

GILBERTO DE ALMEIDA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA HEPCIDINA NA
COLITE INDUZIDA POR TNBS

Bragança Paulista

2012

GILBERTO DE ALMEIDA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA HEPCIDINA NA
COLITE INDUZIDA POR TNBS

Orientador

Prof^a Dr^a. ALESSANDRA GAMBERO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação Stricto
Sensu em Ciência da Saúde da Universidade São Francisco
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2012

WI 522 Ribeiro, Gilberto de Almeida.

R369a Avaliação da participação da hepcidina na colite induzida por TNBS / Gilberto de Almeida Ribeiro. – Bragança Paulista, 2012.
31 p.

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

Orientação de: Alessandra Gambero

1. Hecidina. 2. Anemia. 3. Doenças inflamatórias Intestinais. 4. Doença de Crohn. 5. Colite experimental. 6. Ácido trinitrobenzenossulfônico.

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

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Gambero

Membros:

-
1. Profa. Dra. Alessandra Gambero
 2. Profa. Dra. Gannabathula Sree Vani
 3. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
-

Suplentes:

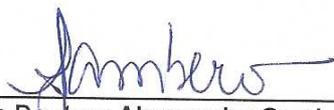
-
1. Profa. Dra. Camila Bononi de Almeida
 2. Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli
-

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

Data: 13/12/2012



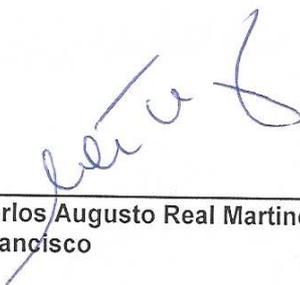
RIBEIRO A.,Gilberto, "Avaliação da participação da hepcidina na colite induzida por TNBS". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em treze de Dezembro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Professora Doutora Alessandra Gambero
Universidade São Francisco



Professora Doutora Gannabathula Sree Vani
Universidade de Taubaté



Professor Doutor Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Joaquim Antunes Ribeiro
e Glacita de Almeida Ribeiro(in memória)*

A minha Irmã Neusa Ribeiro Andriolo

Em especial a minha esposa Acélis Regina P. M. Ribeiro

E meu filho Gilberto de P.M.A. Ribeiro

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tudo permite e tudo conduz.

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

À Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) e toda a equipe do Laboratório da Profa. Dra Alessandra Gambero, que muito contribuíram, obrigado pelos momentos de paciência, compreensão e dedicação. Em especial agradeço às estagiarias da iniciação científica Renata Guerra e Camila Moscato.

À Profa. Dra. Thalita Rocha e o Prof^o Dr. José Aires Clemente pelo apoio, incentivo e colaboração e toda sua equipe do laboratório da USF.

*"Tudo o que somos é resultado do que pensamos
O segredo da saúde mental e corporal está em não se
lamentar pelo passado, não se preocupar com o futuro,
nem se adiantar aos problemas, mas viver sábia
e seriamente o presente".*

Sidarta Gautama - Buda

RESUMO

Trabalhos demonstram que pacientes com Doença de Crohn apresentaram níveis séricos aumentados de hepcidina, bem como a presença de anemia. O objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão da expressão de hepcidina durante a inflamação intestinal no colón e no tecido adiposo mesentérico, utilizando um modelo de colite experimental. Ratos machos Wistar foram divididos em quatro grupos, sendo um controle negativo, dois grupos de colite aguda (avaliados após 24 h e 7 dias de uma única administração de ácido trinitrobenzeno sulfônico; TNBS) e um grupo de colite crônica (avaliado após três administrações de TNBS perfazendo um total de 35 dias). A colite foi avaliada através de escore macroscópico e da quantificação da atividade de mieloperoxidase. A quantificação da hepcidina e IL-6 no colón e no tecido adiposo foi realizada através de Elisa. A mensuração dos níveis séricos de transferrina e de ferro foram realizados utilizando kits comerciais. A presença de ferro tecidual foi avaliada em cortes histológicos submetidos à Reação de Pearls. Os resultados encontrados demonstram um aumento gradativo da hepcidina no colón (no grupo agudo 7 dias e crônico) e a presença de altos níveis de IL-6 em todos os grupos com colite. A hipoferrêmia foi detectada somente no grupo agudo 24 hs correlacionando-se com níveis normais de hepcidina no cólon. A hepcidina aumentada no cólon esteve associada a presença de anemia nos animais, embora os níveis de ferro sérico estivessem normais. A presença de depósitos de ferro no cólon também foi verificada nos grupos agudo 7 dias e crônico, sugerindo que este seqüestro poderia desempenhar uma função local de redução do estresse oxidativo e controle da inflamação, mas que também poderia contribuir para a anemia associada a inflamação.

Palavra Chave: Hepcidina, Ferro, Anemia, Doença de Crohn, Doença Inflamatória

Intestinal, Colite Experimental

ABSTRACT

Literature reports demonstrate that Crohn's disease patients present high hepcidin serum levels associated to anemia. The aim of this work was to evaluate hepcidin expression in colon and mesenteric adipose tissue during an experimental colitis model. Male Wistar rats were distributed in four groups: a negative control, two acute colitis groups (TNBS administration and evaluation after 24 h and 7 days) and a group of colitis with reactivation (three consecutive TNBS administration and evaluation after 35 days). Colitis was assessed by macroscopic score and myeloperoxidase activity. Hepcidin and IL-6 was measured by ELISA. Serum iron and transferrin levels were quantified. Tissue iron was evaluated using Pearls reaction in colon slices. The results demonstrate an increase of colon hepcidin levels during colitis (after 7 and 35 days) and high IL-6 levels in all experimental groups. Low levels of iron in serum were detected in 24 h colitis group correlating with no increase of colon hepcidin. Hepcidin increase was associated with anemia in 7 and 35 days colitis groups, however the iron levels in serum were normal. Iron tissue deposition was observed in the same groups suggesting that colon hepcidin expression could have a role to reducing oxidative stress and inflammation in colon, but also contribute to the anemia establishment during colitis.

Key words: Hepcidin, Iron, Anemia, Crohn's disease, Inflammatory bowel disease

Experimental colitis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ADC - anemia das doenças crônicas

ANOVA - análise de variância

COBEA - colégio brasileiro de experimentação animal

CN - controle negativo

DC - doença de Crohn

DII - doença inflamatória intestinal

DSS - dextran sulfato de sódio

Fe - Ferro

Hamp - proteína antimicrobiana hepcidina

HCL - ácido clorídrico

HE - hematoxilina e eosina

HTAB - hexadeciltrimetil brometo de amônia

IL-6 - interleucina seis

LEAP-1 - peptídeo antimicrobiano expresso pelo fígado

LPS - lipopolissacarídeos

LUAC - laboratório universitário de análises clínicas

MPO - mieloperoxidase

RCUI - retocolite ulcerativa intestinal

SRE - sistema retículo endotelial

Th1, 17- linfócito T Helper

TLR - receptores toll-like

TNBS - ácido trinitrobenzeno sulfônico

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Análise Macroscópica do Colón.....	10
Tabela 2: Avaliação Macroscópica, Atividade de MPO e Peso Corporal.....	13
Tabela 3: Parâmetros hematológicos nos animais controle negativo e Colíticos.....	16

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Ação da hepcidina no metabolismo do ferro.....	04
Figura 2: Grupos experimentais.....	09
Figura 3: Quantificação proteica de hepcidina no colón.....	13
Figura 4: Quantificação proteica de hepcidina no tecido adiposo Mesentérico...	14
Figura 5: Nível de ferro sérico.....	15
Figura 6 : Nível sérico de transferrina.....	15
Figura 7 : Expressão proteica de IL-6.....	16
Figura 8 : Cortes histológico de tecido colón com reação de Pearls.....	17

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Inflamação Intestinal e Anemia.....	01
1.2. Hecpidina e Homeostase do Ferro.....	03
1.3. Inflamação Intestinal e Hecpidina.....	05
1.4. Alterações no Tecido Adiposo Mesentérico Durante a Inflamação Intestinal.	06
2. OBJETIVOS	07
2.1. Objetivo Geral.....	07
2.2. Objetivos Específicos.....	07
3. MATERIAIS E MÉTODOS	08
3.1. Animais.....	08
3.2. Grupos Experimentais.....	08
3.3. Modelo Experimental de Colite Induzida por TNBS.....	09
3.4. Coleta de Amostras.....	10
3.5. Análise Macroscópica de Lesões.....	10
3.6. Análise da Atividade da Mieloperoxidase Colônica (MPO).....	11
3.7. Quantificação de IL-6 e Hecpidina por Elisa.....	11
3.8. Análise de Parâmetros Hematológicos e Séricos.....	11
3.9. Análise Histológica.....	12
3.10. Análise Estatística.....	12
4. RESULTADOS	12
4.1. Caracterização da Colite Experimental.....	12
4.2. Níveis de Hecpidina no Colón e no Tecido Adiposo.....	13
4.3. Níveis de Ferro Sérico, Transferrina e Parâmetros Hematológicos.....	14
4.4. Níveis de IL-6 no Colón.....	16
4.5. Deposição de Ferro no Colón.....	17
5. DISCUSSÃO	18

6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS.....	23
8. ANEXO.....	31

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação Intestinal e Anemia

O termo “doenças inflamatórias intestinais” (DII), é utilizado na descrição de várias doenças inflamatórias que acometem o intestino, como a retocolite ulcerativa intestinal (RCUI) e a Doença de Crohn (DC), (Coelho e Lavery, 1996, Latella e Papi, 2012).

A DC, inicialmente descrita como ileíte regional pelo Dr. Burrill Crohn, mostrou-se com o passar do tempo ser um processo inflamatório crônico, com períodos de melhora e de recidiva, com característica transmural e que pode afetar qualquer parte do trato digestório, desde a boca até o ânus, sendo mais comum o íleo terminal e cólon (Dharmani e Chadee, 2008; Latella e Papi, 2012).

A hipótese mais atual é que a DC seja decorrente de uma interação complexa entre susceptibilidade genética, ambiente e sistema imunológico. Alterações na mucosa ou na interação com antígenos luminiais intestinais levam à ativação da resposta imune inata, possivelmente mediada por uma atividade aumentada de receptores do tipo "toll" (Toll-like receptors, TLR; Himmel *et al.*, 2008).

A DC é predominantemente uma síndrome mediada por Th1 e Th17 (Sakuraba *et al.*, 2009). O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) desempenha um papel importante na DC e a terapia anti-TNF é a principal alternativa terapêutica (D'Haens, 2010).

A apresentação clínica da doença varia de acordo com a extensão, a intensidade e as complicações presentes. Na evolução podem surgir complicações locais, nutricionais e sistêmicas. A doença se agrava e as crises tornam-se mais frequentes, gerando comprometimento do estado geral e piora da qualidade de vida do indivíduo (Peakman e Vergani, 1999).

Pacientes diagnosticados com a DC apresentam diarreia, dor abdominal, fadiga, perda de apetite e de peso, febre, estomatite, fístulas e fissuras perianais. A anemia é também um sintoma comum das DII e principalmente em pacientes com DC, mesmo em períodos de remissão, o que compromete severamente a qualidade de vida destes pacientes (Fatahzadehm, 2009).

A DC é descrita em todo o mundo, mostrando uma tendência no crescimento da sua incidência, inclusive no Brasil. Na região centro-oeste do Estado de São Paulo as DII foram predominantes em mulheres jovens, da raça branca, residindo na zona urbana. Dados coletados e publicados em pesquisas indicam uma incidência de 4,48 casos/ 100.000 habitantes para a RCUI e para a DC atingiu 3,50 casos/100.000 habitantes. Nesta região a prevalência atingiu o valor de 14,81casos/100.000 habitantes para a RCUI, 5,65 casos/100.000 habitantes para a DC. Para todas as DII a prevalência atingiu o valor de 22,61/100.000 habitantes, dados obtidos entre os anos de 2001 a 2005, (Victoria *et al.*, 2009).

Porém, a maior incidência de DC é registrada nas populações da Europa e América do Norte. Na Ásia e na America do Sul a taxa de incidência para RCUI é de 0,5/100.000 de habitantes e para a DC é de 0,08/100.000. Já nos Estados Unidos da America a incidência é de 11/100.000 para a RCUI e 7/100.000 para a DC. 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 15 e 30 anos, tendo um segundo pico entre 60 e 80 anos (Steidler L. *et.al.*, 2000 apud Biondo M. *et al*, 2003).

A deficiência de ferro é a principal causa de anemia em pacientes com DII e ocorre como consequência de vários fatores, como as perdas sanguíneas intestinais, deficiências de absorção de nutrientes e/ou tratamento inadequado da anemia (Gomollón e Gisbert, 2009).

A anemia das doenças crônicas (ADC) também conhecida como anemia da inflamação é considerada a segunda causa de anemia em pacientes com DII e frequentemente cursa em paralelo com a deficiência de ferro (Sun *et al.*, 2012). A ADC é normalmente associada a níveis baixos de ferro sérico e de saturação da transferrina,

mas neste caso, a hipoferrêmia ocorre como consequência do sequestro de ferro pelos macrófagos e o conteúdo total de ferro no organismo pode ser normal ou até aumentado (Ganz e Nemeth, 2009).

A ADC é uma anemia imune mediada e acredita-se que citocinas e células do sistema reticulo-endotelial (SRE) contribuam para o estabelecimento das alterações que potencialmente interferem em diferentes vias da eritropoiese, levando à anemia (Weiss, 2002, 2005; Theuri, 2009 apud. Figueiredo, 2010).

Citocinas inflamatórias, principalmente a interleucina-6 (IL-6), parecem favorecer o aumento da produção hepática de hepcidina (Andrews, 2004; Leong e Lönnerdal, 2004; Ganz e Nemeth, 2006; Fleming, 2008 e Bagni, 2011).

1.2. Hepcidina e Homeostase do Ferro

A primeira descrição desse peptídeo no plasma foi feita por Krause et al. em 2000, que o nomeou como "Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1" (LEAP-1). Um ano depois, Park et al., 2001 divulgou a descoberta desse peptídeo na urina, que passou a ser denominado "hepcidin antimicrobial protein" (HAMP). O gene que codifica a hepcidina é altamente expresso no fígado, mas há relatos de sua expressão no coração, medula espinhal, estômago, intestino e pulmões (Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001).

Mais tarde foi demonstrado que a hepcidina seria um hormônio chave na homeostase do Ferro (Fe), interferindo na regulação da sua absorção intestinal e na sua reutilização pelo SRE (Ganz, 2006; Graf et al., 2008; Sela, 2008). Ao entrar na circulação, a hepcidina regula, negativamente, a saída de Fe das células, especialmente nos macrófagos envolvidos na reciclagem de ferro (Fleming et al., 2008). A hepcidina é também considerada uma adipocina, pois sua expressão no tecido adiposo já foi descrita e associada a hipoferrêmia presente durante a obesidade (Bekri et al, 2006).

A hepcidina age ligando-se à ferroportina, que é a proteína transmembranar encarregada de exportar ferro das células. Essa ligação faz com que a ferroportina seja

internalizada nos lisossomos citoplasmáticos sendo degradada (Figura 1). Conseqüentemente, com a perda dessa proteína na superfície da membrana celular, o Fe acumula-se nessas células, enquanto a concentração de Fe circulante se reduz (Ganz e Nemeth, 2006; Fleming et al., 2008).

Além disso, a hepcidina atua também causando a retenção do Fe nos enterócitos, o que leva à redução no aproveitamento do Fe da dieta, potencializando ainda mais o efeito sobre a concentração de Fe circulante (Fleming, 2008; Mena et al., 2008). No intestino, a hepcidina também causa a internalização da molécula de ferroportina situada na membrana basolateral dos enterócitos, bloqueando a transferência do ferro que está no citoplasma dessas células para a transferrina no plasma (Ganz e Nemeth, 2006; Grotto, 2008).

Inúmeras células expressam hepcidina, mas os níveis séricos deste peptídeo parecem ficar sobre controle da produção hepática e a possível função dessa produção em locais extra-hepáticos de hepcidina precisa ser melhor compreendido.

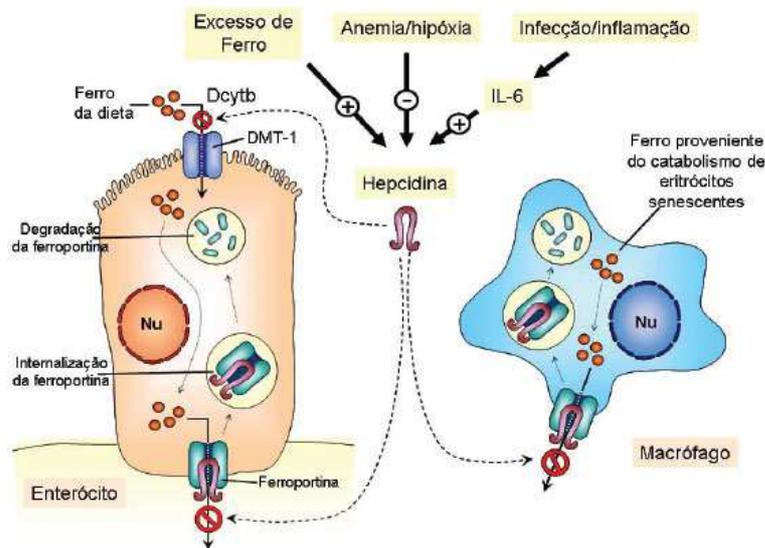


Figura 1. Ação da hepcidina no metabolismo do ferro. No enterócito, a hepcidina forma um complexo com a ferroportina e induz a sua degradação. O ferro não é transportado para o exterior da célula e a absorção intestinal é inibida. No macrófago, o ferro fica acumulado no seu interior, diminuindo o ferro disponível para a eritropoiese. (Grotto, 2008)

1.3. Inflamação Intestinal e Hecpidina

Conforme observamos, a hepcidina foi inicialmente identificada como um peptídeo antimicrobiano produzido pelo fígado, assumindo em seguida, o papel de regulador principal da homeostase de Fe no organismo (Nemeth et al., 2006). Também atua como uma proteína de fase aguda presente em reações imunológicas inatas, ocupando um papel central no estabelecimento da anemia associada à inflamação e às doenças crônicas por inibir o efluxo celular de Fe em macrófagos (Nemeth et al., 2004). Além de ser induzida por citocinas inflamatórias, a hepcidina também é sensível a alterações nos níveis de ferro sérico, fatores eritropoiéticos e hipóxia (Nemeth, 2008).

Pacientes com DC ativa tem reduzida absorção de Fe e níveis elevados de IL-6 quando comparados com pacientes com doença inativa (Semrin et al., 2006). O primeiro estudo dos níveis séricos de hepcidina em pacientes com DC relatou que estes apresentavam níveis séricos de ferro normais e de hepcidina menores, quando comparados a voluntários saudáveis (Arnold et al., 2009), levando os autores desta análise propor a hipótese de que a hepcidina possa ter uma ação dual durante a inflamação intestinal, atuando como agente causador ou perpetuador da inflamação. Entretanto, outro trabalho relatou que pacientes com DC apresentavam níveis séricos aumentados de hepcidina quando comparados com voluntários saudáveis e que estes níveis se correlacionavam com a atividade da doença (Oustamanolakis et al., 2011).

Em pacientes com DII a suplementação com ferro oral não apresenta resultado adequado (Semrim et al., 2006), e adicionalmente, a suplementação oral de ferro em animais com colite experimental por TNBS ou Dextran Sulfato de Sódio (DSS) resulta em piora dos parâmetros inflamatórios além de aumentar a predisposição ao estabelecimento do câncer de cólon (Seril et al., 2002; Uritski et al., 2004).

A ideia de que níveis reduzidos de hepcidina possam atuar como um fator de perpetuação da inflamação também não encontram subsídios nos trabalhos in vitro. Tratamento de macrófagos com hepcidina leva a regulação para baixo da ferroportina e elevação dos níveis intracelulares de Fe, como consequência, um aumento significativo

da capacidade de produção de TNF- α e IL-6 em resposta a estímulo com lipopolissacarídeos(LPS) (Wang et al., 2009).

A capacidade de produção de citocinas por macrófagos também é aumentada quando estes são suplementados com Fe (Wang et al., 2008). A própria produção de hepcidina por macrófagos em cultura é estimulada via estimulação de TLRs (Liu et al., 2005; Koenig et al., 2009). A redução ou o aumento da ação da hepcidina, se considerarmos estes resultados, levaria a uma menor ou maior produção de citocinas pró-inflamatórias.

Portanto, faz-se necessário uma maior compreensão do papel da hepcidina na inflamação intestinal.

1.4. Alterações no Tecido Adiposo Mesentérico Durante a Inflamação Intestinal

A hipertrofia do tecido adiposo mesentérico é uma característica presente na DC e foi descrita inicialmente pelo próprio Dr. Burril B. Crohn em 1932. Embora as alterações no tecido adiposo associadas a DC sejam descritas há muito tempo, ainda é bastante controversa a função desempenhada pelas adipocinas secretadas. Adipocinas é um termo coletivo que descreve substâncias produzidas e secretadas pelo tecido adiposo e que atuam de forma semelhante à citocinas.

Uma hipótese é de que a hipertrofia do tecido adiposo representaria uma função defensiva contra a inflamação intestinal primária e neste caso, a secreção de adipocinas com função anti-inflamatória estaria aumentada. Ao contrário, se a expansão do tecido adiposo tivesse uma função causal, a secreção de adipocinas pró-inflamatórias estaria aumentada (Paul et al., 2006).

Dados obtidos de pacientes com DC mostram que o tecido adiposo hipertrofiado pela patologia, secreta ao mesmo tempo adipocinas pró e anti-inflamatórias (Schaffler *et al.*, 2006), o que também é observado em modelo experimental de inflamação intestinal por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS; Gambero *et al.*, 2007) e, que estas adipocinas devem interagir com células intestinais imunes e não imunes durante a inflamação intestinal crônica.

Como já dito anteriormente, a hepcidina é também considerada uma adipocina, pois sua expressão já foi descrita no tecido adiposo e parece estar associada à anemia presente durante a obesidade. Deste modo, torna-se também importante avaliar se o tecido adiposo mesentérico modifica sua produção durante a inflamação intestinal (Bekri et al, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a participação da hepcidina na inflamação intestinal utilizando um modelo de colite experimental.

2.2. Objetivos Específicos

- Mensurar o conteúdo proteico de hepcidina no cólon durante a inflamação em animais com colite induzida por TNBS;
- Mensurar o conteúdo proteico de hepcidina no tecido adiposo mesentérico de animais com colite induzida por TNBS;
- Estudar as variáveis relacionadas à homeostase do ferro, quantificando os níveis de ferro e transferrina sérica, bem como a presença de anemia em animais com colite induzida por TNBS;
- Avaliar a presença de marcadores inflamatórios como a IL-6 no cólon de animais com colite induzida por TNBS;
- Avaliar a deposição de ferro no cólon de animais com colite induzida por TNBS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando 250-440 g. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas e mantidos no Biotério da UNIFAG, com períodos de 12 horas de claros e escuros e temperatura controlada a 22° C artificialmente. Água e ração foram servidas *ad libitum*. A realização deste estudo seguiu as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido o trabalho aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade São Francisco (anexo)..

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais contendo cinco animais cada, conforme (figura2) sendo:

- a) um grupo de controle, formado por animais que receberam solução salina via intracolônica denominado CONTROLE NEGATIVO/CN;
- b) um grupo de animais com colite aguda, que recebeu 10mg de TNBS via intracolônica no trigésimo quarto dia e foi sacrificado após vinte e quatro horas denominado COLITE 24HS;
- c) um grupo de animais com colite aguda, que recebeu 10mg de TNBS via intracolônica no vigésimo oitavo dia e foi sacrificado após sete dias denominado COLITE 7 DIAS;
- d) um grupo de animais com colite crônica, que recebeu 3mg de TNBS via intracolônica no primeiro, décimo quarto e no vigésimo oitavo dia e foi sacrificado no trigésimo quinto dia denominado COLITE 35 DIAS.



Figura 2. Grupos experimentais.

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.

Foram anestesiados com uma mistura 1:1 (v/v) de soluções de cetamina 100mg/ml e xilasina a 2%, sendo administrado 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo. Após serem anestesiados, os animais do grupo de colite crônica receberam por via intracolônica 3mg de TNBS, dissolvido em 300µL etanol 50%. A solução foi injetada no colón dos animais com o auxílio de uma sonda e estes permaneceram em posição vertical até a recuperação da anestesia.

Esse procedimento foi realizado no 1º, 14º, 28º e no 34º dia. Os animais do grupos de colite aguda receberam pela mesma via 10mg de TNBS em 300µL etanol

50% em uma única administração. Um grupo experimental recebeu somente solução salina e foi considerado controle para a colite experimental.

3.4. Coleta de Amostras

No dia do sacrifício, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina 1:1 (v/v), sendo administrado 0,3ml para cada 100g de peso corpóreo. A cavidade abdominal foi aberta e o sangue coletado da veia abdominal. O tecido adiposo mesentérico foi dissecado e transferido para tubo seco. O cólon foi retirado e aberto para análise macroscópica armazenados para posterior análises.

3.5. Análise Macroscópica de Lesões

A análise macroscópica foi realizada segundo critérios descritos por Rodriguez Cabezas *et al.* (2002) e estão descritos na Tabela1.

Tabela 1. Análise Macroscópica do Cólon.

Score	Critérios
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.

3.6. Análise da Atividade da Mieloperoxidase Colônica (MPO)

Uma amostra do cólon foi imediatamente armazenada a -20°C, para posterior determinação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). As amostras foram homogeneizadas com tampão HTAB (5g de hexadeciltrimetil brometo de amônia - Sigma - diluído em 1 litro de Tampão Fosfato de Potássio) e centrifugadas (10 minutos, 1400 rpm a 4°C). Ao sobrenadante foi adicionado 0-dianisidine (16,7mg de 0-dianisidine - Sigma; 90mL de água deionizada; 10mL de Tampão Fosfato de Potássio; 50µl de água oxigenada 1%) e foram realizadas leituras cinéticas de absorbância em 460nm (Bradley *et al.*, 1982).

3.7. Quantificação de IL-6 e Hecpidina por ELISA

Amostras de cólon e de tecido adiposo foram homogeneizadas em tampão de extração contendo Tris 100mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150mM, aprotinina 0.1mg, 35mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10mM, NaF 100mM, Na₄P₂O₇ 10mM e EDTA 4mM. O homogenato de cólon foi utilizado para quantificação de IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) e para a determinação de hepcidina foi utilizado homogenato de colón e tecido adiposo mesentérico (USCN, Wuhan, China) seguindo as instruções do fabricante.

3.8. Análise de Parâmetros Hematológicos e Séricos

Sangue periférico coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA foi utilizado na realização do hemograma. A dosagem foi realizada pelo LUAC (Laboratório Universitário de Análises Clínicas) do Hospital Universitário São Francisco, utilizando o método por citometria de fluxo - Impedância - Citoquímica. O soro foi obtido de uma amostra de sangue coletada sem anticoagulante após centrifugação e armazenado a -80°C. Níveis séricos de transferrina e de ferro foram mensurados utilizando kit comercial da Genway (San Diego, CA, USA) e da Laborlab (Brazil), respectivamente.

3.9. Análises Histológicas

Fragmentos de cólon foram imediatamente acondicionados em formalina tamponada a 10%. Após 48 horas foram processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5µM foram feitos para reação de Pearls.

A Reação de Pearls foi utilizada para a análise dos estoques teciduais de ferro. As lâminas foram tratadas com ferrocianeto de potássio 5% em água destilada, depois foram tratadas com uma mistura de partes iguais de ferrocianeto de potássio 5% e solução aquosa de HCl 10%. Por fim foram contra-coradas com uma solução de vermelho neutro por 5 minutos.

3.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média mais ou menos (+/-) Erro Padrão da Média (EPM) de 5 experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da Colite Experimental

Notamos na tabela 2 que os animais na fase aguda (24 h) em comparação com o grupo controle (CN), tiveram um aumento na extensão de dano no colón, aumento na atividade de MPO, e uma diminuição no peso corporal. O mesmo pode ser observado nos animais do grupo 07 dias e 35 dias, em comparação com o grupo controle (CN), ou seja, apresentam maior área de lesões e aumento significativo da atividade de MPO. No peso corporal, notamos um redução significativa somente nos grupos de 7 e 35 dias quando comparado ao grupo controle.

Tabela 2. Avaliação Macroscópica, Atividade de MPO e Peso Corporal

	Escore (0-10)	Atividade MPO (U/g Tecido)	Peso Corporal (g)
CN	0.2±0.1	2.2±0.6	405±9
Colite 24 h	10.0±0.0**	36.5±7.9**	379±10
Colite 7 d	8.8±0.9**	22.3±4.2**	353±15*
Colite 35 d	5.8±0.8**	18.2±4.8**	368±4*

* p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao grupo Controle Negativo (CN).

4.2. Níveis de Hecpidina no Colón e no Tecido Adiposo

Os animais com colite 24 horas, apresentam um aumento não significativo em relação ao grupo CN. O grupo de 7 dias e 35 dias, em comparação com o grupo CN, apresentaram um aumento significativo na quantidade de hepcidina no colón, proporcionalmente ao tempo da indução da colite (Figura 3). Quando a análise foi realizada no tecido adiposo mesentérico, não foram observadas alterações na quantificação proteica de hepcidina durante a inflamação intestinal experimental induzida (Figura 4).

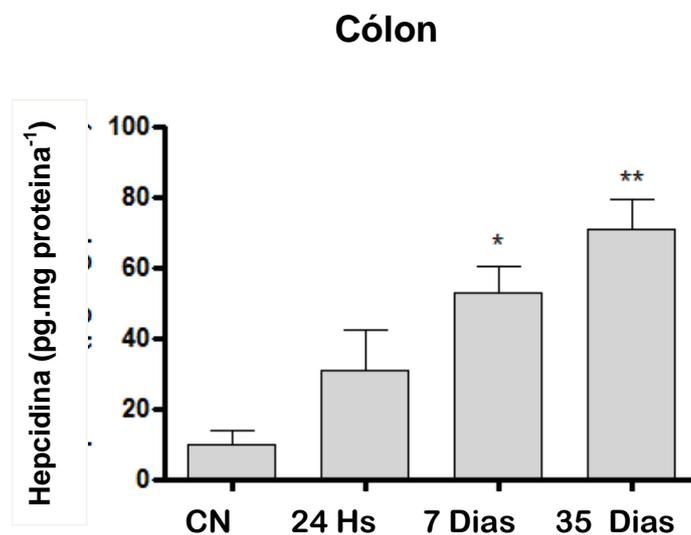


Figura 3. Quantificação proteica de hepcidina no colón de animais CN e colíticos após 24 hs, 7 dias e 35 dias. *p < 0,05 e **p < 0,01 quando comparado aos animais do grupo CN.

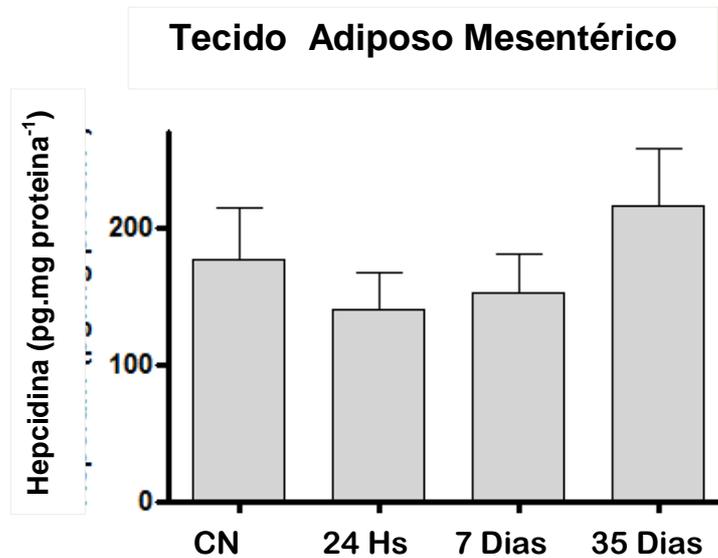


Figura 4. Quantificação proteica de hepcidina no tecido adiposo mesentérico de animais CN e colícticos após 24 hs, 7 dias e 35 dias.

4.3. Níveis de Ferro Sérico, Transferrina e Parâmetros Hematológicos

Observa-se que existe uma queda acentuada nos níveis de ferro sérico no grupo de 24 h em relação ao grupo CN. No grupo 7 dias, os níveis de ferro sérico não diferem do grupo CN e temos uma pequena elevação no grupo 35 dias (Figura 5).

Os níveis de transferrina no grupo de 24 h apresentam uma queda em relação ao CN. Sendo no grupo 7 e 35 dias observado a normalização dos nível de transferrina, tornando-se igual ao do grupo CN (Figura 6).

Notamos ao observar os valores apresentados na Tabela 3 que embora não haja alterações nos valores de hemoglobina, o que indicaria claramente a presença de anemia no grupo 24 horas, o valor de hematócrito encontra-se aumentado sugerindo a ocorrência de hemoconcentração neste grupo. A anemia é detectada no grupo de 7 e 35 dias, claramente caracterizada pela queda de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Os resultados da contagem de leucócitos demonstram aumento em todos os grupos experimentais.

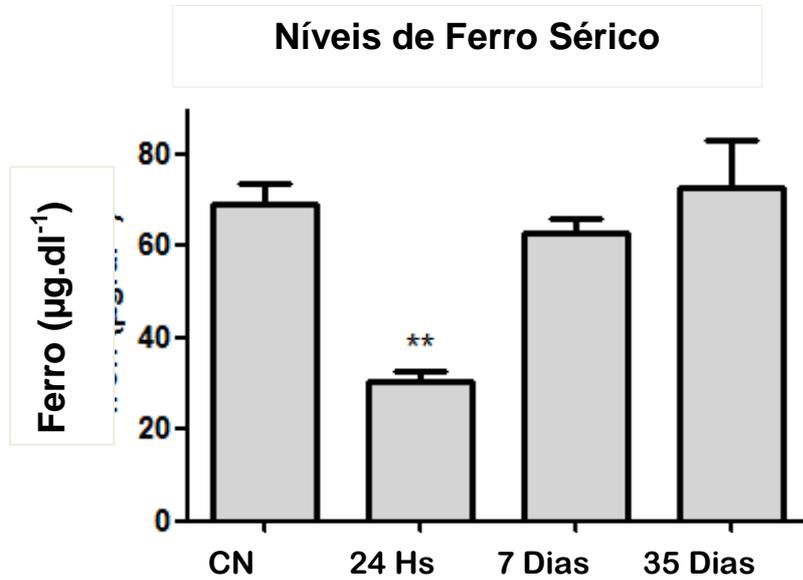


Figura 5. Níveis de ferro sérico nos animais CN e colícticos após 24 hs, 7 dias e 35 dias (colite com reativações). **p < 0,01 quando comparado aos animais do grupo CN.

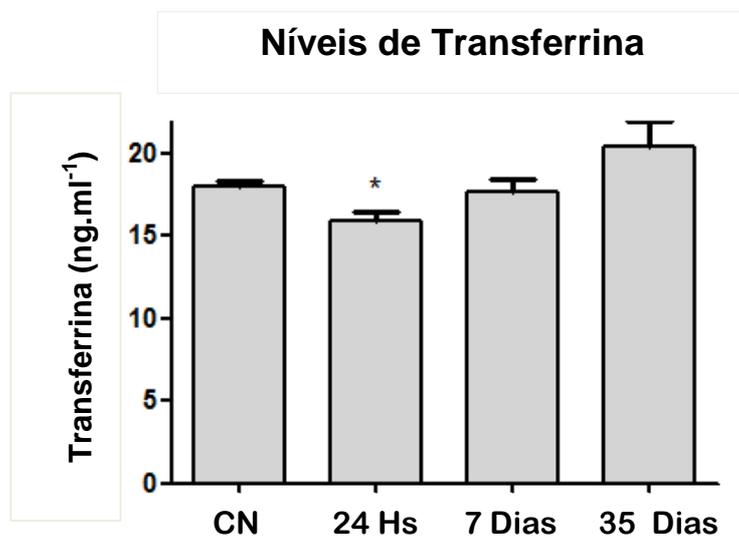


Figura 6. Níveis séricos de transferrina nos animais CN e colícticos após 24 hs, 7 dias e 35 dias (colite com reativações). *p < 0,05 quando comparado aos animais do grupo CN.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos nos animais CN e colícticos após 24 hs e 7 dias.

	CN	Colite 24 hs	Colite 7 dias	Colite 35 dias
Eritrócitos (milhões/mm ³)	8,90±0,17	8,16±0,14	7,14±0,14**	8,11±0,02
Hemoglobina (g/dl)	16,15±0,16	16,75±0,17	14,32±0,36**	14,75±0,10*
Hematócrito (%)	47,17±1,29	50,05±0,40*	42,02±1,07**	43,67±0,31*
Leucócitos Totais (células/mm ³)	5,25±0,66	10,09±1,04**	9,10±1,00*	8,85±0,53**

* p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao grupo CN.

4.4. Níveis de IL-6 no Colón

Os níveis de IL-6 no grupo 24h apresentam um aumento bastante significativo em relação ao grupo CN. No grupo de 7 e 35 dias estes níveis também encontram-se aumentados mais de maneira mais discreta em relação ao grupo CN (Figura 7).

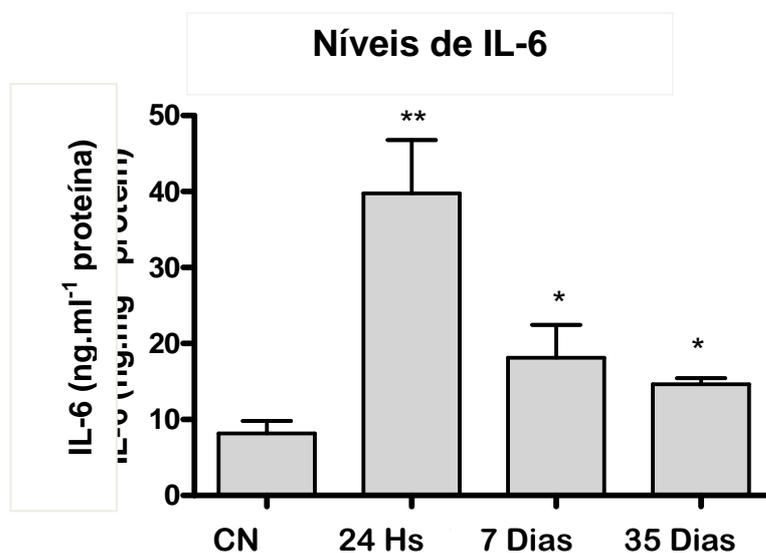


Figura 7. Quantificação proteica de IL-6 no colón de animais CN e colícticos após 24 hs, 7 dias e 35 dias.

*p < 0,05 e **p < 0,01 quando comparado aos animais do grupo CN.

4.5. Deposição de Ferro no Cólon

A avaliação dos cortes histológicos que foram submetidos à Reação de Pearls. Sugerem um acúmulo de ferro no grupo com colite aguda (7 dias), mas principalmente no grupo com colite com reativações (35 dias). Nenhuma reação foi observada no grupo CN, sugerindo que não há um acúmulo de ferro neste. O grupo de colite aguda 24 horas apresentou uma coloração amarelada o que nos parece ser decorrente de resíduos de TBNS o que dificulta tecnicamente a observação da Reação de Pearls.

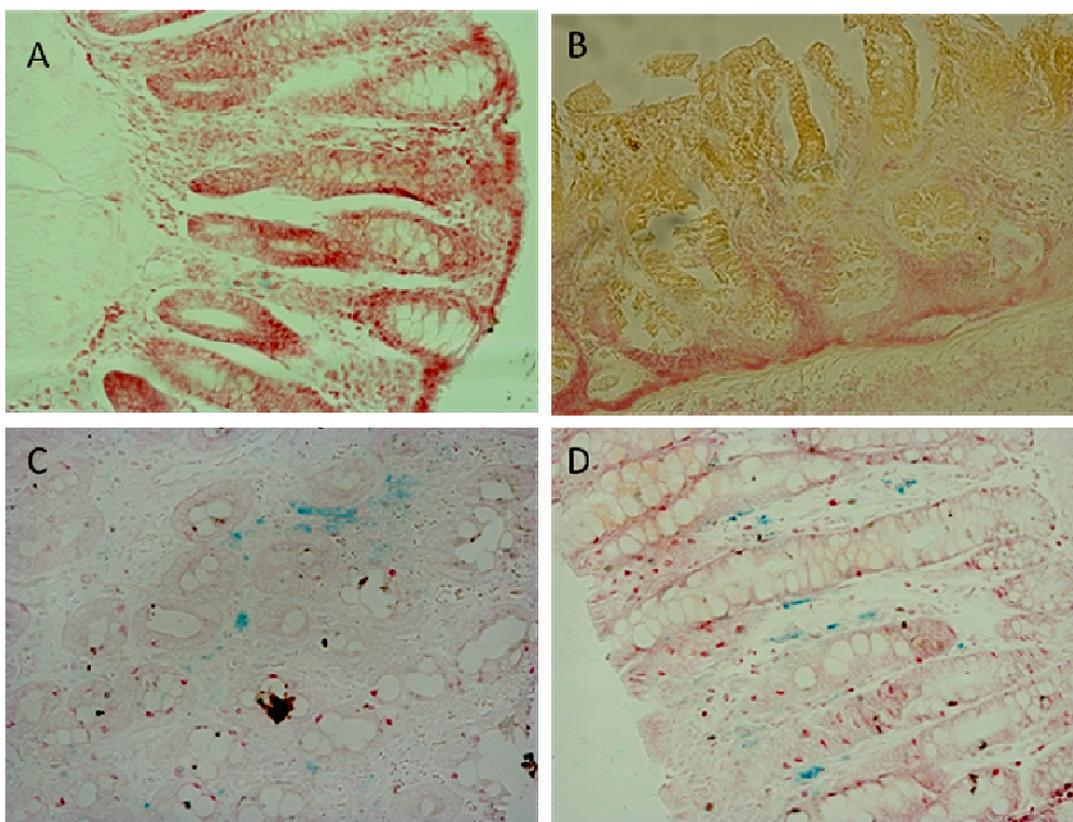


Figura 8. Reação de Pearls (Azul da Prússia) no cólon de animais CN (A), com colite aguda avaliados após 24h (B) e 7 dias (C) e com colite com reativações 35 dias(D). 200x.

5. DISCUSSÃO

A DC é um processo inflamatório crônico, 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 colón (Latella e Papi,2012). O modelo experimental de colite induzida por TNBS e etanol, tem sido apontado como adequado a estudos relacionados à DC (Gambero *et al.*,2007). Na maioria dos estudos, uma única dose de TNBS e etanol é administrada por via intracolônica no início do experimento. Esta administração resulta em uma resposta inflamatória local com produção de citocinas inflamatórias Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-12, sendo a IL-12 essencial para o desenvolvimento da resposta inflamatória neste modelo (Tozawa *et al.*,2003). Esta produção costuma atingir seu ápice por volta de 48 a 72 hs após a administração de TNBS e etanol (Hollenbach *et al.*,2005). Por volta do sétimo dia, os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IFN- γ retornam ao basal, enquanto a IL-12, IL-1 β e IL-6, por exemplo se mantém ainda elevada (Hollenbach *et al.*,2005, Reis *et al.*,2009, Park *et al.*,2012). A inflamação regride e a arquitetura colônica é normalizada por volta do décimo dia (Gambero *et al.*,2007). A administração de doses sucessivas de TNBS e etanol resulta nos modelos com reativações, onde a cada nova administração um quadro inflamatório é estabelecido, intercalando-se períodos de recidiva, onde a inflamação se resolve. O modelo de colite com reativações tem sido extensivamente realizado em nosso laboratório e apresenta como características uma inflamação moderada e alterações no perfil de citocinas no cólon (aumento de TNF- α e redução de IL-10), associada a alterações no tecido adiposo mesentérico, mimetizando o que se observa no tecido adiposo mesentérico de pacientes com Doença de Crohn (Gambero *et al.*,2007; Oliveira *et al.*,2009; Thomaz *et al.*,2009). A colite com reativações é realizada com administrações sucessivas de baixas doses de TNBS e etanol, o que permite a repetição sem mortalidade excessiva. Já a colite decorrente de uma única administração de TNBS e etanol, denominada neste trabalho como colite aguda, utiliza uma dose maior de TNBS e etanol e apresenta um quadro inflamatório bastante

intenso, mas sem ocasionar modificações no padrão de adipocinas do tecido adiposo mesentérico.

Deste modo, a administração combinada do etanol e do hapteno 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).

De fato, observamos neste estudo durante a análise macroscópica do cólon e a quantificação da atividade de MPO, utilizada como um marcador do infiltrado de neutrófilos, que ambos protocolos resultam na indução da colite. No modelo agudo (24h), já podemos observar extenso dano macroscópico no cólon, sustentado até o modelo crônico (35d), onde também se observa a perda de peso nos animais.

Ao analisarmos a presença de hepcidina no cólon encontramos um aumento nos animais com colite em relação ao grupo CN, nos grupos de 7 dias e 35 dias, mas não se modifica no tecido adiposo mesentérico

Claramente, a hepcidina atua como um importante regulador da absorção intestinal de ferro. A ferroportina parece atuar como o 'receptor' de hepcidina, na superfície basolateral do enterócito. Após a ligação da hepcidina, a ferroportina é internalizada, e a capacidade de saída de ferro da célula reduzida, levando ao acúmulo de ferro intracelular (Wallace e Subramanian, 2007). Se a expressão de hepcidina no cólon sofre alguma influência dos níveis sistêmicos de ferro, sua expressão não difere estatisticamente nas primeiras 24 hs da colite experimental (valor de $p=0,14$) onde observamos a presença de hipoferremia e níveis reduzidos de transferrina. Após 7 e 35 dias, os níveis de ferro e transferrina retornam aos valores normais e a expressão de hepcidina no cólon aumenta, embora haja a presença de anemia nestes grupos.

A expressão de hepcidina também pode estar sendo influenciada pelos níveis locais de IL-6 que se encontram elevados em todos os grupos experimentais. A IL-6 tem sido apontada como necessária e suficiente para induzir a expressão de hepcidina durante a resposta inflamatória, sendo apontada como a citocina chave da anemia da

inflamação (Nemeth *et al.*, 2004). Trabalhos experimentais mostraram que a infusão de IL-6 estimula rapidamente a excreção urinária de hepcidina e induz à hipoferremia. Foi demonstrado que a IL-6 age diretamente nos hepatócitos estimulando a produção de hepcidina (Grotto, 2010) e não podemos descartar a hipótese de que esta esteja também induzindo a produção de hepcidina no cólon. A IL-6 presente na resposta inflamatória intestinal é a responsável pela expressão aumentada de hepcidina no cólon, e esta expressão é retardada pela presença de hipoferremia inicial (visto que a IL-6 se encontra muito aumentada no grupo de 24 hs).

Pacientes com DC ativa tem reduzida absorção de ferro e níveis elevados de IL-6 quando comparados com pacientes com doença inativa (Semrin *et al.*, 2006), demonstrando mais uma vez que o modelo de colite por TNBS reproduz várias características presentes nos pacientes com DC.

Não podemos deixar de sugerir que a hepcidina possa estar desempenhando um papel local durante a resposta inflamatória intestinal. Um único trabalho publicado em 2004 por Uritski *et al.* utilizando o modelo de colite por TNBS avaliado após 24hs em diferentes grupos experimentais alimentados com dietas de baixo, normal e alto aporte de ferro, mostrou que os animais que receberam a dieta com baixo aporte de ferro apresentaram menor resposta inflamatória (Uritski *et al.*, 2004). Em modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), a suplementação com ferro exacerba a resposta inflamatória intestinal e promove o desenvolvimento de carcinoma colo retal (Seril *et al.*, 2002 e Carrier *et al.*, 2006). Deste modo, a expressão local de hepcidina poderia atuar como um agente de proteção, sequestrando ferro como forma de controle do estresse oxidativo. Outro mecanismo de proteção que o sequestro de ferro no ambiente colônico poderia desempenhar a redução da disponibilidade deste nutriente a bactérias. A depleção e reposição de ferro alteram também de maneira significativa a população de bactérias colônicas. A redução da disponibilidade de ferro resulta em redução dos níveis de butirato e das populações de Roseburia spp e Eubacterium rectale, aumentando a população de lactobacilos e de enterobacterias (Dostal *et al.*, 2012). Quando o ferro é repostado, as populações bacterianas retornam ao normal e se observa um aumento significativo no infiltrado de neutrófilos na mucosa colônica (Dostal

et al., 2012). Deste modo, o sequestro de ferro promovido pela expressão de hepcidina colônica poderia atuar como um mecanismo de proteção por reduzir a disponibilidade e modificar a população de bactérias e, por reduzir o estresse oxidativo, controlando a resposta inflamatória. Assim, quando analisamos as lâminas histológicas do colón dos animais onde se realizou a coloração de Pearls, notamos que existe uma deposição de ferro no meio das células epiteliais nos grupos de 7 dias e 35 dias, sugerindo que este ferro possa estar sendo retido neste local. Nas lâminas de 24 horas não foi possível fazer uma análise das células, pois temos uma coloração amarelada causada pelo próprio TNBS, que dificulta a análise do material.

6. CONCLUSÃO

A expressão de hepcidina encontra-se aumentada no cólon, mas não no tecido adiposo de animais durante a colite induzida por TNBS. Esta expressão aumentada não é verificada durante a hipoferremia aguda, mas mesmo na presença de anemia os níveis colônicos de hepcidina estão modificados. A citocina IL-6 pode estar atuando na indução da expressão de hepcidina, pois sua expressão se encontra aumentada no tecido colônico. A hepcidina colônica possivelmente é a responsável pela deposição de ferro tecidual observada.

7. REFERÊNCIAS:

- Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. **Eur J Clin Invest.** 2004;113(9):1251-3.
- Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** 2009;21:425-9.
- Bagni UV, Veiga GV. Anemia ferropriva e obesidade: novos olhares para antigos problemas. **Rev Soc Bras Alim Nutr.** 2011 Abr;36(1):177-88.
- Bekri S, Gual P, Anty, R, Luciani N, Oahman M, Ramesh B, Iannelli A, Staeini-Myx A, Casanova O, Ben Amor I, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Gugenheim J, Srai SK, Tran A, Le Marehand-Brustel Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and Nash. **Gastroenterology.** 2006;131:788-96.
- Biondo-Simões MLP, Mandelli KK, Pereira MAC, Faturi JL . Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev Bras Coloproct.** 2003;23(3):172-82.
- Bradley PP et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.** 1982 Mar;78(3):206-9.
- Carrier JC, Aghdassi E, Jeejeebhoy K, Allard JP. Of exacerbation dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: role of NF-kappa B. **Int J Colorectal Dis.** 2006;21(4):381-7.
- Coelho J, Iavery IC. **Aparelho digestivo, clínica e cirúrgica.** 2 ed. Rio de Janeiro(RJ): Medsi; 1996.

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GO. Regional ileitis, a pathology and clinical entity. **J Am Med Assoc.** 1932;99:1323-9.

D'haens GR. Top-down therapy for IB: rationale and requisite evidence. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** 2010;7(2):86-92.

Dharmani P, Chadee K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold. **Curr Mol Pharmacol.** 2008;1:195-212.

Dostal A, Fehlbaum S, Chassard C, Zimmermann MB, Lacroix C. Low iron availability in continuous in vitro colonic fermentations induces strong dysbiosis of the child gut microbial consortium and a decrease in main metabolites. **Blackwell Publishing Ltd.** 2012 Jul 28. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01461.x.

Fatahzadeh M. Inflammatory bowel disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2009;108:e1-10.

Figueiredo SM. Impacto da inflamação na regulação do ferro e deficiência funcional de ferro. **Rev. Bras. Hematol e Hemoter.** 2010;32(supl.2).

Fleming RE. Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin. **J Mol Med (Berl).** 2008 May;86(5):491-4. doi: 10.1007/s00109-008-0349-8.

Gambero A, Maróstica M, Abdalla Saad MJ, Pedrazzoli J Jr. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis Inflammation. **Inflamm Bowel Dis.** 2007 Nov;13(11):1357-64.

Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Am J Hematol.** 2006;1:29-35.

Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annu Rev Nutr.** 2006; 26:323-42.

Ganz T, Nemeth E, Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J. The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. **Blood.** 2009 Jul 9;114 (2):437-43.

Gomollón F, Gisbert PJ. Anemia and inflammatory bowel diseases **World J Gastroenterol.** 2009 Oct 7;15(37):4659-65

Graf L, Herklotz R, Huber AR, Korte W. Old and new iron parameters in iron metabolism and diagnostics. **Ther Umsch.** 2008 Sep;65(9):519-28. doi: 10.1024/0040-5930.65.9.519.

Grotto HZW. Metabolismo do Ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2008;30(5).

Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2010;32(2):8-17.

Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. **Immunology.** 2008;125:145-53.

Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. **Am J Physiol.** 1995;268:G673-84.

Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor kappa B and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn's disease. **J Biol Chem.** 2005;280:14981-88.

Koenig CI, Miller JC, Nelson JM, Ward DM, Kushner JP, Bockenstedt IK, Weis JJ, Kaplan J, De Domenico I. Toll-like receptors mediated induction of hepcidin in mice infected with *Borrelia burgdorferi*. **Blood**. 2009;114:1913-8.

Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Frossmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Lett**. 2000;480(2-3):147-150.

Latella G, Papi C. Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**. 2012 Aug 7;18(29):3790-9.

Lemos RA, Lorene SAI, Boato MCC, Borges FTM, Rondó CHP. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 2010, 56(5);596-9.

Leong W, Lönnerdal B. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. **J Nutr**. 2004;134(1):1-4.

Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. **Blood Cells Mol Dis**. 2005;35:47-56.

Mena NP, Esparza A, Tapia V, Valdés P, Núñez MT. Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. **J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2008;294(1):G192-8.

Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. **Curr Opin Hematol**. 2008;15:169-75

Nemeth E, Preza GC, Jung CI, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: **structure-function study**. **Blood**. 2006;107:328-33.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest**. 2004;113(9):1271-6.

Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.; Ganz, T.; Kaplan, J. hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**. 2004;306:2090-3.

Oliveira CC, et al. Depot-specific alterations to insulin signaling in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammatory response. **International Immunopharmacology**, Amsterdam. 2009 Apr;9(4):396-402.

Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor-ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study; **Gastroenterol**. 2011;24(2):108-14.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **Journal of Biological Chemistry**. 2001;276:7806-10.

Park SY, Ku SK, Lee ES, Kim JA. 1,3-Diphenylpropanone ameliorates TNBS-induced rat colitis through suppression of NF- κ B activation and IL-8 induction, **Chem Biol Interact**. 2012 Mar 5;196(1-2):39-49.

Paul G, Schäffler A, Neumeier M, Fürst A, Bataille F, Buechler C, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Rogler G, Herfarth H. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**. 2006;12:471-7.

Peakman M, Vergani D. Terapias de base imunológica: **imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro(RJ): Guanabara Koogan;1999. p.292-303.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **J Biol Chem.** 2001;276(11):7811-9.

Reis SB, Oliveira CC, Acedo SC, Miranda DD, Ribeiro ML, Pedrazzoli J Jr, Gambero A. Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract., **Phytother Res.** 2009 Mar;23(3):324-9.

Rodriguez Cabezas ME et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia. 2002 Nov;132(11):3263-71.

Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric *Lymph* node dendritic cells in Crohn's disease. **Gastroenterology.** 2009;137:1736-45.

Schaffler A, Fürst A, Büchler C, Paul G, Rogler G, Schölmerich J, Herfarth H. Secretion of Rantes (CCL5) and interleukin-10 from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease: regulation by steroid treatment. **J Gastroenterol Hepatol.** 2006;21:1412-8.

Sela BA. Hepcidin-the discovery of a small protein with a pivotal role in iron homeostasis. **Harefuah.** 2008;147(3):261-76.

Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, Nemeth E, Grand RJ, Weinstein DA. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. **Inflamm Bowel Dis.** 2006;12:1101-6.

Seril DN, Liao J, Ho KL, Warsi A, Yang CS, Yang GY. Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. **Dig Dis Sci**. 2002;47:1266-78.

Steidler L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, Washington. 2000 Aug 25;289(5483):1352-4.

Szczepaik M. Experimental inflammatory bowel disease--role of T cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Krakow. 2000 Jun;51(2):333-46.

Thomaz MA, Acedo SC, de Oliveira CC, Pereira JA, Priolli DG, Saad MJ, Pedrazzoli J Jr, Gambero A. Methotrexate is effective in reactivated colitis and reduces inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammation, **Pharmacol Res**. 2009 Oct;60(4):341-6.

Tozawa K, Hanai H, Sugimoto K, Baba S, Sugimura H, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon-gamma in the pathogenesis of experimental colitis in mice. **J Gastroenterol Hepatol**. 2003 May;18(5):578-87.

Uritski R, Barshack I, Bilkis I, Ghebremeskel K, Reifen R. Dietary iron affects inflammatory status in a rat model of colitis. **J Nutr**. 2004;134:2251-5.

Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, **Arq Gastroenterol**, 2009;46(1):20-5.

Wallace DF, Subramaniam VN. Non-HFE haemochromatosis. **Journal of Gastroenterology**. 2007;13(35):4690-8.

Wang L, Harrington L, Trebicka E, Shi HN, Kagan JC, Hong CC, Lin HY, Babitt JL, Cherayil BJ. Selective modulation of TLR4-activates inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice. **J. Clin Invest.** 2009;119:3322-8.

Wang L, Johnson EE, Shi HN, Walker WA, Wessling Resnick M, Cherayil BJ. Attenuated inflammatory responses in hemochromatosis reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation. **J. Immunol.** 2008;181:2723-31.

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

8. ANEXO:


UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO
Bragança Paulista, 08 de Outubro de 2009.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação do bloqueio da ação do TNF-alfa utilizando anticorpo monoclonal sobre a produção de adipocitocinas e alterações morfológicas do tecido adiposo mesentérico observadas durante a colite experimental

Curso: ODONTOLOGIA

Autor(es): Profª. Drª. Alessandra Gambero

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 002.09.09

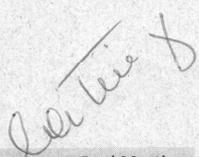
Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente no dia 08/10/2009, as pendências do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,


Carlos Augusto Real Martinez
Vice- Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
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 Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arç CEP 13045-270 (19) 3779-3300
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