

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ELI CRISTIANO DE MENESES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CLISTERES COM
MESALAZINA MMX SOBRE AS MUCINAS NA COLITE
INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO
(TNBS). ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Bragança Paulista
2019

ELI CRISTIANO DE MENESES – RA 001201708949

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE CLISTERES COM
MESALAZINA MMX SOBRE AS MUCINAS NA COLITE
INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO
(TNBS). ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada para Defesa no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Co-Orientador: Prof. Dr. José Aires Pereira

Bragança Paulista
2019

WI 522 Meneses, Eli Cristiano de
M499a Avaliação dos efeitos de clisteres com mesalazina MMX sobre as mucinas na colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS): estudo experimental em ratos / Eli Cristiano de Meneses. - Bragança Paulista, 2019. 73 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Colite experimental. 2. Ácido trinitrobenzenosulfônico. 3. Ácido 5-aminosalicílico. 4. Mesalazina. 5. Análise de imagem assistida por computador. 6. Mucinas. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

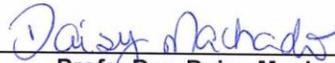
MENESES, Eli Cristiano de. "Avaliação dos Efeitos de Clisteres com Mesalazina MMX Sobre as Mucinas na Colite Induzida por Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Estudo Experimental em Ratos.", Dissertação defendida e aprovado no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 28 de Fevereiro de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Mário Ângelo Claudino
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Daisy Machado
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** pela oportunidade e pela possibilidade da realização dessa pós-graduação.

Ao amigo e **Prof. Dr. JOSÉ PEREIRA AIRES**, por toda cooperação e presteza no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**, pela disponibilidade em orientar-me.

E em especial à **Profa. Dra. MARCIA APARECIDA ANTONIO**, que sempre foi uma grande incentivadora e sempre uma grande inspiração.

Aos professores do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO, BRAGANÇA PAULISTA**, pelas orientações para a realização deste.

A todos aqueles do **LIM – LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES MÉDICAS**, por toda ajuda direta ou indireta na execução das atividades.

Aos colaboradores do **BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, pela dedicação e profissionalismo aos cuidados com os animais durante todo o período do experimento.

À **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, os meus agradecimentos pela oportunidade de permitir mais uma realização profissional dentre outras.

Aos meus filhos **VINÍCIUS e VITÓRIA**, que sempre serão a grande razão e inspiração para minha vida.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada, os meus sinceros agradecimentos.

“Aprender é descobrir aquilo que você já sabe”.
“Fazer é demonstrar que você o sabe”.
“Ensinar é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você”.

Richard Bach

RESUMO

A colite experimental (CE) induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) é um modelo utilizado para o estudo das doenças inflamatórias intestinais. A exposição da mucosa ao TNBS ocasiona lesão da barreira epitelial cólica deflagrando a resposta inflamatória local. A colite por TNBS permite a avaliação dos efeitos de diferentes substâncias no tratamento e prevenção da CE. A mesalazina (ácido 5-aminosalicílico) vem se demonstrando eficaz para o tratamento de diferentes formas de colite. Recentemente foi disponibilizada apresentação denominada MMX, de uso oral, onde o princípio ativo é revestido com agente que retarda a sua liberação, melhorando a concentração da droga na luz intestinal. Os efeitos da aplicação de clisteres com mesalazina MMX ainda não foram avaliados na CE induzida por TNBS. **Objetivo:** Avaliar se a aplicação de clisteres contendo mesalazina MMX, é capaz de melhorar as alterações encontradas na CE induzida por TNBS. **Métodos:** Vinte *Rattus norvegicus albinus*, machos foram submetidos à indução de colite por TNBS. Após a indução da colite os animais foram divididos em dois grupos experimentais receberam aplicações diárias de clisteres contendo Soro Fisiológico 0,9% (SF 0,9%), ou MesalazinaMMX por 7 ou 14 dias. Cada um desses grupos experimentais foi subdividido em dois subgrupos segundo a intervenção realizada por 7 ou 14 dias. Quatro animais não foram submetidos à indução da colite e utilizados como grupo controle. Findo o prazo de intervenção os animais foram eutanasiados para remoção dos segmentos cólicos. Como controle utilizou-se segmento de cólon obtido de animal não submetido à indução da colite por TNBS. O diagnóstico de colite nos segmentos submetidos à intervenção foi avaliado por estudo histopatológico e sua intensidade por escala de graduação inflamatória baseada em variáveis macroscópicas e microscópicas, anteriormente validada. A presença de mucinas neutras e ácidas foi identificada pelas técnicas do PAS e Azul de Alcian, respectivamente. Os subtipos de mucinas ácidas, sulfomucinas e sialomucinas, foram identificadas pela técnica da diamina de ferro alto alcian-blue. O conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas foi realizado por meio de morfometria computadorizada (análise de imagem assistida por computador). Os resultados entre os grupos foram comparados de forma pareada com o teste de Mann-Whitney e a variação com o tempo de intervenção pelo teste de Kruskal-Wallis, estabelecendo-se para ambos, nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Animais submetidos a intervenção com MMX apresentaram redução nos escores macroscópicos e microscópicos de inflamação em relação aos animais tratados com Soro Fisiológico 0,9%, embora maiores que os do grupo controle. O conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas nos animais com colite foi menor que nos animais do grupo controle e não modificou-se independente da solução de intervenção utilizada nem do tempo de aplicação. Houve aumento no conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas nos animais submetidos a aplicação de clisteres com MMX em relação aos que receberam SF 0,9%, embora o conteúdo tenha sido menor que nos animais sem indução de colite. **Conclusão:** Concluiu-se que a aplicação de clisteres contendo mesalazina revestida com etilcelulose (MMX) é eficaz na melhora do processo inflamatório da mucosa cólica e que a aplicação diária de clisteres com MMX aumenta o conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas constituintes da barreira de muco que recobre o epitélio cólico.

Descritores: Colite Experimental. Ácido trinitrobenzenosulfônico. Mesalazina. Mucinas.

ABSTRACT

Experimental Colitis (EC) induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) is a model used to study the inflammatory bowel diseases. Exposure of the mucosa to TNBS causes lesion of the colonic epithelial barrier, triggering the local inflammatory response. Colitis by TNBS allows assessment of the effects of different substances on EC treatment and prevention. Mesalamine (5-aminosalicylic acid) has been shown to be effective for the treatment of different forms of colitis. Recently a presentation called MMX, for oral use, was made where the active principle is coated with an agent that delays its release, improving the concentration of the drug in the intestinal lumen. The effects of application of clastings with mesalazine MMX haven't been evaluated in TNBS-induced EC yet. Purpose: To evaluate whether the application of mesalazine containing MMX, It is able to improve the changes found in the EC induced by TNBS. Material&Methods: Twenty male *Rattus norvegicus albinus* were to submitted to TNBS-induced colitis. After induction of colitis the mice were divided into two experimental groups, according to the daily applications of clisteres containing 0.9% SF, or MMX for 7 or 14 days. Each of the experimental groups was subdivided into two subgroups according to an intervention performed for 7 or 14 days. Four animals weren't submitted to induction of colitis and used as control group. After the intervention period the animals were euthanized for the removal of segments colic. As a control, a colon segment obtained from animals not submitted to TNBS colitis induction was used. The diagnosis of colitis in the segments submitted to the intervention was evaluated by histopathological study and its intensity by scale of inflammatory graduation based on macroscopic and microscopic variables, previously validated. The presence of neutral and acidic mucins was identified by PAS techniques and alcian blue, respectively. The subtypes of acidic mucins, sulfomucines and sialomucines, were identified by the alcian-blue high iron diamine technique. The tissue content of the mucin subtypes was performed using computerized morphometry (computer-aided image analysis). The results between the groups were compared in a paired fashion with the Mann-Whitney test and the variation with the intervention time by the test Kruskal-Wallis was established for both, level of significance of 5% ($p < 0.05$). Results: Animals submitted to MMX intervention showed a reduction in macroscopic and microscopic inflammation scores in relation to animals treated with 0.9% SF, although higher than those in the control group. The tissue content of neutral and acidic mucins in animals with colitis was lower than in the control group and did not change independently of the intervention solution used or the time of application. There was an increase in tissue content of sulfomucines and sialomucines in animals submitted to MMX application in comparison to those receiving 0.9% SF, although content was lower than in animals without induction of colitis. Conclusion: It was concluded that the application of mesalazine containing clays containing ethylcellulose (MMX) is effective in improving the inflammatory process of the colonic mucosa and that the daily application of clitoris with MMX increases the tissue content of sulfomucines and sialomucins constituting the mucus barrier which covers the colic epithelium.

Keywords: Experimental colitis. Trinitrobenzenesulfonic acid. Mesalazine. Mucinas.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fórmula estrutural da Mesalazina. É um aminosalicilato e possui na sua estrutura um anel benzênico. 19
- FIGURA 2.** Algoritmo terapêutico dos animais pertencentes aos Grupos experimentais. 26
- FIGURA 2.** Sistema de análise de imagens assistida por computador, utilizado para mensuração do conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas. 34
- FIGURA 3.** Colite induzida + intervenção SF(7 dias) 36
- FIGURA 4.** Colite induzida + intervenção SF (14 dias) 37
- FIGURA 5.** Colite induzida+intervenção MMX (7 dias) 37
- FIGURA 6.** Colite induzida+intervenção MMX (14 dias) 38
- FIGURA 7.** Escore macroscópico de inflamação no cólon dos animais do Grupo Controle (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX, 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias < SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 7 dias < SF 7 dias; MMX 14 dias < SF 14 dias). (Teste de Mann-Whitney). 39
- FIGURA 8.** Epitélio cólico no grupo sem colite (HE-200x) 40
- FIGURA 9.** Epitélio cólico: grupo com colite SF (HE-200x)..... 41
- FIGURA 10.** Epitélio cólico: grupo com colite MMX (HE 200x). 41
- FIGURA 11.** Escore microscópico de inflamação no cólon dos animais do Grupo Controle (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias < SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 14 dias < SF 14 dias). (Teste de Mann-Whitney). 42
- FIGURA 12.** Mucinas neutras grupo sem colite (PAS-200x)..... 44
- FIGURA 13.** Mucinas neutras-colite SF (PAS 100x) 44
- FIGURA 14.** Mucinas neutras-colite MMX (PAS 200x) 45
- FIGURA 15.** Conteúdo tecidual de mucinas neutras no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou

MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= p<0,01 (Controle 7 dias >SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias, Controle 14 dias > MMX 14 dias) (Teste de Mann-Whitney).....	46
FIGURA 16 – Mucinas ácidas grupo sem colite (AB-200x).....	48
FIGURA 17. Mucinas ácidas-colite SF (AB 200x)	48
FIGURA 18. Mucinas ácidas-colite MMX (AB 200x)	49
FIGURA 19 – Conteúdo tecidual de mucinas ácidas no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= p<0,01 (Controle 7 dias <SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). (Teste de Mann-Whitney).....	50
FIGURA 20 – Sulfomucinas (marrom) e sialomucinas (azul) grupo sem colite (HIDAB-200x)	52
FIGURA 21. Sulfomucinas e sialomucinas-colite SF (AB 200x).....	52
FIGURA 22. Sulfomucinas e sialomucinas-colite MMX (AB 200x).....	53
FIGURA 23 – Conteúdo tecidual de sulfomucinas no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. *=p<0,05 (Controle 14 dias > MMX 14 dias). **= p<0,01 (Controle 7 dias >SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias). ††= p<0,01 (MMX 14dias > SF 14 dias). Teste de Mann-Whitney.....	54
FIGURA 24 – Conteúdo tecidual de sialomucinas no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= p<0,01 (Controle 7 dias >SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias; Controle 14 dias > MMX 14 dias). ††= p<0,01 (MMX 7 dias > SF 7 dias; MMX 14dias > SF 14 dias). Teste de Mann-Whitney.	56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Critério utilizado para avaliar o grau de dano macroscópico à mucosa cólica 33	
Tabela 1 – Variação do escore macroscópico de inflamação ao longo do tempo.	40
Tabela 2 – Variação do escore microscópico de inflamação ao longo do tempo	43
Tabela 3 – Conteúdo tecidual de mucinas neutras em porcentagem/campo, ao longo do tempo.	47
Tabela 4 – Variação do conteúdo de mucinas ácidas em porcentagem por campo ao longo do tempo.....	51
Tabela 5 – Variação do conteúdo de sulfomucinas em porcentagem por campo ao longo do tempo.....	55
Tabela 6 – Variação do conteúdo de sialomucinas em porcentagem por campo ao longo do tempo.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A barreira mucosa cólica.....	13
1.1.1. A camada de muco	14
1.2. A colite induzida por TNBS	17
1.3. Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) – Mesalazina MMX.....	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Aspectos Éticos.....	24
3.2. Animais de experimentação	24
3.3. Preparo da Mesalazina	24
3.4. Etapa pré-operatória	25
3.5. Grupos experimentais	25
3.6. Indução da colite por TNBS	27
3.7. Intervenção com as soluções propostas	27
3.8. Coleta das amostras do intestino grosso	28
3.9. Técnica histológica.....	29
3.9.1. Fixação e processamento	29
3.10. Técnicas de coloração	29
3.10.1. Hematoxilina-Eosina (HE).....	29
3.11. Técnicas histoquímicas	30
3.11.1. Periódico Ácido de Schiiff (PAS) – mucinas neutras.....	30
3.11.2. Azul de Alcian (AB) – mucinas ácidas	31

3.11.3.	Diamina de ferro alto-Alcian-blue (HIDAB) – sulfomucinas e sialomucinas ...	31
3.12.	Avaliação histológica do grau de inflamação (escore inflamatório)	32
3.12.1.	Avaliação macroscópica	32
3.12.2.	Avaliação microscópica.....	33
3.12.3.	Avaliação do conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas	34
3.13.	Método Estatístico.....	35
4.	RESULTADOS	36
4.1.	Escore macroscópico de inflamação.....	36
4.2.	Escore microscópico de inflamação	40
4.3.	Conteúdo tecidual de mucinas neutras	43
4.4.	Conteúdo tecidual de mucinas ácidas.....	47
4.5.	Conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas	51
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÃO	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8.	ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), principalmente representadas pela retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e pela Doença de Crohn (DC) representam um grande problema de Saúde Pública. Estudo epidemiológico mostrou que nos Estados Unidos e na Europa as DII acometem cerca de 1,5 milhão a 2 milhões de pessoas, respectivamente. No Brasil, estima-se que a incidência das DII, considerando ambas as enfermidades, acometa entre 3,5-4,48/100.000 habitantes. (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009). A etiopatogênese da DII é decorrente da interação entre diferentes fatores que apresentam como denominador comum, ocasionarem disfunções à barreira epitelial que compõe a mucosa do trato gastrointestinal. Quer como causa ou consequência da agressão inflamatória, essas disfunções do epitélio intestinal são responsáveis pelo quadro clínico e pela evolução da enfermidade. A perda da integridade da barreira epitelial leva a indução de uma resposta imune exacerbada e inflamação crônica que perpetua a agressão aos diferentes mecanismos de defesa do epitélio intestinal (GOYAL, 2014). As alterações inflamatórias que comprometem a mucosa intestinal nos portadores de DII, levam a um aumento da permeabilidade de água e íons e necrose das células do epitélio intestinal. Essas modificações são responsáveis pelo aparecimento de disenteria e perda de muco pelas fezes, sintomas presentes na maioria dos portadores dessa enfermidade, particularmente nos períodos de atividade da doença (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

1.1. A barreira mucosa cólica

A barreira funcional exercida pelo epitélio cólico representa um dos mais perfeitos mecanismos de defesa existentes no organismo humano (PRAVDA, 2005). Formada por uma única camada de células, a mucosa cólica separa o interior da luz intestinal, onde se encontra uma das maiores concentrações de bactérias conhecidas, da camada submucosa. Além desta camada existe as membranas celulares das células epiteliais, as firmes junções intercelulares e a membrana basal merecem lugar de destaque no processo de defesa (ASLAM; SPICER;

CORFIELD, 1997). Quando se consideram os mecanismos funcionais e imunológicos, a células da resposta inflamatória (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e basófilos), as citocinas, anticorpos e imunoglobulinas, também desempenham um papel de fundamental importância contra diferentes tipos de antígenos potencialmente lesivos à barreira intestinal. A capacidade funcional da barreira cólica pode ser melhor avaliada ao considerar-se que a concentração estimada de bactérias no interior do cólon capaz de invadir a parede intestinal é de 10^{12} colônias por grama de conteúdo fecal (FARRELL, 2002). Para que ocorra infiltração bacteriana passiva no meio interno deverá ocorrer, necessariamente, ruptura da barreira funcional exercida pela mucosa cólica.

Segundo Pravda (2005) e Gaudier e Hoebler (2006) a barreira funcional epitelial é composta por diferentes linhas de defesa que agindo em conjunto impedem translocação bacteriana. Esses sistemas de defesa são representados, principalmente, pela camada de muco que recobre o epitélio intestinal, pelas membranas, apical e basolateral dos colonócitos, pelo eficiente mecanismo de adesão intercelular formado pelos desmossomos, hemidesmossomos junções de oclusão, junções de comunicação e junções aderentes formadas pelas proteínas β -catenina e E-caderina e, finalmente, pela lâmina basal, rica em colágeno.

A importância da barreira funcional fica evidente quando se constata que a maioria dos modelos experimentais que tentam reproduzir em animais as alterações histológicas encontradas nos doentes com colite, possibilita a penetração bacteriana forçada na camada submucosa, pela ruptura desses mecanismos de defesa, pela exposição da mucosa a substâncias químicas tóxicas. Dentre essas substâncias, o ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e o sulfato sódico de dextrana (DSS) são aquelas mais frequentemente utilizadas (ZINGARELLI B; SZAÓ C; SALZMAN, 1999).

1.1.1. A camada de muco

A mucosa cólica tem um revestimento composto por tecido epitelial do tipo colunar simples, constituído por diferentes tipos de células. Dentre estas células evidenciam-se os enterócitos (colonócitos), células enteroendócrinas e, em maior quantidade, as células

caliciformes. Estas células ocupam praticamente, toda a extremidade das criptas intestinais (glândulas de Lieberkhun). São células de forma cilíndrica, produtoras e secretoras de muco, que apresentam dois domínios funcionais: apical e basal. O domínio apical, em forma de cálice, contém em seu meio citosólico, vesículas constituídas de muco que seguem em direção a membrana das células, liberando seu conteúdo para a parte superior do epitélio cólico. Com a responsabilidade de sintetizar a porção protéica do muco, no domínio basal é encontrado o retículo endoplasmático rugoso, e o aparelho de Golgi, que insere oligossacarídeos ao muco sintetizado, surgindo os subtipos de mucinas (MELLO et al., 2012).

A formação do muco secretado pelas células caliciformes, presentes nas glândulas da mucosa intestinal, é feita por compostos glicoprotéicos, principalmente, representados pelas mucinas. Moléculas que possuem alto peso molecular, com uma composição basicamente de 20% de proteínas e 80% de carboidratos. Após serem liberadas pelas células caliciformes, para a superfície epitelial, as mucinas são hidratadas e formam uma cobertura gelatinosa que adere ao epitélio cólico protegendo-o contra a ação mecânica e invasão bacteriana (GOLD; SHOCHAT; MILLER, 1981). Estudos que avaliam a fração proteica da molécula da mucina, encontraram diferentes disposições dos aminoácidos ao longo da proteína. Evidenciaram que existem ao menos 15 diferentes genes capazes de transcrevê-las (PORCHET et al., 1999). Mais tarde essas diferenças foram confirmadas por estudos genéticos que encontraram diferenças na ordem da disposição dos nucleotídeos ao longo do gene codificador da proteína, permitindo identificar os principais subtipos de mucinas com relação à fração protéica.

Quanto à fração glicídica de sua molécula, as mucinas são divididas em dois grandes grupos, representadas pelas mucinas neutras, com grande concentração de glicogênio, e as ácidas, ricas em ácido siálico ou radicais sulfatados (SPICER; LEPPI; STOWARD, 1996). Apesar das diferentes concentrações químicas em seus constituintes glicídicos, os dois tipos de mucinas, possuem as mesmas funções biológicas (FILIPE, 1969). A fração glicídica das mucinas neutras é composta, principalmente, por glicogênio e recebem essa denominação, por possuírem pequena quantidade de ácido siálico na composição. Este subtipo é o encontrado em maior quantidade, no interior das células caliciformes do trato gastrintestinal e representam, em média 80% do conteúdo total de mucinas encontradas no tubo digestivo. A porção glicídica das mucinas neutras apresenta alta concentração de moléculas de frutose, galactose e n-

acetilglucosamina, e uma pequena quantidade de ácido siálico e n-acetilgalactosamina. A fração proteica das mucinas neutras é formada predominantemente pelos aminoácidos alanina, serina e aspartato (GOLD; SHOCHAT; MILLER, 1981).

Diferentemente, as mucinas ácidas possuem na sua fração glicídica grande concentração de ácido siálico. A composição da porção glicídica é principalmente por glucosamina, galactosamina e frutose. Segundo o predomínio de radicais sulfatados ou de ácido siálico, respectivamente, na sua porção glicídica, dividem-se em dois subgrupos representados pelas sulfomucinas e sialomucinas. Em análise da fração proteica das mucinas ácidas, a prolina, treonina e glicina são os aminoácidos mais presentes (GOLD; SHOCHAT; MILLER, 1981).

Pesquisas em diferentes trabalhos avaliaram a expressão de mucinas ácidas e neutras na mucosa do intestino grosso. Esses estudos já demonstraram que no epitélio normal existe predomínio das mucinas ácidas, principalmente sulfomucinas (LEV, 1964). Em toda a superfície epitelial do cólon, estão presentes ambos os subtipos de mucinas ácidas, mas dependendo da região considerada existe uma expressão maior de um subtipo. É comum, em uma mesma célula caliciforme, ser encontrados os dois subtipos de mucinas ácidas. As sialomucinas, localizadas na camada basal da célula, entre o núcleo e o complexo de Golgi, enquanto as sulfomucinas ocupam, principalmente, a região apical próximo à membrana celular, direcionada para a luz intestinal. Uma moderada quantidade de mucinas neutras são encontradas na superfície do epitélio, principalmente, nas porções situadas acima das criptas. Este padrão de distribuição das mucinas predomina no cólon esquerdo e reto (GOLDMAN, 1968). Entretanto, outros estudos, encontraram padrão de distribuição distinto, mostrando que as células que produzem sulfomucinas são em maior quantidade na metade superior das criptas, enquanto as que produzem sialomucinas predominam na parte mais profunda das criptas cólicas (LEV, 1964).

O padrão de expressão das mucinas no tecido epitelial cólico de ratos, é semelhante ao dos seres humanos (SAKATA, 1981). Um estudo experimental demonstrou que o conteúdo de mucinas neutras diminui enquanto o conteúdo de mucinas ácidas aumenta quando se caminha do ceco em direção ao cólon distal. As mucinas ácidas, no entanto constatou que as sulfomucinas estavam presentes apenas no cólon distal, enquanto as sialomucinas, apesar de serem encontradas em todo o cólon, são encontradas em maior concentração à medida que se

progride do ceco para o cólon distal (MIMURA et al., 1999). Outros autores verificaram que no cólon esquerdo, igualmente ao que ocorre no homem, as sulfomucinas ocupam os dois terços superiores das criptas intestinais, enquanto as sialomucinas os dois terços inferiores (KELI et al., 1997).

Segundo Mimura e colaboradores (1999) a intensidade de expressão, o tipo e o padrão de distribuição de mucinas ao longo das criptas modificam-se em diversas doenças que acometem o cólon. Estudos mostraram diferentes padrões de expressão na mucosa cólica de doentes portadores de RCUI.

Nas colites inespecíficas a produção total de mucinas ácidas encontra-se diminuída e, nos locais onde o há uma maior intensidade no processo inflamatório, as mucinas podem não ser identificadas. A expressão de mucinas no decorrer das criptas é irregular e apresenta tanto mucinas neutras quanto ácidas e com as sulfomucinas em maior quantidade (LEV, 1964). Na RCUI o principal subtipo de mucina encontrada no epitélio inflamado é a sialomucina, entretanto é possível encontrar-se pequena expressão tecidual de sulfomucinas, principalmente na porção mais profunda das criptas intestinais. Na RCUI a expressão de mucinas neutras diminui acentuadamente, e em alguns casos está ausente (SANDEY, 1988).

Estudo, utilizando modelo experimental de colite induzida por TNBS, mostrou que a exposição cíclica da mucosa cólica a substância, reduz o conteúdo de mucinas, avaliada por técnicas histoquímicas, na mucosa cólica relacionada ao tempo de exposição ao TNBS, bem como o número de células caliciformes sugerindo que a redução desse fator de proteção da barreira epitelial cólica possa relacionar-se ao agravamento da doença (PFEIFFER; QIU; LAM, 2001).

1.2. A colite induzida por TNBS

O tratamento das DII não é específico e são utilizados fármacos como corticosteroides, aminossalicilatos, imunomoduladores, e antibióticos, estas, no entanto, possibilitam a remissão das crises, mas não a cura da doença. Além disso, apesar do uso intensivo dessas drogas, 60 a

70% dos indivíduos necessitarão de intervenção cirúrgica em decorrência de complicações da doença e, destes, 50% necessitarão de outra cirurgia subsequente (PIZARRO; ARSENEAU; BAMIAS, 2003).

Segundo Abdulsalam; Nadal-Melsio; Naresh (2014) os modelos murinos tradicionais desenvolvidos para o estudo da DC usam indução química, a transferência de células imunes, ou manipulação genética. Modelos da DC, quimicamente induzidos, incluem o TNBS, DSS e oxalazone. Estes modelos são particularmente úteis no estudo das vias bioquímicas do processo inflamatório e na comprovação de novas estratégias terapêuticas.

A indução química da inflamação, em modelos animais de DII, é feita por meio da administração de agente químico exógeno. Modelo amplamente utilizado para o estudo da DII é a indução com TNBS. Este modelo foi desenvolvido por Morris et al, o qual se baseou na hipótese de que, nas DII, um aumento na permeabilidade da mucosa resulta na entrada de um antígeno luminal, na lâmina própria, que não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico da mucosa. Utilizaram uma solução contendo etanol (um “rompedor de barreira”) e o ácido TNBS, um hapteno, que ao se associar com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, são capazes de desencadear uma resposta imunológica. Cabe destacar que os modelos animais de colite experimental (CE), particularmente o modelo de colite induzida pelo TNBS apresentaram manifestações clínicas nos animais, semelhantes às aquelas observadas em humanos. Essas semelhanças possibilitam a avaliação de várias propostas terapêuticas medicamentosas para o tratamento das DII no homem.

A administração combinada do etanol e o ácido TNBS resultaram no desenvolvimento de inflamação severa transmural e granulomatosa do colo distal, com a ulceração da mucosa cólica persistindo por oito semanas. O estabelecimento do modelo é realizado por diversos procedimentos: a observação de sinais característicos da CE em ratos, (presença de diarreia sanguinolenta, queda do pelo e da vitalidade dos animais) e a utilização de escala com escores para a avaliação macroscópica e histológica da lesão cólica e quantificação da inflamação por métodos bioquímicos ou histológicos. Na prática médica, por questão de comodidade a avaliação do processo inflamatório em portadores de colite geralmente é realizada considerando-se aspectos endoscópicos e, principalmente alterações histológicas, macros e microscópicas identificadas em segmentos de biópsia obtidas de áreas normais e com colite.

Outros métodos, mais utilizados experimentalmente, como a pesquisa da atividade da enzima mieloperoxidase nos tecidos é um marcador bioquímico comumente adotado para a mensuração da infiltração de neutrófilos no tecido danificado (ABDULSALAM; NADAL-MELSIO; NARESH, 2014).

1.3. Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) – Mesalazina MMX

A molécula da sulfasalazina foi desenvolvida em 1940 com objetivo de propor novas terapias para artrite infecciosa (MOSHKOVSKA, 2007). Naquela época acreditava-se que o componente sulfapirimidínico da molécula atuaria como agente anti-infeccioso, enquanto o radical salicílico teria ação, predominantemente, anti-inflamatória. Contudo, seu modesto efeito terapêutico no combate a artrite infecciosa contrastava-se com os excelentes resultados quando utilizada em doentes, onde a artrite era de origem puramente inflamatória. Verificou-se que na artrite dos doentes com RCUI, a utilização da sulfasalazina encontrava-se não só associada à significativa melhora dos sintomas clínicos articulares, mas, principalmente, a remissão do quadro inflamatório intestinal (CAMPIERI, 1991). Além de induzir à remissão da doença aguda, o emprego da sulfasalazina em doentes com RCUI também mostrava benefícios na manutenção sustentada da resposta clínica e histológica.

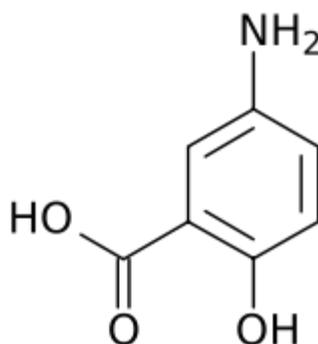


FIGURA 1. Fórmula estrutural da Mesalazina. É um aminosalicilato e possui na sua estrutura um anel benzênico.

Apesar de a sulfasalazina apresentar potenciais efeitos terapêuticos, seu uso contínuo apresentava duas importantes limitações: Primeiro, quando utilizada nos enfermos com doença ativa, apenas 50% dos tratados por via oral apresentavam remissão dos sintomas e, em mais de 30% deles, as recaídas eram frequentes (RILEY, 1998). Em segundo lugar, devido aos efeitos adversos, que ocorriam em mais de um terço dos doentes, em muitos casos havia necessidade da interrupção da medicação (DALLEGRI et al., 1990). Dentre os efeitos colaterais mais frequentemente descritos destacavam-se as reações anafiláticas, com graus variados de gravidade, a anemia por interferência no metabolismo do ácido fólico e a intolerância gástrica.

De acordo com Dallegri e colaboradores (1990) com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia terapêutica anti-inflamatória, pesquisas avaliaram separadamente a ação terapêutica dos dois componentes da molécula de sulfasalazina. Verificou-se que o radical sulfapiridina era a fração responsável pela maioria dos efeitos adversos (AZAD KHAN, 1977). Constatou-se que o radical 5-ASA (ácido 5 aminosalicílico) era a fração da molécula responsável pela ação anti-inflamatória da substância, que incluíam a inibição da síntese de prostaglandinas, redução do metabolismo do ácido araquidônico e efeito inibitório na quimiotaxia dos leucócitos. Nessa mesma época, já se chamava a atenção para um potencial efeito antioxidante do ácido 5-ASA. Essas suspeitas foram confirmadas posteriormente quando se demonstrou, em portadores de RCUI, que a aplicação de enemas que continham apenas o ácido 5-ASA na sua composição, apresentava resultados melhores quando comparados aos da aplicação da sulfasalazina, e como grande vantagem, sem os deletérios efeitos colaterais.

A ação anti-inflamatória do 5-ASA ocorre, diretamente, sobre a mucosa inflamada, bloqueando as vias da cicloxigenase e lipoxigenase reduzindo, com isso, a formação de radicais livres de oxigênio (RLO) (KENJI et al., 2002). O ácido 5-ASA é um potente redutor dos níveis teciduais de hipoclorito prevenindo a oxidação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas células do epitélio cólico. Apesar de menor efeito, também atua na redução de cloraminas e do radical livre O⁻ (BATTA, 1998). Todas essas propriedades sugerem que o ácido 5-ASA possua importante ação antioxidante para as células da mucosa cólica, constantemente expostas ao estresse oxidativo (MCKENZIE; DOE; BUFFINTON, 1999).

Trabalhos demonstraram que o uso tópico através da aplicação de enemas, espumas ou supositórios apresentava melhor eficácia terapêutica quando comparada a administração por via oral (MCKENZIE; DOE; BUFFINTON, 1999). A aplicação de enemas com ácido 5-ASA diretamente sobre a região inflamada permite atingir concentrações teciduais adequadas, mesmo quando se utilizam pequenos volumes, tornando assim, essa via de administração opção interessante. Quando administrada por via oral, a droga distribui-se por todo organismo, não atingindo a mesma concentração tecidual no cólon quando comparada a administração sob a forma de enemas (HAAGEN; BONDESEN; KINETICS, 1983). A maior eficácia da aplicação tópica apresenta vantagens tanto para os portadores de RCUI, quanto para os doentes com DC, onde o processo inflamatório acomete com maior frequência o reto e cólon sigmoide distal.

Estudo experimental avaliando os efeitos do tratamento da colite quimicamente induzida em ratos com enemas contendo ácido 5-ASA verificou que animais que receberam 5-ASA na dose de 100mg/kg apresentavam melhora macroscópica e microscópica do processo inflamatório (SONG; XIA; LI, 2006).

Estudo realizado em modelo experimental de colite quimicamente induzida por DSS constatou que animais tratados pela administração oral do ácido 5-ASA melhoravam significativamente os níveis teciduais de mieloperoxidase, número de leucócitos no sangue e a intensidade da agressão inflamatória tecidual quando comparados com os que não receberam a substância (HAYASHI et al., 2009). Mostrou ainda, que a administração oral da substância melhorava a expressão de proteínas de adesão celular, sugerindo que a recuperação da mucosa cólica, após o tratamento com o ácido 5-ASA, também poderia estar associada à prevenção da quebra dos mecanismos de adesão celular (ARAFI, 2009).

Recentemente foi disponibilizada a mesalazina MMX (Mesacol MMX®, Takeda Pharma Ltda., São Paulo, Brasil), onde os grânulos do princípio ativo da molécula (5-ASA) foram envelopados com tecnologia especial que recobre todo o comprimido externamente só permitindo sua liberação quando esse alcança a porção terminal do intestino delgado e o intestino grosso (cólon), fazendo com que a substância ativa se distribua adequadamente ao longo de todo o cólon. Esta tecnologia permite que a MMX seja administrada uma vez ao dia com eficácia clínica comprovada. O início da melhora dos sintomas é observado a partir do 14º dia de tratamento. O exato mecanismo como a MMX funciona ainda não está totalmente

estabelecido, mas sabe-se que tem uma ação local reduzindo a inflamação e inibindo uma enzima (a cicloxigenase) responsável pela liberação de prostaglandinas pela mucosa do intestino grosso (cólon). Poucos estudos avaliaram os efeitos da aplicação dessa nova tecnologia de confecção da droga na manutenção da integridade dos diferentes sistemas que compõe a barreira mucosa cólica em modelos de CE. É possível que a liberação retardada conferida pelo empacotamento do princípio ativo promova uma maior biodisponibilidade da substância na luz cólica protegendo os diferentes mecanismos de defesa epitelial aumentando a proteção contra a ruptura da mucosa cólica e consequente penetração de antígenos e bactérias pela parede intestinal, mecanismo responsável por perpetuar a agressão tecidual.

Do melhor dos conhecimentos, os efeitos protetores e terapêuticos da mesalazina MMX nos diferentes sistemas de defesa da barreira mucosa cólica nunca foram avaliados em modelo experimental de colite induzida por TNBS. Portanto, o entendimento de mecanismos que possam possibilitar o conhecimento do mecanismo de tratamento da mesalazina MMX em portadores de colite faz-se necessário.

2. OBJETIVOS

A partir do exposto e da importância do tema descrito anteriormente, esse trabalho tem como objetivo geral realizar um estudo *in vivo* em animais que desenvolveram colite por TNBS e que foram tratados posteriormente com Mesalazina MMX por diferentes dias e observar os efeitos deste tratamento. Sendo assim, os objetivos específicos foram:

2.1 - Verificar se aplicação de clisteres diários contendo mesalazinaMMX reduz o processo inflamatório da mucosa cólica em modelo experimental de colite induzida por TNBS;

2.2 - Avaliar se a aplicação de clisteres diários contendo mesalazinaMMX interfere no conteúdo tecidual de mucinas neutras, ácidas, sulfomucinas e sialomucinas nas glândulas cólicas em modelo experimental de colite induzida por TNBS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

O estudo foi realizado obedecendo à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa da Universidade São Francisco, através do número 01.226.2014.

3.2. Animais de experimentação

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300g, com idade entre 3 e 4 meses, onde 4 destes ratos foram usados como branco, ou seja, não tiveram indução de colite. Os animais são provenientes do Biotério ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio, Laboratórios Veterinários (Paulínia, São Paulo).

3.3. Preparo da Mesalazina

A Mesalazina MMX é apresentada em uma forma farmacêutica de pellets, que é revestida com etilcelulose, este revestimento faz com que o princípio ativo esteja disponível e, portanto, seja absorvido apenas no duodeno.

Para a aplicação em clisteres, estes pellets foram macerados, disponibilizando assim o ativo, uma vez que a etilcelulose não seria degradada no intestino para disponibilizar o ativo, e solubilizados em solução salina 0,9% (SF), para a administração no reto dos ratos e apresentando assim uma ação local, apresentando uma maior disponibilidade. A presença da

etilcelulose não alterou em nada a biodisponibilidade do ativo para o desenvolvimento do trabalho.

3.4. Etapa pré-operatória

Durante o período de aclimação (7 dias), os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em estante com ambiente climatizado, com filtro de ar, controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos, com ciclos claro/escuro de 12 horas. Todos os animais permaneceram em jejum durante 12 horas, exceto para água, antes da indução da colite. Identificou-se cada gaiola com o número do animal, o grupo e o subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta da China (tinta nanquim) na cauda de cada animal. Durante o período do experimento todos os animais foram sempre alimentados com a mesma ração específica para roedores (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR).

Os animais foram pesados semanalmente.

3.5. Grupos experimentais

Dos 24 animais selecionados para o estudo, 20 foram submetidos a indução da colite por TNBS. Quatro animais foram separados e não sofreram a indução da colite por TNBS para servirem de Grupo Branco (Grupo sem colite). No dia seguinte à indução da colite por TNBS, cinco animais receberam clisteres diários contendo SF e cinco animais, clisteres contendo MMX por 7 dias. No oitavo dia esses dez animais foram submetidos à eutanásia. Dos 10 animais restantes, cinco continuaram a receber clisteres diários com SF e cinco com MMX por 14 dias. Findo esse prazo foram submetidos à eutanásia. O esquema abaixo mostra o algoritmo terapêutico utilizado nos animais pertencentes ao Grupo Tratamento (**FIGURA 1**)

- Subgrupo Branco (Sem indução de colite – eutanásia em 7 dias)

- Subgrupo SF (Indução de colite – intervenção SF- eutanásia em 7 dias)
- Subgrupo MMX (Indução de colite – intervenção com MMX - eutanásia em 7 dias)
- Subgrupo Branco (Sem indução de colite – eutanásia em 14 dias)
- Subgrupo SF (Indução de colite – intervenção SF - eutanásia em 14 dias)
- Subgrupo MMX (Indução de colite – intervenção com MMX - eutanásia em 14 dias).

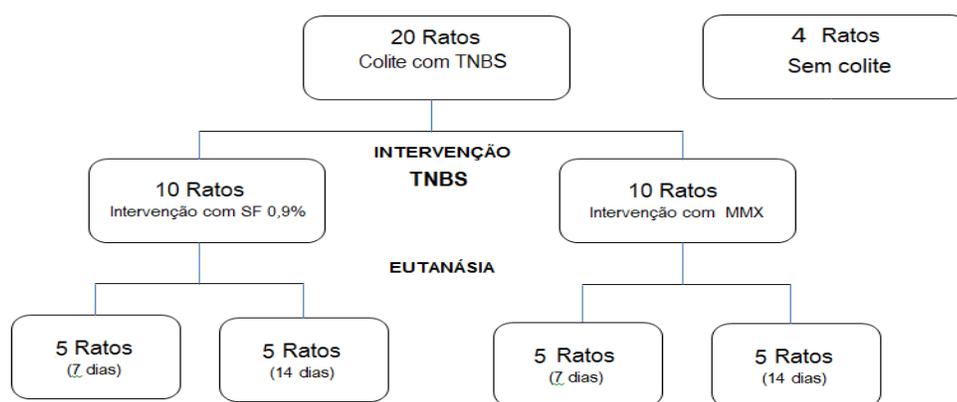


FIGURA 2. Algoritmo terapêutico dos animais pertencentes aos Grupos experimentais.

Como grupo branco utilizou-se quatro ratos que foram confinados com os demais, mas que, no entanto, não foram submetidos a indução da colite. Dois deles foram eutanasiados aos 7 dias e os outros dois, aos 14 dias, seguindo o protocolo dos grupos que foram submetidos à colite induzida pelo TNBS.

3.6. Indução da colite por TNBS

A indução da colite por TNBS em todos os animais foi realizada sob anestesia geral por meio de máscara de isoflurano em nebulização contínua. Após a indução anestésica os animais pertencentes aos dois grupos experimentais foram submetidos à indução da colite por TNBS. Para a aplicação do TNBS, foi introduzido através do ânus do animal, um cateter de polietileno 12F, demarcado em centímetros, por uma distância padrão de 8 cm. Introduzido o cateter todos os animais receberam 2,5 mL de uma solução contendo 20mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico, previamente diluído em etanol a 50%. Terminada a aplicação do TNBS no interior do cólon os animais foram mantidos de cabeça para baixo por 30 minutos, para garantir que a colite seria desenvolvida. Findo este prazo quando foram devolvidos às respectivas gaiolas.

Os animais permaneceram em gaiolas individuais durante todo período de intervenção com as soluções de tratamento propostas (SF ou MMX 2,0g/kg/dia) até a data programada para a eutanásia (7 ou 14 dias). Foram mantidos nas mesmas condições ambientais de umidade, luminosidade e temperatura do período de aclimação no Biotério Central da Universidade São Francisco (USF).

3.7. Intervenção com as soluções propostas

Os animais pertencentes a ambos os grupos experimentais (SF e MMX) foram submetidos à aplicação de clisteres diários com as soluções de intervenção propostas nos períodos de tempos estabelecidos. A aplicação das substâncias de intervenção no interior do intestino grosso dos animais foi realizada utilizando-se cateter de polietileno graduado em centímetros, com diâmetro interno de 16F. Utilizou-se cateter de maior calibre, para possibilitar a passagem dos grânulos da MMX, previamente dissolvidos em SF, pelo seu lúmen. O cateter foi introduzido, cuidadosamente, pelo ânus do animal numa profundidade padronizada em 2cm a partir da margem anal, para evitar que houvesse rompimento do intestino com colite e os

animais viessem a óbito antes do período final de tratamento por septicemia. A seguir, aplicava-se o clister contendo 3,0 mL da solução de intervenção correspondente à cada subgrupo experimental proposto (SF ou MMX na concentração de 2,0g/kg/dia), à temperatura ambiente. As soluções de intervenção foram infundidas manualmente num prazo máximo de 15 segundos.

3.8. Coleta das amostras do intestino grosso

Nas datas programadas para a eutanásia, segundo o grupo experimental considerado, os animais foram anestesiados utilizando-se o cloridrato de xilazina 2% (Anasedan® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP) e o cloridrato de quetamina (Dopalen PET® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP) na dose de 0,1 mL/100g, administradas por via intramuscular na pata traseira esquerda.

A cavidade foi aberta por planos cirúrgicos. Concluída a abertura da cavidade as presenças de aderências com outros órgãos e a eventual presença de abscessos foram transcritas para fichas individuais de cada animal. O cólon de todos os animais foi completamente removido desde o ceco até o ânus. O mesocólon foi dissecado de modo que o colón estivesse completamente livre de qualquer tecido gorduroso. O intestino grosso removido foi aberto pela borda anti-mesentérica e lavado cuidadosamente com SF à 37°C para remoção de detritos fecais. Posteriormente foi identificado a região de necrose causada pelo TNBS, a partir da porção inferior da mesma foi padronizado que a região coletada seria a partir de um centímetro da necrose, assim o material analisado seria somente a colite e/ou a região de colite exposta ao tratamento. Espécimes retirados do cólon esquerdo foram fixados com a superfície mucosa voltada para cima em um pedaço de cortiça. O cólon fixado foi encaminhado para confecção dos blocos de parafina para as diferentes técnicas histológicas propostas. Após a remoção do intestino grosso os animais foram eutanasiados, ainda sob anestesia, pela infusão de dose letal de ácido tiobarbitúrico.

3.9. Técnica histológica

3.9.1. Fixação e processamento

Para a realização dos estudos histológicos, os segmentos cólicos previamente fixados e fragmento de cortiça foram acondicionados em frascos contendo solução de formaldeído tamponado a 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os fragmentos removidos permaneceram imersos em formaldeído por 72 horas. Findo esse prazo, os espécimes foram acondicionados e identificados individualmente em recipientes adequados e processados na seguinte ordem: inicialmente foram lavados em água corrente e água destilada, em seguida desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e impregnados em banhos de parafina líquida a temperatura constante de 60°C. Após, o material proveniente de cada animal foi incluído em blocos individuais de parafina, identificados com o número do animal e o tempo decorrido até o sacrifício (7 ou 14 dias). Os espécimes do cólon removido foram sempre incluídos nos blocos de parafina de modo que permitissem que os cortes histológicos fossem feitos paralelamente as diferentes camadas da parede intestinal (cortes longitudinais).

Cada bloco de parafina foi submetido à microtomia onde foram realizados cortes longitudinais, com 5 µm de espessura, para confecção das lâminas destinadas ao estudo histológico e histoquímico.

3.10. Técnicas de coloração

3.10.1. Hematoxilina-Eosina (HE)

Para a identificação da presença da colite, bem como da intensidade da inflamação

utilizou-se a técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Os espécimes depois de coletados, processados, cortados e identificados foram colocados em lâminas de vidro específicas e expostos à temperatura de 60°C por doze horas. Concluída a desparafinização, as lâminas foram submersas em dois banhos de xilol com a duração de dez minutos cada banho. Em seguida foram submetidas a três banhos de álcool absoluto, por passagem e hidratadas em água corrente por cinco minutos. Após a hidratação, todas as lâminas foram submersas no corante, hematoxilina de Harris por um minuto, seguida de nova lavagem com água corrente para a remoção do excesso do corante. Finda esta etapa, foram expostas ao corante eosina por dois minutos, novamente lavadas com água corrente e, logo a seguir, desidratadas através de três banhos de álcool absoluto, um banho com xilol/álcool e três banhos de xilol. Terminado o processo foram montadas utilizando-se lamínulas e resina para estudo histológico e graduação do inflamatório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.11. Técnicas histoquímicas

3.11.1. Periódico Ácido de Schiiff (PAS) – mucinas neutras

Após a realização dos cortes histológicos, para o estudo das mucinas neutras as lâminas foram desparafinadas em duas imersões sucessivas de xilol por dez minutos cada banho e a seguir, imergidos em três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. Por fim as lâminas foram inseridas em ácido periódico por sessenta minutos à temperatura ambiente. Ao fim desta etapa as lâminas foram lavadas de forma contínua e cuidadosa, inicialmente com água corrente e posteriormente com água destilada por três minutos à temperatura ambiente. Terminada a lavagem foram expostas ao reativo de Schiff por sessenta minutos também em temperatura ambiente e, lavadas novamente em água corrente e destilada por cinco minutos. Terminada a lavagem as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente. Após a contra-coloração foram novamente, lavadas em água corrente e destiladas por três minutos. Finda esta etapa foram

desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto durando três minutos cada banho, e diafanizadas em três banhos de xilol. Após diafanização foram montadas com resina e lamínulas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.11.2. Azul de Alcian (AB) – mucinas ácidas

Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho e, posteriormente alcoolizados em três banhos sucessivos de álcool absoluto por três minutos e hidratados com água destilada à temperatura ambiente. Terminada esta etapa as lâminas foram expostas ao corante Azul de Alcian (AB) por 30 minutos à temperatura ambiente. Concluída esta etapa os fragmentos dispostos sobre as lâminas foram expostos ao ácido acético a 3% em uma única passagem em temperatura ambiente. Após a descoloração pelo ácido acético as lâminas foram lavadas contínua e cuidadosamente com água corrente por cinco minutos à temperatura ambiente e desidratada em três banhos sucessivos de álcool absoluto. Terminada a desidratação foram diafanizados em três banhos de xilol. As lâminas já coradas foram secas por três minutos e findo esse tempo montadas com resina e lamínula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.11.3. Diamina de ferro alto-Alcian-blue (HIDAB) – sulfomucinas e sialomucinas

Para a identificação dos subtipos de mucinas ácidas, sulfomucinas e sialomucinas, com a técnica da diamina de ferro alto alcian-blue (HIDAB), os cortes histológicos foram inicialmente desparafinados em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada. A seguir foram alcoolizados em três banhos sucessivos de álcool absoluto durando um minuto cada e após, hidratados com água destilada por três minutos. Terminada esta etapa os cortes foram expostos ao corante diamina de ferro alto por seis horas à temperatura ambiente. Concluída

esta etapa foram lavados em água corrente por três minutos e posteriormente em água destilada por mais um minuto e expostas ao corante AB com pH 2,5 por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram lavados em água corrente e água destilada por dois minutos. Após, os cortes foram contra-corados pelo corante vermelho neutro por oito minutos à temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido por meio de lavagem em água corrente por três minutos. Finada esta etapa, os tecidos foram desidratados em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizados em três banhos de xilol (passagem). A seguir os cortes foram montados com resina e lamínula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013)

3.12. Avaliação histológica do grau de inflamação (escore inflamatório)

3.12.1. Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica do grau de inflamação foi avaliada segundo escala anteriormente proposta (BELL et al., 1995) (QUADRO 1). O cólon foi examinado sob uma lupa entomológica para avaliar as lesões macroscópicas. As lesões macroscópicas do cólon foram classificadas em uma escala de 0 a 6 com base em critérios que definiriam o grau inflamação.

Quadro 1-Critério utilizado para avaliar o grau de dano macroscópico à mucosa cólica	
0	Sem dano visível
1	Hiperemia sem presença de úlcera
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação visível em pelo menos um local
4	≥ dois locais com presença de úlceras + inflamação
5	≥ duas ulcerações de maior extensão e inflamação ou 1 local com ulceração > 1cm de extensão
6	Quando a úlcera era maior de 2cm de extensão e comprometia mais de um local no cólon
Bell et al., 1995	

3.12.2. Avaliação microscópica

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS-50, com magnificação final de 200x, por patologista experiente em doenças colorretais que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. As fotomicrografias foram feitas com câmera de vídeo-captura (DS-Fi-50), acoplada ao microscópio e, posteriormente, digitalizadas em computador.

Para uniformizar o local da leitura foi obtida uma amostra de cólon localizada precisamente 5cm acima do canal anal. O grau de inflamação nas seções microscópicas longitudinais foi graduado, semiquantitativamente, de 0 a 4 cruces conforme proposto anteriormente (PRAVDA, 2005). Estatificou-se o grau de inflamação em: 0 = sem sinais de inflamação; 1 = nível muito baixo de inflamação; 2 = baixo nível de infiltração de leucócitos; 3 = alto nível de infiltração de leucócitos com alta densidade vascular, espessamento da parede do cólon; 4 = infiltrações transmuralis, perda de células de cálice, alta densidade vascular,

espessamento da parede do cólon.

3.12.3. Avaliação do conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas

O conteúdo tecidual das mucinas neutras, ácidas, sulfomucinas e sialomucinas foram mensurados por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada). Para cada animal o conteúdo tecidual de cada fração da glicoproteína foi mensurado em três campos histológicos distintos onde houvesse pelo menos, três glândulas cólicas contíguas. A imagem selecionada, após adequadamente focada, foi capturada por vídeo-câmera (DS-Fi-Nikon Instruments Inc., Japan) acoplada a um microscópio óptico (Elipse-50i – Nikon Instruments Inc., Japan). A seguir a imagem captada foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements (Nikon Instruments, Japan) instalado em um computador com boa capacidade de processamento de imagens (FIGURA 2).

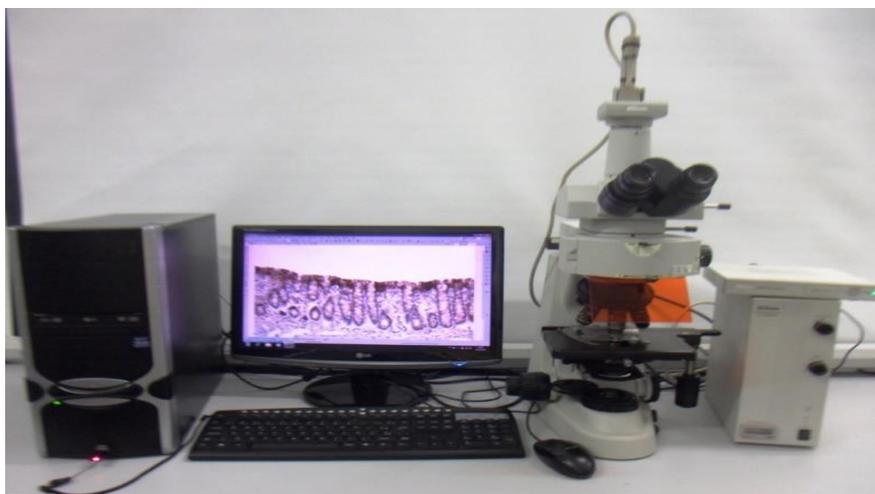


FIGURA 2. Sistema de análise de imagens assistida por computador, utilizado para mensuração do conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas.

Com o programa, a coloração, característica da expressão tecidual de cada proteína

identificada por histoquímica, era substituída pela cor branca, enquanto o restante do campo de visão capturado, sem coloração, em preto formando uma imagem binária. Automaticamente o programa de análise de imagem calculava quantos pixels corados em branco estavam presentes no campo histológico corado em preto. Os valores encontrados para o conteúdo tecidual das proteínas estudadas foram sempre expressos em porcentagem de pixels (proteína estudada) por campo analisado (%/campo). O valor final adotado para os animais pertencentes aos Grupos experimentais propostos foi sempre representado pelo valor médio, com o respectivo erro padrão.

3.13. Método Estatístico

Para o estudo estatístico utilizou-se o BioStat (versão 5.5). Os resultados foram descritos pela média ou mediana, com respectivo erro padrão. Para a avaliação dos resultados encontrados em relação aos escores macroscópicos e microscópicos de inflamação utilizou-se teste de mediana. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para analisar o escore de graduação inflamatória e o conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas, comparando de forma pareada, os animais sem colite e os com colite, submetidos à intervenção com SF ou MMX (2,0g/kg/dia), nos diferentes tempos padronizados para realização da eutanásia (7 ou 14 dias). Adotou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os valores significantes quando se comparou os segmentos irrigados com SF e MMX (2,0 g/kg/dia) com os encontrados no Grupo Controle (sem colite) foram marcados com um asterisco (*) quando o nível de significância encontrado era menor que 5% ou com dois asteriscos (**) quando esse nível era menor que 1%. Os valores significantes quando se comparou os animais com colite, tratados com SF e MMX, após 7 ou 14 dias de intervenção, foram marcados com uma cruz (†) quando o nível de significância encontrado era menor que 5% ou com duas cruces (††) quando esse nível era menor que 1%. Empregou-se o teste Kruskal-Wallis de forma pareada, para análise de variância dos resultados encontrados em cada grupo experimental, com relação ao tempo de intervenção. A influência do tempo de intervenção em cada grupo experimental também foi feita de forma pareada comparando os resultados encontrados após 7 ou 14 dias de intervenção.

4. RESULTADOS

4.1. Escore macroscópico de inflamação

As alterações inflamatórias que comprometem a mucosa intestinal nos portadores de DII, levam a um aumento da permeabilidade de água e íons e necrose das células do epitélio intestinal. As figuras 3 e 4, respectivamente, mostram o cólon seccionado longitudinalmente e visto pela superfície mucosa, dos animais com colite induzida por TNBS e submetidos à intervenção com SF 0,9%. É possível observar na figura 3 e 4 a presença da necrose, região escura no centro da imagem, e logo acima e abaixo a região avermelhada que é a inflamação causada pelo TNBS, caracterizando a colite.



FIGURA 3. Colite induzida + intervenção SF(7 dias)



FIGURA 4. Colite induzida + intervenção SF (14 dias)

As figuras 5 e 6, respectivamente, mostram o cólon seccionado longitudinalmente e visto pela superfície mucosa, dos animais com colite induzida por TNBS e submetidos a intervenção com MMX. Se comparar as imagens pelo mesmo período de tratamento, ou seja, a figura 3 e 5 e a figura 4 e 6 é possível observar uma diminuição na região de necrose e da presença da colite.



FIGURA 5. Colite induzida+intervenção MMX (7 dias)



FIGURA 6.Colite induzida+intervenção MMX (14 dias)

A figura 7 mostra o escore inflamatório após avaliação macroscópica, em mediana, em toda a extensão do segmento, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento antes da realização da eutanásia, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX. É possível observar que não houve alteração entre os grupos controle e SF com os diferentes tempos de tratamento, porém quando compara este valor no grupo tratado com MMX verifica-se uma diminuição com o passar do tempo no escore macroscópico, indicando que o tratamento com o passar dos dias melhora o processo inflamatório causado pela colite.

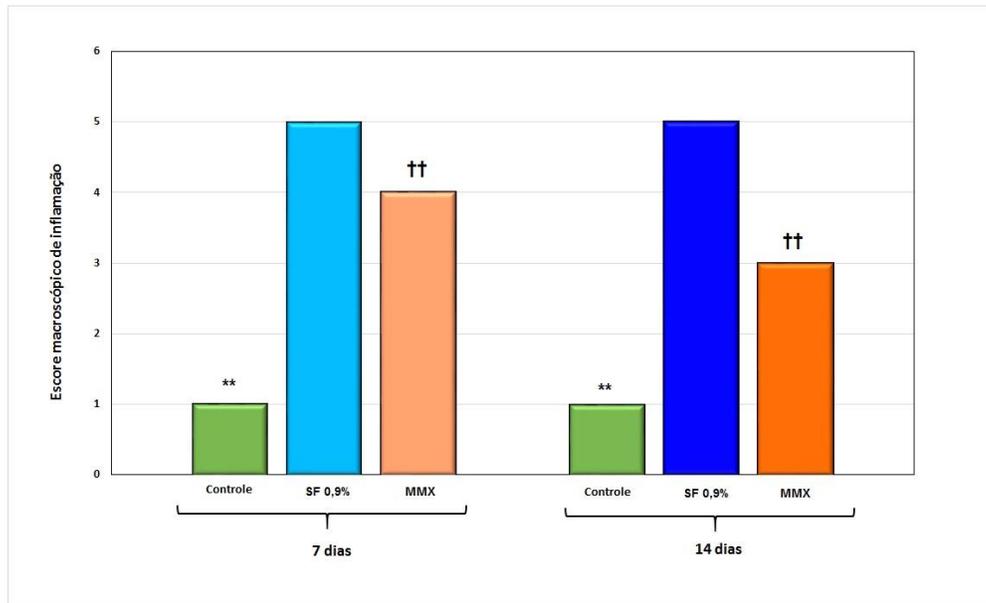


FIGURA 7. Escore macroscópico de inflamação no cólon dos animais do Grupo Controle (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX, 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias < SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 7 dias < SF 7 dias; MMX 14 dias < SF 14 dias). (Teste de Mann-Whitney).

Na tabela 1 a variação do escore macroscópico de inflamação no cólon dos animais ao longo do experimento quando se compara as três populações. Quando se avaliaram os valores de escore inflamatório macroscópico os animais sem colite, após 7 dias e 14 dias de confinamento com o grupo tratado com SF e com MMX verifica-se um aumento no processo inflamatório, porém se for observado os valores do escore do grupo SF com o MMX no período de 14 dias verifica-se que o tratamento diminui de forma significativa o valor do processo inflamatório da colite, indicando que o MMX tenta a recuperar a mucosa do cólon. Porém, quando se comparou somente os achados dos grupos SF e MMX verificou-se que em ambos os tempos de tratamento o processo inflamatório, comparando o escore macroscópico, teve uma diminuição quando tratado com MMX.

Tabela 1 – Variação do escore macroscópico de inflamação ao longo do tempo.

	Peso (mediana)	
	7 dias	14 dias
Controle	1	1
SF	5	5
MMX	4	3

Teste de Kruskal-Wallis

4.2. Escore microscópico de inflamação

Após a análise do escore macroscópico verificou-se o escore microscópico. As figuras 8, 9 e 10, respectivamente, mostram o cólon seccionado longitudinalmente e visto pela superfície mucosa, dos animais sem colite e com colite induzida por TNBS e submetidos à intervenção com SF e MMX por 14 dias. Quando compara a figura 8 com a 9 é possível demonstrar o quanto a colite afeta as diferentes camadas que compõem o epitélio cólico. E na figura 10 verifica-se o quanto o MMX possibilitou a recuperação do epitélio cólico quando comparado com a imagem do tratado com SF, sendo que a recuperação foi tão significativa que as camadas do epitélio cólico estão bem próximas do controle sem colite.

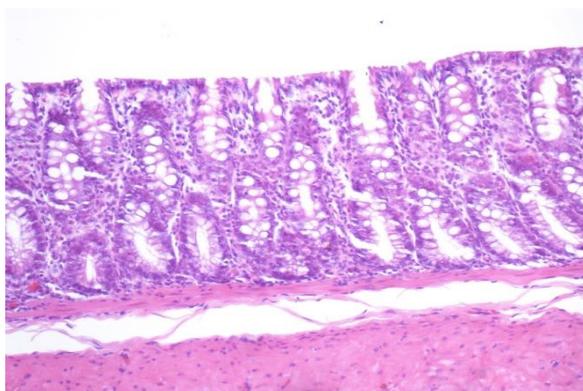


FIGURA 8. Epitélio cólico no grupo sem colite (HE-200x)

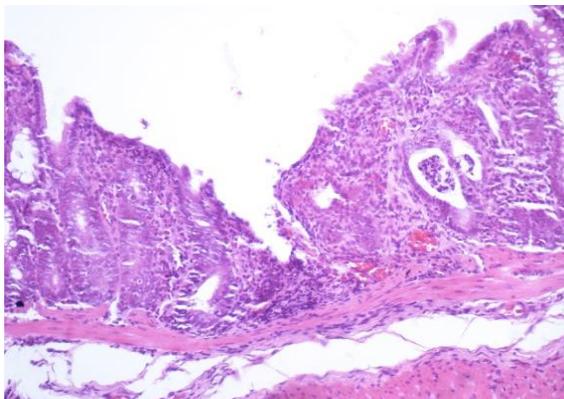


FIGURA 9. Epitélio cólico: grupo com colite SF (HE-200x)

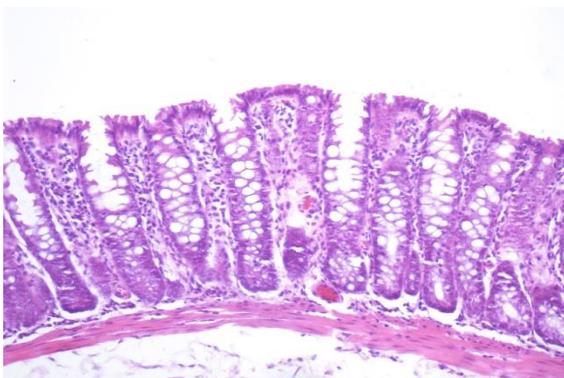


FIGURA 10. Epitélio cólico: grupo com colite MMX (HE 200x).

A figura 11 mostra o escore inflamatório após avaliação microscópica, em mediana, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento antes da realização da eutanásia, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX. Esses dados mostram que os animais sem indução de colite não apresentavam alterações microscópicas na mucosa cólica ao longo do tempo. Nos animais submetidos à indução da colite por TNBS que receberam clisteres contendo SF por 7 e 14 dias, no momento da eutanásia os valores de escore microscópicos eram em mediana de 3 e 4, respectivamente. Esses resultados mostram que existe piora do

grau de dano microscópico à mucosa cólica com o passar do tempo da intervenção. Por sua vez, o escore microscópico de inflamação nos animais tratados com MMX por 7 e 14 dias foi no momento da eutanásia, em mediana de dois, independente do tempo considerado. Os resultados mostram que a aplicação de clisteres com MMX reduziu o escore de inflamação em relação aos animais submetidos a intervenção com SF, embora continuasse maior quando comparado aos animais sem colite.

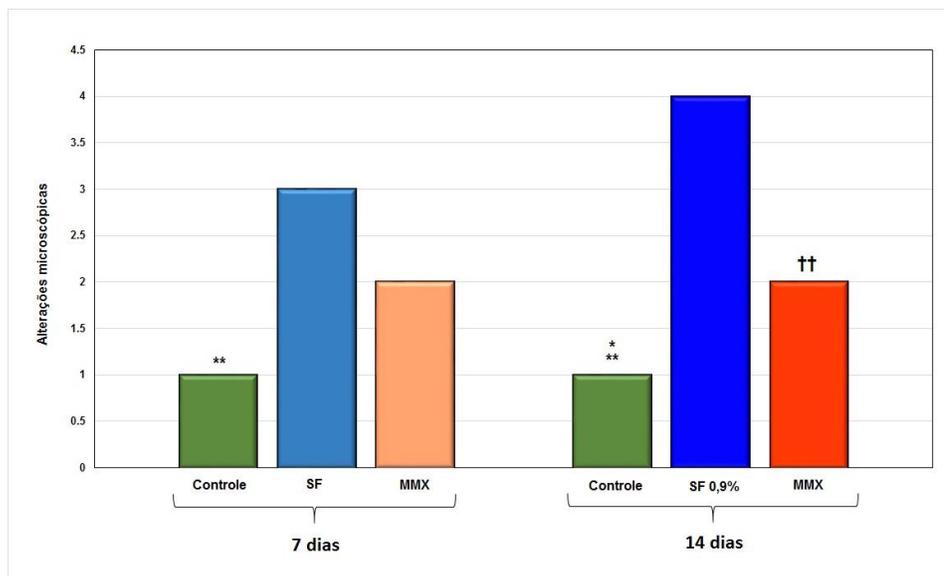


FIGURA 11. Escore microscópico de inflamação no cólon dos animais do Grupo Controle (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias < SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 14 dias < SF 14 dias). (Teste de Mann-Whitney).

Na tabela 2 a variação do escore microscópico de inflamação no cólon dos animais ao longo do experimento. Quando se comparou de forma pareada, utilizando o teste de mediana, o escore microscópico de inflamação comparando animais sem colite com submetidos à irrigação com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente maiores (Controle < SF 7 dias, $p = 0,007$). De modo semelhante, mas com um valor menor, quando se comparou os animais do Grupo Controle com os tratados com MMX por 7 dias o escore microscópico também era maior (Controle < MMX 7 dias, $p = 0,007$). Contudo, quando se compara os animais submetidos à intervenção com MMX com os irrigados com SF

verifica-se que a MMX apesar de diminuir o escore microscópico os resultados não mostraram significância ($p=0,25$). Ao se comparar de forma pareada, utilizando o teste de mediana, o escore de graduação inflamatória avaliado por microscopia dos animais sem colite com os animais com colite induzida, submetidos à irrigação com SF por 14 dias, verificou-se que o escore inflamatório era maior nos animais tratados com SF. (Controle < SF 14 dias, $p=0,007$). Todavia quando se comparou, adotando teste de mediana, o escore microscópico nos animais sem colite com os tratados com MMX por 14 dias verificou-se que os tratados com MMX por 14 dias apresentavam graduação de escore semelhante que o encontrado dos animais sem colite (Controle 14 dias x MMX 14 dias, $p=0,40$). Quando se comparou os níveis de escore inflamatório microscópico entre os animais com colite submetidos à intervenção com SF ou MMX por 14 dias, o tratamento com MMX reduziu o escore ($p=0,02$).

Tabela 2 – Variação do escore microscópico de inflamação ao longo do tempo

	Peso (mediana)	
	7 dias	14 dias
Controle	1	1
SF	3	4
MMX	2	2

Teste de Kruskal-Wallis

4.3. Conteúdo tecidual de mucinas neutras

Na figura 12 observa-se a expressão tecidual de mucinas neutras nos animais do grupo controle. Nas figuras 13 e 14 observa-se a expressão tecidual de mucinas neutras nos animais submetidos a intervenção com SF e MMX por 7 dias, respectivamente

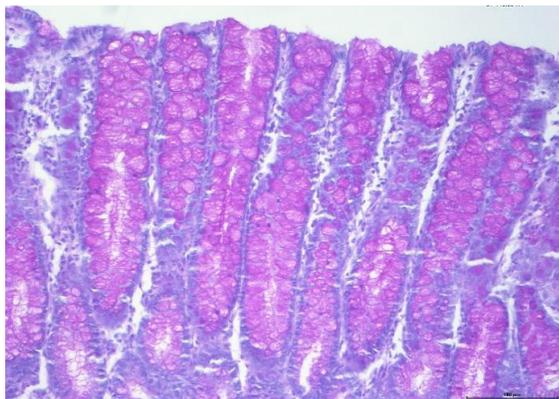


FIGURA 12. Mucinas neutras grupo sem colite (PAS-200x)

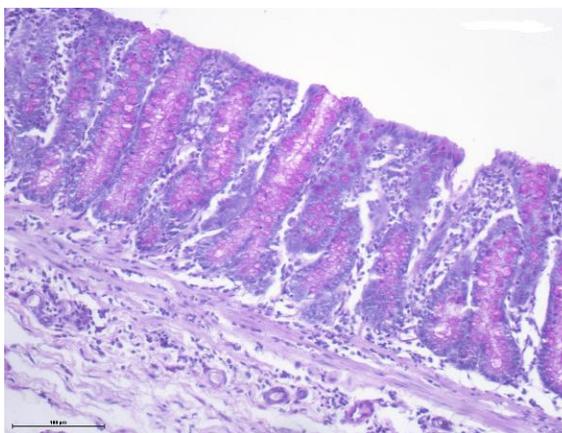


FIGURA 13. Mucinas neutras-colite SF (PAS 100x)

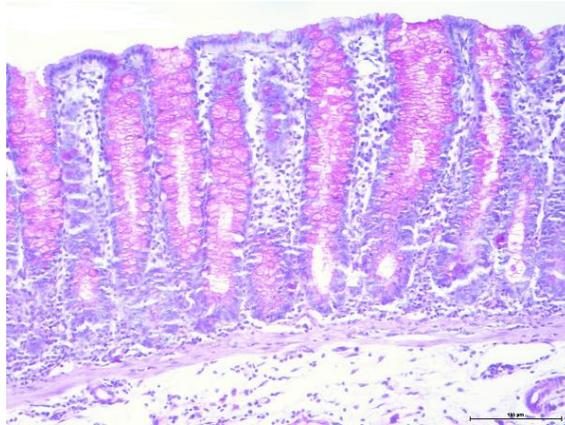


FIGURA 14. Mucinas neutras-colite MMX (PAS 200x)

A figura 15 mostra o conteúdo tecidual de mucinas neutras, em média, com o devido erro padrão, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX. Quando se mensurou o conteúdo de mucinas neutras, os animais sem colite, após 7 dias e 14 dias de confinamento o valor percentual por campo encontrado, em média, com respectivo erro padrão, foi de $43,45\% \pm 0,58\%$ e $48,35\% \pm 0,53\%$, respectivamente. Assim, após 14 dias de confinamento os animais aumentaram em aproximadamente 15% o conteúdo de mucinas neutras no epitélio cólico. O conteúdo de mucinas neutras encontrados nos animais com colite e submetidos à intervenção com clisteres contendo SF por 7 e 14 dias, no momento da eutanásia foi de $30,99\% \pm 2,08\%$ e $28,25\% \pm 1,25\%$, respectivamente. Esses resultados mostram que ocorre redução do conteúdo de mucinas neutras na mucosa cólica ao longo do tempo de 2,74%. De forma semelhante, o conteúdo de mucinas neutras no cólon dos animais com colite e tratados com clisteres contendo MMX por 7 e 14 dias foi no momento da eutanásia de $29,37\% \pm 0,74\%$ e $29,05\% \pm 1,45\%$, respectivamente. Esses resultados mostram que os animais tratados com MMX o conteúdo de mucinas neutras reduziu 0,32% ao longo do período de intervenção.

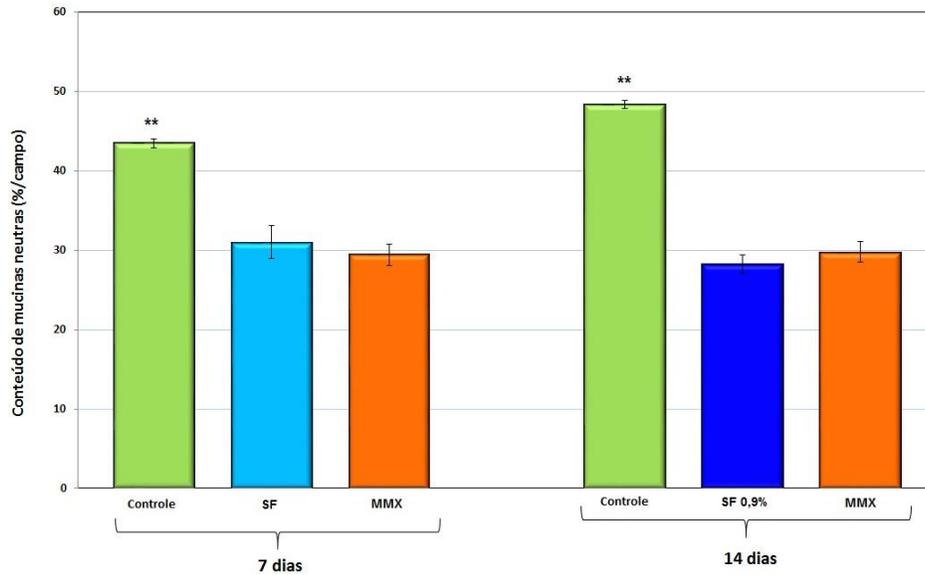


FIGURA 15. Conteúdo tecidual de mucinas neutras no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias > SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias, Controle 14 dias > MMX 14 dias) (Teste de Mann-Whitney).

Na tabela 3 observa-se a variação do conteúdo de mucinas neutras no cólon dos animais ao longo do tempo. Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de mucinas neutras entre os animais sem colite e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores (Controle 7 dias > SF 7 dias, $p = 0,0005$). De modo semelhante, mas com valor ainda menor, quando se comparou os animais do Grupo Controle com os tratados com MMX por 7 dias nos animais com colite, o conteúdo de mucinas neutras também foi menor (Controle 7 dias > MMX 7 dias, $p = 0,0004$). Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de mucinas neutras nos animais sem colite pós 14 dias de confinamento com os tratados com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de mucinas neutras era menor nos animais tratados com SF (Controle 14 dias > SF 14 dias, $p = 0,0005$). Quando se comparou o conteúdo de mucinas neutras nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os tratados com MMX por 14 dias verificou-se que os animais submetidos à intervenção com MMX também, cursaram com conteúdo menor que o encontrado dos animais sem colite (Controle 14 dias > MMX 14 dias, $p = 0,0004$). Esses achados mostram que a

aplicação de clisteres com MMX mesmo por 14 dias não foi capaz de recuperar o conteúdo de mucinas neutras até mesmo quando comparada aos animais submetidos à intervenção com SF Controle 14 dias x MMX 14 dias, $p=0,23$).

Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de mucinas neutras verificou-se que nos animais do Grupo Controle ocorria aumento do conteúdo com o passar do tempo de intervenção (Controle 7dias × Controle 14 dias, $p<0,05$). De modo distinto, nos animais tratados com SF, o conteúdo de mucinas neutras não apresentou variação após 14 dias de intervenção (SF 7dias × SF 14 dias, $p=0,57$). De modo idêntico ao que ocorre com a intervenção com SF, nos animais com colite tratados com MMX não houve variação do conteúdo de mucinas neutras relacionado ao tempo de intervenção (MMX 7dias × MMX 14 dias, $p= 0,42$).

Tabela 3 – Conteúdo tecidual de mucinas neutras em porcentagem/campo, ao longo do tempo.

	Conteúdo de mucinas neutras (%/campo)	
	7 dias	14 dias
Controle	43,45±0,5	48,35±0,5*
SF	30,99±2,0	28,25±1,2
MMX	29,42±1,3	29,79±1,3

Teste de Kruskal-Wallis

4.4. Conteúdo tecidual de mucinas ácidas

Na figura16 observa-se a expressão tecidual de mucinas ácidas nos animais do grupo controle. Nas Figuras 17 e 18 observa-se a expressão tecidual de mucinas ácidas nos animais submetidos a intervenção com SF e MMX por 14 dias, respectivamente e é possível observar que quando se compara estas imagens com a figura 16 a expressão das mucinas está menor e que a expressão muda quando se compara as tratadas com SF e MMX, porém o tratamento

com MMX no período estudado não é suficiente para recuperar completamente quando comparado com o controle.

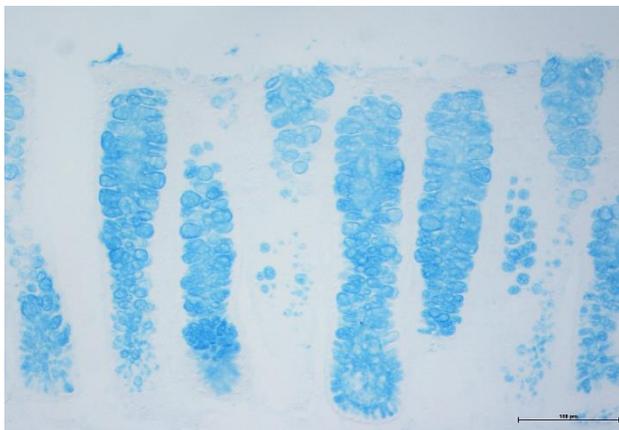


FIGURA 16 – Mucinas ácidas grupo sem colite (AB-200x)

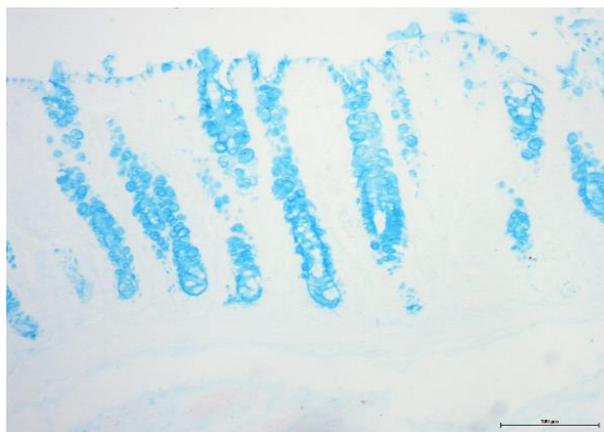


FIGURA 17.Mucinas ácidas-colite SF (AB 200x)

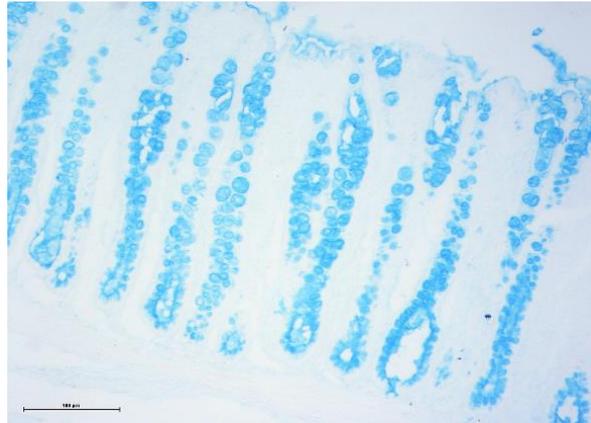


FIGURA18. Mucinas ácidas-colite MMX (AB 200x)

A figura 19 mostra o conteúdo tecidual de mucinas ácidas totais, em média, com o devido erro padrão, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX, sendo possível observar que não há alteração na concentração de mucinas ácidas com o passar do tempo dentro dos grupos, porém observa-se que há a diminuição significativa na expressão das mesmas quando a colite é estabelecida e/ou tratadas com MMX.

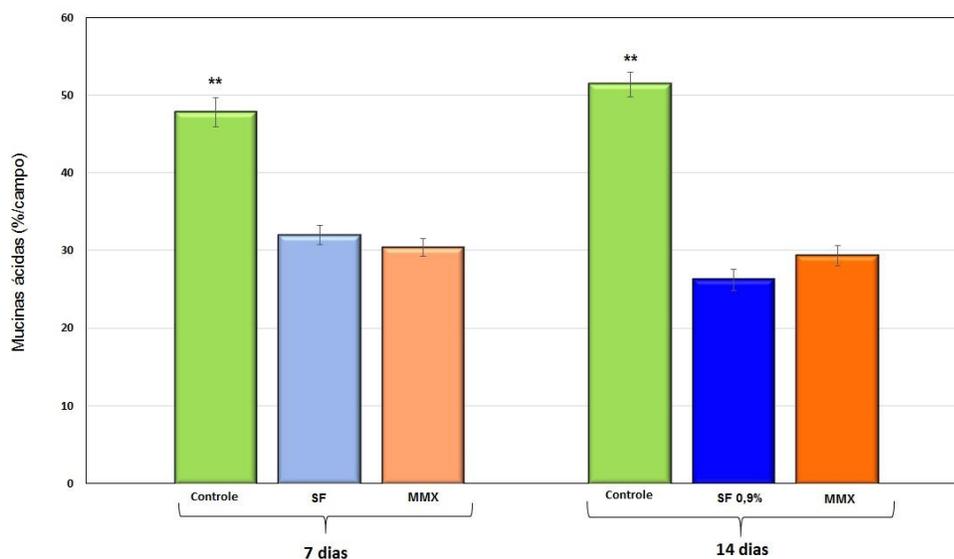


FIGURA 19 – Conteúdo tecidual de mucinas ácidas no cólon dos animais sem colite(após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias < SF 7 dias; Controle 7 dias < MMX 7 dias; Controle 14 dias < SF 14 dias, Controle 14 dias < MMX 14 dias). (Teste de Mann-Whitney).

Na tabela 4 observa-se a variação do conteúdo de mucinas ácidas no cólon dos animais ao longo do tempo. Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de mucinas ácidas entre os animais do grupo controle e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores (Controle 7 dias > SF 7 dias, $p=0,0005$). De modo semelhante, quando se comparou os animais do grupo controle com os tratados com MMX por 7 dias nos animais com colite o conteúdo de mucinas ácidas também diminuiu (Controle 7 dias > MMX 7 dias, $p=0,0005$). Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de mucinas ácidas nos animais do grupo controle após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de mucinas ácidas era menor nos animais tratados com SF. (Controle 14 dias > SF 14 dias, $p=0,0004$). Da mesma forma, o conteúdo de mucinas ácidas nos animais do grupo controle após 14 dias de confinamento era maior que o encontrado dos animais submetidos à aplicação de clisteres com MMX (Controle 14 dias > MMX 14 dias, $p=0,0005$). Ao comparar-se animais

com colite submetidos a intervenção com SF ou MMX verificou-se que a aplicação de clisteres com MMX não aumenta o conteúdo de mucinas ácidas (SF 14 dias x MMX 14 dias, $p=0,08$).

Tabela 4 – Variação do conteúdo de mucinas ácidas em porcentagem por campo ao longo do tempo

	Conteúdo de mucinas ácidas (%/campo)	
	7 dias	14 dias
Controle	47,8±1,9	51,4±1,58
SF	31,93±1,2*	26,21±1,3
MMX	30,34±1,1	29,26±1,3

Teste de Kruskal-Wallis

4.5. Conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas

Na figura 20 mostra a expressão tecidual de sulfomucinas e sialomucinas nos animais do grupo controle. Nas figuras 21 e 22 à expressão tecidual se sulfomucinas e sialomucinas nos animais do grupo com colite, submetidos à intervenção com clisteres contendo SF ou MMX. Quando se observa o corte histológico dos animais tratados com SF verifica-se uma diminuição nas sulfomucinas devido à colite, porém o tratamento com MMX aumenta a expressão das mesmas como representado na figura 22, porém a expressão não é igual ao grupo controle.

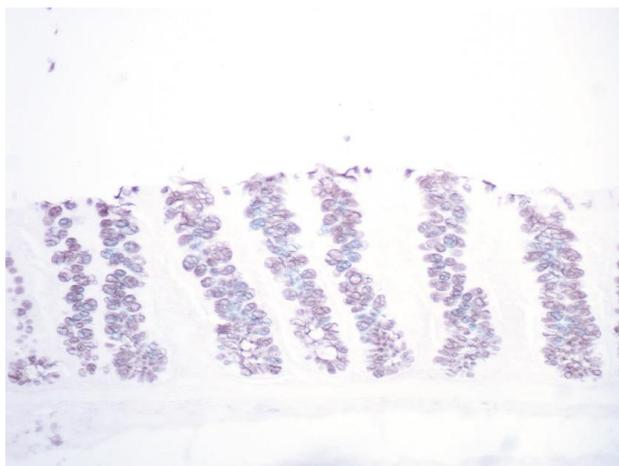


FIGURA 20– Sulfomucinas (marrom) e sialomucinas (azul) grupo sem colite (HIDAB-200x)

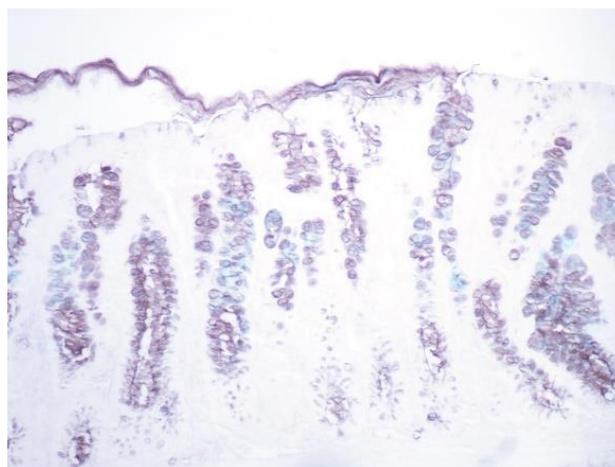


FIGURA 21.Sulfomucinas e sialomucinas-colite SF (AB 200x)

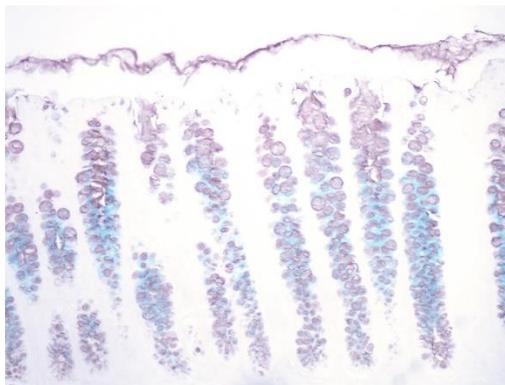


FIGURA22.Sulfomucinas e sialomucinas-colite MMX (AB 200x)

Na figura 23 mostra-se o conteúdo tecidual de sulfomucinas, em média, com o devido erro padrão, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX. No grupo controle há um aumento significativo na expressão de sulfomucinas com o passar do tempo, da mesma forma que o grupo tratado com MMX. Já o grupo tratado com SF há uma tendência a diminuição no conteúdo de sulfomucina.

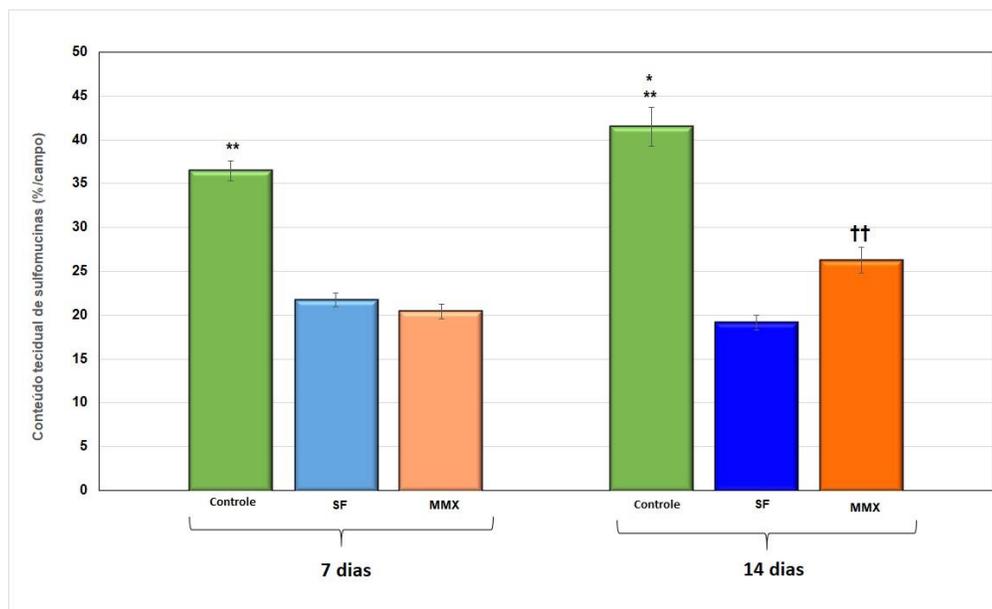


FIGURA 23 – Conteúdo tecidual de sulfomucinas no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. *= $p < 0,05$ (Controle 14 dias > MMX 14 dias). **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias > SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 14 dias > SF 14 dias). Teste de Mann-Whitney.

Na tabela 5 observa-se a variação do conteúdo de sulfomucinas no cólon dos animais ao longo do tempo. Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de sulfomucinas entre os animais sem colite e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores (Controle 7 dias > SF 7 dias, $p=0,003$). De modo semelhante, quando se comparou os animais sem colite com os tratados com MMX por 7 dias nos animais com colite o conteúdo de sulfomucinas também diminuiu (Controle 7 dias > MMX 7 dias, $p=0,0039$). Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de sulfomucinas nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de sulfomucinas era menor nos animais tratados com SF. (Controle 14 dias > SF 14 dias, $p=0,003$). Da mesma forma, o conteúdo de sulfomucinas nos animais do grupo controle após 14 dias de confinamento era maior que o encontrado dos animais submetidos à aplicação de clisteres com MMX (Controle 14 dias > MMX 14 dias, $p=0,003$). Esses achados mostram que a aplicação de clisteres com SF ou MMX não é capaz

de aumentar o conteúdo de sulfomucinas quando comparado aos animais sem colite. Contudo, cabe destacar que ao compararem-se os animais com colite após 14 dias de intervenção submetidos à intervenção com SF ou MMX verificou-se que o tratamento com a MMX aumenta o conteúdo de sulfomucinas (SF 14 dias x MMX 14 dias, $p=0,006$).

Tabela 5 – Variação do conteúdo de sulfomucinas em porcentagem por campo ao longo do tempo

	Conteúdo sulfomucinas (%/campo)	
	7 dias	14 dias
Controle	36,4±1,1	41,4±1,1*
SF	21,7±0,7	19,17±0,8
MMX	20,4±0,8	26,2±1,4*

Teste de Kruskal-Wallis

Na figura 24 mostra o conteúdo tecidual de sialomucinas, em média, com o devido erro padrão, dos animais do grupo controle (após 7 ou 14 dias de confinamento), e dos animais do grupo experimento, 7 ou 14 dias após a indução da colite por TNBS e aplicação diária de clisteres contendo SF ou MMX. Quando observada a figura é possível observar o mesmo perfil encontrado nas sulfomucinas, ou seja, que no controle e grupo tratado com MMX há um aumento significativo no conteúdo de sialomucinas, porém quando é analisado o grupo tratado com SF há uma tendência de aumento, contudo este resultado não é estatisticamente significativo.

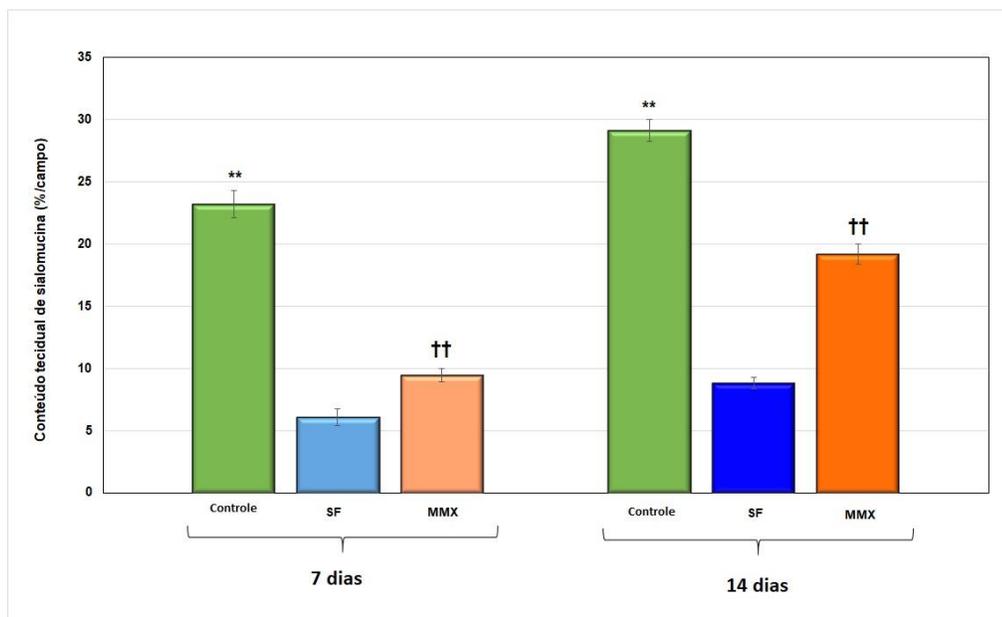


FIGURA 24 – Conteúdo tecidual de sialomucinas no cólon dos animais sem colite (após 7 e 14 dias de confinamento) e dos submetidos à intervenção com SF 0,9% ou MMX 7 e 14 dias após indução da colite por TNBS. **= $p < 0,01$ (Controle 7 dias > SF 7 dias; Controle 7 dias > MMX 7 dias; Controle 14 dias > SF 14 dias; Controle 14 dias > MMX 14 dias). ††= $p < 0,01$ (MMX 7 dias > SF 7 dias; MMX 14 dias > SF 14 dias). Teste de Mann-Whitney.

Na tabela 6 observa-se a variação do conteúdo de sialomucinas no cólon dos animais ao longo do tempo. Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de sialomucinas nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de sialomucinas era menor nos animais tratados com SF. (Controle 14 dias > SF 14 dias, $p = 0,003$). Da mesma forma, o conteúdo de sialomucinas nos animais do sem colite após 14 dias de confinamento foi maior que o encontrado dos animais submetidos à aplicação de clisteres com MMX (Controle 14 dias > MMX 14 dias, $p = 0,003$). Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de sialomucinas verificou-se que nos animais sem colite induzida o conteúdo aumentou com o tempo de intervenção (Controle 14 dias > Controle 7 dias, $p < 0,05$). De modo semelhante, nos animais com colite submetidos à intervenção com SF o conteúdo de sialomucinas também aumentou significativamente após 14 dias de intervenção (SF 14 dias > SF 7 dias, $p < 0,05$). Nos animais

tratados com MMX o aumento no conteúdo de sialomucinas relacionado ao tempo de intervenção foi ainda mais evidente (MMX 14 dias > MMX 7 dias, $p < 0,05$).

Tabela 6 – Variação do conteúdo de sialomucinas em porcentagem por campo ao longo do tempo

	Conteúdo de sialomucinas (%/campo)	
	7 dias	14 dias
Controle	23,2±1,0	29,14±0,8*
SF	6,0±0,6	8,82±0,4*
MMX	9,43±0,5	19,1±0,8*

Teste de Kruskal-Wallis

5. DISCUSSÃO

Modelos experimentais de colite permitem avaliar a eficácia de diferentes opções terapêuticas medicamentosas potencialmente promissoras para o tratamento das DII (OSHIMA.; MIWA; JOH, 2008). A partir da quebra desses mecanismos de defesa o TNBS atua como um hapteno, unindo-se a moléculas de alto peso molecular como as proteínas teciduais. A migração do TNBS para o interior do epitélio cólico lesado deflagra uma resposta imunológica, responsável pelo processo inflamatório encontrado na mucosa e submucosa cólica. Este infiltrado inflamatório caracteriza-se pela presença de grande quantidade de polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. A resposta imune consequente à presença do TNBS é do tipo Th-1, onde ocorre uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (GOYAL, 2014). Portanto a discussão dos achados demonstrados anteriormente está apresentada a seguir.

Escore macroscópico de inflamação

Quando se avaliaram os valores de escore inflamatório macroscópico os animais sem colite, após 7 dias e 14 dias de confinamento, o valor do escore era idêntico para ambos aos períodos de tempo considerados. Esses dados mostram que os animais do grupo controle não apresentavam mudança no escore macroscópico ao longo do tempo de duração do experimento. A maioria dos animais apresentava pontos ocasionais de hiperemia na mucosa cólica ao longo do cólon. De modo semelhante apresentou o escore macroscópico de inflamação encontrado nos animais submetidos à indução da colite e irrigados com clisteres contendo SF por 7 e 14 dias, no momento da eutanásia, porém o valor foi estatisticamente diferente, sendo maior quando comparado com o controle. Esses resultados, corroboram com outros autores mostram que o escore macroscópico não apresentou redução significativa do cólon dos submetidos à intervenção com SF, e foi significativamente maior em relação aos animais sem colite (MORITA et al., 2004). O escore macroscópico de inflamação no cólon dos animais com colite e tratados com clisteres contendo MMX por 7 e 14 dias foi, no momento da eutanásia, de 4 e 3, respectivamente. Esses resultados mostram que animais tratados com MMX o escore inflamatório diminuiu com o passar do tempo, embora fosse sempre maior que

os dos animais sem colite e menor do que os animais tratados com SF. A análise destes resultados sugere que a intervenção com TNBS, em virtude do grave processo inflamatório e edema em que promove, talvez possa ser responsável aumento do escore de inflamação independente da substância de intervenção aplicada e do tempo, mas a aplicação de clisteres contendo MMX é capaz de melhorar o processo inflamatório mucoso. Esses achados corroboram com os que foram descritos anteriormente (MORRIS, 1989).

O radical 5-ASA presente na molécula da SSZ, também conhecido como mesalazina, apesar de não ser isento de efeitos colaterais, quando utilizado isoladamente mostrava-se o principal radical responsável pela ação anti-inflamatória e antioxidante nos portadores de DII, como apresentado pelos resultados aqui encontrados. O exato mecanismo de ação da mesalazina ainda não é totalmente conhecido, embora pareça que ela deva estar presente numa certa concentração no local da inflamação, onde sofre transformação em acetil 5-ASA. Esses efeitos mostraram-se relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas, redução no metabolismo do ácido aracdônico e inibição da quimiotaxia de células inflamatórias (PRAVDA, 2005).

Escore microscópico de inflamação

Quando se avaliou os valores de escore de inflamação do ponto de vista microscópico, verificou-se que nos animais sem colite, após 7 dias e 14 dias de confinamento, os valores eram semelhantes para ambos aos períodos de tempo considerados. Esses dados mostram que os animais sem indução de colite não apresentavam alterações microscópicas na mucosa cólica ao longo do tempo. Nos animais submetidos à indução da colite por TNBS que receberam clisteres contendo SF, por 7 e 14 dias, mostram que existe piora do grau de dano microscópico à mucosa cólica com o passar do tempo da intervenção. Por sua vez, o escore microscópico de inflamação nos animais tratados com MMX por 7 e 14 dias foi no momento da eutanásia mostram que a aplicação de clisteres com MMX reduziu o escore de inflamação em relação aos animais submetidos a intervenção com SF, embora continuasse maior quando comparado aos animais sem colite.

Quando se comparou de forma pareada, utilizando o teste de mediana, o escore microscópico de inflamação comparando animais sem colite com submetidos à irrigação com

SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente maiores (Controle < SF 7 dias, $p=0,007$). De modo semelhante, mas com um valor menor, quando se comparou os animais do grupo controle com os tratados com MMX por 7 dias o escore microscópico também era maior (Controle < MMX 7 dias, $p=0,007$). Esses resultados sugerem que a aplicação de clisteres com SF ou MMX, nos primeiros 7 dias de intervenção, não são capazes de diminuir as alterações microscópicas quando comparadas ao cólon normal. Contudo, quando se compara os animais submetidos à intervenção com MMX com os irrigados com SF verifica-se que a MMX apesar de diminuir o escore microscópico os resultados não mostraram significância ($p=0,25$). É possível que a redução do escore esteja relacionada aos efeitos anti-inflamatórios da MMX e que com uma amostra maior nos grupos experimentais esses resultados talvez pudessem tornar-se significantes.

Ao se comparar de forma pareada, utilizando o teste de mediana, o escore de graduação inflamatória avaliado por microscopia dos animais sem colite com os animais com colite induzida, submetidos à irrigação com SF por 14 dias, verificou-se que o escore inflamatório era maior nos animais tratados com SF. (Controle < SF 14 dias, $p=0,007$). Todavia quando se comparou, adotando teste de mediana, o escore microscópico nos animais sem colite com os tratados com MMX por 14 dias verificou-se que os tratados com MMX por 14 dias apresentavam graduação de escore semelhante que o encontrado dos animais sem colite (Controle 14 dias x MMX 14 dias, $p=0,40$). Quando se comparou os níveis de escore inflamatório microscópico entre os animais com colite submetidos à intervenção com SF ou MMX por 14 dias, o tratamento com MMX reduziu o escore ($p=0,02$). Esses achados mostram que a aplicação de clisteres com MMX por um maior período de tempo reduz os achados inflamatórios microscópicos nos animais com colite induzida.

Conteúdo tecidual de mucinas neutras

Quando se mensurou o conteúdo de mucinas neutras após 7 dias e 14 dias os animais sem colite aumentaram em aproximadamente 15% o conteúdo de mucinas neutras no epitélio cólico. Já o conteúdo de mucinas neutras encontrados nos animais com colite e submetidos à intervenção com clisteres contendo SF por 7 e 14 dias mostram que ocorre redução do conteúdo de mucinas neutras na mucosa cólica ao longo do tempo de 2,74%. De forma

semelhante, o conteúdo de mucinas neutras no cólon dos animais com colite e tratados com clisteres contendo MMX por 7 e 14 dias o conteúdo de mucinas neutras reduziu 0,32% ao longo do período de intervenção, o que não é estatisticamente significativa. A análise destes resultados sugere que na colite induzida por TNBS, em virtude do processo inflamatório grave, existe redução acentuada no conteúdo de mucinas neutras e que independente da substância de intervenção utilizada não houve melhora no conteúdo.

Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de mucinas neutras entre os animais sem colite e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores. De modo semelhante, mas com valor ainda menor, quando se comparou os animais do Grupo Controle com os tratados com MMX por 7 dias nos animais com colite, o conteúdo de mucinas neutras também foi menor. Esses resultados sugerem que a aplicação de clisteres com SF ou MMX, nos primeiros 7 dias de intervenção não preserva o conteúdo de mucinas neutras na mucosa cólica em relação epitélio sem colite. É possível que a gravidade do processo inflamatório além de destruir a população de células componentes do epitélio cólico, entre elas as células caliciformes, associada a maior extrusão do muco para o interior do lume do cólon, como tentativa de proteção epitelial estejam relacionadas à redução do conteúdo. Estudos que avaliaram o conteúdo tecidual em modelos de colite de exclusão mostraram que existe redução no conteúdo de mucinas neutras quando se comparam os cólons com e sem colite, semelhante aos resultados deste estudo (MARTINEZ, 2015). Dois estudos avaliaram a colite de exclusão tratada ou não tratada com a aplicação de clisteres com curcumina e sucralfato no conteúdo de mucinas neutras comparando cólon segmentos cólicos sem colite e os com colite tratados com as substâncias (MARTINEZ, 2015). Os resultados mostraram que ambas as substâncias aumentam o conteúdo de mucinas, porém a valores inferiores aos do cólon sem colite. Cabe destacar, que no presente estudo a aplicação de MMX não foi capaz de reproduzir esse efeito, provavelmente pelo fato de que o modelo de experimental de colite induzida por TNBS provoca uma inflamação muito mais grave que o modelo de colite de exclusão.

Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de mucinas neutras nos animais sem colite pós 14 dias de confinamento com os tratados com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de mucinas neutras era menor nos animais tratados com SF. Estudo avaliando em

modelos de colite do cólon exclusivo, mostrou que a redução do conteúdo de mucinas neutras mantém-se menor, quando comparado com o cólon sem colite, com o passar do tempo (MARTINEZ, 2015). Quando se comparou o conteúdo de mucinas neutras nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os tratados com MMX por 14 dias verificou-se que os animais submetidos à intervenção com MMX também, cursaram com conteúdo menor que o encontrado dos animais sem colite. Esses achados mostram que a aplicação de clisteres com MMX mesmo por 14 dias não foi capaz de recuperar o conteúdo de mucinas neutras até mesmo quando comparada aos animais submetidos à intervenção com SF Controle 14 dias.

Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de mucinas neutras verificou-se que nos animais do Grupo Controle ocorria aumento do conteúdo com o passar do tempo de intervenção. De modo distinto, nos animais tratados com SF e com MMX, o conteúdo de mucinas neutras não apresentou variação após 14 dias de intervenção. Esses resultados mostram que independente da solução de intervenção utilizada, nos animais com colite não existe variação do conteúdo de mucinas neutras na mucosa cólica confirmando a intensa depleção neste tipo de mucina decorrente da grave colite induzida por TNBS.

Conteúdo tecidual de mucinas ácidas totais

Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de mucinas ácidas entre os animais do grupo controle e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores, da mesma forma que MMX por 7 dias. Esses resultados mostram que nos animais com colite, independente da solução utilizada nos primeiros 7 dias de intervenção o conteúdo de mucinas ácidas na mucosa cólica é semelhante.

Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de mucinas ácidas nos animais do grupo controle após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF pelo mesmo período verificou-se uma diminuição significativa. Da mesma forma ocorreu com o conteúdo de mucinas ácidas nos animais submetidos à aplicação de clisteres com MMX quando comparadas com o controle. Ao comparar-se animais com colite submetidos a intervenção com SF ou MMX verificou-se que a aplicação de clisteres com MMX não altera o conteúdo de mucinas ácidas.

Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de mucinas ácidas verificou-se que nos animais do grupo controle o conteúdo não se modificou com o tempo de intervenção. De modo distinto, nos animais com colite submetidos à intervenção com SF o conteúdo de mucinas ácidas reduziu significativamente após 14 dias de intervenção. Nos animais tratados com MMX não houve variação no conteúdo de mucinas ácidas relacionado ao tempo de intervenção. Esses resultados mostram que a intervenção com MMX por 14 dias mantém o conteúdo de mucinas ácidas na mucosa cólica. Resultados semelhantes foram obtidos por autores que avaliaram outras drogas anti-inflamatórias em modelos de colite de cólon excluso (GOYAL et al., 2014).

Poucos estudos avaliaram o conteúdo de mucinas ácidas em modelos experimentais de colite induzida por TNBS submetidos ao tratamento com substâncias químicas, óleos ou extratos vegetais. Esses estudos mostram que substâncias que apresentam ação anti-inflamatória aumentam a produção de mucinas, particularmente de mucinas ácida (GOYAL et al., 2014).

Conteúdo tecidual de sulfomucinas

A partir das alterações do conteúdo de mucinas ácidas totais houve-se a necessidade de estudá-las separadamente. Quando se comparou de forma pareada, o conteúdo de sulfomucinas entre os animais sem colite e os tratados com SF por 7 dias verificou-se que os animais com colite apresentavam valores significativamente menores. De modo semelhante, quando se comparou os animais sem colite com os tratados com MMX por 7 dias nos animais com colite o conteúdo de sulfomucinas também diminuiu. Esses resultados sugerem que independente da solução utilizada, nos primeiros 7 dias de intervenção ocorre redução o conteúdo de sulfomucinas na mucosa cólica nos animais com colite em relação aos animais saudáveis.

Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de sulfomucinas nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de sulfomucinas era menor nos animais tratados com SF. Da mesma forma, o conteúdo de sulfomucinas nos animais do grupo controle após 14 dias de confinamento era maior que o encontrado dos animais submetidos à aplicação de clisteres com

MMX. Esses achados mostram que a aplicação de clisteres com SF ou MMX não é capaz de aumentar o conteúdo de sulfomucinas quando comparado aos animais sem colite. Contudo, cabe destacar que ao compararem-se os animais com colite após 14 dias de intervenção submetidos à intervenção com SF ou MMX verificou-se que o tratamento com a MMX aumenta o conteúdo de sulfomucinas. Esses mesmos achados já foram descritos anteriormente em modelos de colite de desuso em animais tratados com sucralfato substância com propriedades anti-inflamatória e antioxidante, semelhantes as da mesalazina. Em outro estudo avaliando o conteúdo de sulfomucinas em animais tratados com clisteres contendo curcumina em diferentes concentrações verificou que embora o conteúdo tecidual de sulfomucinas aumentasse com o emprego se concentrações mais elevadas ela não foi suficiente para aumentar o conteúdo quando comparada a animais submetidos a clisteres com SF (GOYAL et al., 2014). Nenhum estudo mensurou especificamente o conteúdo tecidual de sulfomucinas em animais submetidos à colite induzida por TNBS. Todavia, já se demonstrou que existe redução do conteúdo tecidual de mucinas em animais com colite induzida por TNBS. Demonstrou-se que o uso de extratos vegetais, com atividade anti-inflamatória e antioxidante, pode aumentar o conteúdo tecidual de mucinas por aumentarem a expressão de genes relacionados à síntese das frações proteicas de sua molécula (GOYAL et al., 2014).

Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de sulfomucinas verificou-se que nos animais sem colite o conteúdo aumentou com o tempo de intervenção. De modo diferente, nos animais com colite submetidos à intervenção com SF o conteúdo de sulfomucinas não se alterou após 14 dias de intervenção. Nos animais tratados com MMX a semelhança com o que ocorreu nos animais saudáveis houve aumento no conteúdo de sulfomucinas relacionado ao tempo de intervenção. Esses resultados mostram que a intervenção com MMX por 14 dias aumenta o conteúdo de sulfomucinas na mucosa cólica.

Conteúdo tecidual de sialomucinas

Ao se comparar de forma pareada, o conteúdo tecidual de sialomucinas nos animais sem colite após 14 dias de confinamento com os submetidos à intervenção com SF por 14 dias verificou-se que o conteúdo de sialomucinas era menor nos animais tratados com SF. Da mesma forma, o conteúdo de sialomucinas nos animais do sem colite após 14 dias de

confinamento foi maior que o encontrado dos animais submetidos à aplicação de clisteres com MMX. Esses achados mostram que a aplicação de clisteres com MMX não é capaz de aumentar o conteúdo de sialomucinas quando comparado aos animais sem colite. Contudo, cabe destacar que, ao compararem-se os animais com colite após 7 ou 14 dias de intervenção submetidos à intervenção com SF ou MMX verificou-se que houve aumento no conteúdo tecidual de sialomucinas nos animais tratados com MMX. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente em modelos de colite de desuso em animais tratados com sucralfato, curcumina substâncias com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes semelhantes as da mesalazina(CAMPOS et al., 1997). Cabe destacar que a MMX foi capaz de aumentar o conteúdo de sialomucinas, geralmente o subtipo de mucina ácida que sofre a maior redução em modelos experimentais de colite(BOLTIN et al., 2013).

Quando se avaliou a interferência do tempo no conteúdo tecidual de sialomucinas verificou-se que nos animais sem colite induzida o conteúdo aumentou com o tempo de intervenção. De modo semelhante, nos animais com colite submetidos à intervenção com SF o conteúdo de sialomucinas também aumentou significativamente após 14 dias de intervenção. Nos animais tratados com MMX o aumento no conteúdo de sialomucinas relacionado ao tempo de intervenção foi ainda mais evidente. Esses resultados mostram que nos animais com colite induzida à intervenção com MMX por 14 dias aumenta o conteúdo de sialomucinas na mucosa cólica.

Quando se analisa em conjunto todos os dados obtidos no presente estudo, é possível constatar que em todos os animais onde a colite foi induzida pelo TNBS, o processo inflamatório, analisado por variáveis clínicas, macroscópicas, microscópicas ou bioquímicas, foi sempre mais intenso quando comparado aos animais onde a colite não foi induzida. Da mesma forma, quando se analisa a expressão tecidual dos vários tipos e subtipos de mucinas, primeiro mecanismo de defesa do epitélio cólico verifica-se redução nos animais onde a colite foi induzida, independentemente do tipo ou subtipo de mucina analisada. Assim sendo, é possível concluir que a exposição da mucosa cólica ao hapteno além de romper a camada de muco, primeira linha de defesa constituintes da barreira epitelial cólica, induz a formação de processo inflamatório intenso, independentemente do tempo do experimento. Esses achados parecem confirmar a eficácia do modelo experimental de colite por TNBS para o estudo experimental de

possíveis agentes terapêuticos, não obstante a gravidade da inflamação que a substância provoca.

Quando se analisam os resultados obtidos comparando os diferentes parâmetros analisados, exclusivamente nos animais submetidos a indução de colite com TNBS e submetidos a intervenção ou com SF (controle +) o MMX, verifica-se que a MMX melhora o processo inflamatório analisado por variáveis clínicas, macroscópicas, microscópicas ou bioquímicas. Nos animais tratados com MMX o processo inflamatório foi sempre menor quando comparado aos animais submetidos a intervenção com SF. Da mesma forma, quando se analisou a expressão tecidual das mucinas, comparando os animais submetidos a intervenção com SF o MMX verificou-se que o conteúdo total de mucinas neutras e ácidas não se modificou. Todavia, quando se avaliou os subtipos de mucinas ácidas (sulfomucinas e sialomucinas) o conteúdo de ambos os subtipos foi maior nos animais tratados com MMX por 14 semanas. É provável que esses achados estejam relacionados com a melhora do processo inflamatório e com a tentativa de restabelecimento da camada de muco ao longo da glândula cólica que, aos poucos, vai se regenerando.

Todos esses resultados analisados conjuntamente permitem concluir que a aplicação de enemas contendo mesalazina revestida com a tecnologia MMX é eficaz na redução do processo inflamatório cólico e recuperação da integridade epitelial em modelo experimental de colite induzida por TNBS. Da mesma forma a aplicação de clisteres com MMX aumenta a produção tecidual de sulfomucinas e sialomucinas, glicoproteínas constituintes da primeira linha de defesa do epitélio cólico representada pela camada de muco. Esse achado sugere que a MMX é capaz de aumentar a proteção dada pela camada de muco pela maior produção de dois subtipos de mucinas ácidas que se alteram nas colites. Apesar de todas essas evidências experimentais, novos estudos utilizando a droga em seres humanos e com maior número de casos ainda são necessários para validar esses resultados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste modelo experimental de colite induzida por TNBS permitem concluir que:

A aplicação do TNBS é um bom protocolo para a indução de colite *in vivo*;

A aplicação de clisteres contendo mesalazina revestida com etilcelulose (MMX) é eficaz na melhora do processo inflamatório da mucosa cólica;

A aplicação diária de clisteres com MMX aumenta o conteúdo tecidual de sulfomucinas e sialomucinas constituintes da barreira de muco que recobre o epitélio cólico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULSALAM, A.H.; NADAL-MELSIO, E.; NARESH, K.N. Complementarity of evaluation of myeloperoxidase expression by flow cytometry and immunohistochemistry on bone marrow trephine biopsy sections in acute myeloid leukemia. **Cytometry B ClinCytom**. 2014;86(1):70-3.
- ARAFI, H.M.; HEMEIDA, R.A.; EL-BAHRAWY, A.I.; HAMADA, F.M. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. **Food Chem Toxicol**. 2009;47(6):1311-7.
- ASLAM, A.; SPICER, R.D.; CORFIELD, A.P. **Biochem Soc Trans**, v. 25, n.1, p.347, 1997.
- AZAD KHAN, A.K.; PIRIS, J.; TRUELOVE, S.C. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. **Lancet**. 1977;2(8044):892-5.
- BATTA, A.K.; TINT, G.S.; XU, G.; SHEFER, S.; SALEN, G. Synthesis and intestinal metabolism of ursodeoxycholic acid conjugate with an antiinflammatory agent, 5-aminosalicylic acid. **J Lipid Res**. 1998;39(8):1641-6.
- BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol**, v.268, p. G622–630, 1995.
- BOLTIN, D; PERETS, T.T; VILKIN, A; et al. Mucin function in inflammatory bowel disease: an update. **J ClinGastroenterol**, v. 47, n. 2, p.106-11, 2013.
- CAMPIERI, M; GIONCHETTI, P; BELLUZZI, A; BRIGNOLA, C; TAMPIERI, M; IANNONE, P; MIGLIOLI, M; BARBARA, L. Optimum dosage of 5-aminosalicylic acid as rectal enemas in patients with active ulcerative colitis. **Gut**. 1991;32:929–81
- CAMPOS, FG; WAITZBERG, DL; LOGULO, AF; CUKIER, C; SOARES, SR; OLIVEIRA, TS; TORRINHAS, RS; PLOPPER, C; TERRA, M; LOTIERZO, PH; HABR-GAMA, A. Technical and histological standardization of experimental colitis with trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**. 1997;52(4):180-6.)
- 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**.1990;31;184-6.
- DOHI, T; FUJIHASHI, K; RENNERT, P.D; IWATANI, K; KIYONO, H; MCGHEE, J.R. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses.**JExp Med**, v. 189, n. 8, p. 1169-80, 1999.
- FARRELL, RF; PEPPERCORN, MA. Ulcerative colitis. **Lancet**. 2002; 359(9303):331-40.

FILIPE, MI. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. **Br J Cancer**. 1975 Jul;32(1):60-77.

FILIPE, MI; FENGER, C. Histochemical characteristics of mucins in the small intestine. A comparative study of normal mucosa, benign epithelial tumours and carcinoma. **J Clin Pathol**. 1972;25(2):123-8.

FILIPE, MI; SANDEY, A; MA, J. Intestinal mucin antigens in ulcerative colitis and their relationship with malignancy. **Hum Pathol**. 1988;19(6):671-81.

FILIPE, MI. Mucins and gastrointestinal malignancy. A new approach to the interpretation of biopsies. **Acta Med Port**. 1979;1(3):351-65.

FILIPE, M.I., Value of histochemical reactions for muco substances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. **Gut**, v. 10, n. 7, p. 577-586, 1969.

GAUDIER, E; JARRY, A; BLOTTIÈRE, HM; DE COPPET, P; BUISINE, MP; AUBERT, JP; LABOISSE, C; CHERBUT, C; HOEBLER, C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2004;287(6):1168-74.

GAUDIER, E; HOEBLER, C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. **Gastroenterol Clin Biol**. 2006;30(8-9):965-74.

GOLD, D.V.; SHOCHAT, D.; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **J Biol Chem**. 1981 25;256(12):6354-8.

GOLDMAN, H.; MING, S.C. Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. **Arch Pathol**. 1968;85(6):580-6.

GOYAL, N.; RANNA, A.; AHLAWAT, A.; et al. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. **Inflammopharmacol**, v.22, n.4, p. 219-223, 2014.

HAAGEN NIELSEN, O.; BONDESEN, S. Kinetics of 5-aminosalicylic acid after jejunal instillation in man. **Br J Clin Pharmacol**. 1983;16(6):738-40.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008.

HAYASHI, Y.; AOYAGI, K.; MORITA, I.; YAMAMOTO, C.; SAKISAKA, S. Oral administration of mesalazine protect against mucosa injury and permeation in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Scand J Gastroenterol**. 2009;44(11):1323-31.

JANKOWSKI, J.A.; BEDFORD, F.K.; KIM, Y.S. Changes in gene structure and regulation of E-Cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 57, p. 187-215, 1997.

L.C. JUNQUEIRA; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^aed. – Rio de Janeiro – Guanabara Koogan, 2013

JURJUS, A.R.; KHOURY, N.N.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 50, n. 2, p. 81-92, 2004

KADRI, C.J.; PEREIRA, J.A.; DA SILVA, et al. E-cadherin expression in colonic mucosa with and without fecal stream. **J Invest Surg**, v. 26, n. 2, p. 72-9, 2013.

KADRI, C.J.; PEREIRA, J.A.; CAMPOS, F.G.; et al. Anti-inflammatory effects of enemas containing an oily extract of curcumin in an experimental model of diversion colitis. **Histol Histopathol**, v.32, n.2, p.161-169, 2017.

KELI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT F.; OHRANT T.; CUGNENC, P.H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum**. 1997;40(2):222-8.

KENJI, T.; YOSHITAKA, A.; TOSHIHARU, A.; TAKATOSHI, M.; TOSHITAKA, N. Comparative Absorption of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) after administration of a 5-ASA enema and salazosulfapyridine (SASP) after an SASP suppository in Japanese volunteers. **Biol Pharm Bull**.2002;25;264-7.

LAPERTOSA, G.; BARACCHINI, P.; ABBAS, S.; et al. Tissue evaluation of epithelial and functional markers of cell differentiation and mucins in colonic malignancy: assessment of diagnostic and prognostic value. **Pathologica**, v. 80, n. 1066, p. 145-157, 1988.

LEV, R.; SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low Ph. **J Histochem Cytochem**. 1964;12:309

MARTINEZ, C.A.; DE CAMPOS. F.G.; DE CARVALHO, V.R.; et al. Claudin-3 and occludin tissue content in the glands of colonic mucosa with and without a fecal stream. **J Mol Histol**, v. 46, n. 2, p. 183-194, 2015.

MARTINEZ, C.A.; KADRI, C.J.; KANNO, D.T.; et al. Claudin-3 and occludin content in the glands of colonic mucosa devoid from fecal stream submitted to topical intervention with oil extract of *Curcuma longa*. **Acta Cir Bras**, v.32, n.1, p. 65-73, 2017.

MARTINEZ, C.A.R.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; SILVA, C.M.G.; KANNO, D.T.; MENDONÇA, R.L.S; PEREIRA, J.A. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the sucralfate in diversion colitis. **J. Coloproctol. (Rio J.)** v. 35, n. 2, p. 90-99, 2015.

MCKENZIE, S.M.; DOE, W.F.; BUFFINTON, G.D. 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells. **Gut**. 1999;44(2):180-5.

- MELLO, R. DE O.; SILVA, C.M.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **RevColBras Cir.** 2012;39(2):139-45
- MIMURA, T.; KURAMOTO, S.; YAMASAKI, K.; KAMINISHI, M.; MIMURA, M. Familial adenomatous polyposis: a case report and histologic mucin study. **J ClinGastroenterol.** 1999;28(4):372-6.
- MORITA, T.; TANABE, H.; SUGIYAMA, K.; et al. Dietary resistant starch alters the characteristics of colonic mucosa and exerts a protective effect on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **BiosciBiotechnolBiochem**, v.68, n.10. p, 2155-64, 2004.
- MORRIS, G.P.; BECH, P.L.; HERRIDGE, M.S.; SZEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology.** 1989;96:795-803.
- MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE, M.S.; et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, p. 795-803, 1989.
- MOSHKOVSKA, T.; MAYBERRY, J.F. Duration of treatment with 5-aminosalicylic acid compounds. **World J Gastroenterol.** 2007; 3(32)4310-5.
- OGATA, S.; UEHARA, H.; CHEN, A.; ITZKOWITZ, S.H. Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. **Cancer Res.** 1992;52(21):5971-8.
- OSHIMA, T.; MIWA, H.; JOH, T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. **J GastroenterolHepatol**, v. 23, p. S146-S150, 2008.
- PFEIFFER, C.J.; QIU, B.; LAM, S.K. Reduction of colonic mucus by repeated short-term stress enhances experimental colitis. **J Physiol Paris.** 2001;95(1-6):81-7.
- PIZARRO, T.T.; ARSENEAU, K.O.; BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Mouse models for the study of Crohn's disease. **Trends Mol Med.** 2003;9(5):218-22.
- PORCHET, N.; BUISINE, M.P.; DESSEYN, J.L.; MONIAUX, N.; NOLLET, S.; DEGAND, P.; PIGNY, P.; VAN SEUNINGEN, I.; LAINE, A.; AUBERT, J.P. Muc genes: a superfamily of genes? Towards a functional classification of human apomucins. **J Soc Biol.** 1999;193(1):85-99.
- PRAVDA, J. Radical Induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v.11, p. 2371-2384, 2005.
- RILEY, S.A. What dose of 5-aminosalicylic acid (mesalazine) in ulcerative colitis? **Gut.** 1998;42(6):761-3.
- SAKATA, T.; VON ENGELHARDT, W. Influence of short-chain fatty acids and osmolality on mucin release in the rat colon. **Cell Tissue Res.** 1981;219(2):371-7.

SONG, M.; XIA, B.; LI, J. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats. **Postgraduat Med J.** 2006;82(964):130-5.

SPICER, S.S.; LEPPI, T.J.; STOWARD, P.J. Suggestions for a histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. **J HistochemCytochem.** 1965;13(7):599-603.

UCHIDA, K.; KADO, S.; ANDO, M.; NAGATA, Y.; TAKAGI, A.; ONOUE, M. A mucinous histochemical study on malignancy of aberrant crypt foci (ACF) in rat colon. **J Vet Med Sci.** 2001;63(2):145-9.

VICTORIA, C.R.; SASSAK, L.Y.; NUNES, H.R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases in Midwestern of São Paulo State, Brazil. **ArqGastroenterol**, v.46, n.1, p. 20-25, 2009

WEISS, A.A.; BABYATSKY, M.W.; OGATA, S., CHEN, A.; ITZKOWITZ, S.H. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. **J HistochemCytochem.** 1996;44(10):1161-6.

YU, D.K.; MORRILL, B.; EICHMEIER, L.S.; et al. Pharmacokinetics of 5-aminosalicylic acid from controlled-release capsules in man. **Eur J ClinPharmacol**, v.48, n.3-4, p. 273-7, 1995.

ZINGARELLI, B.; SZABÓ C.; SALZMAN, A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut.** 1999;45(2):199-209.

8. ANEXO

Anexo I: Paracer do Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos terapêuticos da aplicação de Clísteres com Mesalazina na Colite de Desuso. Estudo Experimental em Ratos", protocolo nº 002.03.2017 – versão III sob responsabilidade do pesquisador Dr. Carlos Augusto Real Martinez que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional e Controle a Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética o Uso de Animais (CEUA da Universidade São Francisco – USF), em reunião do dia **31/08/2017**.

Protocolo: 002.03.2017 – versão III

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/09/2017- 30/12/2018

Número e Animais: 24 ratos Machos

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem Wistar

Peso: 200-300g

Total de Animais: 24 ratos heterogênicos

Procedência do Animal: Laboratório – ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio, Laboratórios Veterinários



Mário Angelo Claudino

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco