

JOSÉ NARCISO STURARO

USO DE ANTICORPO ANTI-TNF- α (INFLIXIMAB) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE COM
REATIVAÇÕES EM RATOS.

Bragança Paulista

2011

i

JOSÉ NARCISO STURARO

USO DE ANTICORPO ANTI-TNF- α (INFLIXIMAB) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE COM
REATIVAÇÕES EM RATOS.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Gambero

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

Bragança Paulista

2011

ii

WI 522	Sturaro, Jose Narciso.
S927u (Infliximab) no modelo experimental de colite com reativações em ratos / Jose Narciso Sturaro. -- Bragança Paulista, 2011.	Uso de anticorpo anti-TNF- α Narciso Sturaro. -- Bragança Paulista, 2011.
	37 p.

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

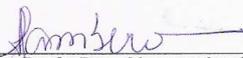
Diretoria Acadêmica de Pós Graduação
Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu
Mestrado em Ciências da Saúde

Credenciado pela CAPES
Portaria Ministerial nº 2.000
DOU 21/12/06 –Seção I – p.35-36

**Ata de Arguição Final da Dissertação do Aluno
José Narciso Sturaro**

Aos quatro dias do mês de Agosto do ano de dois mil e onze , às dez horas , nas dependências da Universidade São Francisco, reuniu-se a Comissão da Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para avaliação da dissertação intitulado "Uso de anticorpo anti –TNF – α (Infliximab) no modelo experimental de colite com reativações em ratos", apresentado pelo aluno José Narciso Sturaro , graduado em Farmácia , pela Universidade Federal do Rio de Janeiro , que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do Grau de "Mestre em Ciências da Saúde" segundo os registros constantes na Secretaria de Campus de Bragança Paulista. Os trabalhos foram instalados às dez horas , pela Prof^a. Dra. Alessandra Gambero, orientadora do Candidato e Presidente da Banca Examinadora, constituída pelos seguintes Professores: Prof^a Beatriz Helena de Mattos Araujo Verri Doutora em Saúde Coletiva pela Universidade Estadual de Campinas, Prof. Marcelo Lima Ribeiro, Doutor em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas . A Banca Examinadora tendo decidido aceitar a dissertação, passou à Arguição Pública do candidato. Encerrados os trabalhos às 12:00 horas, os examinadores, consideraram o candidato aprovado estando apto a receber o título de "Mestre em Ciências da Saúde". E, para constar, eu Prof^a. Dra. Alessandra Gambero lavrei a presente Ata, que assino juntamente com os demais membros da Banca Examinadora.

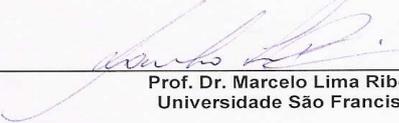
Bragança Paulista, 04 de Agosto de 2011.



Prof^a. Dra. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco



Prof^a. Dra. Beatriz Helena de Mattos Araujo Verri
Universidade Paulista (UNIP – Campinas)



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade São Francisco

Obs.: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Alessandra Gambero, pela sua paciência, dedicação e disposição e estendo esse agradecimento a toda à equipe da UNIFAG. Principalmente para Érica e Thayane.

RESUMO

Doença Inflamatória Intestinal é um termo utilizado para descrever diversas doenças, dentre elas a Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI). A DC é caracterizada por uma inflamação crônica, com períodos de melhora e de recidiva, com característica transmural e que pode afetar qualquer parte do trato digestório, sendo mais comum o íleo terminal e cólon. Caracteriza-se imunologicamente pela produção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α em detrimento da produção de mediadores antiinflamatórios como a IL-10, por exemplo. Os mediadores produzidos são característicos de reações mediadas por linfócitos Th-1. Experimentalmente, estas alterações podem ser observadas no modelo de colite por TNBS com reativações. Deste modo, este projeto teve como objetivo estudar a eficácia do uso de Infliximab (Remicade®), um anticorpo anti-TNF- α utilizado no tratamento de pacientes com DC, no modelo de colite experimental avaliando-se o infiltrado de neutrófilos, as lesões macroscópica e microscopicamente observáveis e as alterações do perfil de citocinas e outros parâmetros inflamatórios presentes no cólon. Nossos resultados mostraram que o Infliximab foi eficiente em reduzir as lesões, o infiltrado de neutrófilos e a expressão de iNOS no cólon dos animais com colite experimental. No entanto, não foi capaz de restaurar a produção de IL-10. A expressão do receptor de TNF- α do tipo 1 também foi aumentada, mostrando que o bloqueio do TNF- α pelo uso de um anticorpo monoclonal é eficiente em controlar a inflamação intestinal, mas sem restaurar a produção endógena de mediadores antiinflamatórios como a IL-10. Verificamos que o infliximab nas doses de 1 e 5 mg/Kg tiveram resultados estatisticamente iguais, o que justifica a proposição de um estudo dose / dependência.

Palavras-chave: Infliximab, TNF- α , colite, citocinas.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease describes a range of different pathologies, such as Crohn Disease (CD) and Ulcerative colitis (UC). DC is characterized by a chronic inflammation, with recurrence and remissions period, with transmural lesions and it can take place at any part of gastrointestinal tract, most frequently occurs in terminal ileum and colon. Immunologically, DC is characterized by increased pro-inflammatory mediator production, such as TNF- α and decreased production of anti-inflammatory mediators, such as IL-10, for example. The mediator production observed is characteristic of an Th-1 response. Experimentally, these alterations can be achieved in a colitis model induced by TNBS with reactivation. Thus, the aim of this work was study the efficacy of Infliximab (Remicade®), an monoclonal antibody anti-TNF- α employed in DC patients therapeutics, in experimental colitis focusing on the neutrophil infiltration, lesions observed macroscopically and microscopically and, the profile of cytokines produced and additional inflammatory marker in colon. Our results shown that Infliximab was efficient in reduce lesions, neutrophil infiltration and iNOS protein expression in colon from colitis animals. However, the treatment was not able to modify either IL-10 neither TNF- α production. The TNF receptors expression was also increased after treatment, suggesting that TNF- α blockade by monoclonal antibody is efficient in the inflammation control, but it was not able to recover the endogenous production of anti-inflammatory mediator, such as IL-10. We found that 1 and 5 mg/Kg doses of infliximab had statistically equal results, which justifies the proposition of a dose / dependence study.

Key words: Imfliximab, TNF- α , colitis, citokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC	Doença de Crohn
DD	Domínio de morte
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DSS	Dextran sulfato de sódio
EDTA	Ácido etileno diamínico tetracético
HLA	Antígeno leucocitário humano
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
JNK	C-JUN N- Terminal Cinase
MPO	Mieloperoxidase
NFKB	Fator nuclear Kappa potencializador de células B ativadas
RIP	Receptor de interação de proteína
RCUI	Retrocolite ulcerativa inespecífica
s TNF α	Fator de necrose tumoral solúvel
TACE	Enzima conversora de TNF α
TH1	Células T Helper 1
TH2	Células T Helper 2
Tm TNF α	Fator de necrose tumoral transmembranar
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF α	Fator de necrose tumoral

TNFR 1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNFR 2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral
TRADD	TNF receptor associado ao domínio de morte

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões macroscópicas no cólon de animais controle (NC, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

Figura 2. Níveis de atividade da mieloperoxidase no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

Figura 3. Análise histológica dos cólons de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com Infliximab 1 mg/kg e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

Figura 4. Níveis teciduais de TNF- α e IL-10 no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

Figura 5. Níveis teciduais de iNOS no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

Figura 6. Níveis teciduais dos receptores de TNF no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/kg nos últimos 7 dias do protocolo).

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Análise macroscópica do cólon.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

-
- 1.1. Doenças *nflamatórias Intestinais*
- 1.2. Citocinas e Doenças Inflamatórias Intestinais
- 1.3. Marcadores inflamatórios: Óxido Nítrico
- 1.4. O Infliximab na DII
- 1.5. Modelos experimentais em Doença de Crohn

2. OBJETIVOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

3.2. Grupos experimentais

3.3. Modelo experimental de colite induzida por TNBS

3.4. Tratamento com Ifliximab

3.5. Coleta de amostras

3.6. Análise macroscópica das lesões

3.7. Análise histopatológica

3.8. Determinação da atividade da mieloperoxidasecolônica

3.9. Imunoensaio enzimático para quantificação de TNF- α e IL-10...

3.10. Análise da expressão protéica da iNOS e dos receptores de TNF- α

.....

3.11. Análise estatística

.....

6. RESULTADOS

.....

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Doenças Inflamatórias Intestinais.*

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), termo que compreende, sobretudo, doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), se constituem em problemas de saúde pública em diversos países. A incidência da DII varia dentro de regiões diferentes. Cerca de 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos (Loftus et al., 2007) e 2,2 milhões na Europa (Neuman, 2007).

O Brasil ainda é considerado uma área de baixa prevalência da DII, apesar de estarmos observando um aumento significativo de trabalhos na literatura nacional descrevendo a incidência destas doenças em nosso país. Como as mesmas não são consideradas doenças de notificação compulsórias, é possível que muitos casos da DII podem não estar sendo diagnosticados e registrados (Souza et al., 2008). Em um trabalho retrospectivo desenvolvido no Estado de São Paulo, observou-se que a incidência da RCUI (4,48 casos/100.000 habitantes) foi maior do que a observada para a DC (3,50 casos/ 100.000 habitantes), embora a incidência da DC tenha apresentado um aumento nos últimos cinco anos enquanto a incidência da RCUI apresentou redução (Victoria et al., 2009).

As DIIs são doenças crônicas, cuja fisiopatologia ainda é desconhecida e os tratamentos disponíveis às vezes com baixa resposta terapêutica. O avanço no conhecimento terapêutico está diretamente relacionado a uma melhor compreensão da fisiopatologia das mesmas e, é neste momento que a abordagem experimental pode contribuir de maneira significativa. Nos últimos anos, muitos progressos foram efetuados, o que permitiu que novos medicamentos fossem disponibilizados para uso terapêutico, melhorando assim a qualidade de vida dos portadores (Cohen et al., 2010).

Conforme Matsumoto e colaboradores (2001), a idade de início da doença está entre os 15 e os 30 anos, tendo um segundo pico entre os 60 e os 80 anos. Não há

predominância de sexo, mas uma possível associação com certas síndromes genéticas.

As principais manifestações clínicas das DIIs são a disenteria, dor abdominal, perda ponderal e náuseas. O índice de mortalidade é baixo e geralmente acontecem nos primeiros anos da doença, principalmente relacionado às alterações nutricionais, como desidratação e anemia, que aumentam a morbidade gerada pelas crises de disenteria (Steidler et al., 2000). Podendo aumentar esta índice se considerarmos em longo prazo, pois pode desencadear outras doenças (câncer intestinal, complicações geradas por má absorção intestinal).

Mais especificamente, a DC caracteriza-se por um envolvimento transmural e descontínuo dos intestinos, podendo atingir todo o tubo digestivo. A etiologia desconhecida tem motivado estudos que apontam causas imunes e possíveis interações com microrganismos intestinais. Observa-se, com freqüência, piora ou início da DC associada a crises emocionais. 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 disenteria, 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).

1.2. *Citocinas e Doenças Inflamatórias Intestinais*

Em condições normais, a integridade da mucosa intestinal fica sobre um delicado controle dado pela produção de citocinas pró- e antiinflamatórias (Bosani et al., 2009). A reação inflamatória descontrolada na DC provavelmente é o resultado da interação entre deficiência genética e sistema imune inato e uma exagerada resposta da imunidade adaptativa, onde certamente se observa um predomínio da produção de citocinas pró-inflamatórias em detrimento da produção de citocinas antiinflamatórias (Bosani et al., 2009). Sugere-se, portanto que a DC decorra de anormalidades

imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microflora normal não patogênica (Matsumoto et al., 2001).

O Fator de Necrose Tumoral (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 desempenha um papel importante na patogênese da DC e a terapia anti-TNF- α utilizando anticorpos monoclonais é a principal alternativa terapêutica atual (D'Haens et al., 2010).

Já a IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida por células T e B e monócitos ativados por lipopolisacarídeos (Kühn et al., 1993). 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, diminuição de outras citocinas como TNF- α e IL-8. A deficiência do gene da IL-10, em camundongos propicia o desenvolvimento espontâneo de inflamação transmural do intestino, lembrando a DC. Este tipo de inflamação é agravado pela presença de bactérias na luz do intestinal e pode ser prevenida com a administração de IL-10 (Herfarth e Schölmerich, 2002). Assim ela contribui para redução da resposta na inflamação aguda. Em modelos animais IL-10 mantém a homeostasia imune, é um caminho promissor para o tratamento de DC (Kühn et al., 1993).

1.3. *Marcadores Inflamatórios: Óxido Nítrico*

O óxido nítrico (NO) está envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças principalmente por modular a permeabilidade endotelial (Moncada et al., 1989). A expressão da isoforma induzida da NOS (iNOS) e a concentração do NO produzido desempenham um papel importante na patogênese das DIIs. Níveis colônicos de NO em pacientes com DII em fase ativa são de dois a cinco vezes maiores do que

pacientes saudáveis ou em remissão (Rachmilewitz et al., 1998). O NO age como um controlador da resposta Th1/Th2, participa nas reações de estresse oxidativo e nas respostas apoptóticas, além de participar de mecanismos de fagocitose de microrganismos (Cho e Chae, 2004).

1.4. O *Infliximab* na *DII*

Como dissemos anteriormente, a terapia anti-TNF- α utilizando anticorpos monoclonais é uma importante alternativa terapêutica da atualidade. Dentre os anticorpos monoclonais anti-TNF- α disponíveis para uso terapêutico, temos o *Infliximab*, *adalimumab* e *certolizumab* (Gonvers et al., 2007). São anticorpos específicos e que após os avanços das tecnologias de recombinação passaram a ter suas respostas imunogênicas bem reduzidas (Drewe e Powell, 2002).

O *Infliximab* (*Remicade*®), um anticorpo IgG quimérico humano-murino tem a capacidade de se ligar ao TNF- α circulante e está sendo amplamente utilizado em DC principalmente em pacientes que não respondem a terapia com glicocorticóides. Um estudo multicêntrico, duplo-cego, controlado com placebo, que forneceu uma única dose intravenosa de *Infliximab* (5 mg/Kg) a pacientes já sob tratamento convencional com doses estáveis de corticóide ou azatioprina, demonstrou melhora clínica, em quatro semanas, de 81% desses pacientes, e de somente 20% nos que receberam placebo (Drewe e Powell, 2002). O *Infliximab* também foi capaz de manter benefícios clínicos por 8 semanas depois de doses repetidas (10 mg/Kg a cada 8 semanas), corroborados por melhora endoscópica, histológica e imunológica (Drewe e Powell, 2002).

1.5. *Modelos experimentais em Doença de Crohn*

Os modelos murinos tradicionais desenvolvidos para o estudo da DC usam indução química, a transferência de células imunes, ou manipulação genética

(Gonçalves et al., 2008). Modelos da DC quimicamente induzidos incluem o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), dextran sulfato de sódio (DSS) e oxazolona. Estes modelos são particularmente úteis no estudo das vias bioquímicas do processo inflamatório e na comprovação de novas estratégias terapêuticas (Linden et al., 2005).

A indução química da inflamação utilizando TNBS em solução alcoólica tem sido extensivamente utilizada. Este modelo foi desenvolvido por Morris e colaboradores (1989), os quais se basearam na hipótese de que, na DC, há um aumento na permeabilidade da mucosa, induzida pelo álcool 50%, com isso resultaria na entrada de um antígeno luminal, que não seria adequadamente eliminado pelo sistema imunológico da mucosa. Adicionalmente, o TNBS, atua como um hapteno, que ao se associar com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas presentes no cólon, desencadeiam uma resposta imunológica (Gonçalves et al., 2008). Deste modo, a administração combinada do etanol e TNBS resulta no estabelecimento de inflamação, com ulceração da mucosa colônica, forte infiltrado de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos), maior produção de citocinas pró-inflamatórias com características de uma resposta Th1, além da presença marcante da expressão aumentada de marcadores inflamatórios como a iNOS (Szczepanik, 2000; Yamada, et al., 1992; Hogaboam et al., 1995).

A avaliação da inflamação intestinal pode ser feita de diferentes formas, por análise histopatológica, por meio da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) tecidual, uma enzima presente principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e até mesmo pela quantificação das citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente (Krawisz et al., 1984).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

- Avaliar a ação do anticorpo monoclonal anti-TNF- α , Infliximab, nas alterações inflamatórias intestinais em modelo de colite experimental.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar a ação do Infliximab (Remicade®) sobre:
 - O dano macroscopicamente observável;
 - Alterações histopatológicas;
 - Infiltrado de neutrófilos;
 - Produção de citocinas pró- e antiinflamatórias, bem como sobre a expressão de outros marcadores inflamatórios no cólon de animais com colite induzida por TNBS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização do estudo, foram utilizados ratos machos Wistar, pesando 200-300 g. Esses animais foram acondicionados em gaiolas 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 (Protocolo CAAE:002.09.09).

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais.

Controle negativo: formado por animais que receberam administrações sucessivas de solução salina via intracolônica;

Controle positivo: formado por animais que receberam administrações sucessivas de solução alcoólica contendo TNBS via intracolônica em duas doses diferentes de tratamento com Infliximab:

1 mg/Kg: grupo formado por animais que receberam administrações sucessivas de solução alcoólica contendo TNBS via intracolônica e Infliximab 1 mg/Kg por via intraperitoneal;

5 mg/Kg: grupo formado por animais que receberam administrações sucessivas de solução alcoólica contendo TNBS via intracolônica e Infliximab 5 mg/Kg por via intraperitoneal.

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 a água. Foram anestesiados com uma mistura 1:1 (v/v) de solução de cetamina 100mg/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 de etanol a 50%. A solução foi injetada no colón dos animais com o auxílio de uma sonda. Esse procedimento foi realizado no 1º, 14º e no 28º dia, sendo os animais sacrificados no 35º dia, totalizando três administrações de TNBS.

3.4. *Tratamento com Infliximab*

Os animais foram tratados nos últimos 7 dias do protocolo de indução da colite experimental descrito anteriormente, ou seja, do 28º ao 35º dia. O Infliximab (Remicade®) foi reconstituído em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e administrado por via intraperitoneal nas doses de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg. O grupo controle positivo recebeu somente solução fisiológica estéril 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 0,15 mL para cada 100 g de peso corpóreo. A cavidade abdominal foi rapidamente aberta, o cólon retirado e aberto para análise do dano macroscópico. Em seguida as amostras foram coletadas 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

As lesões macroscopicamente observáveis foram analisadas de acordo com o descrito por Rodríguez-Cabezas et al. (2002) e mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Análise macroscópica do cólon (Rodríguez-Cabezas et al., 2002).

Escore	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 histopatológica

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

3.8. *Determinação da atividade da mieloperoxidase colônica*

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 (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) – diluído em 1 litro de Tampão Fosfato de Potássio) e centrifugados (10 minutos, 14000 rpm e 4° C). Em seguida, foi adicionado o-dianisidine (16,7 mg de o-dianisidine – Sigma; 90 ul de água oxigenada 1%) ao sobrenadante e foram realizadas leituras cinéticas de absorbância em 460 nm.

3.9. *Imunoensaio enzimático para quantificação de TNF- α e IL-10*

O ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) foi utilizado para quantificar níveis de IL-10 e TNF- α no cólon. Foram utilizados Kit Biotrak ELISA System (Amersham Biosciences – UK). Esse ensaio de captura do antígeno é empregado para detectar produtos secretados, como citocinas. O protocolo utilizado para o desenvolvimento do ensaio segue recomendações do fabricante.

3.10. *Análise da expressão protéica da iNOS e dos receptores de TNF- α*

A expressão protéica de iNOS, e dos receptores de TNF- α no colon foram feitas por *Western blot*. Para tanto, amostras de cólon foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinin 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 min. O sobrenadante foi transferido para tubos contendo tampão de Laemmli com DTT (100 mM) e aquecidas em água fervente por 4 min. para posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separação por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram

transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com os anticorpos de interesse (anti-iNOS, anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti- β -actina) *overnight* a 4°C antes de serem reveladas com Kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare, UK). A intensidade das bandas foi analisada pelo ImageQuant 350 (GE Healthcare, UK).

3.11. *Análise Estatística*

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM) dos experimentos realizados. O escore macroscópico foi apresentado como mediana e tratado como um dado não-paramétrico. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste *t* de *Student* não-pareado ou teste de *Dunnett* para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da colite experimental e efeito do tratamento com Infliximab

Como podemos observar na Figura 1, a administração repetida de TNBS em solução alcoólica via intracolônica aos animais promove um aumento significativo de lesões observáveis macroscopicamente, sendo comuns os achados de necrose, hiperemia e ulcerações. O tratamento dos animais com Infliximab foi capaz de reduzir estas lesões, embora, nas dosagens utilizadas, não tenha sido observado uma relação dose-efeito. Característico deste modelo experimental é o proeminente infiltrado de neutrófilos, observado na Figura 2. O tratamento com Infliximab foi capaz também de reduzir este infiltrado, observado pela atividade da enzima mieloperoxidase. A avaliação histopatológica revela a destruição da camada mucosa com proeminente infiltrado de células inflamatórias na submucosa (Figura 3). O tratamento com Infliximab 1 mg/Kg foi capaz de restaurar a estrutura da camada mucosa, embora ainda seja observado um leve infiltrado celular na submucosa. Nos animais tratados com Infliximab 5 mg/Kg o infiltrado de células inflamatórias também foi atenuado.

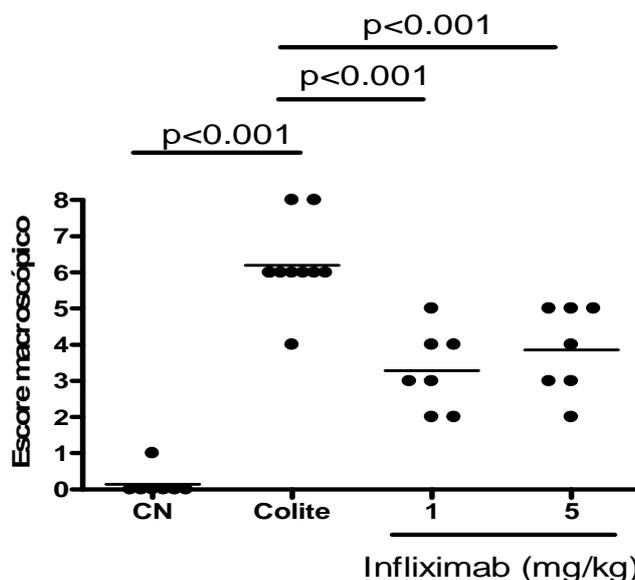


Figura 1. Lesões macroscópicas no cólon de animais controle (NC, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). Os dados e a mediana estão apresentados (n=6-8).

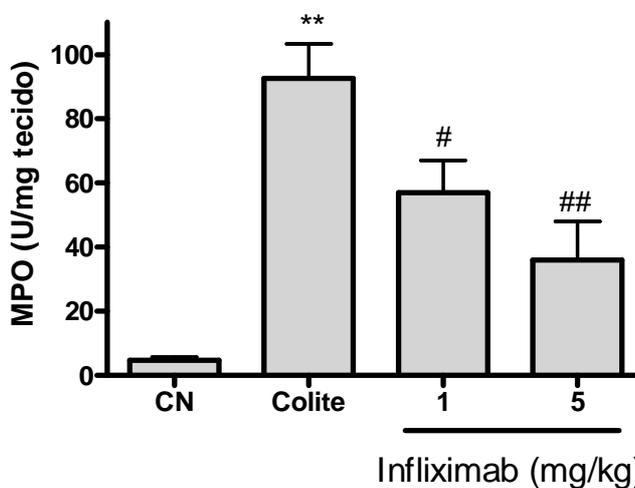


Figura 2. Níveis de atividade da mieloperoxidase no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). As barras apresentam a média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=6-8). ** p<0,01 quando comparado ao CN e #p<0,05 e ##p<0,01 quando comparado ao grupo colite.

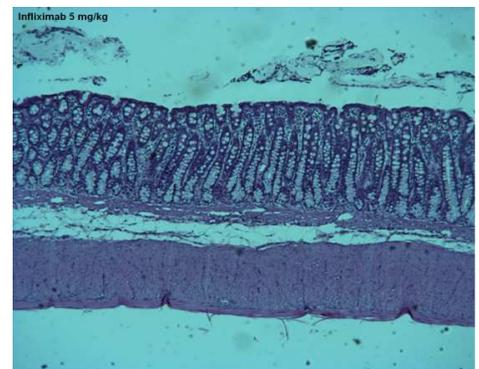
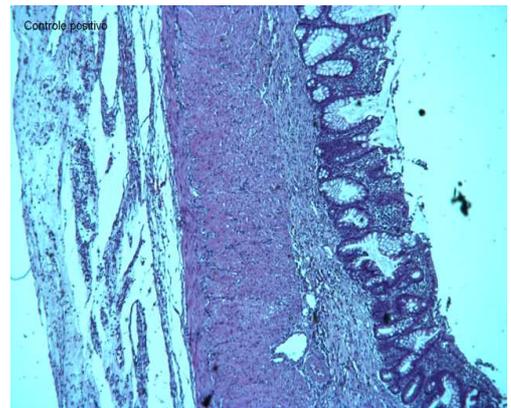
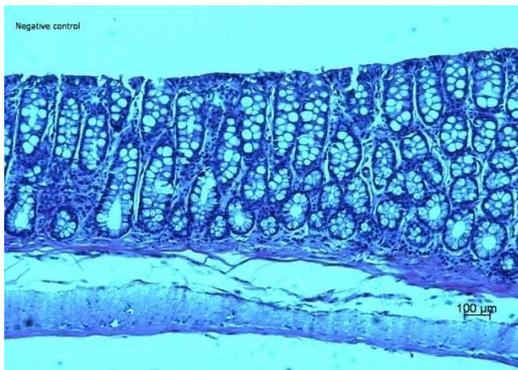


Figura 3. Análise histológica dos cólons de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com Infliximab 1 mg/Kg e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). H&E, 400X.

4.2. Avaliação da produção de citocinas e outros marcadores inflamatórios no cólon

Podemos observar na Figura 4, que a indução da colite induz a um aumento da produção de TNF- α , classicamente uma citocina pró-inflamatória, concomitante a redução da produção de IL-10, uma citocina com propriedades antiinflamatórias. O tratamento com Infliximab aumentou os níveis teciduais de TNF- α . No entanto, não houve modificações nos níveis de IL-10 no cólon após o tratamento.

A expressão colônica de iNOS também foi aumentada em decorrência da colite. O tratamento com Infliximab foi capaz de reduzir a expressão da iNOS nos animais que receberam a dose de 1 mg/Kg de Infliximab (Figura 5).

A expressão protéica dos receptores de TNF- α no cólon também foi avaliada (Figura 6). A colite é capaz de aumentar a expressão tecidual do receptor de TNF- α do tipo 1 e o tratamento com Infliximab resulta em uma maior expressão quando comparado aos animais com colite não-tratados. A expressão do receptor do tipo 2 não foi alterada.

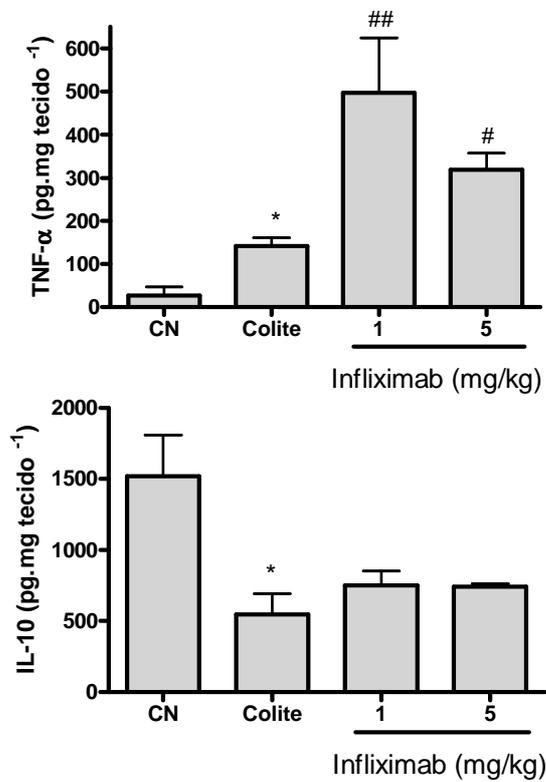


Figura 4. Níveis teciduais de TNF- α e IL-10 no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). As barras apresentam a média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n= 4-6). *p<0,05 quando comparado ao CN e #p<0,05 e ##p<0,01 quando comparado ao grupo colite.

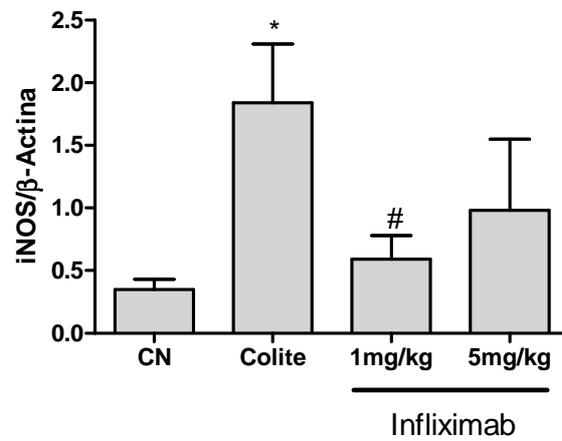


Figura 5. Níveis teciduais de iNOS no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). As barras apresentam a média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=4). * $p < 0,05$ quando comparado ao CN e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo colite.

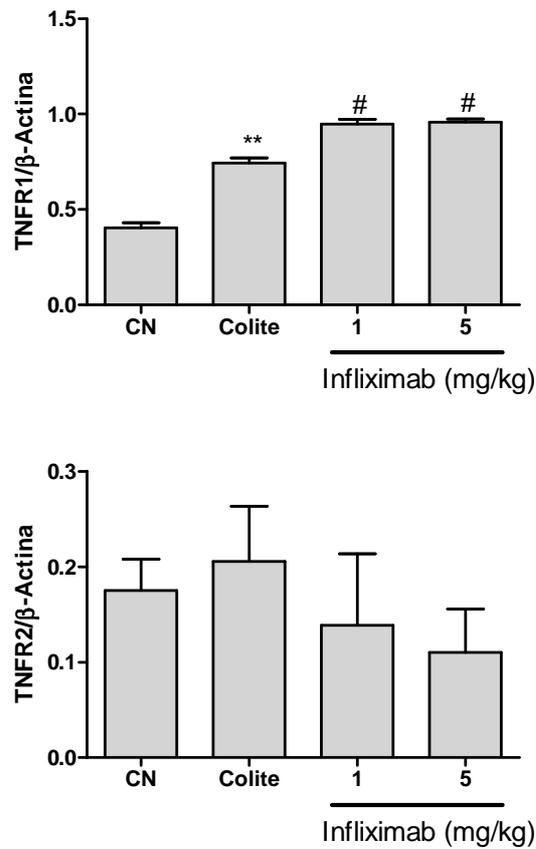


Figura 6. Níveis teciduais dos receptores de TNF no cólon de animais controle (CN, salina), colite (administrações repetidas de TNBS) e colite tratada com duas doses de Infliximab (1 e 5 mg/Kg nos últimos 7 dias do protocolo). As barras apresentam a média acompanhada do respectivo erro padrão da média (n=4). * p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado ao CN e, #p<0,05 e ## p<0,01 quando comparado ao grupo colite.

5. DISCUSSÃO

Os dados relativos ao tratamento farmacológico das DII indicam que, ao menos no Brasil, a maioria dos pacientes tanto como a DC, quanto com RCUI são tratados com, corticosteróides, principalmente na fase aguda das doenças, e os aminossalicilatos são utilizados mais frequentemente nos portadores de RCUI que na DC (Souza et al., 2002). Quando a DC não responde aos tratamentos convencionais, temos como alternativa o tratamento com anti-TNF- α ex: Infliximab. (D`Haens et al., 2010).

Neste estudo experimental o modelo de indução de colite por TNBS com reativações foi escolhido porque reproduz mais fielmente o que ocorre na doença de DC, períodos de remissão e recidiva, alterações no tecido adiposo mesentérico, indução de uma resposta Th-1 e tem sido considerado um modelo adequado para estudos de fisiopatologia e de eficácia terapêutica (Pizarro et al., 2003; Gambero et al., 2007; Santiago et al., 2007). Após a indução da colite foi possível observar macroscopicamente a presença de lesões no cólon, lesões caracterizadas por hiperemia e ulcerações, sem presença de necrose. Histologicamente também foi possível observar a destruição da camada mucosa e um proeminente infiltrado de leucócitos.

A escolha das doses de Infliximab que utilizamos neste trabalho é baseada em relato da literatura, utilizando o modelo de colite aguda por TNBS demonstrou que a dose de 5 mg/Kg de Infliximab apresentou melhores resultados se comparada a doses maiores, como 10 mg/Kg e 15 mg/Kg de Infliximab, quando se avaliou a presença de úlceras ativas, a porcentagem de mucosa não lesionada e os níveis de TNF- α no tecido (Triantafillidis et al., 2005).

Neste estudo utilizamos 1 mg/Kg e 5 mg/Kg e pudemos observar que a administração do Infliximab resultou em redução da presença de lesões macroscópicas e das alterações histopatológicas, corroborando com trabalhos descritos na literatura (Triantafillidis et al., 2005; Shen et al., 2007).

Na DII, o nível de infiltração de neutrófilos estava aumentado o que eleva a quantidade de MPO no órgão inflamado (Nakhai *et al.*, 2006). A mieloperoxidase é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, e é extensamente utilizada como marcador bioquímico de infiltração desses leucócitos, por isso sua quantificação esta relacionada com a presença dessas células nos diferentes tecidos, inclusive no trato gastrointestinal (Yan *et al.*, 2009). Neutrófilos têm sido apontados como sendo o principal tipo celular envolvido na injúria tecidual em DII (Dallegrì *et al.*, 1990). Contribui para esta injúria produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS) e mediadores da inflamação como prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (Middleton Jr. *et al.*, 2000). Experimentalmente, observar-se que neste modelo de colite ocorre um infiltrado de neutrófilos significativo no cólon dos animais e o Infliximab foi capaz de reduzir este infiltrado de células inflamatórias, conforme já havia sido mostrado por Shen e colaboradores (2007). Na literatura, em modelos experimentais de colite também há a descrição da redução dos níveis de MPO quando os animais são tratados com corticóides, imunossupressores, e 5-aminosalicilatos (Appleyard e Wallace, 1995; Galvez *et al.*, 2003).

A resposta imune na DC é caracterizada por um incremento na produção das citocinas pró-inflamatórias, principalmente as decorrentes da ativação de Th-1. Altas concentrações de TNF- α são encontradas em pacientes com DC (Braegger *et al.*, 1992; Nicholls *et al.*, 1993) e por este motivo, o bloqueio desta citocina com o uso de Infliximab tem sido tão importante para bons resultados terapêuticos. O TNF- α é primeiramente sintetizado como uma proteína transmembrana de 26 kDa (TmTNF- α) com uma porção de ligação intracelular. A metaloproteinase enzima conversora de TNF- α (TACE) quebra o TmTNF- α e libera uma proteína solúvel de 17 kDa (sTNF- α) (Black, *et al.*, 1997; Moss, *et al.*, 1997). Muitas células são capazes de produzir TNF- α , mas, quantitativamente monócitos e macrófagos são células com grande importância (Vassalli, 1992).

O TNF- α é dosado por ELISA, observamos um aumento da quantidade, mesmo tratando com Infliximab o que não havia sido relatado pelos trabalhos experimentais anteriores de Triantafilidis e colaboradores (2005) e Shen e colaboradores (2007). No

entanto, alguns trabalhos têm mostrado um aumento da forma solúvel do TNF- α em pacientes que receberam o Infliximab, podendo esta ação estar relacionada ao surgimento de outras doenças relacionadas ao TNF- α durante o tratamento com estes fármacos biológicos (Song et al., 2008). Kast e Altschuler (2008) em uma carta-comentário chamaram a atenção para a necessidade de monitoramento dos níveis de TNF- α nos pacientes em tratamento com o Infliximab ou Etanercept. Esta resposta poderia ocorrer como um mecanismo compensatório devido ao bloqueio da ação do TNF- α . Este monitoramento em humanos é feito através de ELISA e existe a dificuldade adicional de que o ensaio poderia estar quantificando o TNF- α livre, mas também o TNF- α bloqueado pelo anticorpo terapêutico e, portanto, níveis aumentados de TNF- α detectados nestes monitoramentos não se traduziriam em maior atividade biológica. Também utilizamos um ensaio de ELISA neste estudo, e, portanto, não podemos descartar que mesmo o TNF- α bloqueado estivesse sendo dosado e o aumento visto seja decorrente de uma resposta compensatória. Ainda, algumas ações demonstradas pelo Infliximab, como a capacidade de provocar apoptose dos linfócitos T ativados não é reproduzida com o etanercept (um fármaco que mimetiza o receptor de TNF- α solúvel), sugerindo que o Infliximab possa ter outras ações além do bloqueio do sTNF- α (Van et al., 2003).

Os níveis de IL-10, uma citocina com atividade antiinflamatória, bem conhecida, que foram reduzidos com a indução da colite não se modificaram com o tratamento. Imunossuppressores como o metotrexato são capazes de melhorar a produção de IL-10 neste modelo experimental (Thomaz et al., 2009). A etiologia da DC permanece desconhecida, entretanto parece evidente que a inflamação está associada a um desbalanço entre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias pela mucosa intestinal. Curiosamente, embora o tratamento com Infliximab tenha sido capaz de reduzir lesões, a produção de uma importante citocina antiinflamatória como a IL-10 não foi restaurada.

Embora a produção de IL-10 não tenha sido restaurada, a expressão de um importante marcador da inflamação, a enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) foi marcadamente inibida nos animais tratados com Infliximab. A iNOS é uma enzima

presente em quadros inflamatórios responsável por produzir o óxido nítrico NO a partir de L-arginina (Kobayashi, 2010). Não há relatos na literatura da ação do tratamento com anticorpos anti-TNF- α sobre a expressão de iNOS em modelos experimentais de inflamação intestinal. Mas, pacientes com artrite reumatóide severa tratados com Infliximab apresentaram menor expressão da iNOS e produção reduzida de óxido nítrico (Gonzalez-Gay et al., 2009). A inibição farmacológica (Infliximab) ou genética (animais *knockout*) das ações do TNF- α resultam em inibição da ativação da via que envolve NF κ B com consequente redução da expressão de iNOS e produção de óxido nítrico em macrófagos (Crisafulli et al., 2009), o que poderia justificar nossos achados.

Existem 2 tipos de receptores para o TNF- α , o TNFR1 e o TNFR2 (Fiers, 1991; Tartaglia; Goeddel, 1992). Detalhando melhor o mecanismo de ação destes dois receptores, o TNFR1 é ativado via TNF- α solúvel e membranal (Grell et al.1995), a parte intracelular deste receptor possui uma região de interação proteína-proteína chamada de domínio de morte (*death domain*, DD; Tartaglia e Goeddel, 1992). Após a ativação do DD ele se dissocia, é adaptada a outra proteína conhecida que atua como receptor, a TRADD (TNF receptor-associated death domain; Jiang et al., 1999). O DD pode também interagir com outras proteínas de sinalização como o RIP (receptor-interacting protein; Boldin et al., 1996). Todas estas vias de sinalização vão culminar com a ativação do fator de transcrição Nf- κ B ou ativar cinases, como a JNK (c-Jun N-terminal kinase; Liu et al., 1996). Ao contrario do TNFR1, o TNFR2 não possui DD e é preferencialmente ativado por TNF- α membranal do que TNF- α solúvel (Grell, 1995). Sinaliza por vias que se intercomunicam com as vias utilizadas pelo TNFR1 embora traduza respostas mais tardias (24 horas após a estimulação; Maechetti et al., 2004). Ainda, as ações relacionadas à morte celular parecem ser mediadas pelo subtipo 1, enquanto o subtipo 2 mediará respostas relacionadas ao reparo tecidual e angiogênese (Bradley, 2008). A expressão dos subtipos de receptor de TNF- α é altamente regulada em resposta a isquemia e inflamação. Inúmeros estímulos, como o TNF- α , a IL-10 e o ativador de plasminogênio tecidual aumentam a expressão do subtipo 2 do receptor de TNF, enquanto normalmente causam regulação negativa na expressão do subtipo 1 (Winzen et al., 1992; Kalthoff et al., 1993; Winzen et al., 1993). Como não observamos

um aumento de IL-10 e as ações do TNF- α estavam bloqueadas pela ação do Infliximab, a regulação negativa do subtipo 1 não ocorreu, e não observamos alterações na expressão do subtipo 2.

6. CONCLUSÃO

O Infliximab foi efetivo no tratamento da inflamação intestinal no modelo experimental de colite por TNBS com reativações, reduzindo o dano tecidual, o infiltrado de células inflamatórias e a expressão de outros marcadores inflamatórios, no entanto, sem estimular a síntese de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 no intestino.

Observamos que o Infliximab na dose de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg tiveram resultados estatisticamente iguais, podemos propor um estudo de dose dependência o que seria útil para redução de efeitos colaterais e custos.

7. REFERÊNCIAS

Appleyard, C. B.; Wallace, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am J Physiology**, 269:119-125, 1995.

Black, R.; Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) **Nature** 385, 729–733.

Boldin, M.P.; Goncharov, T.M.; Goltseve, Y.V.; Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. **Cell**, 85(6), 803-815, 1996.

Bosani, M.; Ardizzone, S.; Porro, G.B. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Biologics**, 3:77-97, 2009.

Braegger, C. P.; Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S. MacDonald, T. T., Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, 339:89-91,1992.

Bradley JR.; TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**. 214(2):149-60, 2008.

Cho, W.S.; Chae, C. Expression of cyclooxygenase – 2 and nitric oxide synthase 2 in swine ulcerative colitis caused by Salmonella typhimuriun. **Vet Pathol**, 41(4): 419-23, 2004.

Cohen, R.D.; The pharmacoeconomics of biologic therapy for IBD nature reviews **Gastroenterol Hepatol**, 7(2):103-109, 2010.

Crisafulli, C.; Mazzon E, Genovese T, Paterniti I, Bramanti P, Cuzzocrea S. Effect of PD98059, a selective MAPK3/MAPK1 inhibitor, on acute lung injury in mice. **Int J Immunopathol Pharmacol**. ;22(4):937-50 2009.

Dallegri, F.; Ottonello, L.; Ballestrero, A.; Bogliolo, F.; Ferrando, F.; Patrone, F. Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: A potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. **Gut**, 31(2):184-186, 1990.

D'Haens; Panaccione, R.; Higgins, P.D. *et al.*, The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organization : when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response? **Am J Gastroenterol**, 106(2):199-212, 2010.

Drewe, E.; Powell, R.J. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment **J Clin Pathol**, 55(2):81-5, 2002.

Fiers, W.; Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. **Febs Lett**, 285(2):199-212, 1991.

Gálvez J.; Garrido M, Rodríguez-Cabezas ME, Ramis I, de Medina FS, Merlos M, Zarzuelo Am.**Inflamm Bowel Dis.**; 9(6):363-71, 2003.

Gambero, A.; Maróstica, M., Abdalla Saad, M. J. and Pedrazzoli, J. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. **Inflamm Bowel Dis**, 13, 11,1357-64, 2007.

Gonzalez-Gay MA.; Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Fillooy JA, Gonzalez-Juanatey C, de Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J. Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 27(3):452-8, 2009.

Gonçalves, C. C. M.; Hernandez, L.; Oliveira, N.L.B. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Cienc cuid saúde**, 7(1):107-111, 2008.

Grell, M.; Tumor necrosis factor (TNF) receptor in cellular signaling of soluble and membrane – expressed TNF. **J Inflamm**, 47:8-17, 1995.

Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Löhden, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K. . The transmembrane form of tumor necrosis factor in the prime activating ligand of the 80kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, 83(5):793-802, 1995.

Herfarth, H.; Schölmerich, J. IL-10 Therapy In Crohn's disease: At The Crossroad. **Gut**, 50(2):146-7, 2002.

Hogaboam, C.M.; Jacobson, K.; Collins, S.M.; Blennerhassett, M.G. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. **Am J Physiol**, 268 G673-84, 1995.

Gonvers, J.J.; Juillerat, P.; Mottet, C. Maintenance of medically induced remission of crohn's disease. **Digestion**, 76(2):116-129, 2007.

Jiang, Y.; Woronicz, J.D.; Liu, W.; Goeddel, D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. **Science**, 283 (5401):543-546, 1999.

Kalthoff H.; Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W. Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. **J Biol Chem**. 268(4):2762-6, 1993.

Kast, R.E.; Altschuler, E.L. Both etanercept and Infliximab can elevate tumor necrosis factor (TNF)-alpha and be the cause of treatment related new onset disease: the need to measure circulating TNF-alpha. **J Rheumatol**, 35(8):1679-80, 2008.

Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**. 88(6):1157-62, 2010.

Krawisz, J.E.; Sharon, P.; Stenson, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster models. **Gastroenterology**, 87(6):1344-1350, 1984.

Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W.; Mawe, G.M. Interleukin – 10 – deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, 75:263 – 274, 1993.

Linden, D.R.; Couvrette, J.M.; Ciolino, A.; McQuoid, C.; Blaszyk, H.; Sharkey, K.A. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea – pig distal colon. **Neurogastroenterol Motil**, 17(5):751 – 760, 2005.

Liu, Z.G.; Hsu, H.; Goeddel, D.V.; Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF – kappaB activation prevents cell death. **Cell**, 87(3):565-576, 1996.

Loftus, C.G.; Loftus, E.V. Jr; Harmsen, W.S.; Zinsmeister, A.R.; Tremaine, W.J.; Melton, L.J.; Sandborn, W.J. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. **Inflamm Bowel Dis**, 13(3):254-61, 2007.

Maechetti, L.; Klein, M.; Schlett, K.; Pfizenmaier, K.; Eisel, U.L.M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB pathway. **J Biol Chem**, 279(31):32869-32881, 2004.

Satoshi, M.; Nami, W.; Akemi, I.; Yoshio, O. Preventive effects of Bifidobacterium – and Lactobacillus-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence–accelerated mouse PI/Yit strain mice. **Digestion**, 64(2):92-9, 2001.

Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, 52(4):673-751, 2000.

Moncada, S.; Palmer R.M.; Higgs, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol**, 38(11):1709-15, 1989.

Morris, G.P.; Beck, P.L.; Herridge, W.; Depew, W.; Szewczuk, M.R.; Wallace, J.L. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol.*, v.96, p.795-803, 1989.

Moss, M.L.; Jin, S.L.; Milla, M.E.; Bickett, D.M.; Burkhart, W.; Carter, H.L.; Chen, W.J.; Clay, W.C.; Didsbury, J.R.; Hassler, D.; Hoffman, C.R.; Kost, T.A.; Lambert, M.H.; Leesnitzer, M.A.; McCauley, P.; McGeehan, G.; Mitchell, J.; Moyer, M.; Pahel, G.; Rocque, W.; Overton, L.K.; Schoenen, F.; Seaton, T.; Su, J.L.; Becherer, J.D. Cloning of a desintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor – necrosis factor – alpha. **Nature**, 20;385(6618):733-6, 1997.

Nakhai, L.A.; Mohammadirad, A.; Yasa, N.; Minaie, B.; Nikfar, S.; Ghazanfari, G.; Zamani, M.J.; Dehghan, G.; Jamshidi, H.; Boushehri, V.S.; Khorasani, R.; Abdollahi, M. Benefits of Zataria multiflora Boiss in Experimental Model of Mouse Inflammatory Bowel Disease. **Evid Based Complement Alternat Med**, 4(1):43-50, 2007.

Neuman, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Transl Res.**, 149(4):173-86, 2007.

Nicholls, S.; Stephens, C. P.; Braegger, J. A.; Walker, S.; MacDonald, T.T. Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. **J Clin Pathol.**, 46(8):757-760, 1993.

Oppenheim, J.J.; Ruscetti, F.W. **CITOCINAS: imunologia médica** 9 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000; 689.

Peakman, M.; Vergani D. **Terapias de Base Imunológica – Imunologia Básica**, Rio de Janeiro. Guanabara koogan.; 292-303, 1999.

Pizarro, T.T.; Michie, M.H.; Bentz, M.; Woraratanadharm, J.; Smith, M.F.Jr.; Foley, E.; Moskaluk, C.A.; Bickston, S.J.; Cominelli, F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. **J Immunol**; 162: 6829-6835, 1999.

Rachmilewitz, D.; Eliakim, R.; Ackerman Z.; Karmeli, F. Direct determination of colonic nitric oxide level--a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. **AM J Gastroenterol**, 93(3):409-12, 1998.

Rodríguez-Cabezas M.E.; Gálvez, J.; Lorente, M.D.; Concha, A.; Camuesco, D.; Azzouz, S.; Osuna, A.; Redondo, L.; Zarzuelo, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J Nutrition**, 132(11):3263- 71, 2002.

Rothe, M.; Pan, M.G.; Henzel; W.J.; Ayres, T.M.; Goeddel, D.V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. **Cell**, 83:1243-1252, 1995.

Shen C.; de Hertogh, G.; Bullens D.M.; Van Assche, G.; Geboes K.; Rutgeerts P.; Ceuppens J.L. Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization? **Inflamm Bowel Dis**, 13(3): 308-16, 2007.

Song, I.H.; Appel, H.; Haibel, H. New onset of Crohn's disease during treatment of active ankylosing spondylitis with etanercept. **J Rheumatol**, 35(3):532-6, 2008.

Souza, M.M.; Belasco, A.G.; Nascimento, J.E. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. **Ver Bras Coloproct**, 28(3):324-328, 2008.

Souza, M.H.; Troncon, L.F.; Rodrigues, C.M.; Vianna, C.F.; Onofre, P.H.;Monteiro, A. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in the southeastern Brazil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, p.98-105, 2002.

Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neiryck, S.; Obermeier, F.; Fiers, W.; Remaut, E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, 289(5483):1352-1355, 2000.

Szczepanik, M. Experimental inflammatory bowel disease—role of T cells. **J Phys Pharm**, 51(2):333-46, 2000.

Tartaglia, L.A.; Goeddel, D.V. Two TNF receptors, **Immunol Today**, 13(5):151-153, 1992.

Thomaz, M.A.; Acedo, S.C.; de Oliveira, C.C.; Pereira, J.A.; Priolli, D.G.; Saad, M.J.; Pedrazzoli, J.Jr.; Gambero, A. – **Pharm Res**, 60, (4), 341-346, 2009.

Triantafillidis, J.K.; Papalois, A.E.; Parasi, A.; Anagnostakis, E.; Burnazos, S.; Gikas, A.; Merikas, E.G.; Douzinas, E.; Karagianni, M.; Sotiriou, H. Favorable response to subcutaneous administration of Infliximab in rats with experimental colitis. **World J Gastroenterol**; 11 (43): 6843-6847, 2005.

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu Ver Immunol**, 10:411-452, 1992.

Van Den Brande, J.M.; Braat H.; Van Den Brink G.R.; *et al.* Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, 124(7):1774-1785, 2003.

Victoria, C.R.; Sassak, L.Y.; Nunes, H.R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, 46(1):20-25, 2009.

Yamada, T.; Marshall, S.; Specian, R.D.; Grishan, M.B. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, 102: 1524-34, 1992.

Yan, Y.; Kolachala, V.; Dalmaso, G.; Nguyen, H.; Laroui, H.; Sitaraman, S.V.; Merlin, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induce colitis. **Plos One**, 4(6):e6073, 2009.

Winzen R, Wallach D, Kemper O, Resch K, Holtmann H. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. **J Immunol**. 15;150(10):4346-53, 1993.

Winzen, R.; Wallach, D.; Engelmann, H.; Nophar, Y.; Brakebusch, C.; Kemper, O.; Resch, K.; Holtmann, H. Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells. **J Immunol**. 148(11):3454-60, 1992.