

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TNBS: PAPEL DOS ENDOCANABINÓIDES ENDÓGENOS.

Adriano Bezerra Sales (Orientando PIBIC /UFPI), André Luiz dos Reis Barbosa (Orientador dep. de Fisioterapia – CMRV/UFPI)

INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem duas desordens crônicas do intestino: Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCUI). Varias evidências sugerem que essas patologias surgem através de um defeito na resposta inflamatória local e a uma forte susceptibilidade genética por partes dos pacientes que contraem essas doenças (ABRAHAM et al., 2009). Vários estudos confirmaram a hipótese de que a DC leva a uma diminuição de componentes relacionados com o processo inflamatório agudo (HARBORD, 2006; STROBER et al., 2002)

METODOLOGIA

Foram utilizados ratos wistar com massa de 180 a 200 gramas provenientes do Biotério da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estão de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e o projeto foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da dor da Universidade Federal do Piauí com apoio do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer da Universidade Federal do Ceará.

PROTÓCOLOS

1 PREPARAÇÃO DO CÓLON E INDUÇÃO DAS COLITES

As colites foram induzidas pela administração de TNBS (20%, 20 mg diluídas em álcool a 50%, num volume de 0,8 ml), que simula experimentalmente a doença de Crohn, ou etanol (50%, num volume de 0,4 ml), via transanal. O grupo controle receberá apenas salina (0,9%, num volume de 0,4 ml). Para a indução das colites ou não, os animais foram previamente anestesiados e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, um catéter de polietileno nº 6 até 8 cm da margem anal para a injeção das soluções. O animal permaneceu suspenso pela cauda, de cabeça pra baixo, por 30 segundos para evitar o retorno da solução.

2 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA OU DEXTRAN

Esses experimentos foram realizados 3 ou 14 dias após a indução das colites. A carragenina (500 µg/pata, 100µl) ou dextran (500 µg/pata, 100µl) foram administrados intraplantarmente (ipl.). O volume da pata traseira direita de cada rato foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero).. O volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina ou 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 hrs após a injeção do dextran, usando o mesmo

pletismômetro. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA COLITE INDUZIDA POR TNBS

As atividades antinociceptivas das colites foram avaliadas 3 e 4 hrs após a injeção intraplantar de carragenina (500µg/pata; 100 µl) ou PGE2 (400ng/pata; 50µl) nas patas direitas de animais com ou sem colite através da medida da força em gramas (g), aplicada por meio de um analgesímetro digital (Insight®). Todas essas drogas foram diluídas em solução salina a 0,9%. A hipernocicepção mecânica plantar foi avaliada antes (tempo zero) e 3 ou 4 hrs após a injeção das drogas (Carragenina ou PGE2).

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA COLITE INDUZIDA POR TNBS – PARTICIPAÇÃO DA VIA DOS ENDOCANABINÓIDES

A participação da via endocanabinoide foi realizada através do pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos dos receptores CB1 e CB2, respectivamente, AM251 (80 µg/pata; 50 µl) e AM630 (25 µg/pata; 50 µl), 30 minutos antes da administração da carragenina ou PGE2. AM251 e AM630 foram diluídos em uma solução de DMSO a 4% em solução salina a 0,9%.

5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA COLITE INDUZIDA POR TNBS – PARTICIPAÇÃO DA VIA OPIÓIDE

Três dias após a indução ou não das colites, as atividades antinociceptivas das mesmas foram avaliadas 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (500µg/pata; 100 µl) nas patas direitas de animais com ou sem colite através da medida da força em gramas (g), aplicada por meio de um analgesímetro digital (Insight). Naloxona (1,0µg/pata, 50µl). Todas essas drogas foram diluídas em solução salina a 0,9%. Essa droga, que é uma bloqueadora inespecífica dos receptores opióides, foi administrada 30min antes da administração de carragenina.

6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA COLITE INDUZIDA POR TNBS – PARTICIPAÇÃO DA VIA DO OXIDO NÍTRICO

Três dias após a indução ou não das colites, as atividades antinociceptivas das mesmas foram avaliadas 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (500µg/pata; 100 µl) nas patas direitas de animais com ou sem colite através da medida da força em gramas (g), aplicada por meio de um analgesímetro digital (Insight). LNoarg (100µg/pata; 100 µl), que é um anatagonista da enzima oxido nítrico sintetase neuronal, foi administrado subcutâneamente na região plantar das patas direitas de ratos 1 hora antes da administração da carragenina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No terceiro dia após a indução das colites, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) do edema de pata induzido por carragenina ou dextran em animais com colite induzida por TNBS. Essa inibição pode ser vista em todos os tempos em estudo após a injeção subplantar de carragenina ou dextran. Quatorze dias após indução das colites, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do edema de pata induzido por carragenina em animais com colite induzida por TNBS quando comparados com os outros grupos em estudo na 1ª, 3ª e 4ª horas após a injeção de carragenina. Observou-se que o pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores canabinóides, CB1 e CB2, respectivamente, AM251 e AM630, reverteu de forma significativa ($p < 0,05$) a antinocicepção da colite experimental induzida por TNBS tanto na hipernocicepção induzida por carragenina quanto por PGE2 quando comparado esse grupo de animais com o grupo etanol (EtOH) e o grupo salina. A reversão da antinocicepção da colite por TNBS foi observado em todos os tempos em estudo. A administração dos antagonistas canabinóides em animais sem colite não exerceu nenhum efeito sobre a hipernocicepção da carragenina ou da PGE2. Verificamos que a administração intraplantar do antagonista opióide, naloxona, reverteu significativamente ($p < 0,05$) a antinocicepção mediada pela colite experimental induzida por TNBS na hipernocicepção induzida por carragenina quando comparado esse grupo de animais com o grupo etanol (EtOH) e o grupo salina. Para verificar a participação da via do NO, foi administrado a antagonista da NOS L-Noarg, que também reverteu significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo da colite induzida por TNBS. Quando foi administrado a Anandamida (agonista canabinóide) observou – se o retorno da antinocicepção periférica induzida pela colite experimental por TNBS tanto no grupo naloxona como no L-noarg.

CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados podemos inferir que o modelo de colite induzido por TNBS reduz o edema de pata induzido por carragenina (três ou quatorze dias após a indução) ou dextran (três após a indução), estes dados revelam que o potencial antiinflamatório do modelo de colite tem origem tanto vascular como celular. A atividade antiedematogênica quatorze dias após a indução da colite por carragenina demonstra que mesmo no quadro de restauração tecidual esses modelos possuem atividade antiinflamatória. A colite induzida por TNBS reduziu a hipernocicepção periférica induzida por carragenina ou PGE2 e isso parece depender da via canabinóide que ativa a via opióide e a esta, ativa a via final do NO produzindo analgesia periférica na pata de animais com colite por TNBS.

Palavras Chave: Colite, Dor, Inflamação.

Apoio: UFPI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p. 2066-2078, 2009.

CAMILLERI, M.; CARLSON, P.; MCKINZIE, S.; GRUDELL, A.; BUSCIGLIO, I.; BURTON, D. Genetic variation in endocannabinoid metabolism, gastrointestinal motility, and sensation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 294, p. 13–9, 2008.

HARBORD, M.W. Impaired neutrophil chemotaxis in Crohn's disease relates to reduced production of chemokines and can be augmented by granulocyte colony stimulating factor. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 24, p. 651–660, 2006.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P. and BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **JPET.** v.221, p. 261-267, 1982.

MAIONE, S.; PISCITELLI, F.; GATTA, L.; VITA, D.; DE PETROCELLIS, L.; PALAZZO, E.; DE NOVELLIS, V.; DI MARZO, V. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. **Br. J. Pharmacol.**, v. 162, p. 584-96, 2011.

MARKS, D.J.; SEGAL, A.W. Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. **J. Pathol.**, v. 214, p.260–266, 2008.

MASSI, P.; VACCANI, A.; PAROLARO, D. Cannabinoids, immune system and cytokine network. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 3135-46, 2006.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. Terapias de Base Imunológica. Imunologia básica e clínica. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan.** p.292-303, 1999.

STROBER, W.; FUSS, I.J.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 495–549, 2002.