

# **AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DE PARAMETROS INFLAMATÓRIOS AGUDOS NO MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE CROHN.**

*Adriano Bezerra Sales (Orientando ICV - Iniciação Científica Voluntária/UFPI), Francisco das Chagas Vieira Júnior (Orientando ICV - Iniciação Científica Voluntária/UFPI), André Luiz dos Reis Barbosa (Orientador, dep. de Fisioterapia – CMRV/UFPI)*

## **INTRODUÇÃO**

### **DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII).**

Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma terminologia aplicada para um grupo de doenças inflamatórias agudas ou crônicas recorrente no trato gastrointestinal (BAUDITZ et al., 2002). A doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (RU) são as formas mais comuns das doenças inflamatórias intestinais (DII), que se caracterizam por inflamação crônica do intestino, de etiologia ainda não esclarecida. Sugere-se que as DII decorram de anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrointestinal a uma microflora normal não patogênica, porém a patogênese permanece desconhecida (MATSUMOTO et al., 2001).

Sabendo que as (DII) como Doença de Crohn podem envolver eventos inflamatórios agudos e crônicos em diferentes localizações do trato gastrointestinal, e sendo essas patologias de difícil diagnóstico e de etiologia desconhecida, além de estudos na literatura mostrarem que a Doença de Crohn pode levar a diminuição da resposta inflamatória aguda (Marks et al., 2006), propôs-se as seguintes hipóteses: Doença de Crohn diminui a resposta inflamatória aguda em modelos por diminuir o recrutamento de neutrófilos, produção de citocinas pro-inflamatórias e diminuir processos de hiperálgicos induzidos por PGE<sub>2</sub> e carragenina na pata de animais.

## **OBJETIVO**

O trabalho objetiva avaliar se o desenvolvimento experimental da doença de Crohn induzida por TNBS altera alguns processos inflamatórios agudos em ratos, tais como a dor, edema, mediadores pró – inflamatórios e anti – inflamatórios (citocinas), ressaltando a participação do mediador gasoso óxido nítrico (NO) nesse processo.

## **METODOLOGIA**

Utilizaram-se ratos Wistar, machos, pesando 180 - 220 gramas. Esses animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum*. Eles foram colocados em jejum, 18h e 24h antes, em todos os experimentos, mas com livre acesso à água. Foi trabalhado com três grupos experimentais compostos por: Grupo salina (controle); TNBS 20 mg; Álcool a 50 %. E três dias após administração das substâncias supra citadas os protocolos experimentais sugeridos foram executados.

## **PROTOCOLOS**

*1 - Modelo de doença de Crohn induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos.*

As colites foram induzidas pela administração de TNBS ( 20 mg diluídas em álcool a 50%, num volume de 0,8 ml) ou álcool 50% por via retal. O grupo controle recebeu apenas salina. Identificou-se o reto e cólon, e foi isolado uma extensão de 5 cm para avaliação macroscópica.

2 – *Efeito da colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) sobre o edema de pata induzido por Carragenina (Cg 500µg/pata).*

O volume da pata traseira foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo (Cg;500µg/pata), usando o pletismômetro (UGO BASILI).

3 - *AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DAS COLITES INDUZIDA POR TNBS PARTICIPAÇÃO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA DIMINUIÇÃO DA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA (500µG/PATA).*

Decorridos três dias após a indução da colite, foi avaliado a intensidade de hipernocicepção induzida por carragenina das patas dos animais pelo aparelho Von Frey (Insight). O L- NAME (90mg/kg) foi administrado intraperitonealmente (i.p) 1 hora da administração da carragenina e a L-arginina (200mg/kg) foi administrada (i.p) 10 minutos antes da administração do L-NAME.

4 - *AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DAS COLITES INDUZIDA POR TNBS PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO ATP DEPENDENTES (K<sub>ATP</sub>) NA DIMINUIÇÃO DA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA (500µG/PATA).*

Decorridos três dias após a indução da colite, foi avaliado a intensidade de hipernocicepção induzida por carragenina nas patas dos animais pelo aparelho Von Frey (Insight). A Glibenclamida (160µg/pata; 50µl) foi administrada 30 minutos antes da Carragenina na pata direita de animais com ou sem colite. O Diazóxido (600µg/pata ) foi administrado antes da administração da Glibenclamida.

5 - *DOSAGEM DE TNF- α, IL-1β E IL-10.*

Fragmentos das peles das patas onde se induziu o edema de pata por carragenina foram retirados rapidamente para dosagem de TNF- α, IL-1β e IL-10. A dosagem das citocinas será medida por espectrofotometria à 490 nm de absorbância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observamos em nossos experimentos uma diminuição do edema de pata induzido pela Carragenina (500µg/pata; 100µl) nos grupos TNBS, quando comparamos esse grupo com o grupo controle e essa diminuição foi em todos os tempos estudados. Nos grupos de animais onde foi induzida a colite (TNBS) houve um aumento significativo do peso tecidual por centímetro de lesão, além um aumento significativo do limiar da dor em relação ao grupo controle. Estes resultados nos levaram à verificar a participação da via do óxido nítrico (NO) e dos canais de potássio ATP dependentes (K<sub>ATP</sub>) na diminuição da hiperalgesia induzida por Carragenina ( 500µg/pata ). Na via do NO verificamos que com a administração do L-NAME ocorreu uma reversão do potencial antinociceptivo da colite e com a administração da L- Arg a antinocicepção foi restabelecida. Nos canais K<sub>ATP</sub>, quando se usou um bloqueador específico destes canais (glibenclamida) observou-se um aumento da hipernocicepção e posteriormente quando se utilizou um ativador destes mesmos canais (diazóxido) o resultado foi revertido. Na avaliação da dosagem de citocinas, observamos um aumento significativo da IL-10 no

grupo TNBS. Nas dosagens das citocinas TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , não houve diferenças significantes entre os grupos.

### CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados podemos inferir que as substâncias utilizadas para induzir a colite foram eficientes, pois essas substâncias foram capazes de causar aumento de peso tecidual e infiltrado neutrofilico quando comparamos os grupos com colite e o grupo sem colite (controle). A diminuição da dor parece ser modulada pela via NO/cGMP/K<sup>+</sup>ATP. O aumento significativo da IL-10 no grupo TNBS, condiz com a hipótese da diminuição da resposta inflamatória aguda em modelos de colite, por ser uma citocina anti - inflamatória. Até o presente momento, estes resultados confirmam a hipótese de que a colite experimental induzida por TNBS diminui parâmetros inflamatórios agudos.

**Palavras Chave: Colite. Dor. inflamação.**

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO, G. A. C.; SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; VALE, M. L.; LOTUFO, C. M. C.; FERREIRA, S. H.; RIBEIRO, R. A.. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginineNO/cGMP/PKG/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 24, pp. 1175–1181, 2006
3. KORNBLUTH, A. Cyclosporine in inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 1(6):486-90, 1999.
4. KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 87(6):1344-50, 1984
5. MAGALHÃES, A.F.N. Doença de Crohn (CH). In: *Gastroenterologia Clínica.* Dani R, Castro L de P. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.765-76, 1993.
6. MARKS, D.J.B.; MIYAGI, K; RAHMA, F.Z.; NOVELLI, M; BLOOM, S.L.; SEGAL, A.W.. Inflammatory Bowel Disease in CGD Reproduces the Clinicopathological Features of Crohn ' s Disease. *The American Journal Of Gastroenterology.* 2009 Jan;104(1):117-24
7. MUELLER, C. Tumour necrosis factor in mouse models of chronic intestinal inflammation. *Immunology.* 105(1):1-8, 2002.
8. PEAKMAN, M.; VERGANI, D. Terapias de Base Imunológica. *Imunologia básica e clínica.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p.292-303, 1999
9. SECCO, D.D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA S.H.; FERREIRA. S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide,* 9(3):153-64, 2003
10. SCHMIDTKO, A.; GAO, W.; KO" NIG, P.; HEINE, S.; MOTTERLINI, R.; RUTH, P.; SCHLOSSMANN, J.; KOESLING, D.; NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; FRIEBE, A.; and GEISSLINGER, G. cGMP Produced by NO-Sensitive Guanylyl CyclaseEssentially Contributes to Inflammatory and Neuropathic Pain by Using Targets Different from cGMP-Dependent Protein Kinase I. *The Journal of Neuroscience,* August 20, 2008 • 28(34):8568–8576.