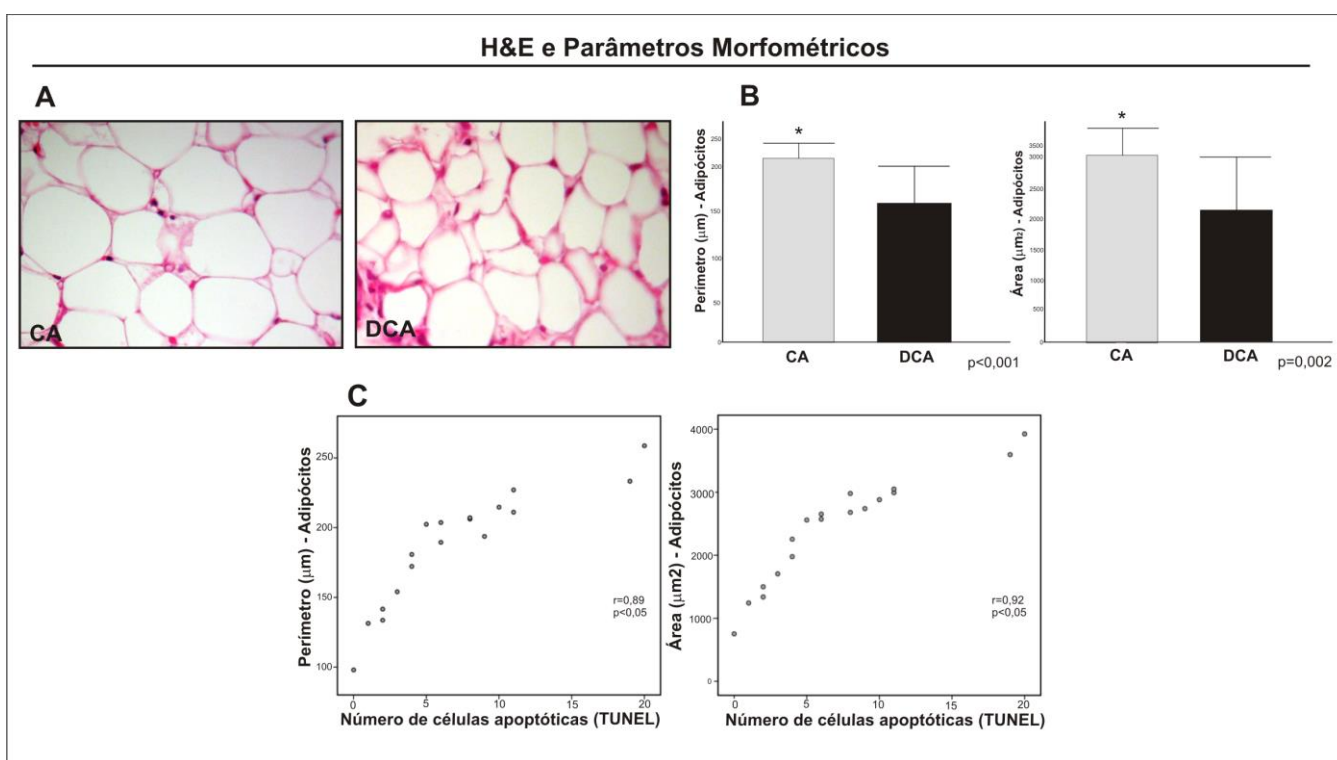


Figura 11 - Coloração para hematoxilina-eosina (H&E) e parâmetros morfométricos. (A) Coloração para hematoxilina-eosina mostra menor área e perímetro dos adipócitos no grupo DCA, em relação ao controle (CA). As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. (B) Análise morfométrica quantitativa no TAM do grupo DCA, em relação ao respectivo grupo controle (CA). Os gráficos mostram diminuição do perímetro (μm) e área (μm^2) dos adipócitos do TAM na DC, em comparação com as amostras

controle. Para DCA, n=10; para CA, n=8, * $p < 0,05$ vs controle. (C) Os gráficos de dispersão mostram uma correlação significativa entre o perímetro (μm) e o número de células apoptóticas (TUNEL+), ($r=0,89$, $p < 0,05$) e também entre a área (μm^2) e o número de células apoptóticas (TUNEL+), ($r=0,92$, $p < 0,05$).

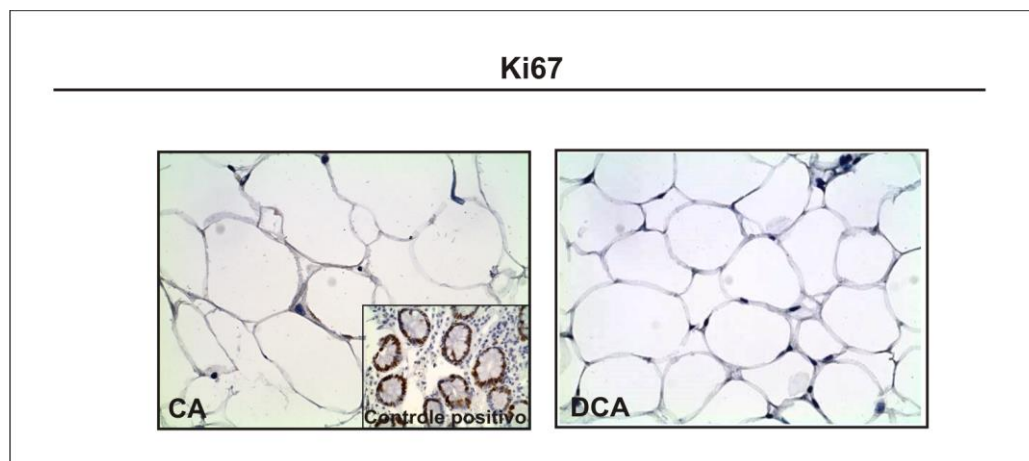


Figura 12 - Imunoistoquímica para Ki67 no TAM; nenhuma evidência de proliferação foi encontrada nas amostras do grupo DCA e CA (DCA, n=10; CA, n=8). As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. O controle positivo foi amostra de mucosa intestinal.

Com relação à avaliação histológica dos cortes corados com hematoxilina e eosina pode-se observar mucosa entérica de aspecto habitual em todas as biópsias de pacientes do grupo controle CI; e tecido adiposo maduro, vascularizado, sem outras particularidades histológicas em todos os fragmentos de pacientes do grupo controle CA. Os pacientes com DC apresentaram nos fragmentos de mucosa intestinal, ileíte crônica de atividade de leve a intensa, com algumas amostras evidenciando ulceração e exsudato fibrinopurulento, o infiltrado na lâmina própria em sua maioria caracterizou-se por ser linfoplasmocitário. Os

fragmentos de TAM dos pacientes com DC revelaram tecido adiposo maduro, vascularizado, inflamação perivascular, com infiltrado linfoplasmocitário em sua maioria, havendo alguns com presença de neutrófilos e depósitos de fibrina.

4.2 - Análise transcricional de genes relacionados à apoptose

Uma vez que alterações foram detectadas no índice apoptótico por meio do ensaio de TUNEL na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC, em comparação com os controles, se explorou os mecanismos moleculares envolvidos. Foram estudados dois transcritos relevantes relacionados com a via de apoptose; Bax e Bcl2, que codificam proteína pró-apoptótica e anti-apoptótica, respectivamente. Evidenciou-se diminuição significativa da expressão transcricional de Bax na mucosa intestinal de pacientes com DC, em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto não foram detectadas diferenças no TAM ($p > 0,05$). Além disso, a expressão transcricional de Bcl2 foi significativamente reduzida na mucosa intestinal e no TAM na DC, quando comparada com os respectivos controles ($p < 0,05$). Estes resultados são mostrados na Figura 13.

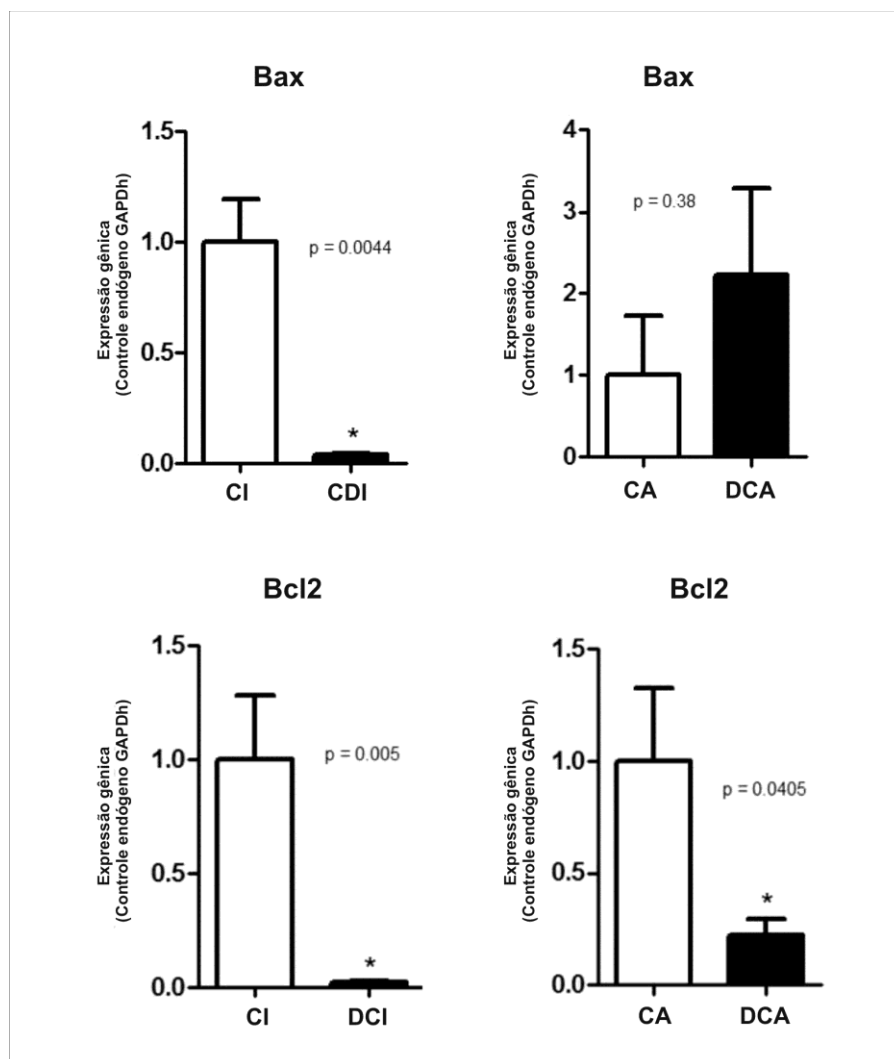


Figura 13 - Níveis transcricionais de Bax e Bcl2, determinados por *RT-PCR*.

Baixos níveis de Bax e Bcl2 são observados na mucosa intestinal do grupo DCI em comparação com o respectivo controle (CI). Diminuição de Bcl2 também é evidenciada no grupo DCA, em comparação com o respectivo controle (CA), enquanto que não há diferenças nos transcritos de Bax no grupo de TAM. Para DCI, n=10; para DCA, n=10; para CI, n=8; e CA, n=8, *p<0,05 vs controle.

4.3 - Imunoistoquímica para Bax e Bcl-2

A fim de validar os resultados dos níveis de transcritos realizou-se imunoistoquímica para Bax e Bcl-2. A Figura 14 (A e B) mostra as imagens representativas da coloração para Bax na mucosa intestinal e no TAM. A mucosa intestinal apresentou positividade para Bax, enquanto as amostras de TAM foram todas negativas para esta proteína. A análise quantitativa revelou uma diminuição significativa da expressão de Bax restrita na *lâmina própria* de pacientes com DC, como mostrado na Figura 14 (A e C), estando de acordo com os resultados da *RT-PCR*. No entanto, não foram encontradas diferenças no epitélio da mucosa intestinal.

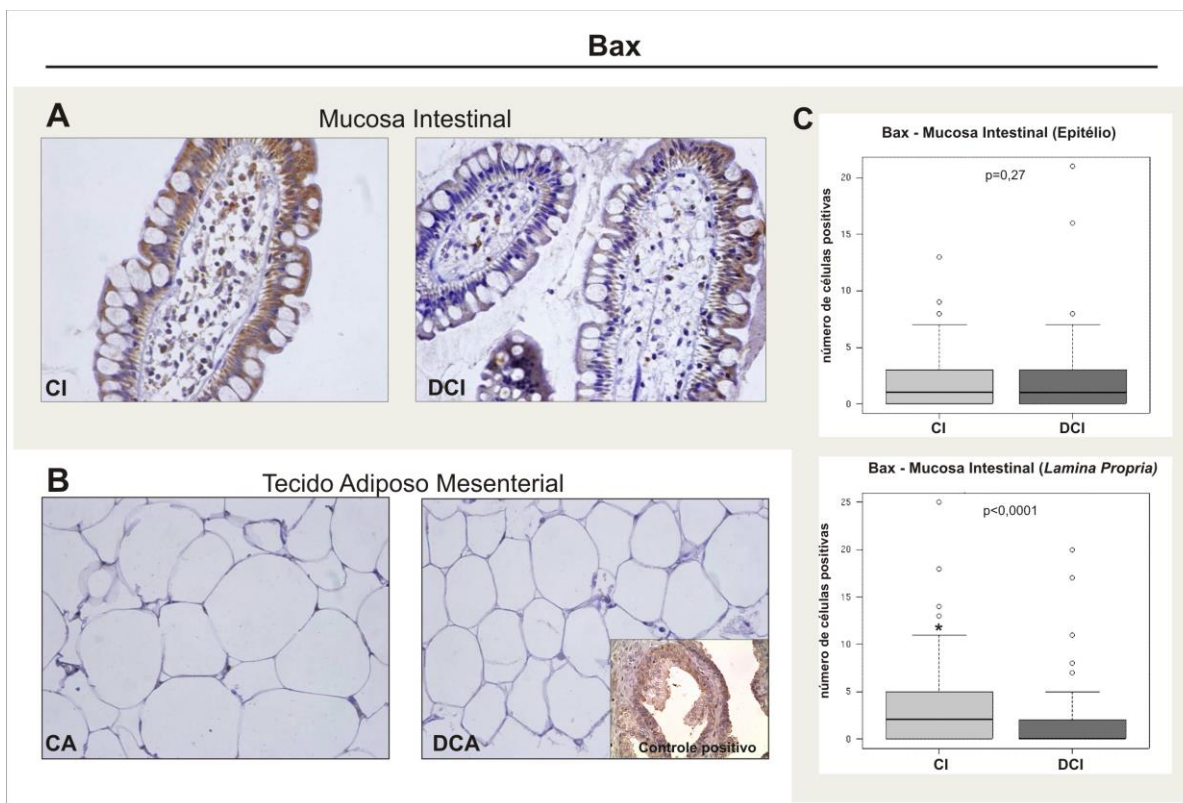


Figura 14 - Imunoistoquímica para Bax no tecido intestinal (epitélio e lâmina própria) e no TAM na DC, em comparação com as respectivas amostras controles (CI e

CA). (A) Corte histológico representativo de íleo terminal dos grupos CI e DCI, mostrando menos células positivas (marrom) na *lâmina própria* do grupo DCI, em comparação com o grupo CI. (B) Corte histológico representativo do TAM dos grupos DCA e CA; não foram encontradas diferenças entre os grupos. As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. O controle positivo foi a partir de secções de amostra de câncer de próstata. Para DCA, n=10; e CA, n=8. (C) Análise quantitativa na mucosa intestinal do grupo DCI, em comparação com o respectivo controle (CI). Os gráficos mostram a análise quantitativa para o epitélio e a *lâmina própria* separadamente. Para DCI, n=10; para CI, n=8, * $p < 0,05$ vs controle.

Considerando os resultados da imunoistoquímica para Bcl-2, os pacientes com DC apresentaram expressão dessa proteína significativamente maior no TAM, em comparação com os controles, tal como visto na Figura 15 (B e D). Positividade para Bcl-2 também foi observada na mucosa intestinal (Figura 15A). No entanto, a análise quantitativa não mostrou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 15C).

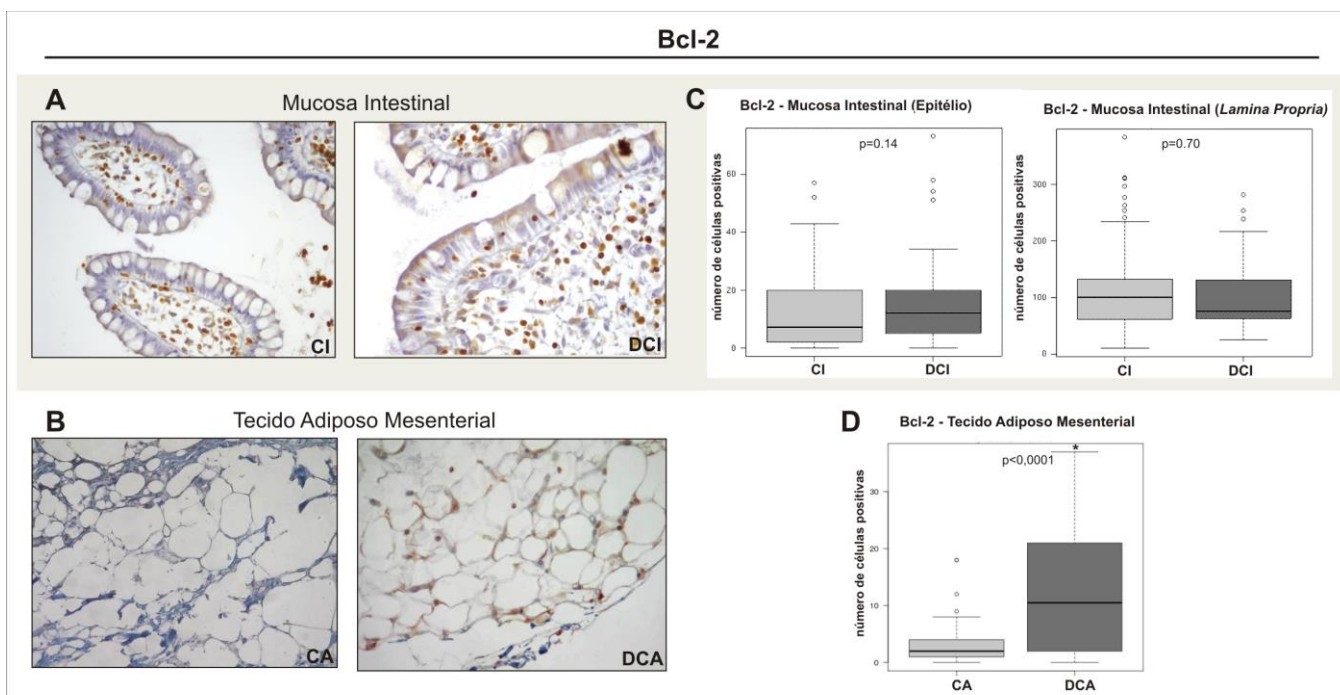


Figura 15 - Imunoistoquímica para Bcl-2 no tecido intestinal (epitélio e lâmina própria) do grupo DCI e do grupo DCA, em comparação com os respectivos controles (CI e CA). (A) Corte histológico representativo de íleo terminal dos grupos CI e DCI que mostram números semelhantes de células positivas (marrom) nestes grupos. (B) Corte histológico representativo de TAM dos grupos CA e DCA, mostrando maior positividade no grupo de DCA, em comparação com o controle (CA). As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. (C) e (D) Análise quantitativa da expressão de Bcl-2 nos grupos DCI e DCA, em comparação com os respectivos grupos de controles (CI e CA). Os gráficos relativos à mucosa intestinal mostram a análise quantitativa para o epitélio e *lâmina própria* separadamente. Para DCI, n=10; DCA, n=10; para CI, n=8; e CA, n=8, * $p<0,05$ vs controle.

4.4 – Imunoblot para Bax e Bcl-2

Devido aos resultados conflitantes relacionados à expressão transcricional de Bcl2 e o estudo de imunoistoquímica da proteína Bcl-2, foi avaliada a expressão de proteínas por imunoblot de extrato proteico total. A proteína Bcl-2 (anti-apoptótica) foi significativamente mais expressa no TAM de pacientes com DC (grupo DCA), quando comparada com os controles (grupo CA) ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças na mucosa intestinal entre os grupos da DCI e CI ($p > 0,05$). Ver Figura 16.

A expressão de Bax por Imunoblot também foi verificada na mucosa intestinal e no TAM de controles e de DC (Figura 16). Os níveis de Bax foram de acordo com os resultados da análise transcricional.

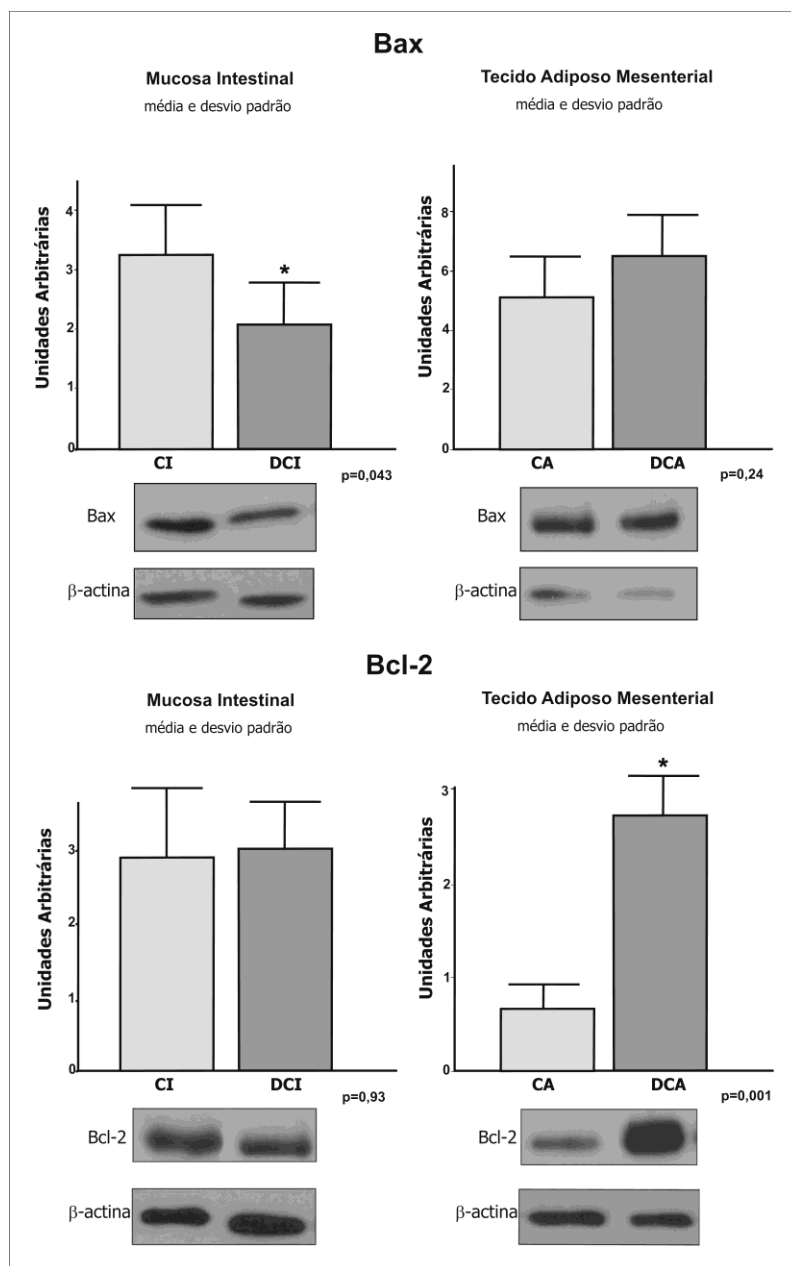


Figura 16 - Análise por Imunoblot representativa e determinação de Bax e Bcl-2 no tecido intestinal (mucosa) do grupo DCI e no TAM do grupo DCA, em comparação com os respectivos controles (CI e CA). Diminuição dos níveis de Bax foi observada no grupo DCI, em comparação com o grupo de controle (CI), e maior expressão de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, no TAM no grupo DCA em comparação com o grupo de controle (CA).

Para fins de ilustração, cada banda auto-radiografada representa um paciente. Para DCI, n=10; para DCA, n=10; para CI, n=8; e para CA, n=8, *p< 0,05 vs controle.

4.5 – Imunofluorescência para Caspase 3

Para confirmar os achados do ensaio de TUNEL e os resultados de expressão de proteínas relacionadas à apoptose foi realizada imunofluorescência para Caspase 3. A Caspase 3 foi significativamente menos expressa no TAM de pacientes com DC (grupo DCA), quando comparada com os controles (grupo CA) (p< 0,05). A Figura 17 ilustra este achado.

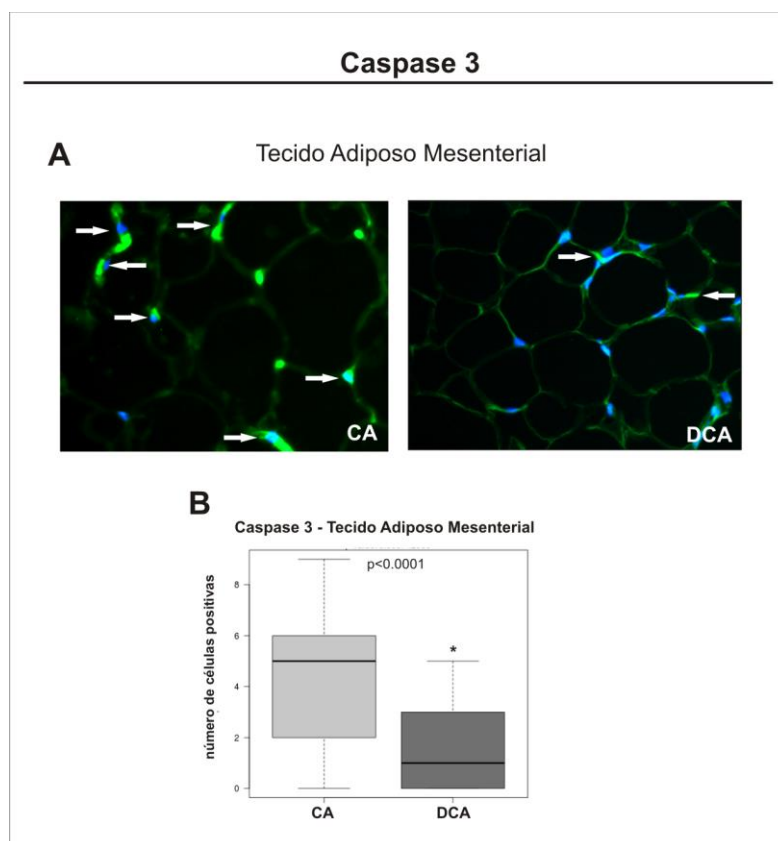


Figura 17 – Imunofluorescência para Caspase 3 no TAM do grupo DCA em comparação com o grupo controle (CA). (A) Cortes histológicos representativos do TAM

nos grupos CA e DCA, mostrando menor número de células positivas para FITC (verde-fluorescente) no citoplasma, co-marcado com DAPI (coloração nuclear: azul-fluorescente) no grupo DCA, em comparação com o controle (CA). As setas indicam as células positivas. As imagens foram obtidas usando aumento de 40X. (B) A análise quantitativa da imunofluorescência para a Caspase 3 no grupo DCA em comparação com o respectivo grupo de controle (CA). Para DCA, n=10; para CA, n=8, *p<0,05 vs controle.

5-DISCUSSÃO

Embora a DC apresente grande variação fenotípica, alguns aspectos macroscópicos comuns podem ser observados, em especial no que diz respeito ao aumento do tamanho do TAM perto da área intestinal afetada pela doença. Esse achado não é visto em pacientes com RCU, que desenvolvem processo inflamatório superficial na parede intestinal, sendo normalmente restrito às camadas mucosa e submucosa intestinal.^{10,44} O tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino, responsável pela produção e a liberação de hormônios e citocinas.⁵⁸ Sabe-se que os adipócitos mesentéricos de indivíduos normais são capazes de sintetizar várias citocinas pró- inflamatórias e anti-inflamatórias, e expressar *Toll-like receptor 4* para o reconhecimento de antígenos bacterianos.⁵⁹ No presente estudo revelaram-se anormalidades no TAM na DC, incluindo a infiltração de linfócitos e plasmócitos, inflamação perivascular, fibrose e diferenças no número e tamanho dos adipócitos, estando de acordo com o descrito por Peyrin-Biroulet L. e colaboradores em 2007.¹¹

Atualmente não há estudos sobre apoptose no TAM de indivíduos com DC, nem em modelo animal de hipertrofia do TAM com colite associada.⁶⁰ Com este propósito, foi utilizado ensaio de TUNEL para avaliar a apoptose na mucosa intestinal e no TAM, o que revelou um número significativamente menor de células apoptóticas na DC, quando comparado com os grupos de controle, não apenas na mucosa intestinal, mas também no TAM. A barreira intestinal é mantida devido às taxas de equilíbrio entre a morte celular e a proliferação de células epiteliais. A literatura mostra que a mucosa intestinal saudável tem altas taxas de proliferação de células na base do epitélio (cripta), com inibição de sinais de

apoptose, enquanto que as células epiteliais que compõem as vilosidades intestinais mostram vias ativadas que induzem à morte programada da célula. Este mecanismo não é totalmente compreendido, mas parece ser um processo de descamação celular associado à morte da célula.⁶¹⁻⁶³ Isso explica uma alta taxa de substituição das células epiteliais intestinais em condições de homeostase. No presente estudo, verificou-se uma baixa quantidade de células epiteliais TUNEL+ na DC em relação aos controles. Isto pode ser explicado pela presença de mucosa danificada consequente à inflamação, onde maior parte das vilosidades está perdida. Nesta situação, as células remanescentes poderão ser aquelas da base da cripta que mostram a baixa taxa de apoptose e elevada taxa de proliferação, a fim de recuperar a área afetada e restaurar a função. No que diz respeito à diminuição da apoptose em células da lâmina própria na DC em comparação com os controles, sendo que são principalmente células do sistema imune, isto confirma os resultados publicados anteriormente na literatura.^{13,40}

Além disso, a principal novidade deste estudo foi a correlação entre o número de células apoptóticas no TAM, tal como evidenciado pelo ensaio TUNEL, com o tamanho reduzido dos adipócitos. Peyrin-Biroulet et al.¹¹ anteriormente descreveram as características morfométricas das adipócitos no TAM espessado na DC, relatando que essas células eram pequenas em tamanho e superior quatro vezes em número, quando comparadas ao grupo controle. No entanto, esses autores não correlacionaram esses achados com a apoptose. A Figura 11C mostra a correlação significativa entre os parâmetros morfométricos (perímetro e área) das células adiposas e o número de células em apoptose no TAM de controles e DC. Estes resultados podem explicar, pelo menos em parte, as características interessantes do TAM na DC: o espessamento deste tecido pode ser devido a uma resistência das células adiposas à apoptose, o que leva ao aumento do número

de adipócitos, que apresentam perímetro e área menor do que o grupo controle. A ativação de NF-KB é um dos mecanismos descritos, que pode inibir a apoptose por indução da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica).^{64,65} Altos níveis de ativação de NF-KB são verificados em DC.^{66,67} Este fator é responsável por ativar a transcrição de um grande número de genes relacionados com a inflamação, entre eles, a transcrição do TNF- α . Isto pode explicar a resistência à apoptose em TAM de pacientes com DC. No entanto, não foi verificado positividade para Ki67 no TAM de pacientes com DC e controles. Este resultado está de acordo com o que é descrito na literatura sobre a célula adiposa em humanos. Em condições de não-obesidade, as células adiposas não são propensas a proliferação. A proliferação de adipócitos (hiperplasia) ocorre apenas em casos graves de obesidade, enquanto a hipertrofia ocorre em todos os estados obesos.⁶⁸ Todos os pacientes com DC incluídos no presente estudo, bem como os controles saudáveis não eram obesos, apresentando o IMC (índice de massa corporal) inferior a 25 kg/m².

Para descrever os mecanismos moleculares envolvidos com o defeito na apoptose detectado pelo TUNEL, estudou-se os transcritos de Bax e Bcl2 e também as respectivas proteínas codificadas na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC. Itoh et al. encontraram baixos níveis de Bax em células T da *lâmina própria* na DC, utilizando análise por citometria de fluxo, quando comparado com RCU e controles, indicando uma resistência à apoptose na DC.¹³ No presente estudo, baixos níveis de transcritos e da proteína Bax na mucosa intestinal de DC foram encontrados, em comparação com os controles. Além disso, observou-se que os baixos níveis de Bax foram localizados na *lâmina própria* e não no epitélio, como visto por meio de imunoistoquímica. Embora tenha havido baixa expressão transcripcional de Bcl2 no grupo DCI, não foram observadas diferenças em relação à expressão da proteína Bcl-2, como analisado por imunoistoquímica

neste grupo. Esses resultados reforçam os dados de Itoh et al.¹³ e Santaolalla et al.⁴⁰, que associam a redução da apoptose na *lâmina própria* com as vias relacionadas com Bax.

Ocorrência reduzida de apoptose também foi observada no TAM na DC. Esta alteração correlacionou significativamente com altos níveis de Bcl-2 e baixos de Caspase 3, e não com a expressão da proteína Bax. A expressão transcripcional baixa de Bcl2 observada em associação com os níveis mais elevados de proteína Bcl-2 no TAM (tal como detectado por imunistoquímica e imunoblot) no grupo DCA pode ser explicado por metilação de citosina, o que aumenta grandemente a estabilidade do promotor Bcl2 (tal como descrito por Lin et al.⁶⁹). Outra possibilidade é que os altos níveis da proteína Bcl-2 poderia induzir um controle de *feedback* negativo na transcrição do gene Bcl2. A diminuição da expressão da Caspase 3 no TAM do grupo DCA em comparação com o controle (grupo CA) confirmou a apoptose alterada neste tecido.

O objetivo deste estudo foi apresentar novos dados que podem explicar as características singulares do TAM em pacientes com DC. Dada ênfase atual que tem sido dada ao papel do tecido adiposo na homeostase intestinal e inflamação⁷⁰, a apoptose reduzida no TAM na DC pode explicar a alta taxa de sobrevivência dessas células, o que em grande quantidade pode expressar níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios. Por exemplo, expressão significativamente maior de proteína C - reativa (PCR), um marcador da inflamação, foi detectado no TAM de DC comparado à RCU e controles.⁷¹ Por outro lado, a comparação da expressão transcripcional de genes de adipócitos do TAM na DC com adipócitos de indivíduos saudáveis mostrou aumento dos níveis de genes pró-inflamatórios e diminuição daqueles que envolvem o metabolismo dos lipídeos.⁴⁵

O TAM pode ter um papel importante na manutenção da inflamação na DC, uma vez que a alteração entre o equilíbrio das citocinas e hormônios pró-inflamatórios e anti-inflamatórios neste tecido, bem como a deficiência de autofagia, foram previamente descritos na literatura.^{8,43,72-76} Entre estes estudos, um deles verificou níveis mais baixos de adiponectina (propriedades anti-inflamatórias) no soro periférico e no TAM de pacientes com DC ativa, revelando condições anti-inflamatórias deficientes.⁷³ Por outro lado, este tecido pode estar envolvido na manutenção da inflamação nas fases tardias da doença, e no mecanismo que conduz à recidiva durante o curso da doença. Por conseguinte, a diminuição da apoptose revelada no presente estudo, associada com os dados anteriores já publicados que demonstram a capacidade das células adiposas de produzir citocinas, além da sua plasticidade^{72-73,77}, poderiam conduzir a bases científicas para explicar o papel do TAM na DC.

6-CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se:

1. Redução da ocorrência de apoptose na mucosa intestinal e no TAM de pacientes com DC, comparando-se aos respectivos controles.
2. O índice apoptótico (TUNEL) no TAM (DC e controles) se correlacionou com os achados morfométricos e histológicos dos adipócitos, evidenciando que quanto menor o número de células em apoptose, menor o perímetro e o diâmetro dessas células.
3. Não se evidenciou proliferação celular no TAM de DC e controles.
4. O mecanismo de diminuição da apoptose na mucosa intestinal na DC esteve correlacionado com a diminuição dos níveis de Bax; e no TAM se caracterizou por aumento de Bcl-2.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26, 239–257.
2. Palmer CD, Rahman FZ, Sewell GW, et al. Diminished macrophage apoptosis and reactive oxygen species generation after phorbol ester stimulation in Crohn's disease. *PLoS One*. 2009;12(11):e7787.
3. Kang-Moon Lee, Ji Min Lee. Crohn's disease in Korea: past, present, and future. *Korean J Intern Med*. 2014; 29:558-570.
4. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther*. 2013; 137(3):283-97.
5. Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(7):1556-65.
6. Chuo JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2008; 8:458-466.

7. Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, et al. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. 2005; Gut 54:789–796.
8. Jung SH, Saxena A, Kaur K, et al. The role of adipose tissue-associated macrophages and T lymphocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Cytokine. 2013; 61:459-468.
9. Schäffler A, Schölmerich J. The role of adiponectin in inflammatory gastrointestinal diseases. 2009; Gut 58:317-22.
10. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, et al. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. Br J Surg. 1992; 79:955-8.
11. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M, Gonzalez F, et al. Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? Gut. 2007; 56:577-583.
12. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. News Physiol Sci. 2004; 19:124-128.
13. Itoh J, de La Motte C, Strong SA, et al. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. Gut. 2001; 49(1):35-41.

14. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, et al. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007; 139:143-156.
15. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Card Clin.* 2001; 19(1):57-74.
16. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Bernemann ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005; 84:627-639.
17. Catarzi S, Marcucci T, Papucci L, et al. Apoptosis and Bax, Bcl-2, Mcl-1 expression in neutrophils of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14(6):819-25.
18. Saraste A1, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(3):528-37.
19. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994; 73:2013–26.
20. Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, et al. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning.* 1996; 18(6):407-416.
21. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, et al. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 2003; 46(11):1498-1507.

22. Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, et al. Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)-mediated epithelial apoptosis – a putative role in pouchitis? *J Surg Res.* 2001; 98:27-32.
23. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce fas/apo-1 expression. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(6):3032-3040.
24. Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, et al. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(17):9166-9171.
25. Sionov RV1, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 1999; 18(45):6145-57.
26. Donald SP, Sun XY, Hu CA, et al. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2001;61(5):1810-5.
27. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408 (6810):307-10.
28. Raha S, Robinson, BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet.* 2001; 106(1):62-70.

29. Liu Z, Lu H, Shi H, et al. Puma overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65(5):1647-1654.
30. Reed JC. Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 1997; 34(4):9-19.
31. Miyashita T., Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994; 9(6):1799-1805.
32. Schendel, S. L., Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 1998;5(5):372-380.
33. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11615-11623.
34. Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, et al. Bcl-2 prevents bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 2001;276(21):18361-18374.
35. Martin, SJ e Green, DR. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell.* 1995; 82(3):349-352.
36. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science.* 1998; 281:1312-1316.

37. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272(29):17907-17911.
38. Nunez, G, Benedict MA, Hu Y, et al. Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 1998;17(25):3237-3245.
39. Ueyama H, Kiyahara T, Sawada N, et al. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut.* 1998; 43:48-55.
40. Santaolalla R, Mañé J, Pedrosa E, et al. Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(7):1490-500.
41. Boirivant M, Marini M, Di Felice G. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology.* 1999; 116(3):557-65.
42. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, et al. Altered expression of Fas ligand by colonic epithelium in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1998; 114:A929.

43. Leal RF, Coy CSR, Velloso LA, et al. Autophagy is decreased in mesenteric fat tissue but not in intestinal mucosae of patients with Crohn's disease. *Cell Tissue Res.* 2012; 350(3):549-52.
44. Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research. *Gut.* 2005; 54:742-744.
45. Zulian A, Canello R, Micheletto G, et al. Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease? *Gut.* 2012; 61:86-94.
46. Biroulet LP, Chamaillard M, Gonzalez F, et al. Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander. *Gut.* 2007; 56:577-583.
47. Raucci R, Rusolo F, Sharma A, et al. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine.* 2013; 61:1-14.
48. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67:1277-92.
49. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 2006; 27:762-78.
50. Vettor R, Milan G, Rossato M, et al. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 22(2):3-10.

51. Rodrigues VS, Milanski M, Fagundes JJ, et al. Serum levels and mesenteric fat tissue expression of adiponectin and leptin in patients with Crohn's disease. Clin Exp Immunol. 2012; 170(3):358-64.
52. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, et al. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's disease Study. Gastroenterology. 1976; 70(3):439-444.
53. Sanders EJ, Wride MA. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. Histochem J. 1996; 28:275-281.
54. Allen TC. Hematoxilina y Eosina. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos da América (ARP), 1995:55-59.
55. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem. 1981; 29:577-580.
56. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-254.

57. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, et al. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:12490-12495.
58. Karmiris K, Koutrobakis IE, Kouroumalis EA. The emerging role of adipocytokines as inflammatory mediators in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11(9):847-855.
59. Pietsch J, Batra A, Stroh T, et al. Toll-like receptor expression and response to specific stimulation in adipocytes and preadipocytes: on the role of fat in inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1996; 1072:407-9.
60. Olivier I, Théodorou V, Valet P, et al. Is Crohn's creeping fat an adipose tissue? *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(3):747-757.
61. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(1):19-33.
62. Bullen TF, Forrest S, Campbell F, et al. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest*. 2006; 86:1052-63.
63. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, et al. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology*. 2011; 140:1208-18.

64. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, et al. NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(9):5923.
65. Sun XF1, Zhang H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol.* 2007; 22(12):1387-98.
66. Rogler G, Brand K, Vogl D, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1998; 115:357–69.
67. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998; 42:477-84.
68. Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396(1):101-4.
69. Lin J, Hou JQ, Xiang HD, et al. Stabilization of G-quadruplex DNA by C-5-methylcytosine in bcl-2 promoter: implications for epigenetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 433(4):368-73.
70. Drouet M, Dubuquoy L, Desreumaux P, et al. Visceral fat and gut inflammation. *Nutrition.* 2012; 28(2):113-7.

71. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, et al. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut*. 2012; 61:78-85.
72. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004; 53:1285-92.
73. Batra A, Zeitz M, Siegmund B. Adipokine signaling in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15(12):1897-1905.
74. Barbier M, Vidal H, Desreumax P, et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol*. 2005; 27:1-5.
75. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, et al. Colonic leptin: source of a novel pro-inflammatory cytokine involved in inflammatory bowel disease. *J Faseb*. 2004; 18(6):696-698.
76. Paul G, Schäffler A, Neumeier M, et al. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12:47-477.
77. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9850-5.

8-ANEXOS

8.1 - Questionário específico

Questionário de Inclusão dos Doentes

Nome: _____ Prontuário: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Etnia: _____ Procedência: _____

Tempo de evolução da DC: _____

Manifestações extra-intestinais: _____

DC perianal: () presente _____ () ausente

Data da Cirurgia: ____/____/____

Cirurgia realizada: _____

IADC (Índice de atividade da DC) no momento da cirurgia: _____

Medicações em uso: _____

Indicação da Cirurgia: () Fístula _____ () Abscesso () Estenose

() Outros _____

Peso: _____ Kg IMC: _____

Complicações intra-operatórias: _____

8.2 - Índice de Atividade da doença de Crohn

Índice de Atividade da Doença de Crohn			
Variável	Valores obtidos	Fator Multiplicador	Subtotal
Média do número de evacuações líquidas ou pastosas por dia nos últimos 7 dias		x 2	
Dor abdominal, em média nos últimos 7 dias(0-ausente,1-dor leve,2-dor moderada,3-dor intensa)		X 5	
Sensação de bem-estar, média dos últimos 7 dias (0-ótimo, 1-bom,2-regular,3-ruim,4-péssimo)		X 7	
Número de complicações 1- Artrite ou Artralgia 2- Irite ou Uveíte 3- Eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide 4- Fissura anal ou fístula ou abscesso anal 5- Outras fístulas 6- Febre		X 20	
Uso de antidiarréicos 0-não, 1- sim		X 30	
Massa abdominal (0-ausente,1-duvidosa,5-definida)		X 10	
Hematócrito Homem(47-Ht) Mulher(42-Ht)		X 6	
Peso percentual abaixo ou acima do peso corporal habitual		X 1	
Total IADC			

Valores de Referência:

Remissão = 150

Leve 150-250

Moderado 250-350

Grave > 350

8.3 - Aprovação pelo Comitê de Ética



CEP, 22/11/11.
(PARECER CEP: Nº 356 /2009)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, DE FATORES DE SINALIZAÇÃO NUCLEAR E DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À APTOSE CELULAR EM TECIDO INTESTINAL E GORDURA MESENTERIAL DE PORTADORES DE DOENÇA DE CHRON E CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GENOTÍPICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Franco Leal

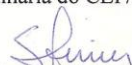
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a adendo que inclui o projeto “**ESTUDO DAS VIAS DE APOPTOSE EM TECIDO INTESTINAL E GORDURA MESENTERIAL DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE CROHN**”, com a finalidade de doutorado da aluna Cilene Bicca Dias, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

8.4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (doentes com doença de Crohn)

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino, causada pela doença de Crohn, por meio da análise da peça cirúrgica já previamente armazenada, na ocasião de meu tratamento. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo que sejam realizados exames anátomo-patológico e de biologia molecular adicionais em fragmentos da peça cirúrgica armazenados na rotina por ocasião de minha cirurgia, e enviados para este estudo.

Autorizo a coleta de sangue por meio de punção no braço (membro superior) para complementação do estudo.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e sobre meu acompanhamento pós-operatório, caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20____.

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 35218936.

8.5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle 1)

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino, causada pela doença de Crohn. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Participarei como grupo controle, autorizando e concordando que sejam realizadas biópsias do tecido gorduroso abdominal durante o procedimento cirúrgico eletivo a que serei submetido. Estas biópsias serão enviadas para exames anátomo-patológico e de biologia molecular a fim de comparação como grupo controle normal. Esta biópsia não afetará o procedimento cirúrgico.

Autorizo a coleta de sangue por meio de punção no braço (membro superior) para complementação do estudo, caso seja necessária.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e sobre meu acompanhamento pós-operatório, caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20____.

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 35218936.

8.6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle 2)

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino, causada por doença de Crohn. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo, ao ser submetido ao exame endoscópico do intestino por outros motivos de doença, fornecer biópsias da porção terminal do intestino fino, que serão enviadas para este estudo, como amostras comparativas.

Fui informado(a) que os riscos decorrentes do exame endoscópico do intestino são perfuração do intestino e sangramento, que podem ocorrer em menos de 1% dos casos, e os riscos decorrentes da medicação utilizada são alergia e diminuição da pressão. Esta medicação poderá ser ou não utilizada.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral caso seja necessário.

Campinas, ____ de _____ de 20____.

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética e Pesquisa local: 35218936.

8.7 - Artigo aceito para publicação na revista PLoS One (próximas páginas)

Defective apoptosis in intestinal and mesenteric adipose tissue of Crohn's disease patients.

Authors:

Cilene Bicca Dias, M.S.^{1,2,3}, Marciane Milanski, Ph.D.², Mariana Portovedo, M.S.², Vivian Horita, B.Sc.⁴, Maria L. S. Ayrizono, M.D., Ph.D.¹, Núria Planell, B.Sc.⁵, Cláudio S. R. Coy, M.D., Ph.D.¹, Lício A. Velloso, M.D., Ph.D.², Luciana R. Meirelles, M.D., Ph.D.⁴, Raquel F. Leal, M.D., Ph.D.^{1,2*}.

Abstract

Background: Crohn's disease (CD) is associated with complex pathogenic pathways involving defects in apoptosis mechanisms. Recently, mesenteric adipose tissue (MAT) has been associated with CD ethiopathology, since adipose thickening is detected close to the affected intestinal area. However, the potential role of altered apoptosis in MAT of CD has not been addressed. Aims: To evaluate apoptosis in the intestinal mucosa and MAT of patients with CD. Methods: Samples of intestinal mucosa and MAT from patients with ileocecal CD and from non-inflammatory bowel diseases patients (controls) were studied. Apoptosis was assessed by TUNEL assay and correlated with the adipocytes histological morphometric analysis. The transcriptional and protein analysis of selected genes and proteins related to apoptosis were determined. Results: TUNEL assay showed fewer apoptotic cells in CD, when compared to the control groups, both in the intestinal mucosa and in MAT. In addition, the number of apoptotic cells (TUNEL) correlated significantly with the area and perimeter of the adipose cells in MAT. Transcriptomic and proteomic analysis reveal a significantly lower transcript and protein levels of Bax in the intestinal mucosa of CD, compared to the controls; low protein levels of Bax were found localized in the *lamina propria* and not in the epithelium of this tissue. Furthermore, higher level of Bcl-2 and low level of Caspase 3 were seen in the MAT of CD patients. Conclusion: The defective apoptosis in MAT may explain the singular morphological characteristics of this tissue in CD, which may be implicated in the pathophysiology of the disease.

Keywords: Crohn's disease, inflammatory bowel disease, cytokines, apoptosis, mesenteric adipose tissue.

Introduction

The pathophysiology of CD is not yet completely elucidated, but environmental factors and inappropriate responses of the immune system in genetically-susceptible individuals have been proposed as possible causes of the disease.[1-3] A common feature in chronic CD with transmural inflammation is hypertrophy of the mesenteric adipose tissue (MAT), close to the affected intestinal area; furthermore, the potential involvement of this phenomenon in the disease's pathophysiology has been recently suggested. This alteration extends from the mesentery, partially covers the circumference, presents an outer layer of intestinal fat and may involve the small and large bowel.[4] Differential expression of adipocytokines and pro-inflammatory cytokines, as well as, histological alterations have been previously described in the MAT of CD individuals.[5-8] However, no studies regarding apoptosis pathways in this tissue have been yet reported.

Apoptosis is a known physiological process of programmed cell death and is essential for the development and homeostasis of tissues and organs as well as the elimination of hazards and abnormal cells.[9,10] In the past 30 years, due to the importance of this cellular mechanism in many diseases, methods have been developed for the detection of apoptosis and of the proteins involved in the process. Apoptosis can be induced by two main pathways: the intrinsic (mitochondrial), in which Bax is one of the most important pro-apoptotic protein, and the extrinsic pathways.[11] In addition, there is a close relationship between these apoptosis-related pathways and inflammatory pathways. TNF- α , an important pro-inflammatory cytokine, is involved in the activation of apoptosis, while NF- κ B has an anti-apoptotic function, activating the expression of other members of the Bcl-2 family, such as Bcl-2, which prevents cell death.[12,13]

While apoptosis in MAT has not yet been investigated in CD, studies regarding apoptosis in the intestinal tissue of CD patients, and in other inflammatory bowel diseases, such as, ulcerative colitis (UC) and in the ileal pouch of UC patients, have been previously published.[14-16] Reports show that the T cells of CD mucosa exhibit resistance to a variety of signals that induce apoptosis, including the differential expression of proteins from the Bcl-2 family and differences in the ratio between pro and anti-apoptotic proteins[10,17], suggesting that apoptosis may be one of the mechanisms involved in CD pathophysiology. Furthermore, defective apoptosis in immune cells, such as macrophages and neutrophils, has been reported.[18,19]

Whether the thickening of MAT acts as a barrier to the inflammatory process, or is a secondary factor that maintains the inflammatory process, resulting in the transmural aspect of CD, is unknown.[4,20,21] Therefore, this study aimed to evaluate the potential contribution of apoptosis in accumulation of MAT, as well as the relationship between altered apoptosis in MAT and in intestinal tissue involved by CD. To do this, we detected apoptotic DNA strand breaks using the TUNEL assay, in addition to analyzing the transcriptional and protein expressions of selected molecules, to determine the pathways potentially involved in altered apoptosis.

Material and Methods

- Sample collection

Intestinal mucosal and MAT samples, located near the affected intestinal area, were taken from 10 patients with ileocecal CD who underwent surgical resection [median age, 34.9 (range, 14-60) years; 50% male]. We labeled as ICD group for intestinal mucosa of CD patients and ACD for MAT of these patients. The presence of disease activity was assessed by colonoscopy before surgery and all patients had a Crohn's disease activity index (CDAI) [22] of more than 250 points. The control groups were composed of 8 patients who underwent intestinal resection for non-inflammatory disease, with normal distal ileum (MAT control group – AC group) [median age, 55.6 (range, 39-70) years; 62.5% male; 37.5% female], and 8 patients with normal ileocolonoscopy (control intestinal tissue group – IC group) [median age, 50.4 (range, 33-60) years; 37.5% male; 62.5% female]. All CD patients and healthy controls had body mass index, (weight in kilograms (kg) divided by height in meters squared) (BMI) less than 25 points.

- TUNEL Apoptosis Detection analysis

For detection and quantification of apoptosis in the intestinal mucosa and MAT samples, the TUNEL Apoptosis Detection assay was performed (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) [23], using a kit from Millipore® (Billerica, MA). This assay is based on the marking of DNA strand breaks by the technique of labelling of DNA with terminal dUTP (FITC-conjugated). We used the protocol recommended by the manufacturer. The nuclear staining was performed with propidium iodide (PI). Photomicrographs were taken using a Leica DM 4500B microscope and Leica DFC 290 digital camera system with Leica Application Suite version 3.8 Software (Leica Microsystems, Wetzlar). Three fields for

each sample were captured. Any cell type showing nuclear co-labeling (FITC+PI) was considered positive for quantitative analysis, which was analyzed by a blinded observer (C.B.D.), in a panchromatic objective field of higher magnification 40X.

- Histological analysis (hematoxylin - eosin)

Biopsies from the mucosa of the terminal ileum and from the MAT, near the affected intestinal area, were embedded in paraffin blocks for histological analysis. Sections of 5µm were cut and stained with hematoxylin and eosin dye.

Photomicrographs were taken using a Zeiss Axiophot microscope and Cannon Power Shot G5 digital camera system (Cannon Inc., Tokyo). Fifty fields of higher magnification (40X) were scanned for each sample and 10 random fields were analyzed. The number of adipocytes was counted and their area and perimeters were obtained. The morphometric results were quantified by a blinded observer (C.B.D.) using the software Image J (Image Processing and Analysis in Java, public domains, rsbweb.nih.gov/ij/21).

- Bax, Bcl-2 and Ki67 Immunohistochemical staining

Histological sections of 5µm were also performed for immunostaining procedures of samples included in paraffin blocks. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide/10 mM PBS pH 6.0 for 15 min. Afterwards, the sections were microwaved in 3% milk buffer for 30 min and incubated overnight with primary antibodies; anti-Bax (DAKO A/S Denmark; N-20 5c493, rabbit polyclonal), anti-Bcl-2 (DAKO A/S Denmark; N-19 5c492, mouse polyclonal), anti-Ki67 (DAKO A/S Denmark; F0788, mouse monoclonal) with dilutions of 1:600, 1:150 and 1:500 respectively at 20°C. The sections were incubated with post primary block and secondary antibodies (Novocastra™ Laboratories Ltd; Novolink RE 7260-K) for 1 h, and processed using the DAB reaction (0.5 mg/ml, Sigma, USA, St Louis). Any cell type showing cytoplasmic staining was considered positive for quantitative analysis[11,24], which was performed by a blinded observer (C.B.D.). The microscope and the software used to capture images for quantitative analysis were the same as those used for the hematoxylin and eosin study.

- Caspase 3 Immunofluorescence staining

Histological sections of 5µm were also performed for immunofluorescence procedures of samples included in paraffin blocks. The preparation of slides was performed (deparaffinization and hydration), followed by antigen retrieval. The tissue was incubated in primary antibody anti-Caspase 3 (Santa Cruz CA; H-277: sc-

7148, rabbit polyclonal), with a dilution of 1:200 at 4°C overnight and after with secondary antibody conjugated with FITC (goat anti-rabbit IgG-FITC: sc-2012) in the same concentration for 1 hour. DAPI was used for nuclear staining. Any cell type showing co-labeling in the cytosol for FITC were considered positive for quantitative analysis[11], which was performed by a blinded observer (C.B.D.). The microscope and the software used to capture images for quantitative analysis were the same as those used for the TUNEL study.

- RT-PCR Analysis

Biopsies from the mucosa of the terminal ileum and from the MAT, located near the affected intestinal area, were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. RNA purity and concentration were determined by UV spectrophotometry at 260nm. RNA was treated with RNase-free Dnase (RQ1 RNase-free Dnase, Promega) and then reverse transcribed using oligo (dT) primers and reverse transcriptase (RevertAid™ Kit, Fermentas). The reaction mixture (20µl) was incubated at 42°C for 60 min, then for 10 min at 70 °C, and cooled on ice. RT-PCR was performed on resulting cDNA, using the manufacturer's protocol, in a 25µl reaction volume per capillary. Gene-specific primers (Applied Biosystems™) were: Hs00180269_m1 (Bax); Hs00608023_m1 (Bcl2); NM_002046.3 (GAPDH). RT-PCR amplification consisted of an initial denaturation step (50°C for 2 min and 95°C for 10 min), 40 cycles of denaturation (95°C for 15s), annealing (53°C for 20s) and extension (72°C for 20s), followed by a final incubation at 60°C for 1 min. All measurements were normalized by the expression of GAPDH gene, considered as a stable housekeeping gene. Gene expression was determined using the delta-delta Ct method: $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($\Delta\Delta CT = [Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{GAPDH})]_{\text{patient}} - [Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{GAPDH})]_{\text{control}}$).

Real-time PCR analysis of gene expression was performed in a 7500 SDS sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of cDNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, were obtained by five-point, two-fold dilution curve analysis for each gene. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems).

- Immunoblotting – Gel electrophoresis:

For total protein extract preparation, the fragments of MAT, which were previously snap-frozen and stored at -80°C, were homogenized in solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100mM Tris-HCl (pH 7.4), 100mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10mM sodium orthovanadate,

2.0mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec. Insoluble material was removed by centrifugation (20 min at 11000 rpm at 4°C). The protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford dye binding method.[25] Aliquots of the resulting supernatants containing 50 µg total proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies.[26]

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, Triton X-100, Tween 20, and glycerol were from Sigma (St. Louis, MO). Nitrocellulose paper (BA85, 0.2µm) was from Amersham (Aylesbury, UK). The anti-Bax (sc-493, rabbit polyclonal) and anti-Bcl-2 (sc-492, rabbit polyclonal) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Molecular weights of proteins were assessed using the PageRuler™ from Fermentas® (Glenburnie, MD). The signal was detected by a chemiluminescent reaction (SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce Biothecnology, Inc. Rockford, IL).

The results of blots are presented as direct comparisons of bands in autoradiographs and were quantified by densitometry using the Gel-Pro Analyzer 6.0 software (Exon-Intron Inc., Farrell, MD). All results were normalized by β-actin.

- Statistical Analysis

The Pearson's regression coefficient (r) was used for correlations between TUNEL results and morphometric data. A non-parametric test (Mann-Whitney U, unpaired) was performed using R Statistics Software (version 2.15.0) for statistical analyses to compare the MAT of the CD group and its respective adipose control group. The intestinal tissue of the CD group and its respective intestinal control group were also compared separately. The level of significance was set at $p < 0.05$.

- Ethical Considerations

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Ethics Committee of the Clinical Hospital of the Faculty of Medical Sciences (University of Campinas, Sao Paulo, Brazil). All biopsies were obtained after patients gave their written informed consent. In the case of minors/teenagers enrolled in our study, parents or guardians signed the informed consent on their behalf. All consents forms are kept as hard copy. The study was carried out in the Coloproctology Unit

of the Surgery Department, and at the Cell Signaling Laboratory of the Department of Internal Medicine, University of Campinas.

Results

TUNEL assay reveals altered apoptosis in the intestinal mucosa and in MAT of CD individuals

The macroscopic increase of MAT close to the affected intestinal area is a common feature in CD, in contrast to observations in other inflammatory bowel diseases. Therefore, our first objective was to determine, using TUNEL assay, the overall rate of apoptotic cells in intestinal mucosa and MAT samples of CD, and compare with their respective controls. This analysis showed a significantly lower number of apoptotic cells in the ICD and ACD groups, when compared to the respective control groups (IC and AC) ($p < 0.05$). A representative image of TUNEL assay is shown in Figure 1 (A and C), where the apoptotic cells are well identified in orange in the different groups. Figure 1 (B and D) shows the quantitative analysis for all assessed samples.

Since we found an impaired apoptosis in the MAT of CD group compared to controls, one of our aims was also to analyze the morphometric characteristics of MAT, near the intestinal affected area, and correlate these findings with the apoptotic index (TUNEL). Figure 1 (E and F) demonstrates the histological aspect (hematoxylin and eosin) and the mean perimeter and area of the adipose cells of the AC and ACD groups. The adipocytes of the ACD group presented a lower mean area and perimeter, when compared to the controls (AC group) ($p < 0.05$). There was a strong positive correlation between the adipocyte area and perimeter with the apoptotic index, as shown in Figure 1G. In addition, immunohistochemistry for Ki67 was performed in all samples from ACD and AC groups to access the proliferation rate of the adipocytes and verify if this could be related to the morphometric characteristics of MAT. However, no evidence of proliferation was verified in MAT from both groups (Figure 1H).

Figure 1

Transcriptional expression of apoptosis-related genes in the intestinal mucosa and in MAT reveals differences between CD and controls

Since alterations were detected in overall rate of apoptosis by TUNEL in intestinal mucosa and in MAT of CD patients compared to the controls, we decide to explore the molecular mechanisms involved. Two relevant genes related to apoptosis pathway were studied; Bax and Bcl2, which encode for a pro-apoptotic and

an anti-apoptotic protein, respectively. We found a significant decrease of Bax transcriptional expression in the intestinal mucosa of patients with CD, compared to the control ($p < 0.05$), while no differences were detected in MAT ($p > 0.05$). In addition, Bcl2 transcriptional expression was significantly decreased in the intestinal mucosa and in MAT in CD, when compared to the respective controls ($p < 0.05$). These findings are shown in Figure 2.

Figure 2

Protein analysis by immunohistochemistry confirms transcriptional expression of Bax in the intestinal mucosa of CD patients

In order to validate our transcriptional finding we used immunohistochemistry in the same samples used in PCR analysis. Figure 3 (A and B) shows a representative picture of Bax staining for intestinal tissue and MAT. A clear positive immunoreactivity was observed for intestinal tissue, while MAT samples were all negative. The quantitative analysis reveals a significant decrease in Bax expression restricted in the *lamina propria* of CD patients, clearly shown in Figure 3 (A and C), according with transcriptional results. However, no differences were found in epithelium from intestinal mucosa.

Figure 3

Immunohistochemical protein analysis revealed a higher expression of Bcl-2 in MAT of CD patients

CD patients presented significantly higher protein expression of Bcl-2 in MAT, compared to the controls, as seen in Figure 4 (B and D). Positive immunoreactivity for Bcl-2 was also observed in the intestinal mucosa (Figure 4A); however, quantitative analysis showed no statistical difference between the groups ($p > 0.05$) (Figure 4C).

Figure 4

Confirmation of the expression of Bax and Bcl-2 proteins in the intestinal mucosa and in MAT of CD patients by immunoblotting

Due to the conflicting data for Bcl2 transcriptional expression and the immunohistochemistry study of Bcl-2, we assessed protein expression by immunoblotting. The Bcl-2 anti-apoptotic protein was found to be significantly more expressed in the MAT of CD patients (ACD group), when compared to controls (AC group) ($p < 0.05$). No differences were detected in the intestinal mucosa between the ICD and IC groups ($p > 0.05$). See Figure 5.

Immunoblotting for Bax, shown in Figure 5, was also performed in intestinal mucosa and MAT from CD and controls. The levels of Bax were in accordance to the transcriptional results.

Figure 5

Caspase 3 expression confirms defective apoptosis in MAT of CD patients

To confirm the TUNEL and protein-related apoptosis expression results, immunofluorescence for Caspase 3 was performed. The Caspase 3 was significantly less expressed in the MAT of CD patients (ACD group), when compared to controls (AC group) ($p < 0.05$). Figure 6 illustrates this finding.

Figure 6

Discussion

Although phenotypic variation occurs in CD patients, some common macroscopic aspects can be observed, especially with regard to the thickening of the MAT close to the affected intestinal area. This feature is not seen in patients with UC who develop a superficial inflammatory process in the intestinal wall that is usually restricted to the intestinal mucosa and submucosa layers.[7,27] The adipose tissue is considered an important endocrine organ, responsible for the production and release of hormones and cytokines.[28] It is known that mesenteric adipocytes of normal individuals are able to synthesize several pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and express Toll-Like Receptor 4 for the recognition of bacterial antigens.[29] These studies revealed abnormalities in the MAT of CD patients, including the infiltration of macrophages and T cells, perivascular inflammation, fibrosis and differences in adipocytes number and size.

There are currently no studies regarding apoptosis in the MAT of CD individuals, nor in the animal model of hypertrophied MAT with associated colitis.[30] With this purpose in mind, we used TUNEL assay to evaluate apoptosis in the intestinal mucosa and in MAT, which revealed significantly fewer apoptotic cells in CD, when compared to the control groups, not only in the intestinal mucosa, but also in MAT. Intestinal barrier is maintained due to balance rates of epithelial cell proliferation and cell death. The literature has shown that healthy intestinal mucosa has high rates of cell proliferation at the base of the epithelium (crypt), with inhibition of signals to apoptosis, whereas epithelial cells that compound the intestinal villi shows cell death activation. This mechanism is not totally understood, but it seems to be a shedding cell associated to cell death.[31-33] This explains the high turn-over of the intestinal epithelial cells in homeostasis conditions.

In the present study, we found a low amount of TUNEL-positive epithelial cells in CD compared to controls. This may be explained by the presence of damaged mucosa consequent to inflammation, where most part of the villi are lost. In this situation, the remaining cells may be the ones that show low rate of apoptosis and high rate of proliferation in order to recover the affected area and restore function. Concerning the decreased apoptosis in *lamina propria* cells of CD compared to the controls, and the fact that part of these cells are immune cells, this confirms previous published results in the literature [10,17].

In addition, the main novelty of our study was the correlation of the number of apoptotic cells in MAT, as evidenced by TUNEL, with reduced adipocyte size. Peyrin-Biroulet et al.[8] previously described the morphometric features of the adipocytes from hypertrophied CD MAT relating that these cells were small in size and four times higher in number when compared to control adipose tissue. However, these authors did not correlate these findings with apoptosis. Figure 1G shows the significant correlation between the morphometric parameters (perimeter and area) of the adipose cells and the number of the apoptotic cells in the MAT of CD and controls. These findings may explain, at least in part, the intriguing features of MAT in CD: the thickening of this tissue may be due to a resistance of adipose cells to undergo apoptosis, leading to an increased number of adipocytes that exhibit a lower perimeter and area than the control group. NF-KB activation is one of the mechanisms described that can inhibit apoptosis by inducing Bcl-2 expression (anti-apoptotic protein). [34,35] High levels of NF-KB activation are verified in CD [36,37]. This factor is responsible for activate transcription of a large number of genes related to inflammation, among them, TNF- α transcription. This may explain the resistance to apoptosis in MAT of CD patients. We did not verify positivity for Ki67 in MAT from CD patients and controls. This result is in accordance with what is described in the literature concerning fat cell turn over in humans. In non-obese conditions, adipose cells are not prone to proliferation. Adipocytes proliferation (hyperplasia) occurs only in severe cases of obesity, while hypertrophy occurs across all obese states. [38] All CD patients included in the present study, as well as the healthy controls were not obese, presenting BMI (body mass index) less than 25.

To describe the molecular mechanisms involved with the defective apoptosis detected by TUNEL, we studied Bax and Bcl2 transcripts and also the respective encoded proteins in the intestinal mucosa and MAT of CD patients. Itoh et al. found low levels of Bax in CD *lamina propria* T cells, using flow cytometric analysis, when compared to UC and controls, indicating a resistance to apoptosis in CD.[10] In the present

study, we report findings of low transcript and protein levels of Bax in the intestinal mucosa of CD, compared to the control intestinal mucosa. Moreover, we observed that the low protein levels of Bax (as seen by immunohistochemistry) were localized in the *lamina propria*, and not in the epithelium. Although there was low transcriptional expression of Bcl2 in the ICD group, no differences were observed with regard to Bcl-2 protein expression, as analyzed by immunohistochemistry in this group. These findings reinforce the data of Itoh et al.[10] and Santaolalla et al.[17], who associated the defective apoptosis in the *lamina propria* to the Bax-related pathways.

A defective apoptosis was also seen in the MAT of CD. This apoptosis correlated significantly with high levels of Bcl-2 and Caspase 3, and not with Bax protein expression. The low Bcl2 transcriptional expression observed in association with higher protein MAT levels of Bcl-2 (as detected by immunohistochemistry and immunoblotting) in the ACD group could be explained by cytosine methylation, which greatly increases the stability of the Bcl2 promoter (as described by Lin et al.[39]). Another possibility is that high Bcl-2 protein levels could induce a negative feedback control of Bcl2 gene transcription. The decreased expression of Caspase 3 in MAT of ACD group compared to the control (AC group) confirmed an altered apoptosis in this tissue.

The point of our study is to present new data that may help to explain the singular characteristics of MAT in CD patients. Given the current emphasis that has been given to the role of adipose tissue in gut homeostasis and inflammation [40], the defective apoptosis of MAT in CD may explain the high survival rate of these cells, which in large amount may express higher levels of pro-inflammatory mediators. For instance, significantly higher expression of C-reactive protein (CRP), an inflammatory marker, was detected in the MAT of CD compared to UC and controls.[41] Moreover, a comparison of adipocyte gene expression from MAT of CD and in healthy individuals showed up-regulation of pro-inflammatory genes and decrease of genes involving lipid metabolism.[21]

MAT may have an important role in the maintenance of inflammation in CD, since the altered balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory factors in this tissue, as well as defective autophagy, have been previously reported in the literature.[5,42-48] Among these studies, one of them verified lower levels of adiponectin (anti-inflammatory properties) in peripheral serum and in MAT of active CD patients, revealing deficient anti-inflammatory conditions. [43] Moreover, this tissue may be involved in

the maintenance of inflammation in the late stages of the disease, and in the mechanism that leads to relapses during the course of the disease. Therefore, the decreased apoptosis revealed in the present study, associated with already published previous data that have shown the capacity of the adipose cells to produce cytokines and its plasticity [42,44,49], could lead to insights for further research that may explain the complete role of MAT in CD.

Acknowledgements

We thank FAPESP (Foundation for Research Support of the Sao Paulo State) for financial support and CAPES-Brazil for research fellowship (C.B.D.). We thank Dr. A. Salas and Dr. J. Panés for their review of our manuscript, Ms. A.C.S. Piazza for assistance in the immunohistochemical staining, Dr. J. Contin for assistance in TUNEL assay and N. Conran for English review.

References

1. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, et al. (2013) Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 137(3):283-97.
2. Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. (2013) The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(7):1556-65.
3. Chao JH. (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 458:458-466.
4. Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, Kihara S, Okamoto Y, et al. (2005) Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut* 54:789-796.
5. Jung SH, Saxena A, Kaur K, Fletcher E, Ponemone V, et al. (2013) The role of adipose tissue-associated macrophages and T lymphocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Cytokine* 61:459-468.
6. Schäffler A, Schölmerich J. (2009) The role of adiponectin in inflammatory gastrointestinal diseases. *Gut* 58:317-22.
7. Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, Shepherd NA. (1992) Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg* 79:955-8.
8. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M, Gonzalez F, Beclin E, Decourcelle C, et al. (2007) Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut* 56:577-583.
9. Ziegler U, Groscurth P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19:124-128.
10. Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C, et al. (2001) Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 49(1):35-41.

11. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. (2007) Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 139:143-156.
12. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. (2001) The Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Card Clin* 19(1):57-74.
13. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Bernemann ZN. (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84:627-639.
14. Ueyama H, Kiyahara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, et al. (1998) High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 43:48-55.
15. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, et al. (2003) Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 46(11):1498-1507.
16. Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, O'Connell J, Neary P, et al. (2001) Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)- mediated epithelial apoptosis – a putative role in pouchitis? *J Surg Res* 98:27-32.
17. Santaolalla R, Mañé J, Pedrosa E, Lorén V, Fernández-Bañares F, et al. (2011) Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 17(7):1490-500.
18. Palmer CD, Rahman FZ, Sewell GW, Ahmed A, Ashcroft M, et al. (2009) Diminished macrophage apoptosis and reactive oxygen species generation after phorbol ester stimulation in Crohn's disease. *PLoS One* 12(11):e7787.
19. Catarzi S, Marcucci T, Papucci L, Favilli F, Donnini M, et al. (2008) Apoptosis and Bax, Bcl-2, Mcl-1 expression in neutrophils of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 14(6):819-25.
20. Karmiris K, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. (2008) Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin - Implications for inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 52:855-866.
21. Zulian A, Canello R, Micheletto G, Gentilini D, Gilardini L, et al. (2012) Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease? *Gut* 61:86-94.
22. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. (1976) Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's disease Study. *Gastroenterology* 70(3):439-444.
23. Sanders EJ, Wride MA. (1996) Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem J* 28:275-281.
24. Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580.
25. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
26. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, et al. (1996) Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490-12495.
27. Schaffler A, Herfarth H. (2005) Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research. *Gut* 54:742-744.

28. Karmiris K, Koutrobakis IE, Kouroumalis EA. (2005) The emerging role of adipocytokines as inflammatory mediators in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 11(9):847-855.
29. Pietsch J, Batra A, Stroh T, Fedke I, Glaubien R, et al. (2006) Toll-like receptor expression and response to specific stimulation in adipocytes and preadipocytes: on the role of fat in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1072:407-9.
30. Olivier I, Théodorou V, Valet P, Castan-Laurell I, Guillaud H, et al. (2011) Is Crohn's creeping fat an adipose tissue? *Inflamm Bowel Dis* 17(3):747-757.
31. Barker N. (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1):19-33.
32. Bullen TF, Forrest S, Campbell F, Dodson AR, Herselman MJ, et al. (2006) Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest* 86:1052-63.
33. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Edelblum KL, Duckworth CA, et al. (2011) The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* 140:1208-18.
34. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin Jr AS. (1999) NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19(9):5923.
35. Sun XF, Zhang H. (2007) NF κ B and NF κ BI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol* 22(12):1387-98.
36. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, et al. (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115:357-69.
37. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 42:477-84.
38. Arner P, Spalding KL. (2010) Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 396(1):101-4.
39. Lin J, Hou JQ, Xiang HD, Yan YY, Gu YC, et al. (2013) Stabilization of G-quadruplex DNA by C-5-methyl-cytosine in bcl-2 promoter: implications for epigenetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 433(4):368-73.
40. Drouot M, Dubuquoy L, Desreumaux P, Bertin B. (2012) Visceral fat and gut inflammation. *Nutrition* 28(2):113-7.
41. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, et al. (2012) Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut* 61:78-85.
42. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, et al. (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285-92.

43. Rodrigues VS, Milanski M, Fagundes JJ, Torsoni AS, Ayrizono ML, et al. (2012) Serum levels and mesenteric fat tissue expression of adiponectin and leptin in patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 170(3):358-64.
44. Batra A, Zeitz M, Siegmund B. (2009) Adipokine signaling in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15(12):1897-1905.
45. Barbier M, Vidal H, Desreumax P, Dubuquoy L, Bourreille A, et al. (2005) Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 27:1-5.
46. Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, et al. (2004) Colonic leptin: source of a novel pro-inflammatory cytokine involved in inflammatory bowel disease. *J FASEB* 18(6):696-698.
47. Paul G, Schäffler A, Neumeier M, Fürst A, Bataillle F, et al. (2006) Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:47-477.
48. Leal RF, Coy CS, Velloso LA, Dalal S, Portovedo M, et al. (2012) Autophagy is decreased in mesenteric fat tissue but not in intestinal mucosae of patients with Crohn's disease. *Cell Tissue Res* 350(3):549-52.
49. Charrière G1, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, et al. (2003) Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278(11):9850-5.

Figures Legends

Figure 1 – TUNEL assay shows different patterns in the intestinal mucosa (ICD) and in the mesenteric adipose tissue (MAT) of Crohn's disease (ACD), compared to the respective control biopsy samples (IC and AC). (A) Enterocyte and *lamina propria* cell apoptosis are shown by immunofluorescence staining (overlay image); TUNEL+ cells are showed in orange (co-labeled by PI and FITC). Low numbers of TUNEL+ enterocytes and *lamina propria* cells were detected in the ICD group compared to IC. (C) Adipocyte apoptosis, shown by immunofluorescence staining (overlay image); TUNEL+ cells are showed in orange (co-labeled by PI and FITC). Low numbers of TUNEL+ adipocytes were detected in the ACD group compared to AC. Note the high density of TUNEL+ adipocytes, in orange, in the control (AC). Images were obtained using a 40x objective. (B) and (D) Quantitative analysis of TUNEL staining in the ICD and ACD groups, compared to the respective controls (IC and AC). The graphs of intestinal tissue show the quantitative analysis for the epithelium and *lamina propria* TUNEL staining, separately. For ICD, n=10; for ACD, n=10; for IC, n=8; and, for AC, n=8, *p<0.05 vs control. (E) Representative hematoxylin-eosin (H&E) staining of fixed paraffin-embedded MAT from AC and ACD groups shows lower area and perimeter of the adipocytes in the ACD group, compared to the control (AC). Images were obtained using a 40x objective. (F) Quantitative morphometric histological analysis in the mesenteric adipose tissue (MAT) of Crohn's disease

(ACD), compared to the respective control group (AC). The graphs show the decreased perimeter (μm) and area (μm^2) of the adipocytes from the MAT of Crohn's disease, compared to the control biopsy samples. For ACD, $n=10$; for AC, $n=8$, $*p<0.05$ vs control. (G) The graphs dispersion show a significant correlation between the perimeter (μm) and the number of apoptotic cells (TUNEL+), ($r=0.89$, $p<0.05$) and also between the area (μm^2) and the number of apoptotic cells (TUNEL+), ($r=0.92$, $p<0.05$). (H) Immunohistochemical staining of Ki67 in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's disease group (ACD), compared to the control biopsy samples (AC); no evidence of proliferation were found in all samples (ACD, $n=10$; AC, $n=8$). Images were obtained using a 40x objective. The positive control was from tissue section of intestinal mucosa.

Figure 2 - Bax and Bcl2 gene expressions, as determined by RT-PCR; low transcript levels of Bax and Bcl2 are observed in the intestinal mucosa of the Crohn's disease group (ICD), compared to the respective control (IC). Low transcript levels of Bcl2 are also seen in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's disease group (ACD), compared to the respective control (AC), while no differences in Bax transcripts were found in the MAT groups. For ICD, $n=10$; for ACD, $n=10$; for IC, $n=8$; and, for AC, $n=8$, $*p<0.05$ vs control.

Figure 3 - Immunohistochemical staining of Bax in the intestinal tissue (epithelium and *lamina propria*) of the Crohn's disease group (ICD) and in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's disease group (ACD), compared to the respective control biopsy samples (IC and AC). (A) Representative staining of fixed paraffin-embedded tissue of terminal ileum from IC and ICD groups showing fewer positive cells (brown) in the *lamina propria* of ICD, compared to the IC group. (B) Representative staining of fixed paraffin-embedded mesenteric adipose tissue in the AC and ACD groups; no differences were found among the groups. Images were obtained using a 40x objective. The positive control was from tissue section of prostatic cancer. For ACD, $n=10$; and for AC, $n=8$. (C) Quantitative analysis of immunohistochemical staining for Bax in the intestinal mucosa of the Crohn's disease group (ICD), compared to the respective control (IC). The graphs show the quantitative analysis for the epithelium and *lamina propria* immunostainings separately. For ICD, $n=10$; for IC, $n=8$, $*p<0.05$ vs control.

Figure 4 - Immunohistochemical staining of Bcl-2 in the intestinal tissue (epithelium and *lamina propria*) of the Crohn's disease group (ICD) and in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's

disease group (ACD), compared to the respective control biopsy samples (IC and AC). (A) Representative staining of fixed paraffin-embedded tissue of terminal ileum from IC and ICD groups showing similar numbers of positive cells (brown) in the ICD and IC groups. (B) Representative staining of fixed paraffin-embedded mesenteric adipose tissue from the AC and ACD groups, showing a higher intensity in the ACD group, compared to the control (AC). Images were obtained using a 40x objective. (C) and (D) Quantitative analysis of immunohistochemical staining for Bcl-2 of ICD and ACD groups, compared to the respective control groups (IC and AC). The graphs of intestinal tissue show the quantitative analysis for the epithelium and *lamina propria* immunostainings separately. For ICD, n=10; for ACD, n=10; for IC, n=8; and for AC, n=8, *p<0.05 vs control.

Figure 5 - Representative Western blot analyses and determination of Bax and Bcl-2 protein expression in the intestinal tissue (mucosa) of the Crohn's disease group (ICD) and in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's disease group (ACD), compared to the respective controls (IC and AC). Decreased expression of Bax was observed in ICD group, compared to the control group (IC), and higher expression of Bcl-2, an anti-apoptotic protein, was observed in the MAT of Crohn's disease (ACD) compared to the control group (AC). For illustration purposes, each band represents one patient. For ICD, n=10; for ACD, n=10; for IC, n=8; and, for AC, n=8, *p<0.05 vs control.

Figure 6 - Immunofluorescence staining of Caspase 3 in the mesenteric adipose tissue (MAT) of the Crohn's disease group (ACD) compared to the respective control biopsy samples (AC). (A) Representative staining of fixed paraffin-embedded mesenteric adipose tissue from the AC and ACD groups, showing a higher number of positive cells for FITC (green-fluorescent) in the cytosol, co-labeled with DAPI (nuclear staining: blue-fluorescent) in the ACD group, compared to the control (AC). The arrows show the positive cells. Images were obtained using a 40x objective. (B) Quantitative analysis of immunofluorescence staining for Caspase 3 of ACD group compared to the respective control group (AC). For ACD, n=10; for AC, n=8, *p<0.05 vs control.

Figure 1

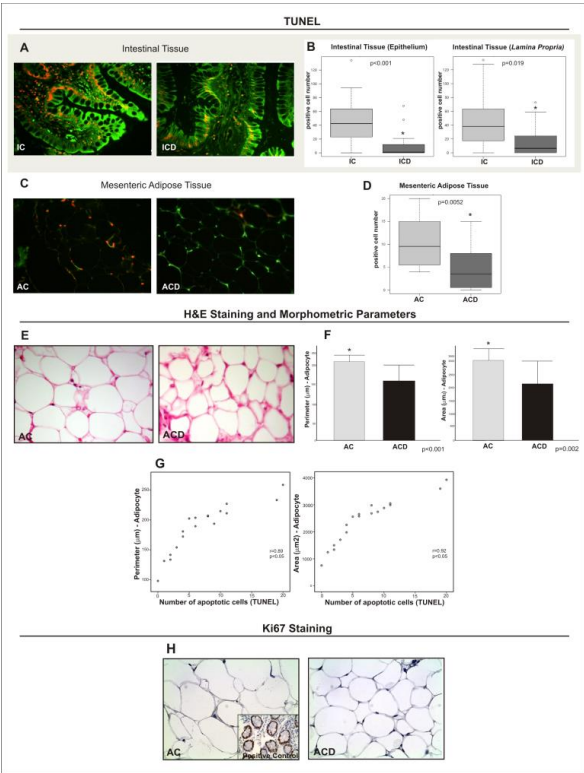


Figure 2

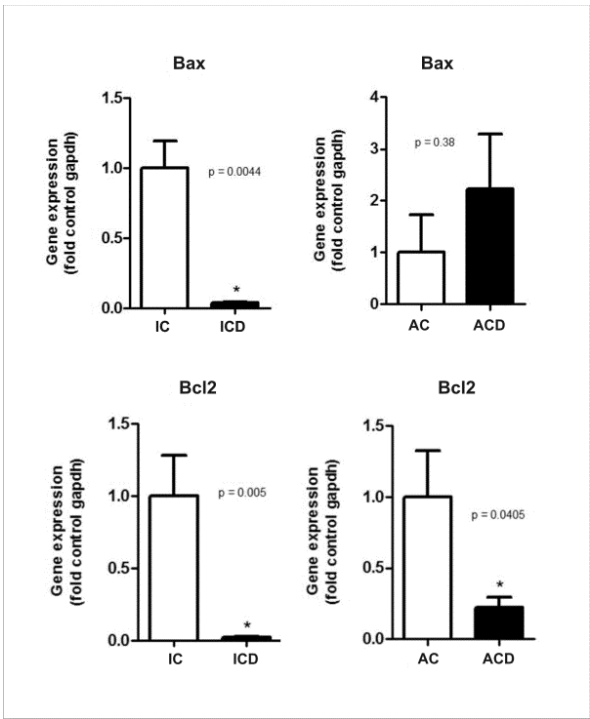


Figure 3

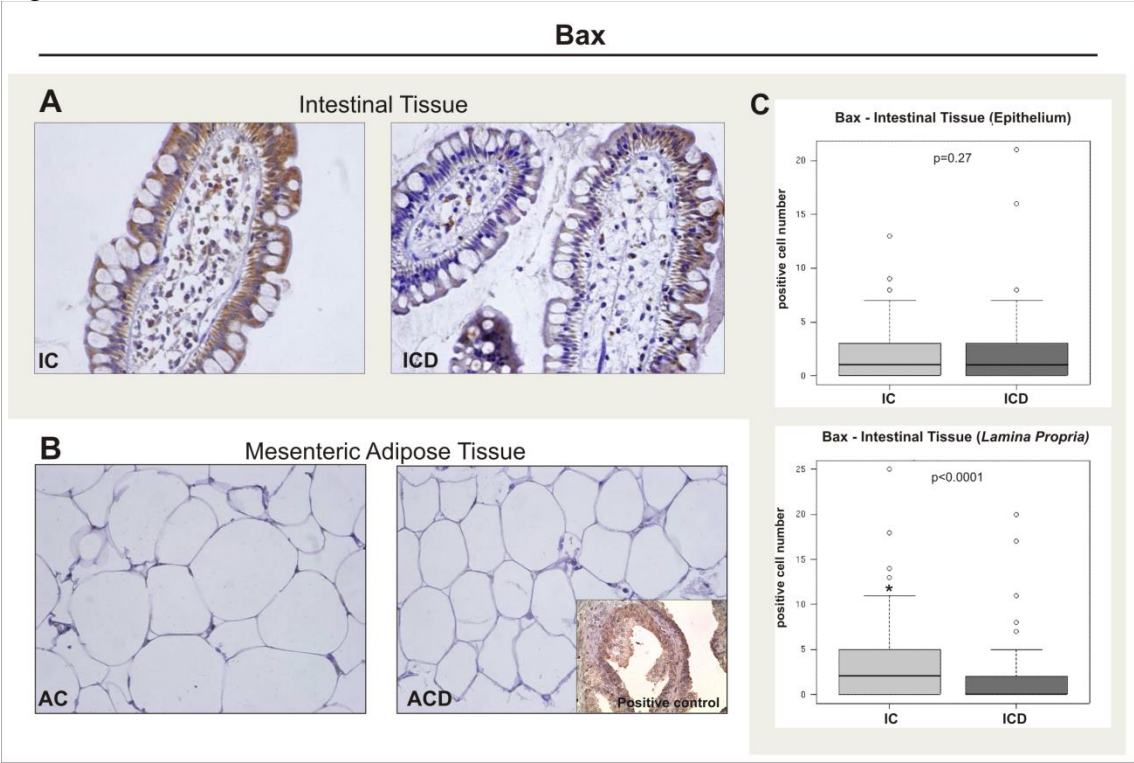


Figure 4

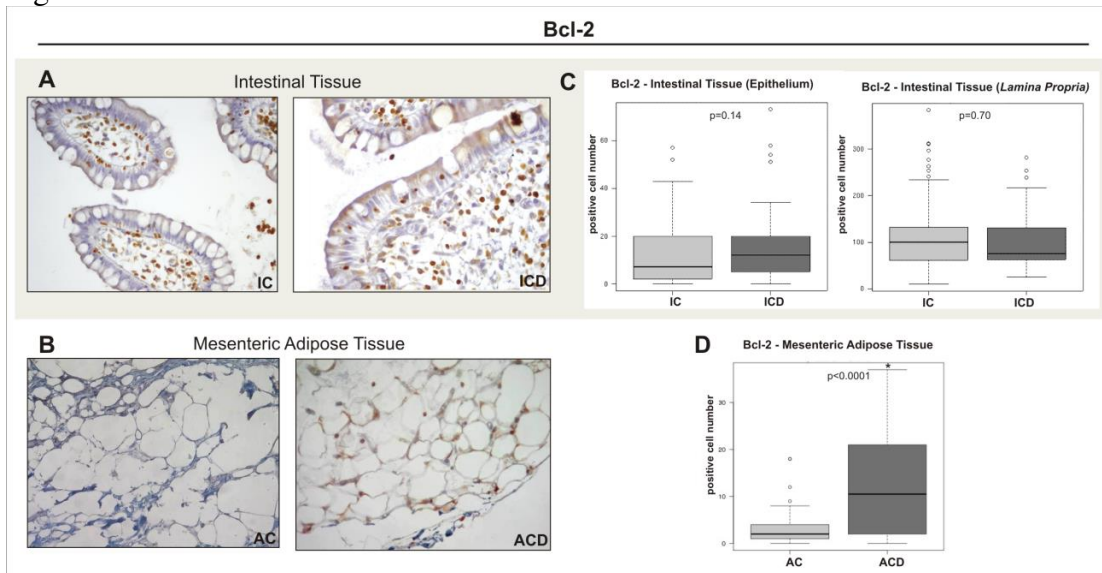


Figure 5

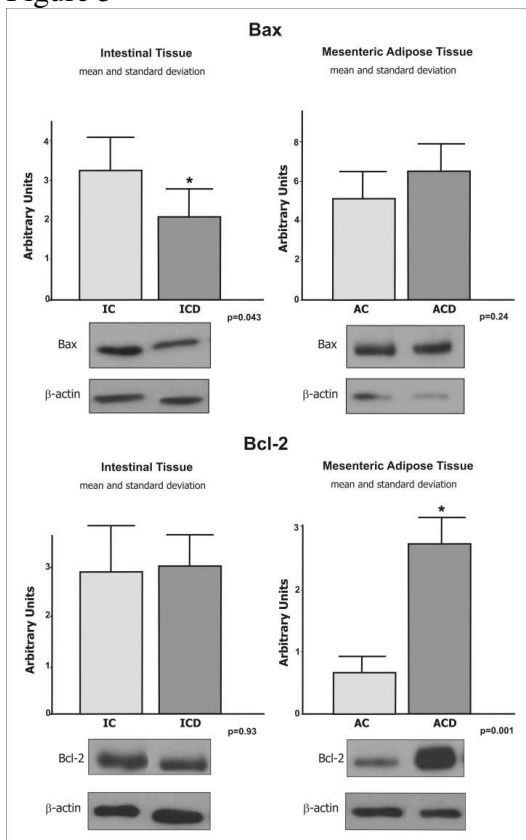


Figure 6

