

Márcia Cristina Aparecida Thomaz

**Efeito do metotrexato nas alterações
inflamatórias do tecido adiposo durante a
inflamação intestinal experimental**

Bragança Paulista

2009

Márcia Cristina Aparecida Thomaz

**Efeito do metotrexato nas alterações
inflamatórias do tecido adiposo durante a
inflamação intestinal experimental**

ORIENTADOR

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da
Saúde da Universidade São
Francisco (USF) para a
obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2009

WI 512
T381e

Thomas, Márcia Cristina Aparecida.
Efeito do metotrexato nas alterações inflamatória
do tecido adiposo durante a inflamação intestinal
experimental / Márcia Cristina Aparecida Thomas. --
Bragança Paulista, 2009.
63 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação: Alessandra Gambero.

1. Doença de Crohn. 2. Adipocitocinas. 3. Tecido
adiposo - Alterações inflamatórias. 4. Metotrexato.
5. Modelo experimental. I. Gambero, Alessandra. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Gambero

Membros:

1. Profa. Dra. Alessandra Gambero
 2. Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo
 3. Profa. Dra. Aparecida Érica Bighetti Ribas
-

Suplentes:


1. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
 2. Prof. Dr. Dennys Esper Correa Cintra
-

**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.**

Data: 29/09/2009



THOMAZ, Márcia Cristina Aparecida. "Efeito do Metotrexato nas Alterações Inflamatórias do Tecido Adiposo Durante a Inflamação Intestinal Experimental". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de Setembro de 2009 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof.^a. Dr.^a. Alessandra Gambero- Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco



Prof.^a. Dr.^a. Eliana Pereira de Araújo
Universidade Estadual de Campinas



Prof.^a. Dr.^a. Aparecida Érica Bighetti Ribas
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oswaldo Perez e Izilda Perez

Ao meu irmão, Tiago Perez Tovazi

Em especial ao meu marido, Marcelo Scilezo

À minha avó Soledade D Perez (in memória)

À minha amiga Elis

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tudo permite e tudo conduz.

À Profa. Dra. Alessandra Gambero, pelo seu carinho, dedicação, disposição, simplicidade e competência .

À UNIFAG e toda a equipe do Laboratório da Profa. Dra. Alessandra Gambero e ao Prof. Dr. José Aires Pereira, que muito contribuíram, obrigada pelos momentos de paciência, compreensão e dedicação. Em especial agradeço às mestrandas Simone e Caroline. À minha amiga Elis pelo incentivo e amizade.

À Profa. Beatriz Verri e Profa. Maria Cristina Traldi pelo apoio e incentivo.

***Há um tempo para tudo e
um tempo para todo propósito debaixo do céu.***

***Tempo de nascer e tempo de morrer;
tempo de plantar e tempo de colher.***

Ecl. 3, 1-2

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais	28
3.2 Grupos experimentais	28
3.3 Modelo experimental de colite	29
3.4 Tratamento	29
3.5 Coleta de amostras	29
3.6 Análise macroscópica das lesões	30
3.7 Análise microscópica das lesões	31
3.8 Determinação da atividade da mieloperoxidase colônica	31
3.9 Análise da liberação de adipocitocinas <i>ex vivo</i>	31
3.10 Imunoensaio enzimático	32
3.11 Análise de proteínas por imunoblotting	32
3.12 Expressão de resultados e análise estatísticas	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54
8. ANEXOS	62

RESUMO

Introdução: Hipertrofia do tecido adiposo mesentérico e modificações na produção de adipocitocinas são características presentes nos pacientes com Doença de Crohn. Experimentalmente, estas alterações podem ser obtidas em animais com colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). O metotrexato (MTX) é uma droga utilizada em pacientes com Crohn que não respondem a terapia com corticóides. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do tratamento com MTX sobre o tecido adiposo mesentérico em animais com colite reativada por TNBS. **Metodologia:** Ratos machos Wistar receberam 3 administrações de TNBS (3mg em etanol 50%) e foram tratados com MTX (3 mg/kg). Um grupo saudável foi mantido como controle (CN). A colite foi avaliada através de escore macroscópico, histologicamente e pela atividade de mieloperoxidase, bem como pela expressão de citocinas (TNF- α e IL-10) na mucosa colônica e outros marcadores inflamatórios (iNOS e TLR-4) através da *Western blot*. As alterações de tecido adiposo foram avaliadas por meio da determinação de adipocitocinas liberadas no sobrenadante de células colônicas de curto-prazo (TNF- α , IL-10, leptina e adiponectina) por ELISA. O infiltrado de macrófagos foi avaliado através da expressão de F4/80 no tecido adiposo. **Resultados:** Metotrexato exerce uma atividade antiinflamatória na colite reativada resultando em um menor escore, adicionalmente, o tratamento com MTX resultou em redução da expressão de TNF- α e aumento de IL-10 no cólon. O MTX reduziu a expressão de iNOS e TLR-4. No tecido adiposo, o MTX reduziu a produção de adipocitocinas pró- e antiinflamatórias, bem como o infiltrado de macrófagos. **Conclusão:** A terapia imunossupressora reduz as alterações inflamatórias no intestino e também no tecido adiposo adjacente, sugerindo que a modulação farmacológica seja também fundamental para reduzir as alterações de tecido adiposo no paciente com doença de Crohn.

ABSTRACT

Introduction: Mesenteric white adipose tissue hypertrophy and modifications in adipocytokine production are described features of Crohn's disease. Experimentally, these alterations can be induced in a model of reactivated colitis by repeated administration of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Crohn's disease patients refractory to corticosteroid treatment are frequently treated with methotrexate. Thus, the subject of this work was evaluate the effect of methotrexate upon mesenteric WAT alterations and inflammatory intestinal inflammation in TNBS reactivated colitis. **Methodology:** Male Wistar rats received TNBS (3mg in ethanol solution) three times during 35 days and they were treated with methotrexate (3mg/kg). A control group was carried out. Colitis status was evaluated by macroscopic score, histopathological analysis, myeloperoxidase activity, as well as TNF- α , IL-10, iNOS and TLR-4 expression in colon samples. The adipose tissue alterations were assessed by TNF- α , IL-10, leptin and adiponectin production, as well as by macrophage infiltration evaluation. **Results:** Methotrexate exerts an anti-inflammatory activity in experimental reactivated colitis by reducing the inflammatory score and neutrophil infiltration. Additionally, methotrexate treatment reduces TNF- α and improving IL-10 production in colon. Methotrexate treatment also reduces other inflammatory parameters in the colon, such as iNOS and TLR-4 expression. In mesenteric white adipose tissue, methotrexate treatment reduces the production of pro- and anti-inflammatory adipocytokines as well as macrophage infiltration. **Conclusion:** The immunosuppressant therapy reduces the intestinal inflammatory response and it has a role in adjacent adipose tissue, suggesting that immunosuppressant drugs diminish adipose tissue alterations in Crohn disease patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

DC	Doença de Crohn
DDNBS	Ácido dinitrobenzeno-sulfônico
DDS	Dextran sulfato de sódio
EPM	Erro padrão da média
HIV	Vírus de imunodeficiência
IL	Interleucina
Inos	Enzima óxido nítrico sintase induzida
MCP -1	Proteína quimiotática de monócitos -1
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
TNBS	Trinitrobenzenosulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRL 4	<i>Receptor Toll like</i>
PPAR- γ	Receptor ativado pelo proliferador de peroxisoma
SLHIV	Síndrome da Lipodistrofia do vírus de imunodeficiência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peso corporal dos animais do grupo controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	34
Figura 2. Escore macroscópico atribuído aos cólons de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	35
Figura 3. Observação histopatológica dos colons .	36
Figura 4. Níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) nos cólons de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	37
Figura 5. Expressão de TNF- α no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX)	38
Figura 6. Expressão de IL-10 no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	39
Figura 7. Expressão de iNOS no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	40
Figura 8. Expressão de TLR-4 no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	41
Figura 9. Níveis de TNF- α liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	42
Figura 10. Níveis de IL-10 liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	43
Figura 11. Níveis de leptina liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	44
Figura 12. Níveis de adiponectina liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	44
Figura 13. Expressão de F4/80 no tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX).	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tecido Adiposo e adipocitocinas

Estudos demonstram que durante muitos anos o tecido adiposo foi considerado o mais importante órgão de armazenamento de energia do organismo humano. Para garantir a sobrevivência de todas as espécies, mesmo em condições de escassez de nutrientes no meio ambiente, os mamíferos são capazes de estocar o excesso de calorias consumidas e não requisitadas para suprir suas necessidades metabólicas imediatas, como lipídios, proteínas e carboidratos (glicogênio). Os lipídeos, por serem hidrofóbicos, podem ser armazenados em grandes quantidades dispensando a participação da água como solvente, e contêm, por unidade de massa, mais do que o dobro de energia armazenada que os outros dois componentes, fornecendo mais energia metabólica quando oxidados. O excesso de energia consumido é convertido em moléculas de triglicérides, que em situações de necessidade como no jejum, podem ser liberados rapidamente na forma de ácido graxos livres e glicerol, garantindo assim a manutenção da homeostase. O controle da estocagem e da liberação de lipídeos se dá graças à inervação simpática do tecido adiposo, e à presença, na membrana dos adipócitos, de receptores para diversos hormônios como glicocorticóides, insulina e hormônios tireoideanos (Hanauer, 2004; Havel, 2004).

Na última década, à caracterização do tecido adiposo - fundamentalmente como um órgão de armazenamento de energia - vêm sendo acrescentadas propriedades distintas, principalmente após a descoberta da leptina ocorreu em 1994, pelo grupo do Dr. Friedman da Universidade Columbia de Nova York.

Este conceito emergente define para o tecido adiposo importante função endócrina, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocitocinas, mantendo intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos (Hanauer, 2004).

As adipocitocinas influenciam uma variedade de processos fisiológicos. Entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão, a coagulação sanguínea e a modulação do sistema imunológico. Alterações na secreção de adipocitocinas, consequentes da hipertrofia e/ou da hiperplasia dos adipócitos, podem também estar relacionadas à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (Havel, 2004).

O tecido adiposo, enquanto órgão secretor, apresenta distintas peculiaridades, entre elas:

1) constitui tecido de ampla e variada distribuição orgânica, cuja característica compartimentalização individual, nem sempre apresenta conexão entre si. Os mecanismos envolvidos com a atividade secretora dos adipócitos permanecem sob investigação, existindo dúvidas acerca dos processos humoral e/ou neural relacionados;

2) adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos e macrófagos, representam os diferentes tipos de células que constituem o tecido adiposo e participam da sua função endócrina;

3) a capacidade metabólica do tecido adiposo varia em função da sua localização, subcutânea ou visceral, podendo contribuir de forma mais ou menos intensa para a secreção de adipocitocinas específicas (Dusserre e cols., 2000).

O tecido adiposo possui a capacidade de produção de adipocitocinas, substâncias que participam da resposta inflamatória. Estas adipocitocinas podem apresentar ações pró ou antiinflamatórias, como o TNF- α e leptina e, adiponectina, respectivamente (Gambero e cols., 2007)

Os pesquisadores dedicados a essa linha de estudos acreditam que uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na secreção de vários fatores, hormônios e citocinas, pelo tecido adiposo, poderá auxiliar na prevenção e tratamento de diferentes doenças (Charriere e cols., 2003; Guerre-Millo, 2004; Fantuzzi, 2005).

1.2. Adipocitocinas e inflamação

As citocinas são proteínas de sinalização celular que controlam as interações entre as células do sistema imunológico onde formam um grupo diversificado e regulam não apenas as respostas inflamatórias locais e sistêmicas, mas também a cicatrização de feridas, hematopoese e outros processos biológicos. Até hoje, foram identificadas mais de cem citocinas estruturalmente distintas e geneticamente não relacionadas. Trata-se de compostos extremamente potentes, que atuam em baixíssimas concentrações (10^{-9} a 10^{-5} M), através de ligação a receptores específicos nas células-alvo. A maioria delas parece atuar apenas localmente, de maneira parácrina (células adjacentes) ou autócrina (própria célula que a produz). Muitas são funcionalmente redundantes, isto é, verifica-se uma extensa superposição de suas atividades, além disso, uma citocina pode induzir a secreção de outras ou

de mediadores, produzindo assim uma cascata de efeitos biológicos (Oppenheim e Ruscetti, 2000).

As citocinas, produzidas e liberadas pelo tecido adiposo, podem ser denominadas adipocitocinas ou adipocinas. Podem atuar paracrinamente no tecido adiposo ou serem lançadas na circulação desencadeando ou contribuindo para o processo inflamatório (Bastard e cols., 2000; Tataranni e cols., 2005).

As adipocitocinas são classificadas em pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e leptina, por exemplo, baseado na sua participação na amplificação da resposta inflamatória e, adipocitocinas antiinflamatórias, como a IL-10, IL-4 e adiponectina, por exemplo, pois reduzem a produção das citocinas pró-inflamatórias (Gambero e cols., 2007).

1.2.1. Citocinas e Adipocitocinas pró-inflamatórias

1.2.1.1. TNF- α

O TNF- α possui várias ações pró-inflamatórias e imunorreguladoras como o aumento da ativação dos linfócitos T-auxiliares (*T-helper*), a produção de imunoglobulinas e a indução da resposta de fase aguda do fígado. Nesta situação, os hepatócitos aumentam a produção de proteínas plasmáticas, importantes para a defesa inespecífica do hospedeiro contra infecções como por exemplo, a Proteína C-reativa (Oppenheim e Ruscetti, 2000).

O TNF- α age sobre o tecido adiposo estimulando a lipólise (Zhang e cols., 2002) o aumento da sua concentração pode causar caquexia por aumentar a atividade da lipase, a diminuição de TNF- α causa resistência a insulina, sendo assim um hormônio-sensível (Kern e cols., 1995), enzima que retira os lipídeos estocados no tecido adiposo, liberando-os na circulação, bem como através da inibição da lipase lipoprotéica, enzima que remove os lipídeos da circulação depositando-os nos adipócitos (Oppenheim e Ruscetti, 2000). Estes efeitos, em conjunto, podem acarretar o aumento das concentrações circulantes de ácidos graxos livres, contribuindo para a resistência à insulina (Kern e cols., 2001).

1.2.1.2. Interleucina –6

A IL -6 é uma citocina com múltiplas atividades biológicas produzida por muitos tipos celulares como linfócito T e B ativados, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e adipócitos. O tecido adiposo é uma importante fonte de IL-6 para a circulação sistêmica existindo uma correlação direta entre a produção de IL-6 e massa adiposa, sendo o tecido visceral o maior responsável por esta produção (Fried e cols., 1998).

Uma das funções mais conhecidas e estudadas da IL-6 é a de estimular a produção de proteína C –reativa, pelos hepatócitos. Esta proteína é a principal mediadora da resposta inflamatória de fase aguda, e possui funções imunoreguladoras como o recrutamento e ativação do sistema complemento, o aumento da reatividade leucocitária e o estímulo da liberação de citocinas como IL-1 β , IL-18, a própria IL-6 e o TNF- α (Black e cols., 2004).

1.2.1.3. Leptina

O adipócito é a principal fonte conhecida do produto do gene (*ob*), a leptina. A leptina age como um fator de sinalização do tecido adiposo para o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético e, assim, fazendo a homeostase do peso corporal e mantendo constante a quantidade de gordura (Gualillo e cols., 2007). No homem, como nos roedores, se observa uma correlação fortemente positiva entre os níveis circulantes de leptina e a quantidade de gordura corpórea, indicando que secreção de leptina é um reflexo de hipertrofia gordurosa (Gualillo e cols., 2007) .

Vários estudos indicam que a leptina desempenha um papel crucial na resposta imune e inflamatória. Devido à sua dupla natureza como hormônio e como citocina, a leptina pode ser hoje considerada o elo entre o sistema neuroendócrino e imunológico. O aumento na produção da leptina, que ocorre durante infecções e processos inflamatórios, sugere fortemente que esta adipocitocina pode atuar como um componente de proteção do hospedeiro à inflamação (Faggioni e cols., 2001). A leptina regula a resposta de células T, polarizando ao fenótipo Th1 (Faggioni e cols., 2001). Deficiências de leptina geram hematopoese deficiente, bem como uma maior susceptibilidade aos estímulos infecciosos e inflamatórios, associados à deficiência na produção de citocinas (Faggioni e col., 2001). Vários estudos têm implicado a leptina na patogênese de condições inflamatórias auto-imunes, tais como encefalomielite, diabetes tipo I, inflamação intestinal crônica e doenças degenerativas articulares, como artrite reumatóide e osteoartrose (Otero e cols., 2005).

1.2.2. Citocinas e Adipocitocinas antiinflamatórias

1.2.2.1. Interleucina-10

A IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos, linfócitos, monócitos, e secretada pelo tecido adiposo visceral e subcutâneo de humanos, sendo de maior expressão no depósito visceral. Possui ação antiinflamatória, suprimindo a produção de citocinas inflamatórias e conferindo proteção vascular (Herfarth e Scholmerich, 2002) .

Esta citocina suprime a inflamação por vários mecanismos imunológicos, incluindo a redução da expressão de HLA classe II, redução da secreção de IL-2 pelas células T e, diminuição de outras citocinas como TNF- α e IL-8. A deficiência do gene da IL-10, em ratos, propicia o desenvolvimento de inflamação transmural do intestino, lembrando a Doença de Chohn (DC) Este tipo de inflamação é agravado pela presença de bactérias na luz do intestino e pode ser prevenida com a administração de IL-10 (Herfarth e Scholmerich, 2002).

1.2.2.2. Adiponectina

A adiponectina foi descoberta simultaneamente por diferentes grupos de estudos, recebendo diferentes denominações como apM1, ACRP30 ou adipoQ. Trata-se de adipocina produzida abundantemente pelo tecido adiposo e que circula em altas concentrações plasmáticas (Arita e cols., 1999). Estas

concentrações circulantes podem ser afetados por fatores como sexo, idade e estilo de vida e, ao contrário de outras adipocinas, encontram-se em níveis reduzidos em portadores de obesidade, bem como de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Ouchi e cols. , 1999; Hotta e cols., 2000; Kadowaki e Yamaguchi, 2005). Correlacionam-se positivamente com a sensibilidade à insulina e negativamente com a produção endógena de glicose (Stefan e cols., 2003).

Tem função antiaterogênica e ação antiinflamatória, resultando na diminuição da produção e/ou inibição da ação do TNF- α , diminuição da produção da IL-6, com conseqüente indução da produção da IL-10 e do antagonista de receptor da IL-1 β (; Kern e cols., 2003; Stumvoll e cols., 2005). Possui efeito antiaterogênico, pois inibe moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) e diminui a adesão de monócitos às células endoteliais, processos cruciais no surgimento de doenças cardiovasculares (Ouchi e cols.,1999).

1.3. Alterações no tecido adiposo, associadas às patologias.

O tecido adiposo pode se modificar rapidamente durante infecção e inflamação aguda. A supressão do apetite, mediada pela leptina, TNF- α e outras citocinas, combinadas com alterações do sistema nervoso autonômico, estimulam o tecido adiposo a secretar produtos da lipólise e uma variedade de moléculas com ações endócrinas e parácrinas (Pond, 2001). Deste modo, durante infecções e inflamações agudas é possível observar o aumento de ácidos graxos não-esterificados no plasma, além de várias adipocitocinas (Pond, 2001).

Num processo à longo prazo o tecido adiposo também se modifica em patologias como o Diabetes do tipo 2 e na Síndrome de Cushing, por exemplo, resultando em alterações na concentração plasmática de lipídeos e na sensibilidade periférica à insulina (Arner, 2005). Em outras patologias também têm sido descritas alterações no tecido adiposo, como na infecção pelo HIV e na DC.

As alterações do tecido adiposo, observadas em pacientes com HIV, parecem estar relacionadas ao uso da terapia antirretroviral. E também está acompanhada de alterações metabólicas como dislipidemia, resistência insulínica, hiperglicemia e redistribuição da gordura corporal, fatores de risco para doença cardiovascular. O conjunto destas alterações é conhecido como síndrome lipodistrófica do HIV (SLHIV) (Jonhson e cols., 2004).

A lipodistrofia pode ser classificada clinicamente em três categorias, sendo:

1 – lipoatrofia: caracterizada pela redução da gordura em regiões periféricas, como braços, pernas, face e nádegas, podendo apresentar proeminência muscular e venosa relativas;

2 – lipohipertrofia: caracterizada pelo acúmulo de gordura em região abdominal, presença de gibosidade dorsal, ginecomastia e aumento das mamas em mulheres;

3 – forma mista: caracterizada pela associação de componentes das duas formas anteriormente descritas (Jonhson e cols., 2004).

Já na DC temos como característica a cronicidade. O tecido adiposo torna-se hipertrófico, e a inflamação descontrolada da mucosa pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal (Hanauer, 2006).

Durante a inflamação intestinal ocorre um predomínio da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , enquanto que a expressão de citocinas antiinflamatórias encontra-se reduzida na mucosa intestinal, como IL-4, IL-5 e IL-10 (Rogler e Andus, 1998; Li e He, 2004).

1.4. Doença Inflamatória Intestinal: Doença de Crohn

A doença inflamatória intestinal é um termo que descreve coletivamente várias patologias inflamatórias que acometem o intestino, como a colite ulcerativa e a DC (Coelho e Lavery, 1996).

A DC, inicialmente descrita como *ileíte regional* pelo Dr. Burrill Crohn, mostrou-se se tratar de um processo de inflamação crônica, capaz de afetar qualquer segmento do canal alimentar da boca até o ânus. E que evolui com

surtos de exacerbação e remissão imprevisíveis, assim como sua resposta à terapia medicamentosa ou cirúrgica (Damião e Habr-Gamma, 1993).

É descrita em todo mundo, mostrando uma tendência no crescimento da sua incidência, inclusive no Brasil. Porém, a maior incidência é registrada nas populações da Europa e América do Norte. Em geral, distribui-se de forma semelhante entre ambos os sexos, com maior prevalência na raça branca do que em africanos ou orientais. A idade de início da doença está entre os 15 e 30 anos, tendo um segundo pico entre os 60 e 80 anos (Steidler e cols., 2000).

Várias hipóteses procuram estabelecer relações entre o aparecimento da DC e fatores ambientais, alimentares, imunogenéticos e infecciosos. Mas, o que se observa com freqüência é a piora ou início da DC, associada a crises emocionais. Sugere-se que a partir deste fator desencadeante ocorram anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microflora normal não patogênica (Matsumoto e cols., 2001).

A apresentação clínica da doença varia de acordo com a extensão, a intensidade e as complicações presentes. Acomete, com maior freqüência, o íleo terminal e o cólon, iniciando-se tipicamente com crises de diarreia, febre, dor abdominal e emagrecimento. Na evolução, podem surgir complicações locais, nutricionais e sistêmicas. A doença se agrava e as crises tornam-se mais freqüentes, gerando comprometimento do estado geral e piora da qualidade de vida do indivíduo (Peakman e Vergani, 1999).

A DC é caracterizada macroscopicamente e microscopicamente, por inflamação crônica em todas as camadas da parede intestinal. Entre as alterações macroscópicas presentes, temos a presença de hiperemia, edema,

no mesentério apresentando linfonodos avermelhados e tumefeitos (Glickman, 1998). Paralelo à inflamação ocorrem alterações no tecido adiposo mesentérico, caracterizadas pela hipertrofia e modificação na produção de adipocitocinas (Desreumaux e cols., 1999; Paul e cols., 2006). Essas alterações são características da doença e descritas como o tecido adiposo mesentérico, que recobre parcialmente a circunferência do intestino delgado e grosso, associada à perda do ângulo intestino-mesentério (Peyrin-Biroulet e cols., 2007). Em 1999, foi descrito que o tecido adiposo mesentérico produzia TNF- α nesses pacientes (Desreumaux e cols., 1999). Na seqüência, foi descrito que, além do TNF- α , o tecido adiposo hipertrofiado também produz quantidades aumentadas de adiponectina. Como vimos, uma adipocitocina considerada antiinflamatória, sugerindo que o tecido adiposo poderia atuar como um regulador da inflamação (Yamamoto e cols., 2005). Análise histológica do tecido adiposo hipertrofiado também revela um infiltrado de células inflamatórias, principalmente de macrófagos e células T (Charriere e cols., 2003).

1.5. Terapêutica da Doença de Crohn

Um grande número de drogas que atuam como antiinflamatórios gerais ou seletivos têm sido empregados, porém consegue-se a indução e manutenção da remissão das crises, mas não a cura da doença (Kozuch e Hanauer, 2008). O tratamento da DC é inicialmente clínico com medidas gerais, amenizando os sintomas como dor e diarreia. As dietas enteral, parenteral parcial ou total são indicadas na DC grave e/ou complicada,

principalmente com fístulas, podendo causar remissão da inflamação aguda e melhora da condição nutricional (Rigaud e cols.,1991).

O tratamento cirúrgico é reservado para as complicações da DC ou quando sintomas graves persistem, mesmo após tratamento intensivo com drogas antiinflamatórias ou imunossupressoras (Rigaud e cols.,1991).

Os avanços mais recentes na terapêutica da DC incluem a utilização de terapias que inibem TNF- α , pelo uso de anticorpos monoclonais, como o infliximab e o adalimumab (Haunauer e cols., 2002). Os dados relativos a estudos clínicos que utilizaram salicilatos, como o 5-ASA, são bastante controversos (Desreumaux e Ghosh, 2006). Os antibióticos tem uma utilização limitada no tratamento da DC colônica (Sandborn e Feagan, 2003). Antiinflamatórios esteroidais continuam a ser a primeira escolha terapêutica para o tratamento da doença na fase ativa, podendo ser administrado por via sistêmica ou local, como a budenosida retal. Outros imunomoduladores, como a azatioprina e sua forma ativa 6-mercaptopurina (6-MP), também têm sido usados na manutenção da fase de remissão (Kozuch e Hanauer, 2008). E, finalmente, o metotrexato, um imunomodulador que é utilizado tanto na fase de indução como de manutenção da remissão da DC (Kozuch e Hanauer, 2008).

1.6. Metotrexato

O metotrexato é um antagonista do ácido fólico. É uma droga eficaz, de perfil de segurança aceitável e de baixo custo (Tian e Cronstein, 2007). Como citado anteriormente, tem sido usado para a indução e manutenção da remissão na DC. Quimicamente, o metotrexato é o ácido N (2,4-diamino-6-pteridinil) metil-

metilamino benzoil-L-glutâmico, responsável por inibir a diidrofolato redutase (DHFR) e outras enzimas dependentes de folato, interferindo com a síntese de DNA e com a replicação celular, resultando, então, em um efeito antiinflamatório e imunossupressor por reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzir apoptose de linfócitos ativados (Fraser e cols., 2002). O metotrexato inibe a produção de citocinas produzidas por linfócitos T, como a IL-4, IL-13, IFN- γ e TNF- α . Outro mecanismo de ação, apontado para o metotrexato, é a capacidade de liberar adenosina somando então o efeito antiinflamatório da adenosina (Tian e Cronstein, 2007). A adenosina liberada inibe a adesão de neutrófilos *in vitro*, bem como reduz o acúmulo de leucócitos em exsudatos inflamatórios no modelo de bolsa de ar em camundongos, atuando por sua ligação à receptores de adenosina (Cronstein e cols., 1993).

1.7. Modelo experimental de Colite por TNBS

O modelo experimental de colite, induzida por ácido-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), é freqüentemente utilizado em estudos, onde se busca correlacionar achados fisiopatológicos ou terapêuticos com a doença inflamatória intestinal. E contribui para avaliação dos fatores imunológicos envolvidos na patologia, bem como na elucidação de possíveis mecanismos farmacológicos das drogas utilizadas na terapêutica. Neste modelo, o hapteno TNBS é administrado em solução etanólica por via intracolônica em ratos ou camundongos - resultando em uma resposta inflamatória, mediada por linfócitos TH1 -, visto que o álcool rompe a barreira epitelial e permite a introdução de componentes bacterianos e proteínas colônicas haptenadas. Isso

produz uma resposta imune antigênica, que envolve também a participação dos linfonodos mesentéricos. A inflamação transmural também é caracterizada pela presença de edema e proeminente infiltrado de células inflamatórias (Szczepanik e cols., 2000; Ishiguro e cols., 2004).

A manutenção dos animais experimentais - associando indução da colite à períodos de remissão durante 35 dias - é capaz de promover alterações no tecido adiposo mesentérico. Nestes, o tecido adiposo aumenta de volume, embora os adipócitos apresentem menor diâmetro, sugerindo uma proliferação dessas células, envolvendo o fator PPAR- γ (Gambero e cols., 2007). O tecido adiposo também é capaz de produzir uma quantidade aumentada de TNF- α , bem como apresenta um maior infiltrado de macrófagos (Oliveira e cols., 2009). Isso sugere que seja um bom modelo experimental para avaliarmos a ação de medicamentos, utilizados na terapêutica da DC sobre as alterações inflamatórias do tecido adiposo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a ação de um imunossupressor nas alterações inflamatórias intestinais e do tecido adiposo mesentérico no modelo de colite experimental.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a ação do metotrexato sobre a produção de citocinas, e outros marcadores inflamatórios no cólon de animais com colite reativada, induzida por TNBS;

- Avaliar a ação do metotrexato sobre o dano macroscópico, microscópico e infiltrado de neutrófilos no cólon de animais com colite reativada, induzida por TNBS;

- Avaliar a ação do metotrexato sobre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo mesentérico de animais com colite reativada, induzida por TNBS;

- Avaliar a ação do metotrexato sobre alterações inflamatórias presentes no tecido adiposo mesentérico de animais com colite reativada, induzida por TNBS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização do estudo, foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas. Esses animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas e mantidos no Biotério, com ciclos artificiais de 12 horas de períodos claro e escuro. A temperatura constante foi de 25°C. Água e ração foram servidas *ad libitum*. A realização deste estudo obedeceu às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido este trabalho aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade São Francisco (anexo I).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais contendo cinco animais cada, sendo:

- a) um grupo de controle, formado por animais que receberam administrações sucessivas de solução salina via intracolônica;
- b) um grupo de animais com colite, que receberam administrações sucessivas de TNBS via intracolônica;
- c) um grupo de animais com colite, que receberam administrações sucessivas de TNBS via intracolônica e tratados com metotrexato.

3.3. Modelo experimental de colite induzida por TNBS

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, que antecederam a realização da administração de TNBS, sendo mantido o livre acesso à água. Eles foram anestesiados com uma mistura 1:1 (v/v) de soluções de cetamina 100 mg/ml e xilasina a 2%, sendo administrado 0,1 ml/kg de peso corporal. Após indução da anestesia, os animais receberam por via intracolônica 3 mg de (TNBS), dissolvido em 300 µL etanol a 50%. A solução foi injetada no colon dos animais com o auxílio de uma sonda. Um grupo experimental recebeu somente solução salina e foi considerado controle para a colite experimental. Esse procedimento foi realizado no 1º, 14º e no 28º dia, sendo os animais sacrificados no 35º dia, totalizando três administrações de TNBS (Szczepanik e cols., 2000; Ishiguro e cols., 2004).

3.4. Tratamento

Os animais foram tratados com metotrexato 3 mg/Kg, dividido em duas administrações na última semana do protocolo experimental de colite, ou seja, no 28º e 31º dia, por via intraperitoneal.

3.5. Coleta de amostras

No 35º dia do protocolo, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina 1:1 (v/v), sendo administrado 0,1 ml para cada 100 g de peso corpóreo. A cavidade abdominal foi rapidamente aberta, o tecido

adiposo mesentérico foi dissecado e transferido para meio adequado, e o cólon retirado e aberto para análise ou coleta de amostras. Amostras de cólon foram obtidas, através de cortes longitudinais e distribuídas aleatoriamente para as determinações descritas adiante. Em seguida, sob o efeito anestésico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.6. Análise macroscópica de lesões

O cólon retirado foi aberto longitudinalmente e lavado com solução salina para a análise macroscópica conforme o escore mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Análise macroscópica do cólon (Rodriguez-Cabezas e cols., 2002).

Score	Crítérios
0	Ausência de lesões.
1	Hiperemia, sem ulcerações.
2	Ulceração linear sem inflamação.
3	Ulceração linear com inflamação.
4	Duas ou mais ulcerações e inflamação.
5	Duas ou mais ulcerações e inflamação ou uma ulceração com extensão superior a 1 cm longitudinalmente no cólon.
6-10	Se as lesões forem superiores a 2 cm de extensão longitudinalmente, será atribuído 1 ponto para cada centímetro adicional.

3.7. Análise microscópica de lesões

Fragments foram imediatamente acondicionados em formalina tamponada a 10%. E após 48 horas foram processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 4 μ foram corados com Hematoxilina e Eosina. A presença de infiltrado inflamatório, edema e ulcerações foi avaliada utilizando microscópio ótico acoplado a sistema de captação de imagens.

3.8. Determinação da atividade da mieloperoxidase colônica (MPO)

Uma biópsia do cólon foi imediatamente armazenada a -20° C, para posterior determinação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). Para tanto, as amostras foram homogeneizadas com tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia – Sigma – diluído em 1 litro de Tampão Fosfato de Potássio) e centrifugadas (10 minutos, 14000 rpm e 4° C). Em seguida, foi adicionado o-dianisidine (16,7 mg de o-dianisidine – Sigma; 90 mL de água deionizada; 10 mL de Tampão Fosfato de Potássio; 50 μ l de água oxigenada 1%) ao sobrenadante e foram realizadas leituras cinéticas de absorbância em 460 nm (Bradley e cols., 1982).

3.9. Análise da liberação de adipocitocinas *ex vivo*

Biópsias do tecido adiposo foram fragmentadas e incubadas por 3 horas em Meio 199 (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY), contendo albumina de soro bovino (BSA) 1% a 37 graus em banho-maria com agitação constante

de 50 ciclos por minuto, com borbulhamento de carbogênio (5% CO₂ e 95% O₂). Após a incubação, o meio foi coletado e estocado a – 80° C para posterior determinação de adipocinas: TNF- α , leptina, adiponectina e IL-10. A quantificação dos níveis de adipocitocinas foi feita por imunoenensaio enzimático.

3.10. Imunoensaio enzimático (Enzymatic Imunoassay - EIA)

O ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*) foi utilizado para a quantificação de IL-10, TNF- α , leptina e adiponectina no sobrenadante das culturas de tecido adiposo. Foram utilizados Kits Biotrak ELISA System (Amersham Biosciences®- UK). Esse ensaio de captura do antígeno é empregado para detectar produtos secretados, como citocinas (Janeway e cols., 2006). O protocolo utilizado para no desenvolvimento do ensaio segue recomendações do fabricante.

3.11. Análise de proteínas por imunoblotting

Biópsias de tecido adiposo e de cólon foram homogenizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7,6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinina 0,1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM. Os extratos foram centrifugados em 12000 rpm à 4°C por 20 minutos. O conteúdo de proteína dos extratos foi determinado através do método de Biureto.

Ao sobrenadante coletado foi adicionado Tampão de Laemmli, contendo DTT 100 mM, e as amostras foram fervidas em banho-maria por 5 minutos para

aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separação por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos anti-TNF- α , anti-IL-10, anti-iNOS, anti- β -actina, anti-TLR-4 e anti-F4/80 e permaneceram *overnight* a 4°C até a revelação com *kits* comerciais de quimioluminescência.

3.12. Expressão dos resultados e Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas, utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da colite experimental

Os animais com colite apresentaram uma redução do peso corporal, em comparação a animais saudáveis do grupo controle (Figura 1). Após o tratamento com metotrexato não houve uma recuperação significativa, demonstrando que o tratamento com metotrexato não alterou o peso corpóreo final dos animais.(Figura 1).

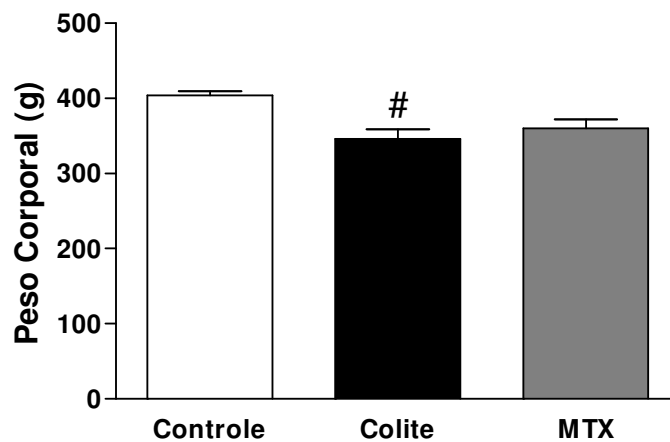


Figura 1. Peso corporal dos animais do grupo controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 10 experimentos. # $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

A Figura 2 mostra que os animais que receberam TNBS, conforme descrito, apresentaram maior grau de lesões que podem ser visualizadas macroscopicamente, caracterizadas por hiperemia e ulcerações. Lesões necróticas não foram observadas. Após tratamento com metotrexato houve uma redução da presença de lesões observadas (Figura 2).

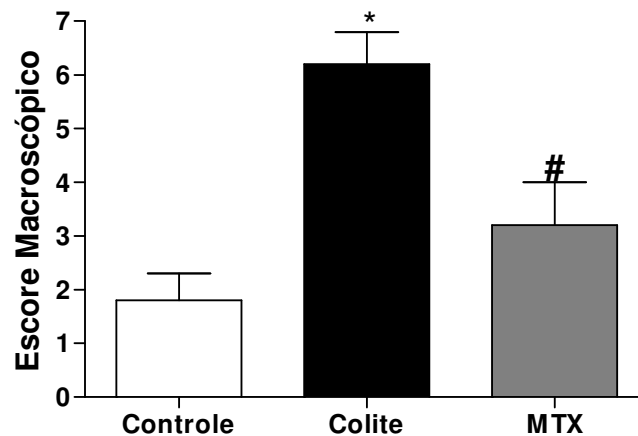


Figura 2. Escore macroscópico atribuído aos cólons de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 10 experimentos. * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo colite.

A análise microscópica revelou que o tratamento com metotrexato foi capaz de reduzir o edema e o infiltrado de neutrófilos, reduzindo também a presença de ulcerações (Figura 3). Essas alterações não foram observadas em animais do grupo controle.

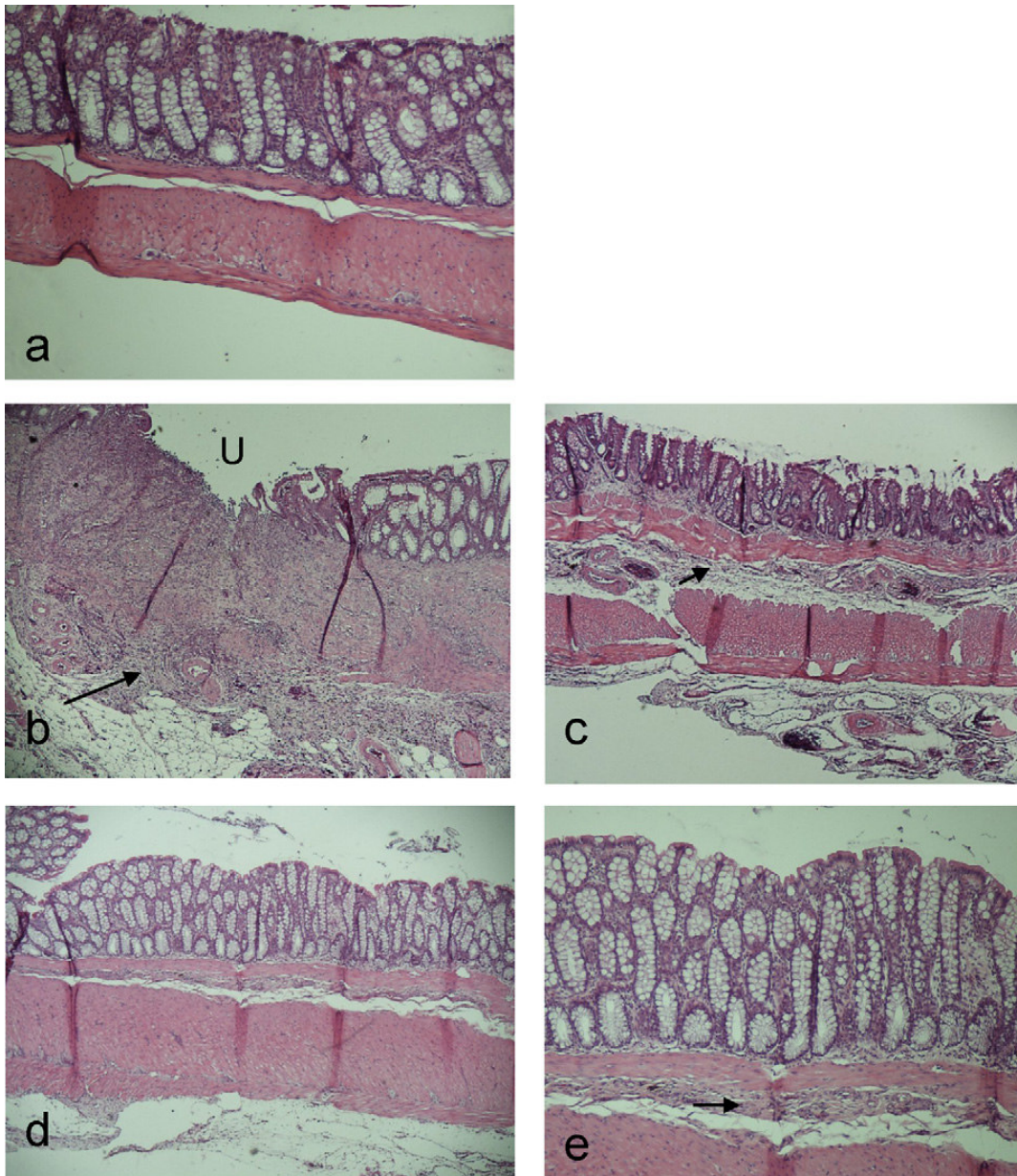


Figura 3. Observação histopatológica dos colons. (A) Mucosa colônica normal de ratos controle (H&E 40X). (B e C) Mucosa colônica de ratos com colite. Nota-se ulcerações (U) e edema de submucosa com intenso infiltrado de células inflamatórias (seta; H&E 100X). (D e E) Mucosa colônica de animais com colite após tratamento com metotrexato. Nota-se infiltrado de células inflamatórias moderado e edema reduzido (H&E 40x e 100x, respectivamente).

Quando analisamos a atividade de mieloperoxidase no tecido colônico desses animais, identificamos que esta se encontra aumentada naqueles com colite, quando comparado aos do grupo controle (Figura 4). Após tratamento com metotrexato podemos observar uma redução significativa da atividade de mieloperoxidase no tecido colônico, confirmando os dados histológicos que mostravam a redução do infiltrado de células inflamatórias após tratamento (Figura 4).

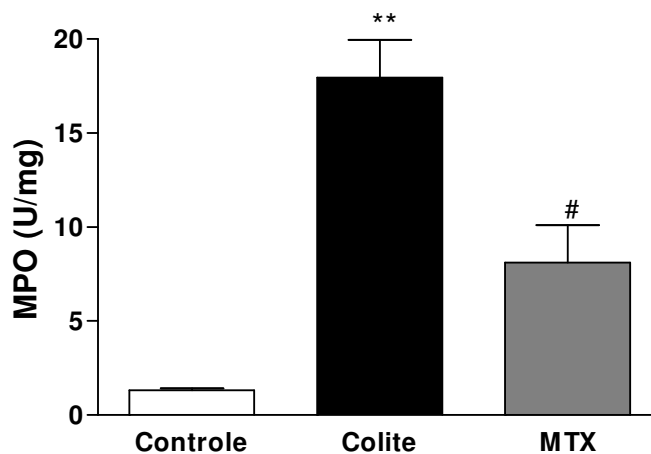


Figura 4. Níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) nos cólons de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$ comparado ao grupo colite.

4.2. Expressão de citocinas, iNOS e TLR-4 no cólon

A Figura 5 apresenta os níveis de TNF- α presentes nos tecidos colônicos dos animais controle com colite e após tratamento. Podemos observar um aumento da expressão de TNF- α no cólon dos animais com colite e uma diminuição significativa naqueles tratados com metotrexato.

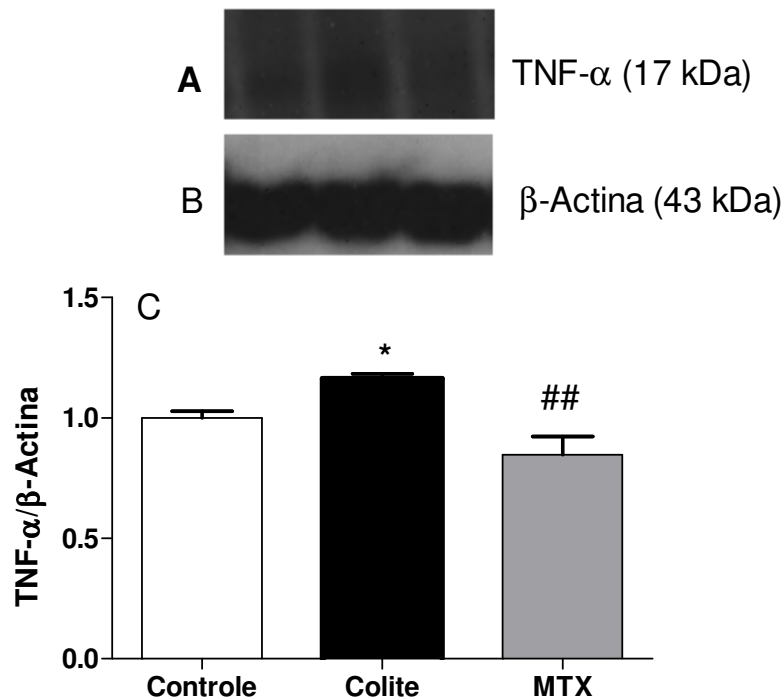


Figura 5. Expressão de TNF- α no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). A e B - Imagens ilustrativas de *Western blots* obtidos com anti-TNF- α e anti- β -actina em mesma amostra. C - Os valores representam a quantificação da intensidade das bandas obtidas com anti-TNF- α , corrigidas pela intensidade das bandas obtidas com anti- β -actina nas amostras, e estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo colite.

Na Figura 6 podemos observar um aumento significativo da expressão da citocina IL-10 no cólon dos animais com colite, após o tratamento com metotrexato. Esta expressão foi reduzida nos animais com colite quando comparada aos de controle.

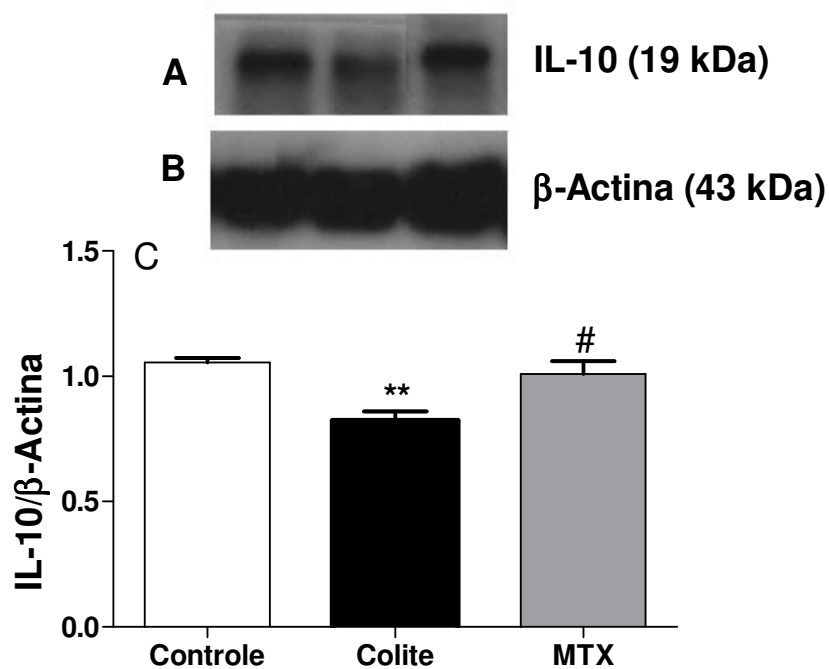


Figura 6. Expressão de IL-10 no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). A e B - Imagens ilustrativas de *Western blots* obtidos com anti-il-10 e anti- β -actina em mesma amostra. C - Os valores representam a quantificação da intensidade das bandas obtidas com anti-IL-10 corrigidas pela intensidade das bandas obtidas com anti- β -actina nas amostras e estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM), de três experimentos realizados. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo colite.

A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida, a iNOS, também foi avaliada no cólon. Podemos observar na Figura 7 que a colite determina um aumento significativo na expressão desta enzima e que o tratamento com o metotrexato foi capaz de reduzir de maneira significativa esta expressão.

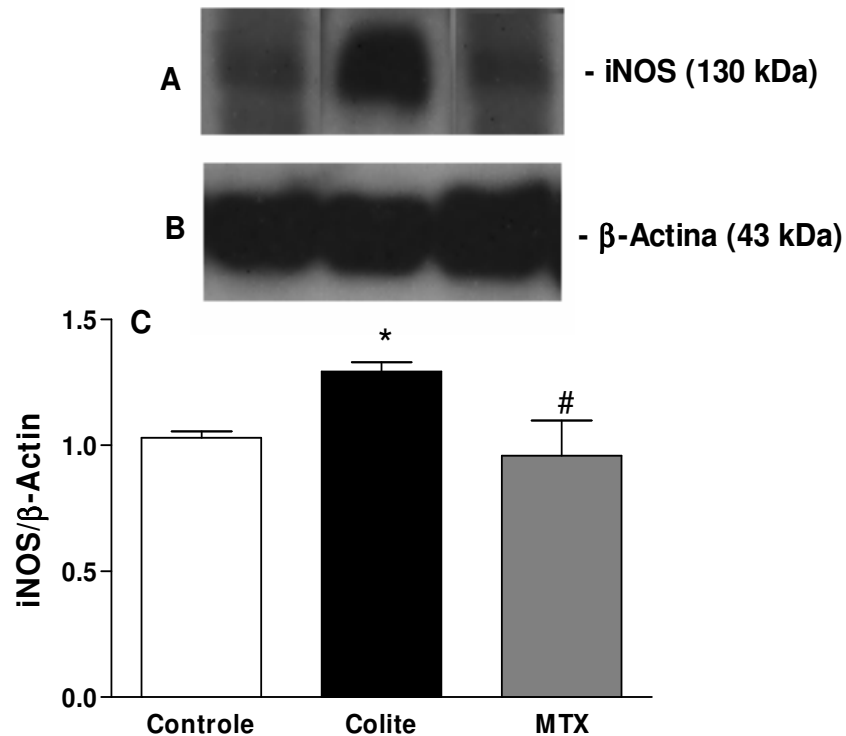


Figura 7. Expressão de iNOS no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). A e B - Imagens ilustrativas de *Western blots* obtidos com anti-iNOS e anti- β -actina em mesma amostra. C - Os valores representam a quantificação da intensidade das bandas obtidas com anti-iNOS corrigidas pela intensidade das bandas obtidas com anti- β -actina nas amostras, e estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de três experimentos realizados. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo colite.

Finalmente, analisamos no cólon a expressão do *Toll-like receptor-4* (TLR-4) e mostramos na Figura 8 que a colite está associada a uma expressão aumentada de TLR-4 no cólon. Novamente, o tratamento com o metotrexato foi capaz de reduzir esta expressão de maneira significativa.

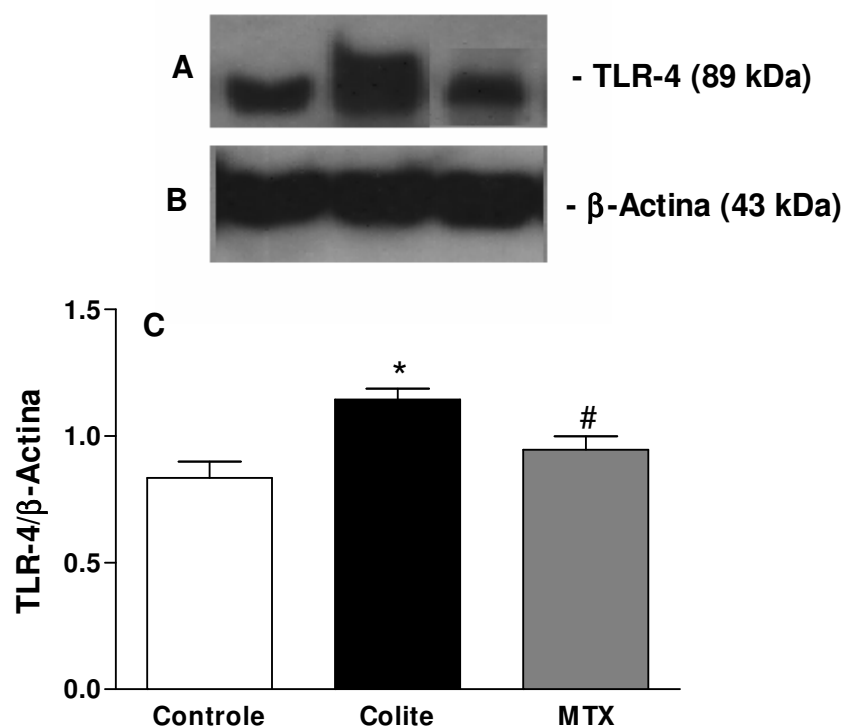


Figura 8. Expressão de TLR-4 no cólon de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). A e B - Imagens ilustrativas de *Western blots* obtidos com anti-TLR-4 e anti- β -actina em mesma amostra. C - Os valores representam a quantificação da intensidade das bandas obtidas com anti-TLR-4 corrigidas pela intensidade das bandas obtidas com anti- β -actina nas amostras, e estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM), de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo colite.

4.3. Produção de Adipocitocinas pelo Tecido Adiposo Mesentérico

Nas culturas de tecido adiposo mesentérico de animais com colite pudemos observar um aumento significativo da capacidade de liberação *ex-vivo* de TNF- α e IL-10 quando comparados ao grupo de animais saudáveis (Figura 9 e 10, respectivamente). Após o tratamento com metotrexato, observamos uma redução da liberação de TNF- α , mas também uma significativa diminuição de liberação de IL-10 (Figura 9 e 10, respectivamente).

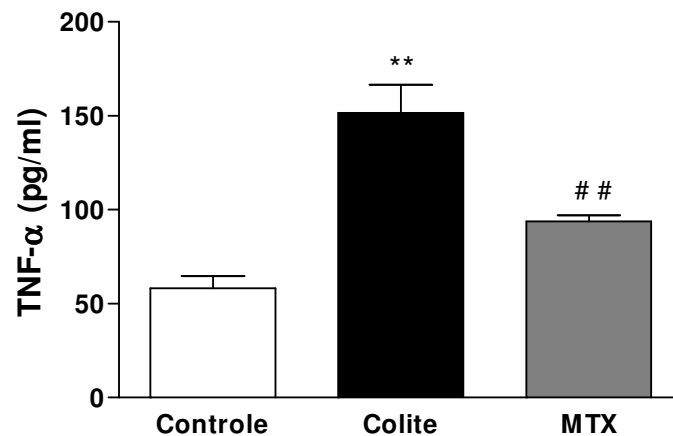


Figura 9. Níveis de TNF- α liberados *ex-vivo* pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo colite.

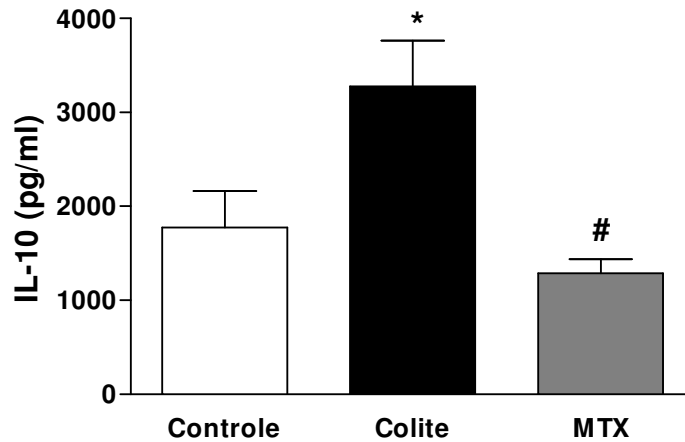


Figura 10. Níveis de IL-10 liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$, quando comparado ao grupo colite.

Não observamos modificação nos níveis de leptina e adiponectina, liberadas pelo tecido adiposo durante a vigência da colite (Figura 11 e 12, respectivamente). O tratamento com metotrexato também não foi capaz de modificar os níveis de leptina, produzidos pelo tecido adiposo mesentérico (Figura 11), mas pudemos observar uma redução significativa da liberação de adiponectina após tratamento dos animais com metotrexato (Figura 12).

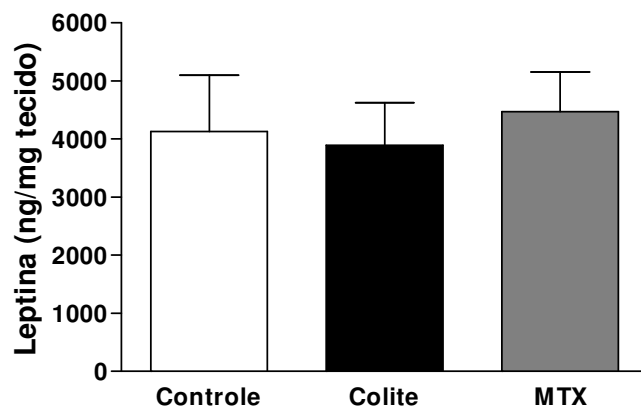


Figura 11. Níveis de leptina liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos.

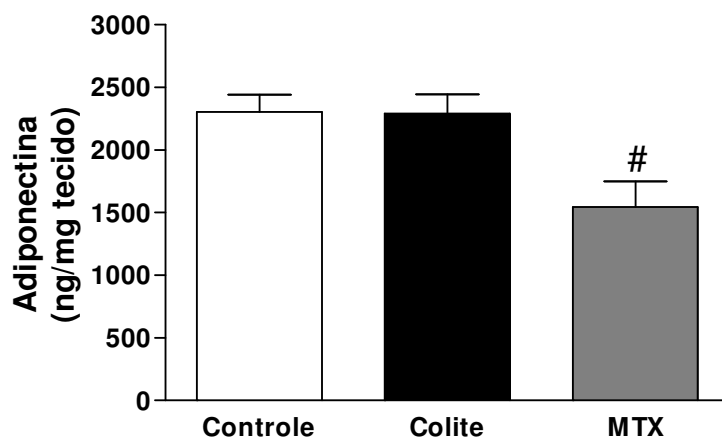


Figura 12. Níveis de adiponectina liberados ex-vivo pelo tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), com colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de cinco experimentos. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo colite.

4.4. Expressão do marcador F4/80 no tecido adiposo mesentérico

Os animais com colite apresentaram no tecido adiposo um nível mais elevado de expressão de F4/80 quando comparado àqueles do grupo controle, indicando a presença de infiltrado de macrófagos (Figura 13). O tratamento com metotrexato foi capaz de reduzir de maneira significativa esta expressão (Figura 13).

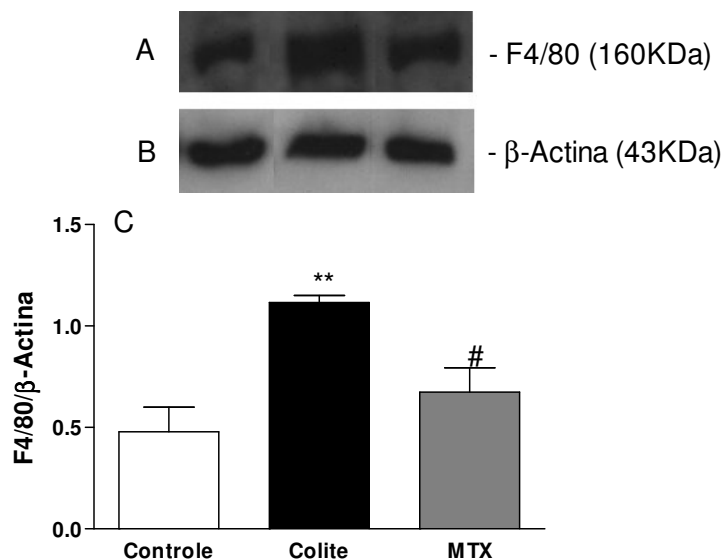


Figura 13. Expressão de F4/80 no tecido adiposo mesentérico de animais controle (CN), colite (CP) e tratados com metotrexato (MTX). A e B - Imagens ilustrativas de *Western blots* obtidos com anti-F4/80 e anti- β -actina na mesma amostra. C - Os valores representam a quantificação da intensidade das bandas obtidas com anti-F4/80 corrigidas pela intensidade das bandas obtidas com anti- β -actina nas amostras, e estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de três experimentos realizados. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo colite.

5. DISCUSSÃO

A DC é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por períodos de atividade, com exacerbação dos sinais e sintomas, alternados com períodos de inatividade (Hanauner, 2004). O modelo experimental de colite induzida por TNBS é o que mais se assemelha à DC. O protocolo utilizado neste estudo incluiu três administrações de TNBS em solução etanólica em intervalos regulares, mimetizando a ocorrência de períodos de atividade seguidos de remissão da doença inflamatória, como se observa na DC. O protocolo utilizado neste estudo também resulta no estabelecimento de alterações no tecido adiposo mesentérico, como descrito em portadores da DC (Gambero e cols., 2007).

O metotrexato (MTX) tem sido utilizado no tratamento de pacientes com DC, mas não há relatos de seu uso no modelo experimental de colite por TNBS com reativações. Também são escassos os relatos científicos da ação de fármacos, utilizados na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais com relação a alterações que se estabelecem no tecido adiposo. Deste modo, iniciamos nosso trabalho procurando caracterizar a ação do metotrexato sobre a inflamação intestinal, e, posteriormente, sobre as alterações do tecido adiposo.

Após indução da colite foi possível observar a presença de lesões macroscópicas no cólon, lesões caracterizadas por hiperemia e ulcerações, não sendo observada presença de necrose. Após tratamento com metotrexato, houve uma redução da presença de lesões observadas. Há vários relatos na

literatura que demonstram resultados semelhantes, alguns em modelo que avaliam após 24 horas, 7 e 14 dias da indução da colite, onde os autores relatam a presença de lesões macroscópicas e altos níveis de infiltrado de neutrófilos (Xia e col., 2004; Camacho-Barquero e cols., 2007). Determinamos os níveis de atividade de MPO existentes no cólon do grupo de animais com inflamação intestinal e comparamos com o grupo saudável. Nesta análise observamos um aumento significativo na atividade de MPO nos animais com colite, confirmando o quadro inflamatório induzido pelo TNBS e o descrito pela literatura.

Não há relatos da utilização de metotrexato no modelo de colite por TNBS com reativações. No modelo de colite reativada, drogas como dexametasona, ciclosporina A e 5-aminosalicilatos foram capazes de reduzir os danos macroscópicos e a atividade do MPO (Appleyard e col., 1995; Galvez e cols., 2003). Em modelo de colite aguda por DNBS (ácido dinitrobenzeno-sulfônico), em camundongos, o tratamento com metotrexato na dose de 0,5 mg/kg/dia, durante sete dias, produziu resultados controversos (Graffner-Nordberg e cols., 2003). Já em outros modelos de colite, como a induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), em camundongos, o tratamento com metotrexato, na dose de 1 mg/kg/dia durante sete dias, reduziu o escore inflamatório (Melgar e cols., 2008). Deste modo, optamos por tratar os animais com uma dose de metotrexato de 3 mg/kg/semana, baseado no descrito em relatos de literatura para outros modelos experimentais de inflamação, que também avaliavam a capacidade de inibir a síntese de TNF- α (Tekeoglu e cols., 2007; Du e cols., 2008). O tratamento escolhido foi capaz de reduzir significativamente o escore macroscópico inflamatório, bem como reduzir a

atividade colônica de MPO confirmando sua ação antiinflamatória e imunossupressora neste modelo experimental. Assim demos prosseguimento, avaliando as alterações histopatológicas.

A DC é caracterizada macroscopicamente e microscopicamente por inflamação crônica em todas as camadas da parede intestinal, no mesentério e nos linfonodos regionais, tanto nos segmentos do intestino delgado, quanto nos segmentos cólicos. Embora pouco definidas as alterações iniciais macroscópicas, o íleo terminal apresenta-se hiperemiado, edemaciado, com mesentério e com linfonodos mesentéricos, correspondentes avermelhados e tumefeitos. Em casos mais avançados, a mucosa tem aspecto nodular, descrito como “pedra de calçamento”. Essa aparência é resultado do espessamento da camada submucosa, aliado a ulcerações da camada mucosa, freqüentemente lineares ao longo do eixo axial do intestino. O comprometimento transmural na DC pode provocar abertura de fístulas, abscessos e fissuras devido à inflamação da camada serosa das alças justapostas, que leva a deposição de fibrina, tornando a superfície mesentérica das alças intestinais inflamadas e aderentes entre si e entre as demais vísceras abdominais. Isso facilita a formação de trajetos fistulosos e aderências fibrosas entre as vísceras (Glickman, 1998). No modelo experimental utilizado neste estudo foi possível observar a formação de lesões transmurais, edema e grande infiltrado de células inflamatórias. O tratamento com metotrexato foi eficiente em reduzir esses parâmetros.

Os problemas nutricionais na DC estão sempre presentes como por exemplo : à ingestão alimentar inadequada, o aumento das perdas intestinais, à má absorção de nutrientes, o catabolismo mediado por citocinas e perdas por

fístulas levando o paciente a perda de peso corpóreo (Cabre e cols., 2002). A correção de deficiências nutricionais é recomendada, especialmente para melhorar a habilidade do paciente em reagir a grandes e extensos períodos de inflamação (Reimond e cols., 2005). Vimos que o protocolo de colite, com reativações, também induz à uma redução no peso corpóreo final dos animais. No entanto, o tratamento com metotrexato não foi capaz de reverter esta redução - provavelmente por ter sido aplicado somente na última semana que antecedeu o sacrifício dos animais - e não permitiu a recuperação deste parâmetro apesar da melhora do quadro inflamatório.

Avaliamos a expressão de TNF- α e IL-10 no cólon dos animais controle, com colite, e também após o tratamento com o metotrexato. Observamos no grupo colite um aumento da expressão de TNF- α e uma redução de IL-10. O metotrexato reduziu a expressão de TNF- α e restabeleceu a expressão de IL-10. A IL-10 é uma citocina com propriedades imunomoduladoras, produzida por vários tipos celulares, incluindo linfócitos B e T, macrófagos, mastócitos e células epiteliais intestinais (Couper e cols., 2008). A IL-10 é capaz de inibir tanto a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), como as derivadas de células Th2 (IL-4 e IL-5). Animais com colite induzida por TNBS, tratados com dexametasona, também apresentaram um aumento da expressão de IL-10 colônico paralelamente à inibição de TNF- α (Zhang e cols., 2006).

Também verificamos a capacidade do metotrexato em modificar outros parâmetros inflamatórios intestinais, como a expressão da iNOS e de TLR-4. Postula-se que a DC surge a partir de uma resposta imunitária à bactérias presentes no ambiente intestinal. Os TLRs são receptores expressos por células do sistema imunológico ou por outras células, como os enterócitos e

têm como função o reconhecimento de padrões expressos por patógenos, ou seja, os TLRs são capazes de identificar microorganismos patogênicos ou comensais, protegendo o organismo de infecção e controlando a homeostase local, respectivamente. Uma maior expressão de TLR-4 foi descrita no íleo terminal de pacientes com DC na fase ativa (Frolova e cols., 2008). Os resultados mostraram que ocorre um aumento na expressão de proteína TLR-4 no cólon, como já havia sido descrito anteriormente (Arranz e cols., 2006; Lubbad e cols., 2009). Observou-se que o tratamento com metotrexato foi capaz de normalizar os níveis de TLR-4 nos animais com colite, sugerindo que esta via poderia contribuir para reduzir a inflamação do intestino. A apoptose de células epiteliais intestinais, durante inflamação, pode estar relacionada a um nível elevado de peroxinitrito produzido localmente pela enzima iNOS (Yue e cols., 2001). O tratamento com metotrexato foi capaz de reduzir a expressão de iNOS nos animais com colite, sugerindo que mais uma via que leva a injúria tecidual possa estar sendo eficientemente reduzida pelo tratamento imunossupressor.

As principais alterações presentes no tecido adiposo mesentérico de pacientes com DC incluem a hipertrofia do tecido e o estado inflamatório crônico local (Desreumaux e cols., 1999). O tecido adiposo possui a capacidade de produção de adipocitocinas, substâncias que participam da resposta inflamatória. Essas adipocitocinas podem apresentar ações pró ou antiinflamatórias, como o TNF- α e leptina e adiponectina, respectivamente (Gambero e cols., 2007). Estudos conduzidos por Paul e cols. (2006) mostram que no tecido adiposo mesentérico, de pacientes com DC, ocorre um aumento da capacidade de produção de adipocitocinas pró-inflamatórias (TNF- α e

leptina), mas também de antiinflamatórias (IL-10, adiponectina). Avaliamos a liberação de adipocitocinas no tecido adiposo mesentérico dos animais controle e com colite, tanto durante a inflamação como após o tratamento com o metotrexato. No modelo experimental, a indução da colite resultou em um aumento da produção pelo tecido adiposo mesentérico de TNF- α e IL-10, mas não houve alterações na produção de leptina e adiponectina. Pudemos observar, após o tratamento com metotrexato, uma inibição significativa da produção da citocina inflamatória TNF- α , associada à redução da produção de IL-10 e, curiosamente, à redução da produção de adiponectina, duas adipocitocinas com funções imunomoduladoras. A capacidade do metotrexato em reduzir significativamente a produção de TNF- α confirma sua ação antiinflamatória e imunossupressora, mostrando que durante a inflamação intestinal, o fármaco age não somente no foco inflamatório intestinal, mas também nos tecidos adjacentes, como o tecido adiposo mesentérico, inibindo a formação de substâncias que possam contribuir para o processo inflamatório. A IL-10 aumenta durante a inflamação, podendo atuar como um mecanismo de equilíbrio entre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias. A redução da produção de TNF- α poderia justificar a redução da produção de IL-10, ou mesmo ser esta uma consequência da ação direta do metotrexato. Outra adipocitocina que possui a função antiinflamatória é a adiponectina expressa por adipócitos maduros que atua em macrófagos e células endoteliais, diminuindo a produção e inibindo a ação do TNF- α (Kern e cols., 2003). Assim, uma redução da produção de TNF- α , associado com uma melhora do estado inflamatório do cólon, poderia resultar em uma menor produção de adiponectina (Stumvoll e cols., 2005).

E finalmente, avaliamos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo mesentérico, por meio da expressão de um marcador específico, o F4/80. O tecido adiposo mesentérico, durante a resposta inflamatória intestinal, é capaz de produzir a proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 dentre outras quimiocinas, que atraem monócitos, os quais se diferenciarão de macrófagos no tecido adiposo e contribuirão para o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório (Robker e cols., 2004; Yu e cols., 2006). No protocolo experimental utilizado neste estudo, pudemos observar que os animais com colite apresentaram um nível mais elevado de F4/80, indicando a presença de infiltrado de macrófagos. O tratamento com MTX foi capaz de reduzi-lo, sugerindo que o fármaco esteja interferindo com os processos que levam ao recrutamento de monócitos para o tecido adiposo, como a expressão de moléculas de adesão, por exemplo (Vivasnathan e cols., 2007). Um menor infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo também pode ser o responsável pela redução das citocinas, produzidas localmente.

Cabe destacar que este estudo ganhou espaço nas páginas da revista internacional *Pharmacological Research*, em janeiro de 2009, com a publicação do artigo intitulado *Methotrexate is effective in reactivated colitis and reduces inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammation* (ANEXO 1).

6. CONCLUSÃO

O tratamento com metotrexato foi capaz de reduzir a inflamação intestinal no modelo de colite por TNBS com reativações em ratos, reduzindo todos os parâmetros observados (lesões, infiltrado de células inflamatórias, produção de citocinas e outros marcadores pró-inflamatórias). O fármaco foi também capaz de restaurar a produção local de fatores antiinflamatórios, como a IL-10. A ação antiinflamatória/imunossupressora do fármaco foi ainda capaz de reduzir as alterações inflamatórias, estabelecidas no tecido adiposo mesentérico durante a resposta inflamatória intestinal, como a produção de citocinas pró-inflamatórias e o infiltrado de macrófagos. Isso sugere que a intervenção terapêutica pode modificar também as alterações observadas no tecido adiposo de pacientes com DC.

7.REFERENCIAS

APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 269, pt. 1, p. 119-25, Jul. 1995.

ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, London, v. 19, n. 4, p. 471-482, Dec. 2005.

ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 257, n. 1, p. 79-83, 2 Apr. 1999.

ARRANZ, A. et al. Effect of VIP on TLR2 and TLR4 expression in lymph node immune cells during TNBS-induced colitis. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 1070, p. 129-34, Jul. 2006.

BASTARD, J. P. et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, Philadelphia, v. 85, n. 9, p. 3338-42, Sep. 2000.

BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-Reactive Protein. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 47, p. 48487-90, Nov. 2004.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar. 1982.

CABRÉ, E.; FERNANDEZ-BAÑARES, F.; GASSULL, M. A. Nutrición em la enfermedad inflamatoria intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v. 17 (Supl.), p. 27-31, 2002.

CAMACHO-BARQUERO, L. et al. Curcumin, a curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX 2 and Inos expression in chronic experimental colitis. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 333-342, Mar. 2007.

COELHO, J.; LAVERY, I. C. **Aparelho digestivo, clínica e cirúrgica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi. Rio de Janeiro, 1995.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, n. 9, p. 5771–7, 1 May 2008.

CHARRIERE, G. et al . Preadipocyte conversion to macrophage: evidence of plasticity. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 11, p. 9850-5, 14 Mar. 2003.

CROSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate : increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 92, n. 6, p. 2675-82, Dec. 1993.

DAMIÃO, A. O. M. C.; HABR-GAMA, A. Retocolite ulcerativa idiopática (RCUI). In: Dani R, Castro L. de P. **Gastroenterologia Clínica** . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1993. cap. 1, p. 1037-69

DESREUMAUX, P. et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 117, n. 1, p. 73–81, Jul. 1999.

DESREUMAUX, P.; GHOSH, S. Review article: mode of action and delivery of 5-ammosalicylic acid – new evidence. **Alimentary Phamacology and Therapeutics**, Oxford, v. 24, Suppl. 1, p. 2-9, Sep. 2006.

DU, F. et al. T 614, a novel immunomodulator, attenuates joint inflammation and articular damage in collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 10, n. 6, p. R136, 19 Nov. 2008.

DUSSERRE, E.; MOULIN, P.; VIDAL, H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. **Biochimica et Biophysica Acta.**, Amsterdam, v. 1500, n. 1, p. 88-96, 3 Jan. 2000.

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **FASEB Journal** , Bethesda, v. 14, n. 15, p. 2565-71, Dec. 2001.

FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 115, n. 5, p. 911-919, May 2005.

FRASER, A. G. et al. The efficacy of methotrexate for maintaining remission in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.16, n. 4, p. 693-7, Apr. 2002.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6, depot difference and regulation by glucocorticoid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v. 83, n. 3, p. 847-50, Mar. 1998.

FROLOVA, L. et al. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 56, n. 3, p. 267–74, Mar. 2008.

GALVEZ, J. et al. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 9, n. 6, p. 363–71, Nov. 2003.

GAMBERO, A. et al. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 13, n. 11, p. 1357-64, Nov. 2007.

GLICKMAN, R. M. Inflammatory bowel disease: ulcerative colitis and Crohn's disease. In: HARRISON, T. R. **Harrison's principles of internal medicine**. 14. ed. New York: McGraw-Hill, 1998.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes and Metabolism**, Masson, v, 30, n. 1, p. 13-19, Fev. 2004.

GRAFFNER-NORDBERG, M. et al. Design and synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors encompassing a bridging ester group, Evaluation in a mouse colitis model. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 46, n. 16, p. 3455-62, 31 Jul. 2003.

GUALILLO, O.; GONZÁLEZ-JUANATEY, J. R. ; LAGO, F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 17, n. 8, p. 275-83, Nov. 2007.

HANAUER, S. B. et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomized trial. **Lancet**, London, v. 359, n. 9317, p. 1541-1549, 4 May 2002.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel diseases: epidemiology, pathogenesis therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 12, n. 5, p. S3-S9, May 2006.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 83, n. 4, p. 653-8, 30 Dec. 2004.

HAVEL, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, New York, v. 53, Suppl 1, p. S143-51, 1 Feb. 2004.

HERFARTH, H.; SCHOLMERICH, J. IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroad. **Gut**, London, v. 50, n. 2, p. 146-7, Feb. 2002.

HOTTA, K. et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, Dallas, v. 20, n. 6, p.1595-99, Jun. 2000.

ISHIGURO, Y. et al. A. The presentation of haptenated proteins and activation of T cells in the mesenteric lymph nodes by dendritic cells in the TNBS colitis rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1029, p. 346-7, Dec. 2004.

JANEWAY, J. R. et al. **Imunologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JOHNSON, J. A. et al. Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV- associated lipodystrophy. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 286, n. 2, p. E261-71, Fev. 2004.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 26, n. 3, p. 439-51, May 2005.

KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue : regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 95, n. 5, p. 2111-19, May 1995.

KERN, P. A. et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 280, n. 5, p. E745-51, May 2001.

KERN, P. A. et al. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. **Diabetes**, New York, v. 52, n. 7, p. 1779–85, Jul. 2003.

KOZUCH, L. P.; HANAUER, S. B. Treatment of inflammatory bowel disease; a review of medical therapy. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 3, p. 354-377, 21 Jan. 2008.

LI, M. C.; HE, S. H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 10, n. 5, p. 620–5 1 Mar. 2004.

LUBBAD, A.; ORIOWO, M. A.; KHAN, I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague. V. 322, n. 1-2, p. 127-35, Feb 2009.

MATSUMOTO, S. et al. Preventive effects of bifidobacterium- and Lactobacillus- fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. **Digestion**, Basel, v. 64, n. 2, p. 92-9, 2001.

MELGAR, S. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, n. 6, p. 836–44, Jun. 2008.

OLIVEIRA, C. C. et al. Depot-specific alterations to insulin signaling in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammatory response. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 396-402, Apr. 2009.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W. **Citocinas**: imunologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

OTERO, M. et al. Lepstin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FESBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 2, p. 295-301, 17 Jan. 2005.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma proetin adiponectin. **Circulation**, Dallas, v. 100, n. 25, p. 2473-76, 21 Dec. 1999.

PAUL, G. et al. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, Hoboken, v. 12, n. 6, p. 471-7, Jun. 2006.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Terapias de base imunológica**: imunologia básica e clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1999, p. 292-303.

PEYRIN-BIROULET, L. et al. Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? **Gut**, London, v. 56, n. 4, p. 577-83, Apr. 2007.

POND, C. M. Long-term changes in adipose tissue in human disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 60, n. 3, p. 365-374, Aug. 2001.

REIMUND, J. M. Immune activation and nutritional status in adult Cronh's disease patients. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 37, n. 6, p. 424-31, Jun. 2005.

RIGAUD, D. Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet. **Gut**, London, v. 32, n. 12, p. 1492-7, Dec.1991.

ROBKER, R. L. et al. Leukocyte migration in adipose tissue of mice null for ICAM-1 and Mac-1 adhesion receptors. **Obesity Research**, Baton Rouge, v. 12, n. 6, p. 936-40, Jun. 445, 2004.

RODRIGUEZ-CABEZAZ, M. E. et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 11, p. 3263-71, Nov. 2002.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Surgery**, New York, v. 22, n. 4, p. 382-389, Apr. 1998.

SANDBORN, W. J.; FEAGAN, B. G. Review article: mild to moderate Crohn's disease—defining the basis for a new treatment algorithm. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.18, n. 3, p. 263-277, 1 Aug. 2003.

STEFAN, N. et al. Plasma adiponectin and endogenous glucosa production in humans. **Diabetes Care**, Alexandria, 26, n. 12, p. 3315-19, Dec. 2003.

STEIDLER, L et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, Washington, v. 289, n. 5483, 1352-4, 25 Aug. 2000.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, London, v. 365, n. 9467, p. 1333-46, 9-15 Apr. 2005.

SZCZEPAIK, M. Experimental inflammatory bowel disease--role of T cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow, v. 51, n. 2, p. 333-46, Jun. 2000.

TATARANNI, P. A.; ORTEGA, E. A Burning question: does na adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? **Diabetes**, New York, v. 54, n. 4, p. 917-27, Apr. 2005.

TEKEOGLU, I. et al. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 9 p. 895–7, Sep. 2007.

TIAN, H.; CRONSTEIN, B. N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, Andover, v. 65, n. 3, p. 168–73, 2007.

VISVANATHAN, S. et al. Changes in biomarkers of inflammation and bone turnover and associations with clinical efficacy following infliximab plus methotrexate therapy in patients with early rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 34, n. 7, p. 1465–74, Jul. 2007.

XIA, B. et al. Effects of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 10, n. 5, p. 729-732, 1 mar. 2004.

YAMAMOTO, K.; KIYOHARA, T.; MURAYAMA, Y; et al. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. **Gut**, London, v. 54, n. 6, p. 789-796, Jun. 2005.

YU, R.; KIM, C.S.; KWON, B.S.; KAWADA, T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. **Obesity** ;14:1353–62, 2006.

YUE, G.; LAI, P.S.; YIN, K. ; SUN, F.F.; NAGELE, R.G.; LIU, X.; et al. Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production. **J. Pharmacol. Exp. Ther** ;297:915–25, 2001.

ZHANG, H. H.; HALBLEIB, M.; AHMAD, F.; MANGANIELLO, V.C.; GREENBERG, A. S. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. **Diabetes**, 51:2929-35, 2002.

ZHANG, M.; DENG, C.S.; ZHENG, J.J.; XIA, J. Curcumin regulated shift from Th1 to Th2 in trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. **Acta Pharmacol. Sin.** ;27:1071–7, 2006.

8. ANEXO