



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ROBSON SALVIANO DE MATOS

**EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE OXIDATIVO DO LUZINDOL, UM
INIBIDOR DE RECEPTOR MT1 E MT2 DE MELATONINA, COM OU SEM
LIPOPOLISSACARÍDEO, NO JEJUNO DE CAMUNDONGOS SWISS**

FORTALEZA

2018

ROBSON SALVIANO DE MATOS

**EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE OXIDATIVO DO LUZINDOL, UM
INIBIDOR DE RECEPTOR MT1 E MT2 DE MELATONINA, COM OU SEM
LIPOPOLISSACARÍDEO, NO JEJUNO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M382e Matos, Robson Salviano de.

Efeito pró-inflamatório e de estresse oxidativo do luzindol, um inibidor de receptor mt1 e mt2 de melatonina, com ou sem lipopolissacarídeo, no jejuno de camundongos Swiss / Robson Salviano de Matos. – 2018.

84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin.

1. Jejuno. 2. Melatonina. 3. Luzindol. 4. Inflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 610

ROBSON SALVIANO DE MATOS

**EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE OXIDATIVO DO LUZINDOL, UM
INIBIDOR DE RECEPTOR MT1 E MT2 DE MELATONINA, COM OU SEM
LIPOPOLISSACARÍDEO, NO JEJUNO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Biomedicina

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof(a). Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof(a). Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me possibilitar caminhar ao seu lado em todos os momentos.

Aos meus pais Luis Salviano e Maria Salviano, pelo amor, carinho, ensinamentos construídos, educação e apoio. Aos meus irmãos Brenda e Rodrigo, pelo companheirismo.

À minha esposa, Larissa Menezes, pelo incentivo, parceria, amor e paciência.

À Professora Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin, pela orientação, ensinamentos e por me apresentar esse mundo extraordinário da pesquisa científica.

Ao Professor Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pelo apoio, disponibilidade e colaboração direta durante todo o estudo.

À professora Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte, pela colaboração nas análises morfométricas e de escores histopatológicos.

À professora Dra. Flávia Almeida Santos, pela colaboração nas análises de estresse oxidativo.

Ao Professor Dr. Pedro Felipe de Bruin, pela oportunidade de discutir sobre diversos assuntos relacionados à pesquisa.

Ao grande amigo Daniel Vieira, pela amizade e parceria na execução das análises.

À colega Ana Flávia do LPN, pela fundamental ajuda nas medidas de estresse oxidativo.

À minha amiga e vizinha Lianna Cavalcante, pelos ensinamentos da técnica de dissecação do tecido, boas conversas e que juntamente com a Cristhyane Costa me ajudaram nas inúmeras tentativas da "Saga Blot".

Aos técnicos do NEMPI. Flávia, pelo preparo dos blocos de parafina e lâminas coradas com HE, e ao Júnior, pelo preparo das lâminas para Imunohistoquímica.

Aos bolsistas de iniciação científica do LABICONTE Jardlon, Mirella e Carol, pela ajuda em algumas etapas de desenvolvimento das técnicas aplicadas.

Aos amigos Leonardo, Kildere, Felipe, Dulce, Juliana, Raul, José Carlos, Amanda e a todos os outros membros do LABICONTE.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, secretárias Ivone e Rita, além dos professores que compartilharam os seus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A melatonina (MEL) é um hormônio natural encontrada no trato gastrointestinal em grandes quantidades. É produzida por células enterocromafins e apresenta efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. O lipopolissacarídeo (LPS), um composto existente na membrana externa de bactérias gram-negativas, quando presente em altas concentrações no lúmen intestinal, pode provocar efeitos danosos. Essa endotoxina é usada para indução de doença inflamatória intestinal em modelos animais. O luzindol é um antagonista dos receptores MT1 e MT2 de MEL. A ação modulatória do luzindol tem sido frequentemente investigada, porém os seus efeitos isolados ainda não foram plenamente esclarecidos. No presente estudo, avaliou-se o efeito agudo do luzindol e LPS sobre os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no jejuno de camundongos. Foram utilizados 32 camundongos *Swiss*, machos, tratados com solução salina (0,35 mg/kg, i.p, n=8); ou luzindol (0,35 mg/kg, i.p, n=8); ou LPS (1,25 mg/kg, i.p, n=8); ou luzindol + LPS (0,35 mg/kg, i.p e 1,25 mg/kg, i.p, respectivamente, n= 8). Após uma hora e meia do tratamento, os animais foram eutanasiados e amostras do jejuno coletadas para avaliação dos parâmetros morfométricos dos vilos e criptas, escore histopatológico das criptas e marcadores de células caliciformes. Foi avaliado o processo inflamatório através da imunomarcagem para molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), fator nuclear kappa beta (NFkB), além da avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Foram realizadas, também, determinações de marcadores de estresse oxidativo: catalase (CAT), glutationa reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e nitrato/nitrito. Os animais tratados com luzindol, LPS e luzindol + LPS apresentaram encurtamento da altura dos vilos comparados com o salina ($p < 0,05$). Os animais tratados com luzindol + LPS apresentaram menor profundidade da cripta comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os animais dos grupos luzindol e LPS apresentaram menor razão vilo/cripta quando comparados aos grupos salina e luzindol + LPS ($p < 0,05$). O grupo LPS apresentou pior escore histopatológico das criptas quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). O tratamento com luzindol, LPS e luzindol + LPS reduziu a quantidade de células caliciformes imunomarcadas com PAS ($p < 0,05$) e apresentou aumento de células imunomarcadas com Iba-1 ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). A imunomarcagem para IL-1 β , TNF- α e NFkB foi mais intensa no grupo luzindol comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo LPS apresentou maior atividade da MPO que os grupos salina e luzindol ($p < 0,05$). Houve uma redução na atividade das enzimas CAT nos grupos luzindol, LPS e luzindol + LPS quando comparado ao salina ($p < 0,05$). O grupo luzindol apresentou aumento do GSH quando comparado ao salina ($p < 0,05$). Não houve alterações significativas no iNOS, MDA e nitrato/nitrito. Os resultados desse estudo sugerem que o luzindol, via bloqueio de receptores MT1 e MT2, e o LPS provocam efeitos agudos no jejuno de camundongos. O luzindol e o LPS induzem alterações morfológicas e modulam positivamente a resposta inflamatória.

Palavras-chave: Jejuno. Melatonina. Luzindol. LPS. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Melatonin is a natural hormone found in the gastrointestinal (GI) tract occurring in large quantities. It is produced by enterocromaffin cells and has antioxidant and anti-inflammatory effects. Lipopolysaccharide (LPS) is a compound present in the outer membrane of gram-negative bacteria that can cause harmful effects when present in high concentrations in the intestinal lumen. This endotoxin induces inflammatory bowel disease (IBD) in animal models. Luzindole is a melatonin (MT1 and MT2) receptor antagonist. The modulatory action of luzindole has been frequently investigated, but its isolated effects have not been fully elucidated. In the present study, the acute effect of luzindole and LPS on the inflammatory and oxidative stress parameters in mice jejunum was evaluated. Thirty-two Swiss male mice treated with saline solution (0.35 mg/kg, i.p, n=8); or luzindole (0.35 mg/kg, i.p., n=8); or LPS (1.25 mg/kg, i.p, n=8); or luzindole + LPS (0.35 mg/kg, i.p and 1.25 mg/kg, i.p, respectively, n=8) were used. After an hour and a half of treatment, the animals were euthanized and jejunum samples collected for evaluation of the morphometric parameters of the villus and crypts, histopathological score of the crypts and markers of goblet cells. The inflammatory process was evaluated through immunoblotting for ionizing calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), induced nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor kappa beta (NF κ B), and myeloperoxidase activity (MPO). Parameters of oxidative stress were also measured: catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and nitrate / nitrite. The animals treated with luzindole, LPS, and luzindole + LPS showed shortening of villus height compared to saline ($p < 0.05$). The animals treated with luzindole + LPS presented lower crypt depth compared to the other groups ($p < 0.05$). The animals of the luzindole, and LPS groups presented lower villus/crypt ratio when compared to the saline, and luzindole + LPS groups ($p < 0.05$). The LPS group had worse histopathological score of the crypts when compared to the other groups ($p < 0.05$). The treatment with luzindole, LPS, and luzindole + LPS reduced the amount of PAS-positive goblet cells ($p < 0.05$) and showed an increase of Iba-1-immunolabelled cells ($p < 0.05$) when compared to the saline group ($p < 0.05$). Immunoblotting for IL-1 β , TNF- α , and NF κ B was more intense in the luzindole group compared to the other groups ($p < 0.05$). The LPS group had higher MPO activity than the saline and luzindole groups ($p < 0.05$). There was a reduction in the activity of CAT enzymes in the luzindole, LPS, and luzindole + LPS ($p < 0.05$) groups when compared to saline. The luzindole group showed an increase in GSH when compared to saline ($p < 0.05$). There were no significant changes in iNOS, MDA, and nitrate/nitrite. The results of this study suggest that luzindole lead to acute effects in the jejunum of mice via blockade of MT1 and MT2 receptors, and LPS. Luzindole and LPS induce morphological changes and positively modulate the inflammatory response.

Keywords: Jejunum. Melatonin. Luzindole. LPS. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático da ativação do TLR4 por LPS e sinalização inflamatória.....	20
Figura 2. Biossíntese da melatonina.....	22
Figura 3. Possíveis mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes da melatonina.....	27
Figura 4. Estrutura química do luzindol e melatonina.....	28
Figura 5. Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilos e profundidade da cripta (A e B) utilizando o programa <i>Image J 1.4</i> [®] (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).....	36
Figura 6. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) corados com HE (x100). Escala: 100 µm.....	43
Figura 7. Avaliação morfométrica da altura dos vilos no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	44
Figura 8. Avaliação morfométrica da profundidade das criptas no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	44
Figura 9. Avaliação morfométrica da razão vilos/cripta no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	45
Figura 10. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) corados com HE (x400). Escala: 20 µm.....	46

Figura 11. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) marcados com PAS (400x). Escala de 20 µm.....	48
Figura 12. Quantidade de células caliciformes positivas no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	49
Figura 13. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) marcados Iba-1 (400x). Escala de 20 µm.....	50
Figura 14. Quantificação da imunomarcação para Iba-1 no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com soluço salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combina�o luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	51
Figura 15. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com soluço salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combina�o luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) marcados com IL-1�, TNF-� e NF�B (400x). Escala de 20 µm.....	52
Figura 16. Quantifica�o da imunomarca�o para IL-1� no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com soluço salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combina�o luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	53
Figura 17. Quantifica�o da imunomarca�o para TNF-� no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com soluço salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combina�o luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	53
Figura 18. Quantifica�o da imunomarca�o para NF�B no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com soluço salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combina�o luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	54

Figura 19. Quantificação da imunomarcção para iNOS no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	54
Figura 20. Atividade enzimática da MPO no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	55
Figura 21. Atividade da enzima CAT no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	56
Figura 22. Níveis de GSH no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	57
Figura 23. Níveis de MDA no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	58
Figura 24. Níveis de nitrato/nitrito no jejuno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com solução salina (0,35mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).....	59
Figura 25. Fluxograma dos principais resultados encontrados no estudo.....	60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Critérios utilizados para determinação dos escores de criptas com lesão/alteração histopatológica..... 37

Tabela 1. Avaliação das criptas necróticas no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados (celsius)
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CD14	Receptor antígeno de diferenciação 14
cm	Centímetro
COX	Ciclo-oxigenase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al</i>	E colaboradores
g	Gramma
GSH	Glutathiona reduzida
H&E	Hematoxilina e eosina
i.p	Intraperitoneal
Iba-1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ikk	Inibidor kappa quinase
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina- 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRAK-1	Quinase 1 associada a IL-1
Kg	Kilograma
LBP	Proteínas ligadoras de lipopolissacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
Mad-CAM	Molécula de adesão à célula de adesão da mucosa
MD2	Proteína mielóide 2
MDA	Malondialdeído
MEL	Melatonina
mg	Miligrama
min	Minuto

mm³	Milímetro cúbico
MPO	Mieloperoxidase
Myd88	Fator de diferenciação mieloide 88
NFkB	Fator nuclear kappa beta
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NODs	Domínios de oligomerização de nucleotídeos
OH	Radical hidroxila
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
PMNs	Polimorfonucleares
PRRs	Proteínas dos receptores de reconhecimento de padrões
PSI	Pounds-force per square inch
rpm	Rotações por minuto
seg.	Segundos
TLRs	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator 6 relacionado ao receptor TNF
UFC	Universidade Federal do Ceará
W	Watts
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Arquitetura do intestino delgado.....	16
1.2	Lipopolissacarídeo (LPS).....	17
1.3	Vias de sinalização inflamatória e estresse oxidativo por LPS.....	19
1.4	Melatonina.....	22
1.4.1	Melatonina no TGI.....	23
1.4.2	Melatonina no TGI e sua ação anti-inflamatória e antioxidante.....	25
1.5	Luzindol.....	27
2.	JUSTIFICATIVA.....	30
3.	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Drogas e reagentes.....	32
4.2	Equipamentos e materiais.....	33
4.3	Animais.....	33
4.4	Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa.....	34
4.5	Protocolo experimental.....	34
4.6	Coleta de amostras.....	34
4.7	Morfometria Intestinal.....	35
4.8	Escores de criptas necróticas.....	36
4.9	Determinação de células caliciformes positivas com ácido periódico de Shiff (PAS).....	38
4.10	Avaliação dos marcadores do processo inflamatório.....	38
4.10.1	Ensaio imunohistoquímico para Iba-1, IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS... ..	38
4.10.2	Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....	39
4.11	Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.....	40
4.11.1	Ensaio enzimático da catalase (CAT).....	40
4.11.2	Determinação da glutathiona reduzida (GSH).....	40

4.11.3	Dosagem de malondealdeído (MDA).....	40
4.11.4	Avaliação dos níveis de nitrato/nitrito.....	41
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1	Avaliação morfométrica.....	42
5.2	Avaliação dos escores de criptas necróticas.....	46
5.3	Determinação de células calciformes positivas.....	48
5.4	Avaliação dos marcadores do processo inflamatório.....	49
5.4.1	Imunomarcção para Iba-1.....	49
5.4.2	Imunomarcção para IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS.....	51
5.4.3	Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).....	55
5.5	Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo.....	56
5.5.1	Atividade enzimática da catalase (CAT).....	56
5.5.2	Níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	56
5.5.3	Níveis de malondialdeído (MDA).....	57
5.5.4	Níveis de nitrato/nitrito.....	58
5.6	Síntese dos resultados.....	60
6.	DISCUSSÃO.....	61
7.	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO.....	83

1. INTRODUÇÃO

Alterações da barreira epitelial intestinal são ocorrências precoces em doenças intestinais agudas. As lesões agudas no intestino possuem uma forte relação com morte celular, alterações na barreira epitelial e disbiose (desequilíbrio da microbiota intestinal e proliferação de bactérias patogênicas) (KIESSLICH et al., 2012; LIU et al., 2011).

O lipolissacarídeo (LPS), um composto presente na membrana externa de bactérias gram-negativas da microbiota intestinal, quando presente em altas concentrações no lúmen do intestino pode induzir alterações na homeostasia intestinal, incluindo comprometimento da barreira intestinal, apoptose de células epiteliais intestinais, translocação bacteriana e indução inflamatória na mucosa (TRAN; WHITFIELD, 2009; TRENT et al., 2006). A administração de LPS tem sido utilizada como um modelo consistente, rápido e efetivo para indução de doença intestinal inflamatória em animais de laboratório (WILLIAMS et al., 2013).

A melatonina (MEL), por sua vez, possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (BRZOZOWSKI et al., 1997; CARPENTIERI et al., 2012; SONG et al., 2005). Trata-se de um hormônio produzido em diferentes tecidos. No intestino, a MEL encontra-se em grandes concentrações, sendo sintetizada pelas células enterocromafins (SLOMINSKI et al., 2012). O luzindol é um antagonista dos receptores de MEL utilizado em estudos experimentais para investigar o papel de receptores MT3 da MEL e para bloquear os efeitos desse hormônio via receptores MT1 e MT2 (SUGAWARA et al., 1998). A ação modulatória do luzindol sobre a MEL tem sido frequentemente investigada, porém os seus efeitos isolados no intestino ainda são pouco conhecidos.

A imunomarcagem para MT1 e MT2 foi descrita por Söderquist et al. (2015) no trato gastrointestinal (TGI). Esses receptores foram encontrados principalmente em células produtoras de muco (células da mucosa e células caliciformes), enterócitos e células imunes (SÖDERQUIST; HELLSTRÖM; CUNNINGHAM, 2015).

A interação entre o efeito citotóxico do LPS e a regulação protetora promovida pela MEL pode então ser estudada com a adição do luzindol como o fator bloqueador da ação desse hormônio.

1.1 Arquitetura do intestino delgado

O intestino delgado é um dos componentes do sistema digestivo, sendo responsável por quebrar e absorver nutrientes, liberar produtos desnecessários da digestão, além de possuir uma importante função imunológica. Anatomicamente, esse órgão é dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. O duodeno é a região proximal, de menor comprimento, que recebe o quimo vindo do estômago, assim como enzimas do pâncreas e fígado que permitem a quebra de macronutrientes. O jejuno, região intermediária, possui o papel de absorver boa parte dos produtos da digestão. O íleo é a porção final e tem a função de absorver a vitamina B₁₂ e os ácidos biliares (KIELA; GHISHAN, 2016; VOLK; LACY, 2017).

As camadas do intestino delgado assemelham-se às dos demais tecidos do trato digestório, formada pela região mucosa, submucosa, muscular e serosa, cada uma com característica específica no processo digestivo. A mucosa, camada em contato direto com o lúmen intestinal, possui uma íntima relação com a absorção. A submucosa, região de tecido conjuntivo, é onde estão presentes várias células desse tecido, como os macrófagos e fibroblastos. A camada muscular, formada por músculo liso, participa do peristaltismo juntamente com gânglios do sistema nervoso autônomo. Já a região serosa, camada mais externa, circunda os segmentos intestinais (ORIÁ; BRITO, 2016).

Dentre essas camadas, a mucosa apresenta algumas peculiaridades, como as vilosidades, que estão presentes, exclusivamente, no intestino delgado e favorecem um aumento da absorção. Essas vilosidades são formadas por tecido conjuntivo frouxo e revestidas por epitélio simples. Por sua vez, o epitélio simples é composto por células cilíndricas ou enterócitos, que são células responsáveis pela absorção, além de células caliciformes, que secretam o muco, cuja função é de lubrificação e umidificação da superfície da mucosa. Na região de tecido conjuntivo frouxo, também estão presentes as células de defesa, como os linfócitos (T e B), macrófagos e fibroblastos (GASSLER, 2017; KIELA; GHISHAN, 2016).

Ainda na mucosa intestinal, existe uma região chamada de lâmina própria, ocupada por glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn. Essas criptas são formadas por várias células, como: as células-tronco do epitélio intestinal, responsáveis pela renovação do epitélio; células de Paneth, localizadas na região inferior da cripta, de estrutura granular arredondada, responsáveis pela proteção contra patógenos (bactérias, parasitas, dentre outros), assim como na secreção de lisozimas e citocinas pró-inflamatórias; células enteroendócrinas ou enterocromafins, responsáveis pela secreção de algumas substâncias, como a serotonina e glucagon, por exemplo; além das células caliciformes e os enterócitos (DE MEY; FREUND, 2013; GASSLER, 2017).

1.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

A parede celular das bactérias gram-negativas, como em espécies do gênero *Escherichia* e *Salmonella*, é formada por peptidoglicanos, membrana externa, lipoproteína e LPS. A membrana externa estabelece o formato da célula, sendo também, responsável pela proteção do citoplasma. A lipoproteína possui a função de estabilização da membrana externa, além de, promover a sua ancoragem aos peptidoglicanos. A membrana externa é composta por uma dupla camada de fosfolipídeos, contendo ainda proteínas e em sua camada mais externa o LPS, que compreende a maior parte da camada externa das bactérias (TRAN; WHITFIELD, 2009).

O LPS é uma endotoxina formada por uma molécula grande composta por um lipídeo A, oligossacarídeo central e antígeno-O. O lipídeo A liga-se ao oligossacarídeo central no núcleo interno e tem a função de ancorar o LPS na camada externa, já o antígeno-O está ligado ao núcleo externo (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O LPS é fundamental para a manutenção da integridade estrutural e funcional das bactérias, eles formam uma barreira contra a entrada de agentes antimicrobianos e sais biliares, sendo permeáveis somente a pequenos compostos hidrofóbicos. Essa endotoxina também possui uma importante função de mediadora da interação do organismo com o seu ambiente (NIKAIDO, 2003; TRAN; WHITFIELD, 2009).

O lipídeo A é o ligante do receptor *Toll-like 4* (TRL4), expresso por células imunes, logo esse componente é responsável por induzir uma resposta imune inata

(TRAN; WHITFIELD, 2009). O seu potencial efeito pró-inflamatório pode diferir entre as espécies das bactérias gram-negativas e a intensidade de resposta inflamatória, que pode variar de acordo com a dose recebida pelo hospedeiro (BRANDENBURG; SCHROMM; GUTSMANN, 2010; MAITRA et al., 2012; MARTIROSYAN et al., 2013).

Bactérias da microbiota intestinal são potenciais fontes de LPS e tem sido estimado que estejam presentes no hospedeiro num volume aproximado de 1g dentro do intestino (ERRIDGE et al., 2007). O local de entrada do LPS no organismo humano se dá, de forma preponderante, pelo intestino, entretanto, os mecanismos e a região de passagem de LPS pela mucosa ainda não estão inteiramente compreendidos. O lúmen intestinal possui mecanismos para esquivar-se do LPS e evitar o seu alcance a nível das células epiteliais. Considera-se, porém, que o LPS pode atravessar a camada epitelial, principalmente, em sua porção apical (BOUDRY et al., 2011).

Evidências mostram que o LPS presente no lúmen auxilia na homeostase do sistema imunológico, influenciando a maturação das células T e auxiliando na destruição de organismos invasores (HRNCIR et al., 2008). Entretanto, alta concentração dessa endotoxina na circulação sistêmica pode levar a efeitos deletérios severos ao hospedeiro (TRENT et al., 2006).

Estudos anteriores mostraram que grandes concentrações de LPS (1-50 mg/ml) provocaram apoptose e morte celular. A atividade biológica de concentrações fisiológicas de LPS não foi plenamente descrita (HIROTANI et al., 2008; YU et al., 2005). Nessa linha, estudos revelaram que o LPS plasmático em concentrações fisiológicas (0–10 ng/ml) não causa morte de células epiteliais intestinais, mas na verdade, aumenta a permeabilidade do intestino tanto *in vitro* como *in vivo* (GUO et al., 2013). Segundo Williams et al. (2013), doses de LPS com concentrações variando entre 0,125 e 20 mg/kg administradas via intraperitonal (i.p) em roedores são suficientes para provocar apoptose das células epiteliais intestinais e encurtamento das vilosidades (WILLIAMS et al., 2013).

1.2 Vias de sinalização inflamatória e estresse oxidativo por LPS

A inflamação é um processo patológico que envolve uma resposta de defesa frente a estímulos agressores ou compostos patogênicos, também chamados de

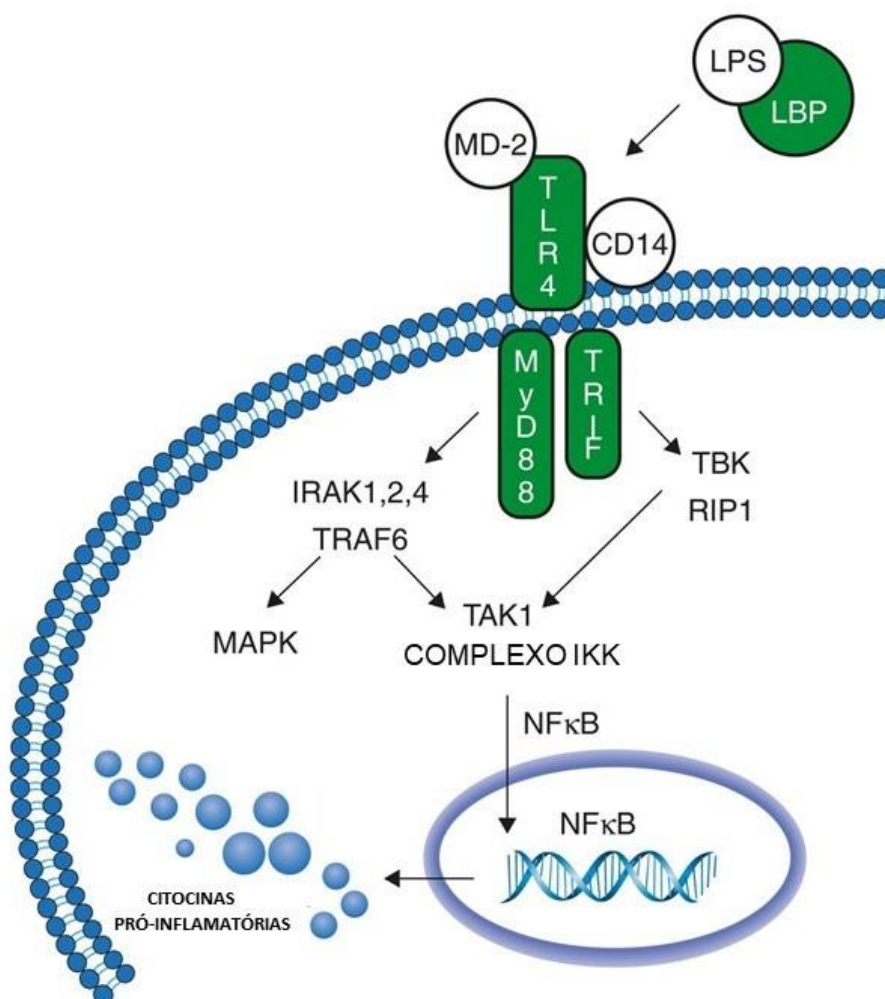
padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Na inflamação aguda, células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias (neutrófilos, eosinófilos e linfócitos) são ativadas e iniciam todo o processo inflamatório (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; SIMON; GREEN, 2005). Essas células respondem a estímulos e secretam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), assim como, os mediadores inflamatórios óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e óxido nítrico (NO) (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

As principais vias de sinalização inflamatórias são compostas pela família de proteínas dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os *toll like* (TRLs) e os domínios de oligomerização de nucleotídeos (NODs). Ambas possuem a fundamental função de reconhecimento de PAMPs e modulam respostas antibacterianas e anti-inflamatórias (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009). Esses receptores estão presentes em vários tecidos, dentre eles o intestino (PARLATO; YERETSSIAN, 2014). O TRL4 parece ser o TRLs mais investigado, estando presente em diversas células intestinais (BECKER; O'NEILL, 2007).

O LPS é reconhecido pelos receptores transmembrana TLR4, encontrado na superfície celular, expresso em células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; GAO; LI, 2017). Esse receptor possui um importante papel na defesa do hospedeiro, sendo essencial para os sinais intracelulares desencadeados pela endotoxina. A interação entre o LPS e o TRL4 depende da proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP), que se liga ao LPS; da proteína mieloide 2 (MD2), ligada ao domínio extracelular do TLR4; e do receptor antígeno de diferenciação 14 (CD14) (CARTON; NAPPI, 2001).

Após a ligação LPS-TLR4, com receptor já ativo, ocorre uma alteração conformacional e vias de sinalização são ativadas. Uma dessas vias é dependente do fator de diferenciação mieloide 88 (Myd88), que recruta a quinase associada a IL-1 (IRAK1) para ativar o fator 6 relacionado ao receptor TNF (TRAF6) e o complexo inibidor kappa quinase (IKK). Esse complexo fosforila a proteína inibitória kappa B (I κ B) e pode levar a ativação do fator de transcrição nuclear-kB (NF κ B) no núcleo, que por sua vez estimula a expressão de moléculas pró-inflamatórias como o IL-1 β , IL-6, TNF- α e iNOS (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013; XU et al., 2008) (**Figura 1**).

Figura 1. Modelo esquemático da ativação do TLR4 por LPS e sinalização inflamatória.



Fonte: (NEVES et al., 2013), adaptado.

O TLR4 é ativado pelo complexo LPS-LBP. Após ativação, com a participação de alguns elementos (CD14 e MD-2), o receptor recruta as moléculas adaptadoras: MyD88, que ativa o complexo IKK a partir das IRAKs (1,2 e 4) e TRAF6; e TRIF, que ativa IKK via TAK1 e RIP1. O complexo IKK auxilia na difusão do NFκB no núcleo e posteriormente ocorre o estímulo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Ainda durante a resposta inflamatória, com a ativação dos macrófagos e neutrófilos, ocorre a produção de produtos tóxicos, como os radicais livres, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN). Dentre esses produtos, as EROs e ERN, são bastante estudados o óxido nítrico (NO), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) (CARVALHO; TROTTA, 2003). O

acréscimo da produção de EROs e ERN ocorrem a partir de complexos enzimáticos, como o NADPH oxidase, existentes nas células fagocíticas. Esse complexo é capaz de gerar ânion O_2^- , mieloperoxidase (MPO) e iNOS (PARIHAR et al., 2008).

O aumento exacerbado de espécies reativas, durante a inflamação, pode favorecer a reação com macromoléculas, como as proteínas, lipídios (danos aos lipídios celulares, peroxidação lipídica e aldeídos derivados dos lipídios, como é o caso do malondialdeído-MDA) e ácidos nucleicos, resultando em possíveis alterações em sua estrutura química e influenciando o funcionamento de órgãos e sistemas (BREALEY et al., 2002; BUELNA-CHONTAL; ZAZUETA, 2013; LEE et al., 2004; NAIK; DIXIT, 2011; YADAV; RAMANA, 2013).

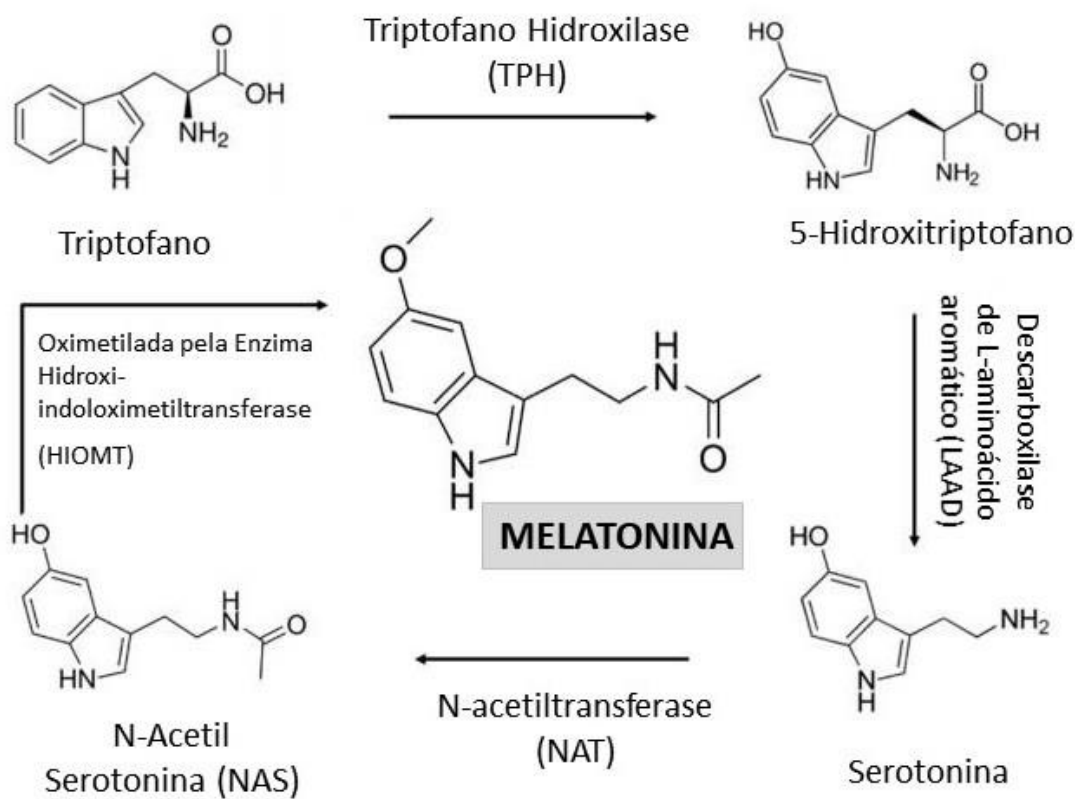
A produção de radicais livres, EROs e ERN ocorre em condições fisiológicas e patológicas. Em eventos fisiológicos, sob o metabolismo celular normal, existe um equilíbrio entre a produção dessas espécies reativas e a remoção, através de mecanismos de proteção, como os agentes antioxidantes. Já em condições patológicas, como na inflamação, ocorre um desequilíbrio, podendo levar ao estresse oxidativo (VALKO et al., 2007).

1.3 Melatonina

A MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina que foi encontrada em animais e descrita pelo dermatologista Aaron Lerner em 1958 (LERNER et al., 1958). A glândula pineal, principal órgão produtor da MEL, é responsável pela síntese noturna desse hormônio, e durante muito tempo foi considerada como sendo a única fonte (BERNARD et al., 1999).

Trata-se de um hormônio derivado do triptofano que é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina/5-HT). Duas etapas compõem a conversão de serotonina em MEL, envolvendo duas enzimas, serotonina N-acetiltransferase (NAT) e a hidroxindolometiltransferase (HIOMT). Sabe-se que para que ocorra a síntese de MEL é fundamental a disponibilidade de triptofano (SÁNCHEZ; CALPENA; CLARES, 2015) (**Figura 2**).

Figura 2. Biossíntese da melatonina



Fonte: (SÁNCHEZ; CALPENA; CLARES, 2015), adaptado.

A secreção da MEL ocorre durante o período noturno, em todos os vertebrados, mesmo em animais de hábitos diurnos ou noturnos (CARNEIRO et al., 1994). Verifica-se que os seus maiores níveis plasmáticos estão presentes entre 3 e 4 horas da manhã, podendo variar de acordo com o ritmo circadiano (CLAUSTRAT; LESTON, 2015). Seus níveis durante o dia são baixos ou, praticamente, inexistentes. Uma redução da secreção noturna desse hormônio pode associar-se a uma fragilidade do ritmo observada em algumas condições mórbidas, como atraso da fase do sono, síndrome do jet-lag, entre outras. A secreção de MEL também pode alterar-se de forma progressiva com o envelhecimento, podendo reduzir o seu pico de concentração ou até deixar de ser produzida em idades mais avançadas (KARASEK, 2004; SCHOLTENS et al., 2016). A MEL plasmática tem a capacidade de chegar a todos os tecidos do corpo, podendo, por exemplo, penetrar na barreira hematoencefálica e modular atividades cerebrais (DI BELLA; GUALANO, 2006).

Inicialmente, estudos desenvolvidos com animais, e posteriormente, com humanos mostram que a secreção da MEL é regulada pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), localizados no hipotálamo (PERREAU-LENZ et al., 2005). O ritmo claro/escuro é o principal sincronizador da secreção de MEL. Durante o dia, a presença da luz detectada através do trato retino-hipotalâmico impede a síntese do hormônio (TÄHKÄMÖ; PARTONEN; PESONEN, 2018). Variações do tipo de luz artificial, além da intensidade e duração da exposição a luz, podem suprimir a secreção fisiológica da MEL (GOOLEY et al., 2011; SIMONNEAUX, 2003).

A MEL possui numerosas funções influenciando o sono e o ritmo circadiano, a imunomodulação, os efeitos anti-apoptóticos e o controle de infecções patogênicas, além de, possuir uma potente atividade antioxidante e anti-inflamatória (BOURNE; MILLS, 2006; GALANO et al., 2015; LARANJEIRA-SILVA et al., 2015; LIU et al., 2015; SANTELLO et al., 2008; TEKBAS et al., 2008). Dessa forma, a MEL influencia o sistema imunológico, e potencialmente, protege a mucosa (BUBENIK, 2008; SLOMINSKI et al., 2012).

As funções desempenhadas pela MEL ocorrem em decorrência do seu fácil acesso às membranas celulares e capacidade de ligação a receptores específicos. Tais receptores podem estar localizados na membrana, como é o caso do MT1 e MT2 acoplados a proteína G, além do receptor citosólico MT3 (LIU et al., 2016). Além dessas interações com receptores de membrana e nucleares, a MEL também pode ligar-se a algumas proteínas intracelulares (CARDINALI et al., 1997; CARRILLO-VICO et al., 2003; EKMEKCIOGLU, 2006).

1.3.1 Melatonina no TGI

Ao longo do tempo, foram encontradas enzimas relacionadas a MEL na retina e no cerebelo (BUBENIK et al., 1974; CARDINALI; ROSNER, 1971). Foi visto que, a MEL também é produzida secundariamente na pele, plaquetas, medula óssea, intestino e outros locais (BUBENIK, 2002; CARDINALI et al., 2003; CHAMPIER et al., 1997; LIU et al., 2004; SLOMINSKI et al., 2002).

No intestino, a MEL é secretada pelas células enterocromafins. Sua produção não é influenciada pela presença ou ausência da luz, como na glândula pineal, e sim,

de acordo com o consumo alimentar, em especial alimentos que contém triptofano (BUBENIK, 2002; CHEN et al., 2011). A ação dessa indolamina no TGI é mediada através de vários mecanismos, incluindo o receptor de membrana MT2, o receptor 5-HT e pela atividade antioxidante (DRAGO; MACAUDA; SALEHI, 2002; KASIMAY et al., 2005; MANOCHA; KHAN, 2012; REITER et al., 2003). A mucosa do TGI representa a maior fonte de MEL, com concentrações centenas de vezes maiores que na glândula pineal (BUBENIK, 2008; HUETHER, 1993).

Sabe-se que os mecanismos de ação da MEL são mediados por seus receptores MT (PANDI-PERUMAL et al., 2008) e o intestino delgado apresenta uma considerável expressão desses receptores (POIREL et al., 2003). Nesse tecido, o receptor MT2, está mais presente nas células epiteliais e nas regiões do plexo mioentérico e submucoso, do que o receptor MT1 (SÖDERQUIST; HELLSTRÖM; CUNNINGHAM, 2015) e o receptor MT3 é expresso no citosol (CHEN et al., 2011).

Dentre os efeitos da MEL no TGI, destaca-se o papel como reguladora da ingestão e digestão alimentar. A MEL atenua a motilidade intestinal, participando da estimulação da secreção de HCO_3 , no duodeno, na melhoria do sistema imunológico e prevenção de úlcera intestinal. Observa-se também um efeito protetor gástrico em experimentos que envolvem isquemia e reperfusão (ATES et al., 2004; BUBENIK et al., 1999; THOR et al., 2007). De maneira geral, o efeito protetor desse hormônio parece ser mediado por sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória. A MEL possui um grande potencial de combate às EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN), além de, atuar na inibição de fatores de transcrição que estimulam as citocinas pró-inflamatórias ($\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$) (CARPENTIERI et al., 2012; PANDI-PERUMAL et al., 2008).

Estudos recentes mostram que a MEL atua na proteção do epitélio e da barreira endotelial possivelmente através melhorando a barreira paracelular (SOMMANSSON; NYLANDER; SJÖBLOM, 2013; YUAN et al., 2011). Como também, atua de forma benéfica na cicatrização de úlceras e combate a substâncias nocivas, evitando danos ao epitélio intestinal (BRZOWSKI et al., 1997; SONG et al., 2005).

Tem sido mostrado que a utilização da MEL, por via oral, reduz a permeabilidade intestinal. Um estudo recente corrobora os benefícios da administração oral de MEL sobre os danos no tecido intestinal de ratos, possivelmente

trazendo benefícios para os distúrbios no TGI (SOMMANSSON et al., 2014). Trata-se de um medicamento de baixo custo e baixíssima toxicidade (MULDER et al., 2009; NDUHIRABANDI; DU TOIT; LOCHNER, 2012; SONG et al., 2005).

A descoberta de elevados níveis de MEL no intestino de roedores, mais especificamente nas regiões do jejuno e íleo quando comparado aos outros segmentos, sugere que essa indolamina possui uma importante função fisiológica no TGI (BUBENIK; BROWN, 1997).

1.3.2 Melatonina no TGI e sua ação anti-inflamatória e antioxidante

A MEL no TGI atua, potencialmente, na modulação da resposta imune. Isso pode ocorrer a partir da inibição da atividade dos macrófagos, um dos possíveis gatilhos na inflamação. A presença de receptores de MEL na superfície de macrófagos, indica que essa indolamina pode regular a atividade dessa célula e atenuar processos inflamatórios (MEI et al., 2002).

A regulação de enzimas e citocinas relacionadas com a inflamação parece ser um papel importante da MEL. Por exemplo, esse hormônio reduz a atividade das enzimas MPO, uma peroxidase presente nos neutrófilos, e da ciclooxigenase-2 (COX), uma enzima relacionada a produção de mediadores inflamatórios (DONG et al., 2003; TAHAN et al., 2011). Também tem sido bem documentado que a MEL inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) (ESPOSITO et al., 2008; RAHIMI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2007).

Evidências recentes demonstram que a MEL atenua a inflamação e o estresse oxidativo pelo bloqueio do complexo proteico NF κ B, via inibição da atividade dos macrófagos (CHUFFA et al., 2015; MALDONADO et al., 2016; WANG et al., 2009).

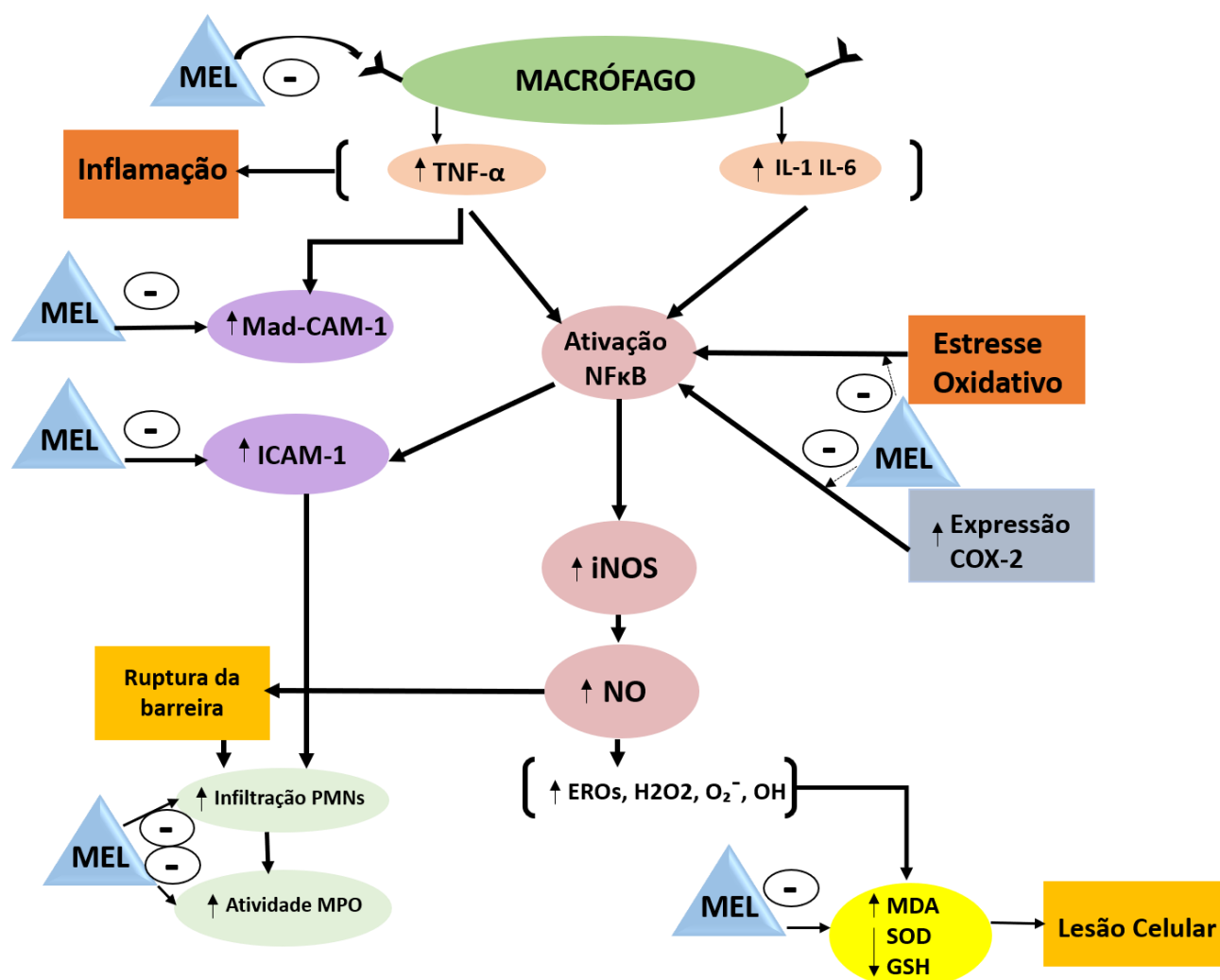
A MEL possui uma importante atividade antioxidante, tendo papel fundamental na eliminação de EROs e ERN. Essa indolamina estimula o sistema de defesa antioxidante celular a partir do aumento dos níveis do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e da expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GSH) e catalase (CAT) (GALANO; TAN; REITER, 2013; REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004).

Juntamente com os seus metabólitos, a MEL atua no sequestro de radicais livres e na neutralização do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). A interação da MEL com o radical OH desencadeia uma série de reações que removem radicais e geram metabólitos, como exemplo, o 3-hidroxi-melatonina cíclica (C_3HOM), N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), que também funcionam na eliminação de radicais livres (GALANO; TAN; REITER, 2014).

A MEL também possui a capacidade de interagir com a bicamada lipídica, preservando a sua fluidez e evitando características rígidas decorrentes do estresse oxidativo, além da sua atividade na redução da peroxidação lipídica e estabilização da membrana mitocondrial (GARCÍA et al., 1997, 2014). Outro efeito benéfico dessa indolamina está sobre a sua capacidade antiapoptótica (GALANO; TAN; REITER, 2014).

Alguns dos possíveis mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes da MEL sobre as doenças inflamatórias são ilustrados na figura abaixo (**Figura 3**).

Figura 3. Possíveis mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes da melatonina



Fonte: (MOZAFFARI; ABDOLLAHI, 2011), adaptado.

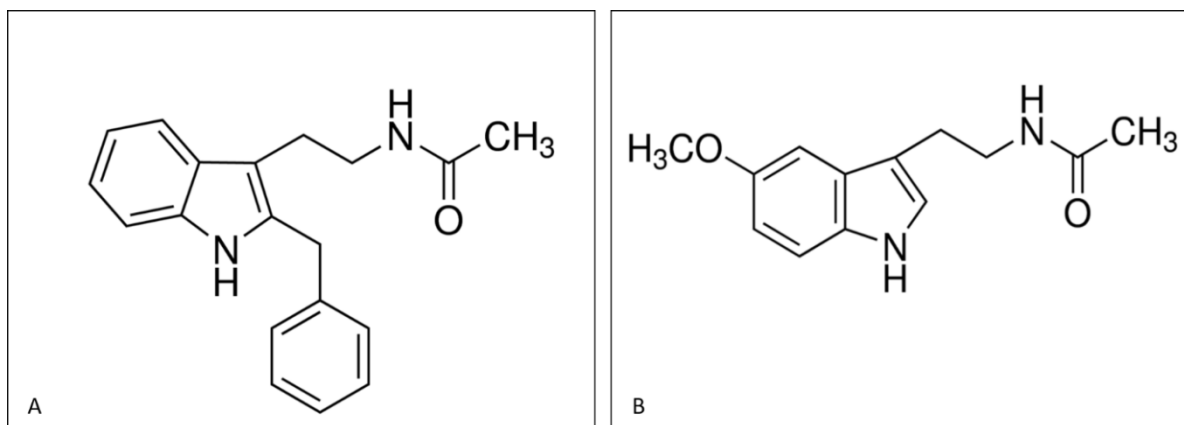
MEL (Melatonina); COX (Ciclo-oxigenase); GSH (Glutaciona reduzida); OH (Radical hidroxila); ICAM (Molécula de adesão intercelular); IL (Interleucina); iNOS (Óxido Nítrico Sintase); Mad-CAM (Molécula de adesão à célula de adesão da mucosa); MDA (malondialdeído); MPO (mieloperoxidase); TNF (fator de necrose tumoral); Linfócito T-helper (TH); NO (óxido nítrico); PMNs (polimorfonucleares); SOD (Superóxido dismutase); - (Inibição); ↓ (diminui); ↑ (aumenta).

1.4 Luzindol

O luzindol (2-benzil-N-acetilriptamina) foi identificado como o primeiro antagonista dos receptores de MEL. A sua estrutura química difere da indolamina pela remoção do grupo 5-metoxi e adição de uma porção benzílica de duas posições (DUBOCOVICH et al., 1997) (**Figura 4**). O luzindol é um ligante não seletivo dos receptores MT1 e MT2, apesar de alguns estudos demonstrarem uma maior afinidade

pelo subtipo MT2 (DUBOCOVICH et al., 1998; MAKOVEC et al., 1987; WITTENDERBY et al., 2006). Esse antagonista pode bloquear determinadas funções da MEL (HUSSON et al., 2002; STUMPF; MÜHLBAUER; PESCHKE, 2008; SUGAWARA et al., 1998).

Figura 4. Estrutura química do luzindol e melatonina



Fonte: (SUGDEN et al., 2004), adaptado.

A. Luzindol; **B.** Melatonina

A utilização de antagonistas de receptores é de potencial relevância para auxiliar na melhor compreensão das funções da MEL endógena e seus processos a nível fisiológico e em condições patológicas. A inibição da MEL através do luzindol tem sido largamente utilizada. As evidências obtidas contribuem para o maior conhecimento sobre os mecanismos da MEL em condições fisiológicas e patológicas.

De maneira geral, os estudos utilizam esse antagonista concomitante ao uso da MEL exógena. Trabalhos têm mostrado que, em determinadas situações, o luzindol pode exercer um papel bloqueador sobre os efeitos da MEL (HUSSON et al., 2002). Porém, a ausência desse bloqueio, em alguns estudos, sugere que a ação da MEL pode ser mediada através de outro receptor, e.g. MT₃, ou a partir de uma mecanismo independente dos receptores MT (ZIELIŃSKA et al., 2016). Husson et al., 2002, demonstraram o efeito neuroprotetor da MEL sobre a leucomalácia periventricular e o luzindol suprimiu tal ação (HUSSON et al., 2002). Entretanto, em outro trabalho, foi observado que o luzindol não foi capaz de bloquear a atividade de MEL em um modelo de úlcera (ZIELIŃSKA et al., 2016). Outro estudo *in vitro*, mostrou ainda que esse

antagonista não alterou o efeito antioxidante da MEL (BENITEZ-KING et al., 2003). Tem sido observado, e conseqüentemente sugerido, que parte da ação antioxidante e anti-inflamatória da MEL é mantida mesmo quando os seus receptores MT1 e MT2 estão bloqueados (BENITEZ-KING et al., 2003; PAPPOLLA et al., 2002; REQUINTINA; OXENKRUG, 2007; ZIELIŃSKA et al., 2016).

Alguns estudos mostram que o luzindol *per se* pode apresentar uma ação antioxidante, porém, essa questão não está bem esclarecida. Essa descoberta partiu de pesquisadores que utilizaram um modelo *in vitro* e avaliaram o efeito de antagonistas da MEL, dentre eles o luzindol, sobre a peroxidação lipídica induzida por LPS (REQUINTINA; OXENKRUG, 2007). Outro estudo mostrou que esse efeito antioxidante do luzindol parece ser bem semelhante ao da MEL ou até mesmo superior (OXENKRUG; REQUINTINA, 2005).

A descoberta da MEL foi há mais de meio século e embora exista uma grande quantidade de estudos sobre o seu papel fisiológico no intestino, lacunas permanecem por serem preenchidas. A utilização de antagonistas é de potencial relevância para auxiliar na melhor compreensão das funções da MEL nesse tecido. O luzindol, um antagonista bastante utilizado, e sua possível ação bloqueadora, principalmente de forma isolada, não está totalmente esclarecida, além disso, sua participação na resposta inflamatória induzida pelo LPS no TGI ainda é pouco explorado.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças inflamatórias intestinais são um grupo de afecções crônicas, de grande importância epidemiológica, associadas a processos inflamatórios, aumento do estresse oxidativo e alterações morfológicas.

A melatonina é encontrada na mucosa intestinal em concentração centenas de vezes superior a glândula pineal. Apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória, possuindo considerável importância para o equilíbrio da função intestinal e manutenção da barreira paracelular do intestino. A ação da melatonina não se dá necessariamente através da mediação dos receptores MT1 e MT2. Uma melhor compreensão sobre o seu mecanismo de ação e as vias envolvidas é necessária.

O LPS, um composto presente na membrana das bactérias gram-negativas, é um potente fator imunogênico, sendo capaz de induzir efeitos inflamatórios e é utilizado com frequência como indutor de lesão intestinal aguda.

O luzindol, um antagonista dos receptores MT1 e MT2, tem sido avaliado concomitante a administração de melatonina para testar seus efeitos como bloqueador. No entanto, o efeito agudo do luzindol sobre o intestino sem a presença da melatonina exógena ainda não foi estudado. Uma avaliação sobre os efeitos agudos do luzindol nos parâmetros morfométricos, inflamatórios e do estresse oxidativo deve contribuir para maior esclarecimento sobre a ação da melatonina.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos agudos do luzindol isoladamente ou combinado com o LPS sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no jejuno de camundongos *Swiss*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No jejuno de camundongos *Swiss*, tratados com salina, luzindol, LPS e luzindol + LPS, avaliar e comparar:

- Os parâmetros morfométricos de altura dos vilos, profundidade das criptas e relação vilo/cripta.
- As lesões/alterações das criptas através dos escores histopatológicos.
- A quantidade de células caliciformes PAS-positivas presentes nos vilos.
- Os parâmetros inflamatórios a partir de marcadores envolvidos no processo inflamatório: molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator nuclear kB (NFkB), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e atividade da mieloperoxidase (MPO).
- O estresse oxidativo a partir da atividade da enzima catalase (CAT), dos níveis de glutatona reduzida (GSH), malondealdeído (MDA) e nitrato/nitrito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e reagentes

- Ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma Aldrich, EUA)
- Ácido 5,5-ditiobis (Sigma Aldrich, EUA)
- Ácido acético (Vetec Química, Brasil)
- Ácido etilenodiaminotetracético (Dinâmica, Brasil)
- Ácido tricloroacético (Sigma Aldrich, EUA)
- Azul de nitrotetrazólio (Sigma Aldrich, EUA)
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Aldrich, EUA)
- Dimetilsufóxido (DMSO) (Dinâmica, Brasil)
- Dodecil sulfato sódico (Sigma Aldrich, EUA)
- Eosina (Sigma Aldrich, EUA)
- Etanol absoluto (Sigma Aldrich, EUA)
- Formol (Alphatecm, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico e dibásico (Vetec, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico (Vetec, Brasil)
- Hematoxilina (Sigma Aldrich, EUA)
- Cetamina (Syntec, Brasil)
- Lipopolissacarídeo (LPS) (L2630, Escherichia coli0111:B4, Sigma Aldrich, EUA)
- L-metionina (Vetec, Brasil)
- Luzindol (L2407, Sigma Aldrich, EUA)
- O-dionisidina (Sigma Aldrich, EUA)
- Peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil)
- Riboflavina (Vetec, Brasil)
- Tetrametoxipropano (Sigma Aldrich, EUA)
- Xilazina (Agener União, Brasil)

4.2 Equipamentos e materiais

- Balança analítica bioprecisa (Shimadzu, Brasil)
- Centrífuga refrigerada para tubos (Cientec, Brasil)
- Criotubos, 2,0 ml
- Equipamentos de proteção individual (EPI's): avental de algodão, propé (proteção para os pés), touca, máscara e luvas de nitrila
- Espectrofotômetro (Beckman Coulter, EUA)
- Geladeira e freezer ThermoScientific (-80°C)
- Instrumental cirúrgico
- Lanceta plástica
- Placas de petri
- Ponteiras para pipetas
- Ração para camundongos (Presence-Labina®)
- Sacos plásticos com símbolo de contaminante
- Seringas
- Tubos de polipropileno para centrífuga
- Tubos Eppendorf, 1,5 ml (Cequímica)
- Tubos Falcon, 15 e 50 ml (Cequímica)
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio
- Vórtex Maxi Mix II

4.3 Animais

Foram utilizados 32 camundongos (*Mus musculus*, da linhagem *Swiss*, 25-30g) machos, provenientes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acomodados numa sala com temperatura controlada, ciclo claro/escuro normal de 12 horas e alojados em caixas de polipropileno (390 x 320 x 170 mm³), contendo raspas de madeira, como forração e com água e comida *ad libitum* durante todo o experimento.

4.4 Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo 117/2016 (Anexo 1).

4.5 Protocolo experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo salina (n=8), que recebeu solução salina 0,35 mg/kg via intraperitoneal (i.p); grupo tratado com luzindol na dose de 0,35 mg/kg i.p (n=8); grupo tratado com LPS na dose de 1,25 mg/kg i.p (n= 8); grupo tratado inicialmente com luzindol na dose de 0,35 mg/kg i.p e posteriormente (30 min após) com LPS na dose de 1,25 mg/kg i.p (n= 8).

Todos os animais estudados foram eutanasiados 1,5 hora após o experimento.

A dose do luzindol foi baseada no modelo experimental de Sommanson, Nylander e Sjöblom (2013). Os autores observaram que 0,35 mg/kg de luzindol é suficiente para provocar o bloqueio dos receptores MT1 e MT2 de melatonina (MEL) no intestino de camundongos.

A dose do LPS (1,25 mg/kg), assim como o tempo entre tratamento e eutanásia (1,5 hora), está de acordo com o modelo experimental de apoptose e diarreia em camundongos de Williams et al. (2013).

4.6 Coleta das amostras

Os animais foram eutanasiados por sobredose do anestésico cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina por via i.p e posterior deslocamento cervical. Imediatamente após a eutanásia, a cavidade abdominal foi aberta e amostras do jejuno foram cuidadosamente retiradas. Parte do tecido coletado foi imediatamente fixado em formol, para posterior análise histológica, e outra parte foi congelada em nitrogênio líquido, logo após em freezer -80° C, para posterior análise por espectrofotômetro. Consideramos o jejuno como sendo o segmento que corresponde a porção anterior a 10 cm do ligamento de Treitz (CARNEIRO-FILHO et al., 2004).

4.7 Morfometria intestinal

Após eutanásia dos animais, amostras de jejuno foi retirada e fixada em formol a 10 % (tamponado) durante 24 horas e posteriormente armazenada em álcool a 70%. Logo após, foram desidratadas em etanol e fixadas em parafina. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para serem analisados.

Na análise morfométrica foram analisados os parâmetros de altura dos vilos e profundidade das criptas, que são marcadores de integridade do tecido intestinal. A altura do vilão foi medida a partir da linha da base até o seu topo. A profundidade da cripta foi mensurada a partir da linha apical até o fundo da cripta (**Figura 5**). Foram observados aproximadamente 10 vilos por animal utilizando um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Medidas foram feitas a partir de imagens digitalizadas pelo programa *Image J 1.4®* (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), cuja calibração foi realizada através de uma micro-régua.

Toda a análise foi feita de forma cega por um histopatologista experiente.

Figura 5. Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilão e profundidade da cripta (A e B) utilizando o programa *Image J 1.4®*.



Fonte:(PIRES; SILVEIRA; SILVA, 2003), adaptado

4.8 Escores de criptas necróticas

Os escores de criptas necróticas foram calculados de forma cega, por histopatologista com experiência na área. A mucosa, em pequeno e maior aumento em lâminas coradas em H&E, foi examinada. Foram consideradas criptas necróticas as criptas cortadas longitudinalmente, com alteração da citoarquitetura normal e com fundo cego exibindo lesão necrótica e infiltrado celular inflamatório com ausência ou perda de células de Paneth e células caliciformes na base das criptas. O quadro descreve os critérios utilizados para a avaliação dos escores (**Quadro 1**). Foram observados 4 campos por animal.

Quadro 1 – Critérios utilizados para determinação dos escores de criptas com lesão/alteração histopatológica.

Grau 0	> 90 % das criptas apresentando citoarquitetura e tamanhos normais, sem alargamento e hiperplasia, exibindo base de fundo cego regular bem delineado, com presença de células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 1	> 70 % das criptas exibindo hiperplasia e alargamento do tamanho, contudo com citoarquitetura normal, sem alterações necróticas, exibindo células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 2	Semelhante ao grau 1, contudo até 30% das criptas apresentando comprometimento da citoarquitetura normal, com lesão necrótica na sua base com infiltrado de células inflamatórias, com possível presença de células de Paneth, contudo sem células caliciformes com grânulos aparentes.
Grau 3	Entre 50 e 70 % das criptas exibindo alterações necróticas da base da cripta com infiltrado de células inflamatórias. O restante das criptas apresentando hiperplasia e alargamento, com ausência de células de Paneth e caliciformes com grânulos visíveis.
Grau 4	> 70 % das criptas com comprometimento da citoarquitetura normal, com lesão necrótica da base da cripta com invasão de infiltrado de células inflamatórias e ausência de células de Paneth e caliciformes com grânulos aparentes na base da cripta.

Fonte: (ARAÚJO et al., 2015)

4.9 Determinação de células caliciformes positivas com ácido periódico de Schiff (PAS)

Com a finalidade de detectar o muco presente em células caliciformes dos vilos dos camundongos, espécimes foram submetidas a cortes de 4 μm de espessura e montados em lâminas de vidro, desparafinizados, reidratados e oxidados com ácido periódico a 0,5 %. Logo em seguida, as lâminas foram coradas com reagente de Schiff por 20 minutos e posteriormente, as mesmas lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 20 minutos.

As imagens das lâminas foram obtidas pelo microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Foram observados e quantificados de oito a dez vilos por animal. O resultado foi expresso como número de células caliciformes por vilos.

Toda a análise foi feita de forma cega por um histopatologista experiente.

4.10 Avaliação dos marcadores do processo inflamatório

4.10.1 Ensaio imunohistoquímico para Iba-1, IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS

Para a realização da imunohistoquímica, os espécimes foram novamente submetidos a cortes de 4 μm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxysilano Sigma ChemicalCo®, Saint Luis, MO, EUA).

Os cortes foram submetidos aos anticorpos Iba-1, IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS utilizando método de estreptavidina-biotina (HSU; RAINE, 1981). Resumidamente, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados em xilol e álcool.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0 em panela pressurizada (Pascal), a \pm 22-25 PSI, durante 30 seg a temperatura de 126 °C. Após retornar a temperatura ambiente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3 % durante 10 min. Os cortes foram incubados com anticorpo primário para Iba-1, IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS (ABCAM®), durante 1 h a

temperatura ambiente, na diluição de 1:300 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA), e, posteriormente, lavados com solução de PBS.

Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA) por 10 min. a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita incubação em solução cromógena preparada com 3,3`diaminobenzidine (DAB), durante 5 min em câmara escura. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, porém o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5 %. Os cortes foram então lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada.

Os parâmetros de positividade da marcação imunohistoquímica do antígeno em todos os cortes incluídos consistiram nas células que exibiram coloração acastanhada no seu citoplasma, independente da intensidade de imunomarcção.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Para quantificar a área imunomarcada utilizou-se o programa Image J 1.4® (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). A mensuração foi calculada pela razão da área marcada pela fração da área (%). Foram quantificados quatro campos por animal.

4.10.2 Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5 % diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH, 6,0) na proporção de 5 %. Posteriormente, o homogenato foi submetido a um processo de congelamento e descongelamento três vezes seguidas, foi centrifugado em 8300 rpm, por 10 minutos, a 4º C. O sobrenadante (100µL) foi adicionado a 1,9 mL da solução de reação (cloridrato de o-dionisidina, 0,167 mg/mL, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e peróxido de hidrogênio 0,0005 %). Logo após a mistura, a reação foi lida em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 450 nm, por seis minutos (BRADLEY et al., 1982). Os resultados foram expressos como unidade de MPO por miligrama de tecido.

4.11 Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

4.11.1 Ensaio enzimático da catalase (CAT)

As amostras do jejuno foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,4), na proporção de 10 %. O homogenato foi então centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos, 4°C, e o sobrenadante foi aspirado. Adicionou-se uma solução 0,059 M de peróxido de hidrogênio para a leitura em cubeta de quartzo em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 240 nm, por 6 minutos (BEERS; SIZER, 1952). Os resultados foram expressos em mmol de CAT pelo tempo por 100 miligramas de tecido.

4.11.2 Determinação da glutatona reduzida (GSH)

A glutatona reduzida (GSH) ou grupamentos sulfidrilas não proteicos (NP-SHs) do jejuno foi determinada através do reagente Ellman's, de acordo com um protocolo padronizado (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A amostra foi homogeneizada em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 0,02 M; pH 8,9). O homogenato foi misturado em água destilada e ácido tricloroacético a 50 %, posteriormente foi centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi pipetado em uma placa de 96 poços com tampão Trizma (0,4 M), EDTA e ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico). A absorvância foi analisada em um leitor de microplaca, com comprimento de onda de 412 nm. Os valores encontrados foram interpolados a uma curva padrão do GSH e os resultados expressos em μmol de GSH por miligrama de tecido.

4.11.3 Dosagem de malondialdeído (MDA)

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (AGAR et al., 1999). Alíquotas (100 μL) do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20 % e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5 % (diluído em ácido acético 20 %, pH 2,4 - 2,6). A mistura foi transferida para o banho-maria com temperatura de 95°C, onde

permaneceu durante 60 minutos, e imediatamente após foi para o banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, recebeu dodecil sulfato sódico (8,1 %), e foi centrifugado a 12000 rpm, por 15 min, a 25°C. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em nanomols de MDA por miligrama de tecido.

4.11.4 Avaliação dos níveis de nitrato/nitrito

A avaliação dos níveis de nitrato/nitrito foi determinada a partir da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Os tecidos foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (50 mM e pH7,8). Posteriormente, o homogenato (10 %) foi centrifugado a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante (100 µL) foi misturado ao reagente Griess (100 µL) (0,1 % dihidroclorato de N-(1-naftil) etilenodiamida a 1 % em ácido fosfórico a 5 %) e após 10 minutos a absorvância foi analisada em espectrofotômetro em 540 nm. As absorvâncias foram interpoladas à curva padrão de nitrito de sódio. Todos os resultados foram expressos em micromols de nitrato/nitrito por miligrama de proteína. A dosagem de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em média \pm EPM. Todos os valores foram testados para a normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância (ANOVA), seguida pela correção de Bonferroni, foi utilizada para comparação de múltiplos grupos. Para a avaliação dos escores de criptas necróticas utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o GraphPad Prisma 5.03 (San Diego, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação morfométrica

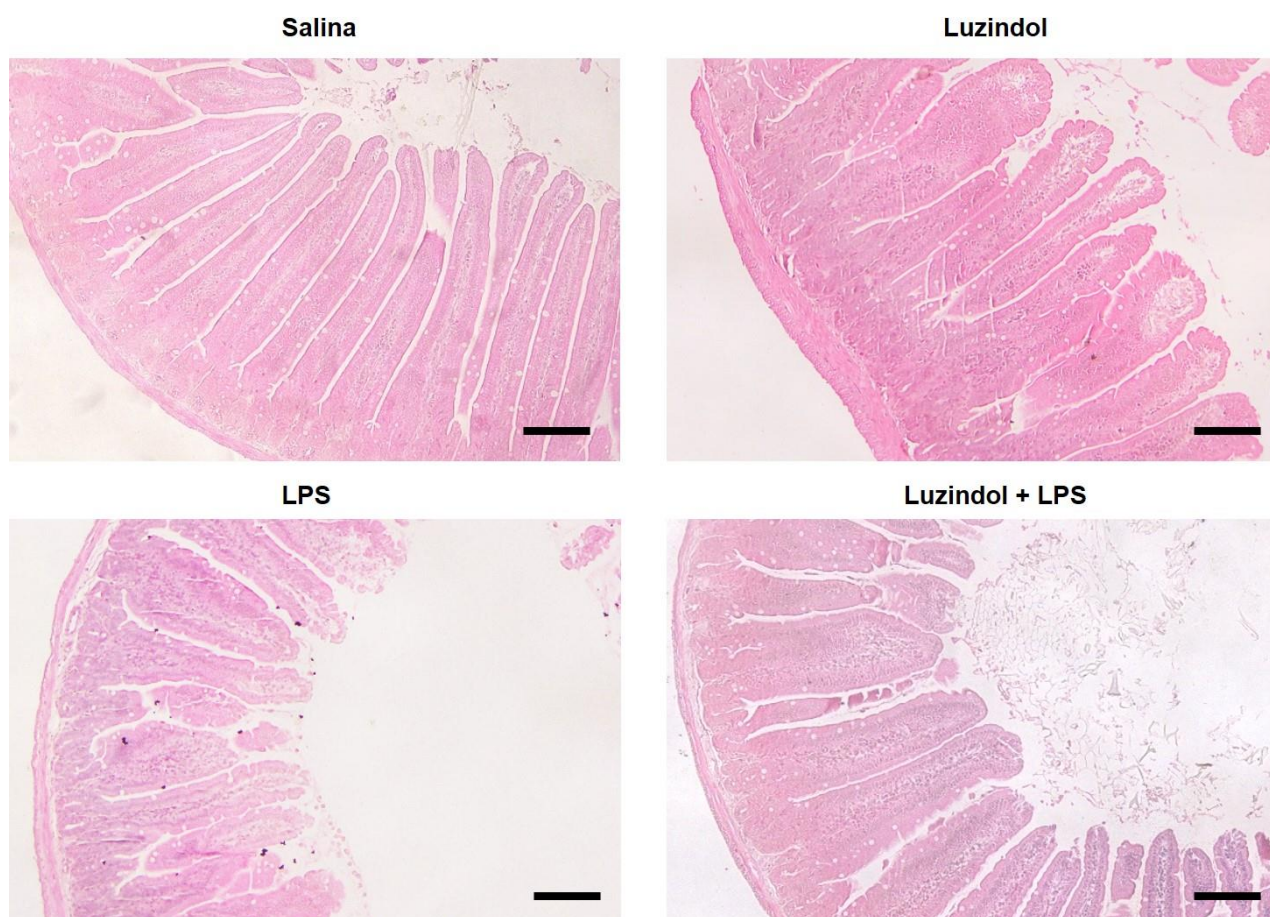
Para verificar os efeitos do tratamento com solução salina, luzindol, LPS e luzindol + LPS sobre os parâmetros morfométricos, realizou-se a medição da altura dos vilos, profundidade das criptas e a relação vilo/cripta.

Em relação aos vilos, pode ser visto que os camundongos dos grupos tratados com luzindol, LPS e luzindol + LPS apresentaram redução da altura quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$). Além disso, o grupo tratado com LPS apresentou vilos menores quando comparado ao grupo luzindol ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença entre os animais dos grupos LPS e luzindol + LPS (**Figura 6 e 7**).

No que se refere a cripta, observou-se que os camundongos dos grupos salina, luzindol e LPS apresentaram uma maior profundidade quando comparado ao grupo luzindol + LPS ($p < 0,05$). Porém, não houve diferença entre os grupos salina, luzindol e LPS ($p > 0,05$) (**Figura 6 e 8**).

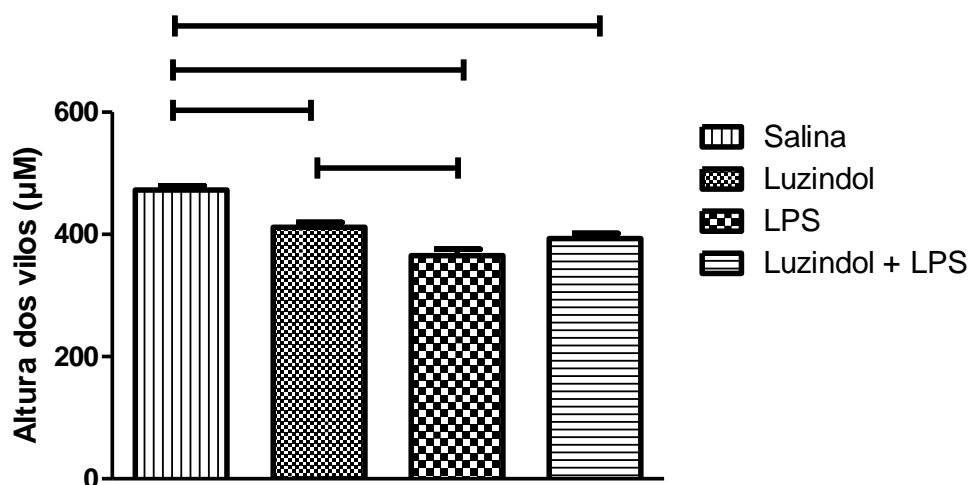
Quando realizado a avaliação morfométrica da razão vilo/cripta foi visto que os animais dos grupos tratados com luzindol e LPS apresentaram menor razão quando comparados aos grupos salina e luzindol + LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos salina e luzindol + LPS, assim como não houve diferença entre os grupos luzindol e LPS ($p > 0,05$) (**Figura 9**).

Figura 6. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) corados com H&E (x100). Escala: 100 μ m



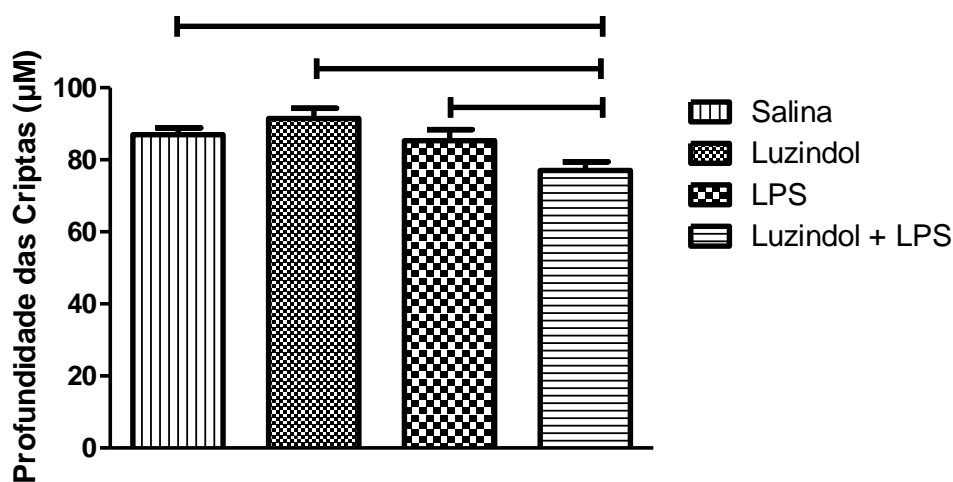
Fonte: o autor.

Figura 7. Avaliação morfométrica da altura dos vilos no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).



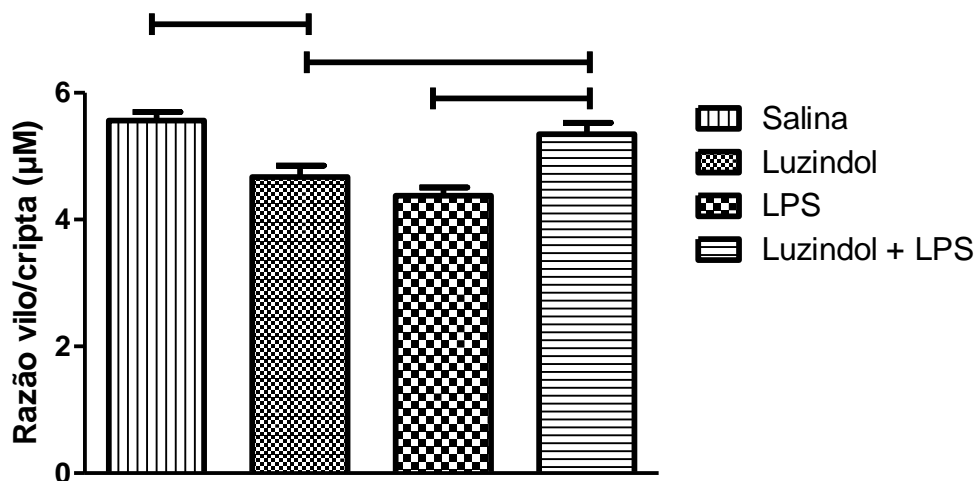
Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

Figura 8. Avaliação morfométrica da profundidade das criptas no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).



Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

Figura 9. Avaliação morfométrica da razão vilo/cripta no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única).

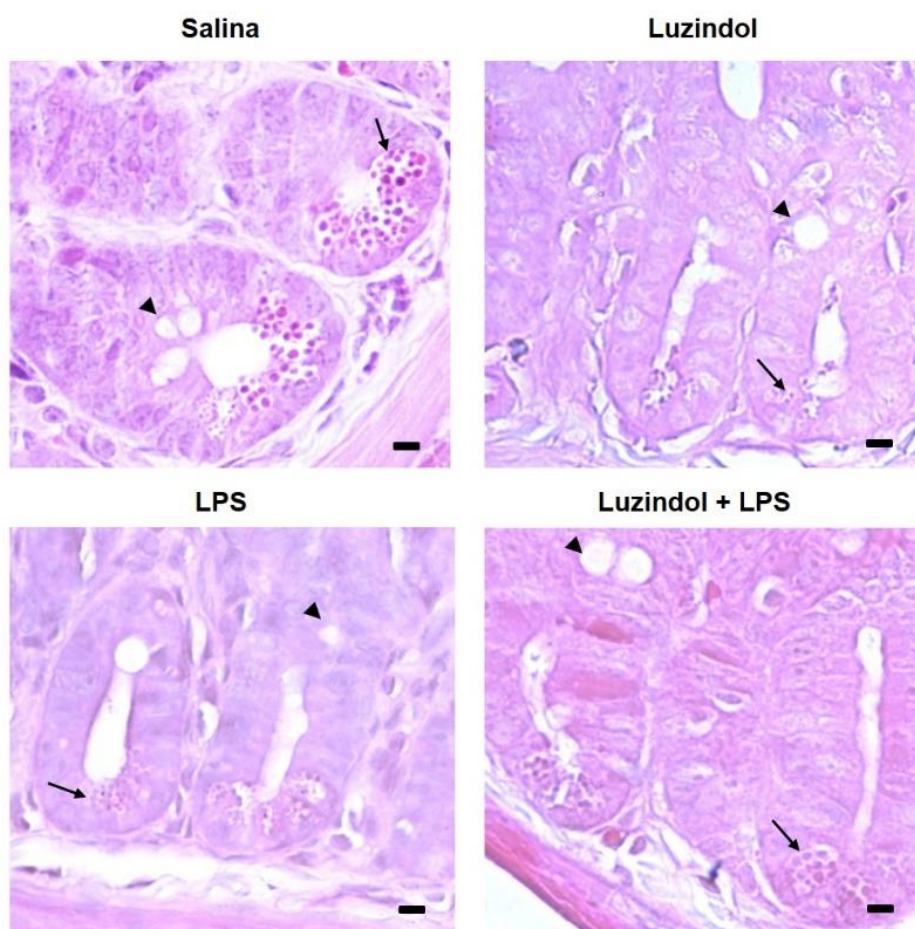


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.2 Avaliação dos escores de criptas necróticas

Os animais do grupo salina foram enquadrados nos critérios para escores de criptas necróticas com grau zero. Os animais do grupo LPS apresentaram escores mais elevados quando comparado ao grupo salina, luzindol e luzindol + LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos salina, luzindol e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 10 e Tabela 1**).

Figura 10. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) corados com H&E (x400). Escala: 20 μ m



Fonte: o autor.

Seta (↘): células de Paneth. Cabeça de seta (◄): células caliciformes

Tabela 1. Avaliação das criptas necróticas no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)

Grupos	Salina	Luzindol	LPS	Luzindol + LPS
Escore	0 (0-0)	0 (0-1)	3 (2-4) ^a	0,5 (0-1)

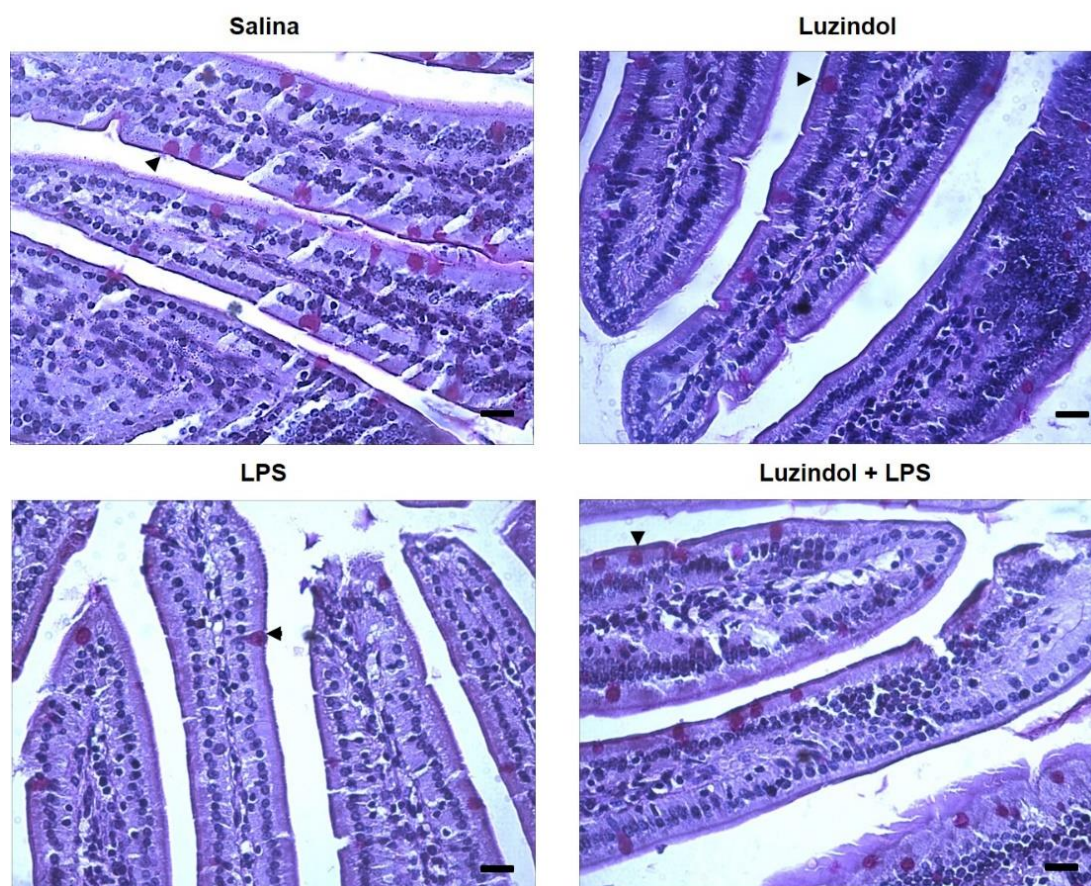
Fonte: o autor.

Os valores apresentam a mediana e a variação (0-4).^a $p < 0,05$ comparado ao salina pelo teste Kruskal-Wallis. Número de animais por grupo (n= 8).

5.3 Determinação de células caliciformes positivas

Observou-se que os grupos luzindol, LPS e luzindol + LPS apresentaram menor quantidade de células caliciformes PAS-positivas quando comparado ao grupo salina. Também foi visto diferença entre os grupos luzindol e LPS, assim como LPS e luzindol + LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos luzindol e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 11 e 12**).

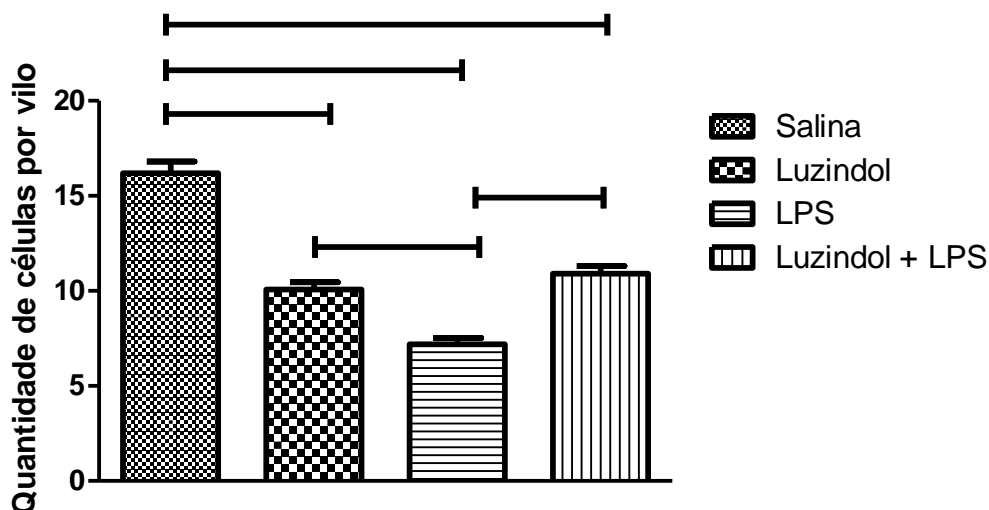
Figura 11. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) marcados com PAS (400x). Escala de 20 μ m



Fonte: o autor.

Cabeça de seta (\blacktriangle): células caliciformes

Figura 12. Quantidade de células caliciformes no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



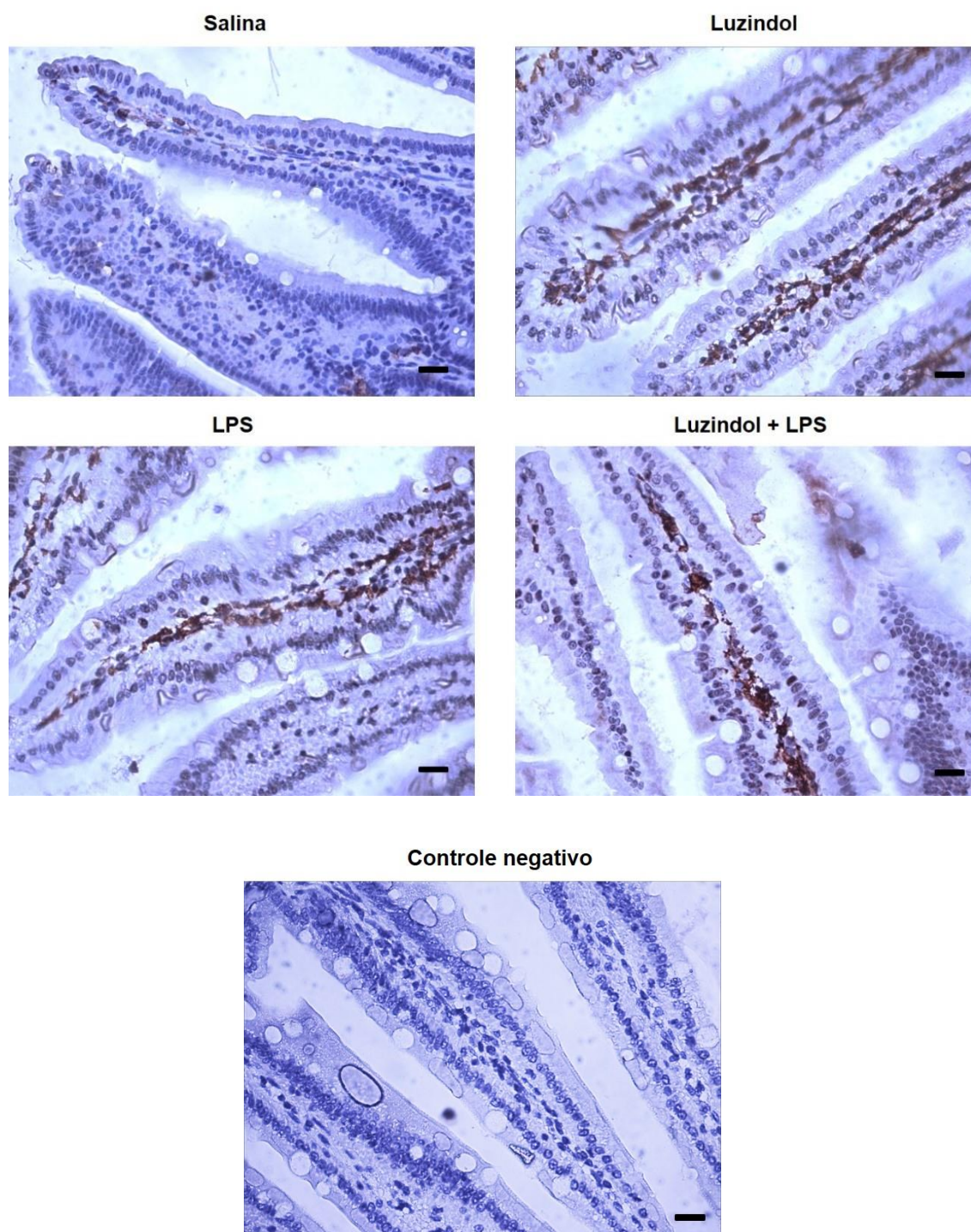
Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 4).

5.4 Avaliação dos marcadores do processo inflamatório

5.4.1 Imunomarcção para Iba-1

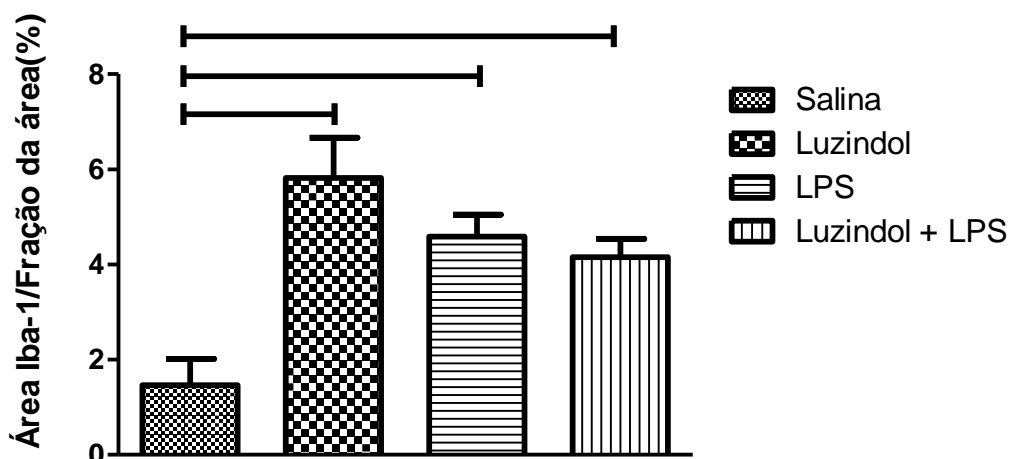
Observou-se que o luzindol, LPS e luzindol + LPS induziram aumento da imunomarcção para Iba-1 no jejuno de camundongos comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos luzindol, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 13 e 14**).

Figura 13. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) marcados Iba-1 (400x). Escala de 20 μ m



Fonte: o autor.

Figura 14. Quantificação da imunomarcção para Iba-1 no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.4.2 Imunomarcção para IL-1 β , TNF- α , NF κ B e iNOS

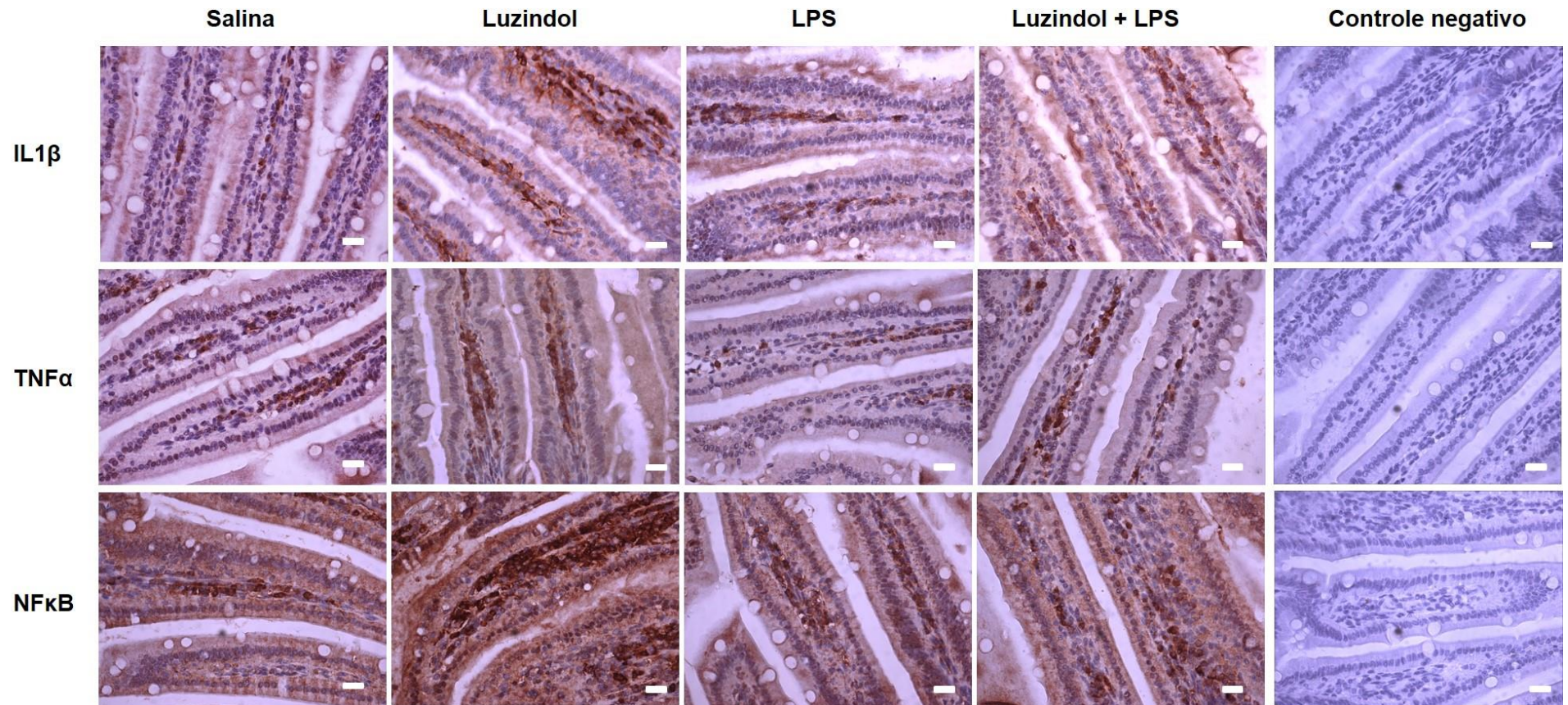
Observou-se uma maior imunomarcção para IL-1 β no grupo luzindol quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos luzindol e os grupos LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$). Também não houve diferença entre os grupos salina, LPS e luzindol + LPS. ($p > 0,05$) (Figura 15 e 16).

Os animais do grupo tratado com luzindol apresentaram uma maior imunomarcção para TNF- α quando comparado aos grupos salina, LPS e luzindol + LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos salina, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (Figura 15 e 17).

A imunomarcção para NF κ B foi maior no grupo luzindol quando comparado aos grupos salina, LPS e luzindol + LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos salina, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (Figura 15 e 18).

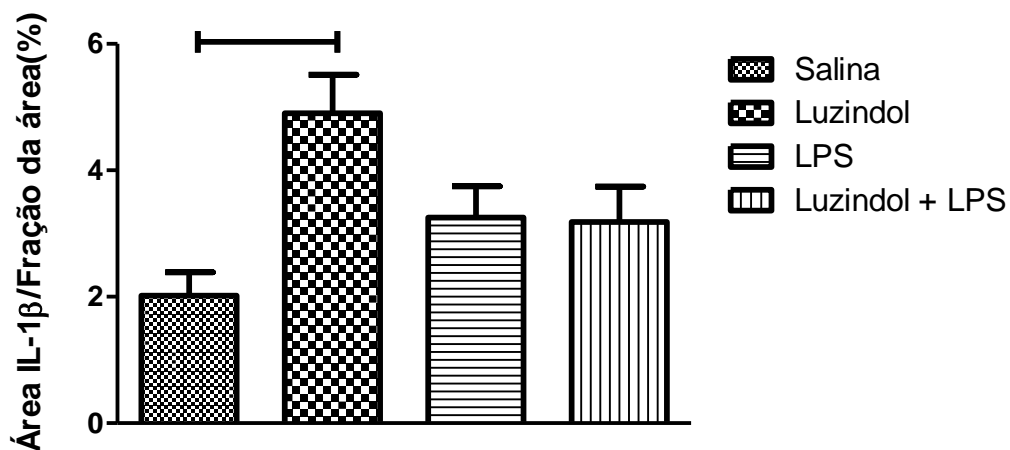
Não foi encontrada diferença na imunomarcção para iNOS entre os grupos salina, luzindol, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (Figura 19).

Figura 15. Fotomicrografias representativas do jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p,dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p,dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p,dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p,dose única) marcados com IL-1 β , TNF- α e NF κ B (400x). Escala de 20 μ m



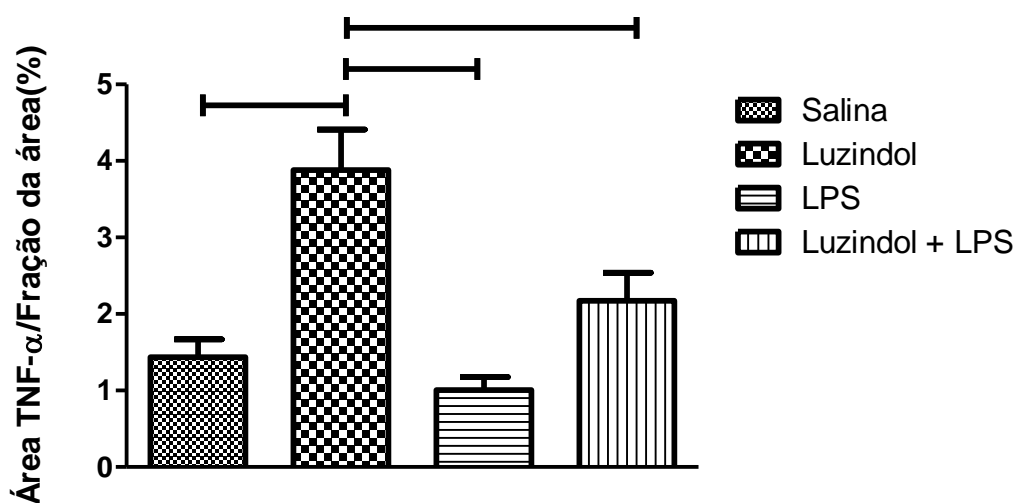
Fonte: o autor.

Figura 16. Quantificação da imunomarcação para IL-1 β no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



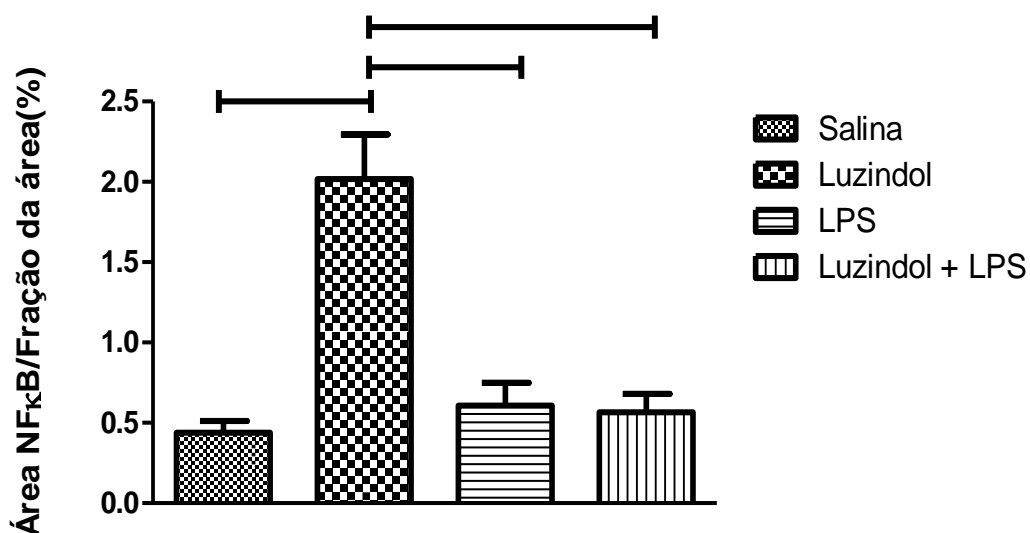
Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 4).

Figura 17. Quantificação da imunomarcação para TNF- α no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



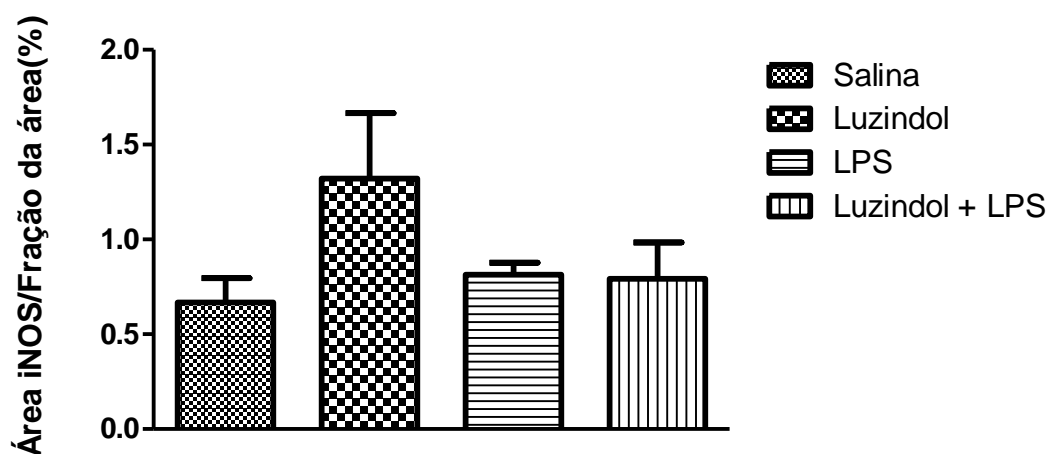
Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 4).

Figura 18. Quantificação da imunomarcação para NFkB no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 4).

Figura 19. Quantificação da imunomarcação para iNOS no jejuno de camundongos Swiss tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)

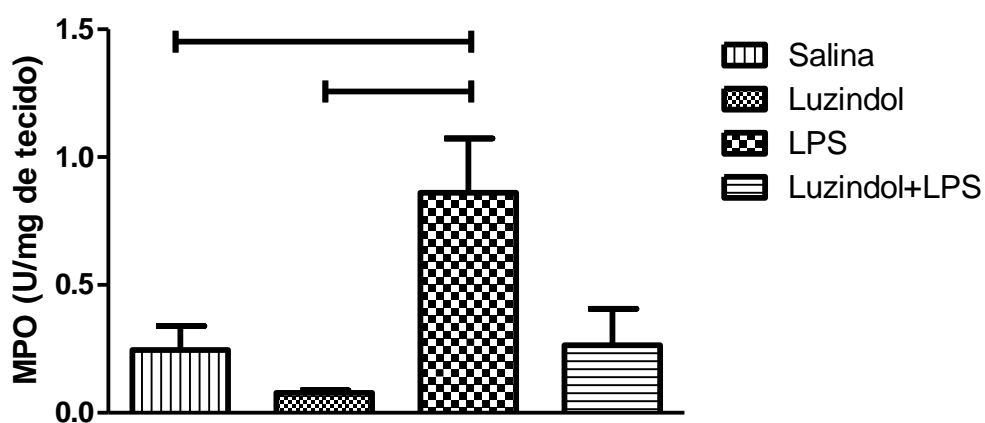


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 4).

5.4.3 Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

Observou-se diferença na atividade enzimática da MPO quando comparado o grupo LPS com os grupos salina e luzindol ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo LPS e luzindol + LPS, assim como também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos salina, luzindol e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 20**).

Figura 20. Atividade enzimática da MPO no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



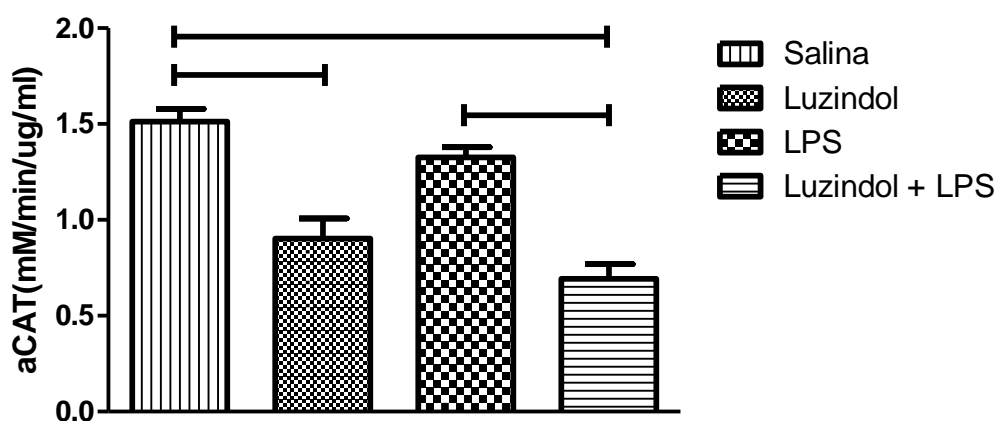
Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.5 Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

5.5.1 Atividade enzimática da catalase (CAT)

Observou-se uma menor atividade da CAT nos grupos luzindol e luzindol + LPS quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). Também foi observado uma menor atividade da CAT no grupo luzindol + LPS quando comparado ao grupo LPS ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos LPS e salina ($p > 0,05$), luzindol e LPS ($p > 0,05$), assim como luzindol e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 21**).

Figura 21. Atividade da enzima CAT no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)

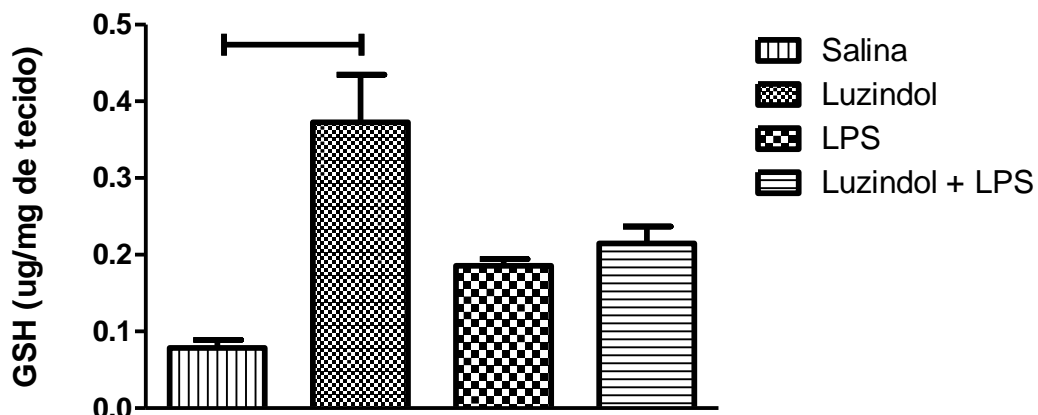


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.5.2 Níveis de glutatona reduzida (GSH)

Observou-se um aumento dos níveis de GSH no grupo luzindol quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos salina, LPS e luzindol + LPS, assim como entre os grupos luzindol, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 22**).

Figura 22. Níveis de GSH no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)

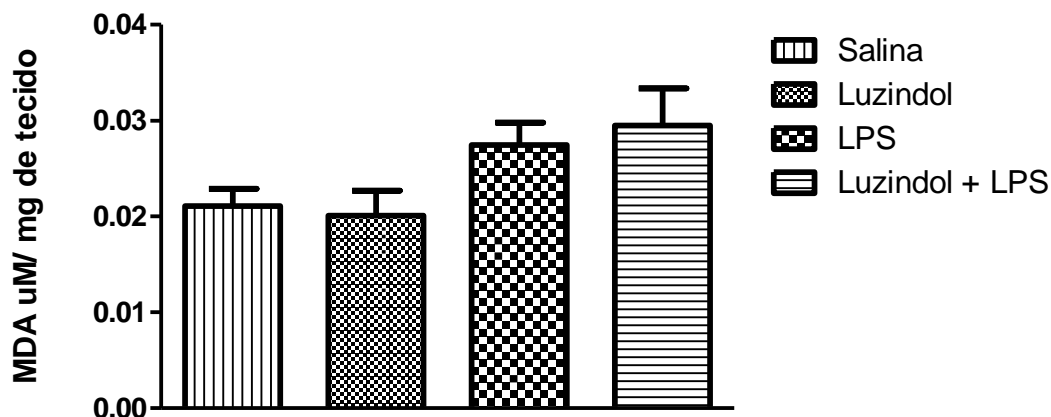


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.5.3 Níveis de malondealdeído (MDA)

Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de MDA entre os grupos salina, luzindol, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 23**).

Figura 23. Níveis de MDA no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)

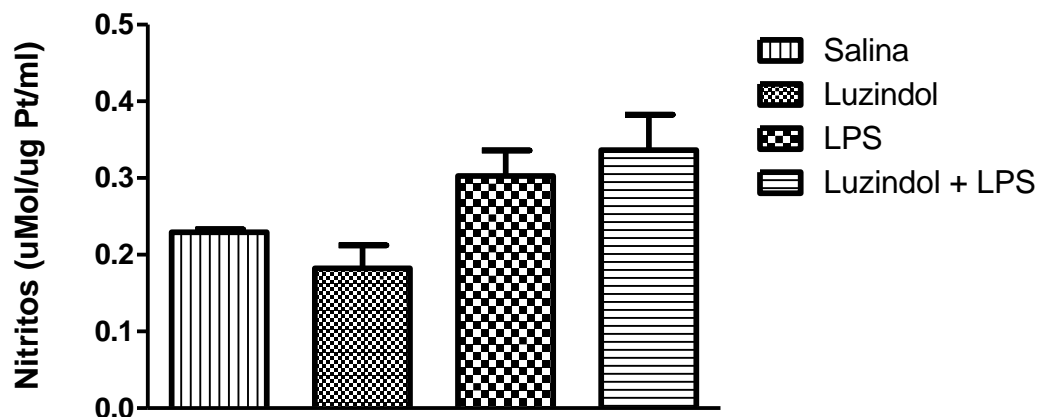


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n= 6).

5.5.4 Níveis de nitrato/nitrito

Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de nitrato/nitrito entre os grupos salina, luzindol, LPS e luzindol + LPS ($p > 0,05$) (**Figura 24**).

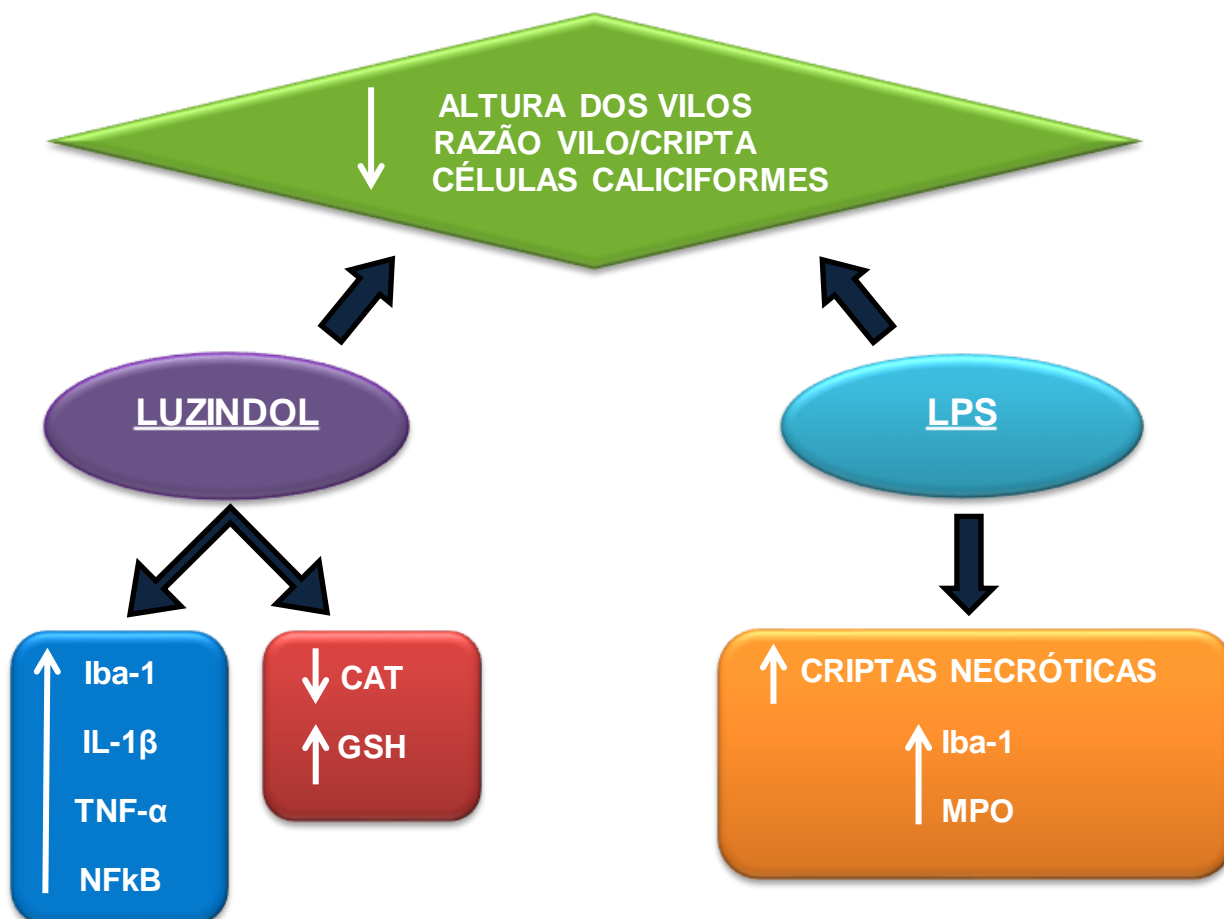
Figura 24. Níveis de nitrato/nitrito no jejuno de camundongos *Swiss* tratados com solução salina (0,35 mg/kg, via i.p), luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única), LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única) e combinação luzindol (0,35 mg/kg, via i.p, dose única) + LPS (1,25 mg/kg, via i.p, dose única)



Os valores foram expressos pela média \pm EPM. Foi utilizado o teste Anova "one way", seguida do pós-teste Bonferroni's. Número de animais por grupo (n=5).

5.6 Síntese dos resultados

Figura 25. Fluxograma dos principais resultados encontrados no estudo



Fonte: Própria

Resumidamente, foi identificado que o luzindol reduziu a altura dos vilos e a relação vilo/cripta; aumentou a imunomarcagem para Iba-1, IL-1 β , TNF- α e NF κ B; reduziu a atividade da CAT e aumentou os níveis do GSH. O tratamento com LPS resultou na redução da altura dos vilos e da relação vilo/cripta; provocou necrose de criptas; aumentou a imunomarcagem para Iba-1; aumentou a atividade da MPO. Iba-1 (Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1); MPO (Mieloperoxidase); IL-1 β (Interleucina-1 beta); TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- alfa); NF κ B (Fator nuclear kB); CAT (Catalase); GSH (Glutaciona reduzida); ↑ (aumento); (aumento mais significativo que o grupo tratado com luzindol); ↓ (redução).

6. DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que o luzindol, o LPS e a combinação luzindol + LPS, administrados agudamente, apresentam efeitos distintos sobre o jejuno de camundongos. A ação do luzindol pode ser compreendida pelo bloqueio dos receptores MT1 e MT2 da MEL endógena, um hormônio fisiológico com efeito anti-inflamatório e antioxidante, existente em altas concentrações no intestino.

No estudo atual, a atividade aguda do LPS sobre o jejuno de camundongos foi avaliada. Essa endotoxina é um componente estrutural da membrana externa das bactérias gram-negativas, muito utilizada em modelos de indução de necrose tecidual e alteração do sistema imunológico (RUAN et al., 2014).

Deve-se ter em mente que a arquitetura dos vilos e das criptas reflete, em parte, a saúde do intestino delgado, visto que, a altura dos vilos proporciona uma maior capacidade de absorção, a partir do aumento da área de contato. E alterações das criptas, como na redução de sua altura, estão associadas à elevada taxa de proliferação de células epiteliais intestinais (HAN et al., 2016).

Após tratamento com luzindol, LPS ou luzindol + LPS foram observadas alterações caracterizadas por redução da altura dos vilos e necrose nas criptas quando comparado ao grupo salina. Apesar desses achados, nota-se que os animais tratados com LPS apresentaram maior comprometimento agudo da mucosa quando comparado aos animais salina, observações estas que corroboram com estudos anteriores (REQUINTINA; OXENKRUG, 2007; SJÖBLOM; JEDSTEDT; FLEMSTRÖM, 2001).

O encurtamento dos vilos induzido pelo LPS está também de acordo com o estudo desenvolvido por Williams et al. (2013), que utilizaram doses diversas (0,125 a 20 mg/kg i.p). Foram observados resultados semelhantes 1,5 e 6 horas após o tratamento. Os efeitos deletérios provocados pelo LPS sobre os parâmetros morfométricos de altura de vilos no intestino delgado são bem reconhecidos (WILLIAMS et al., 2013). Embora, a maioria dos trabalhos descreva uma maior ocorrência desse processo com doses mais elevadas e/ou tempo superior ao usado no presente estudo (LI et al., 2011; RUAN et al., 2014; YANG et al., 2018).

Os animais do grupo luzindol e luzindol + LPS também apresentaram efeitos danosos significativos, apesar de menor proporção quando comparado ao grupo LPS, no que concerne aos parâmetros morfométricos de altura dos vilos e de necrose das criptas.

Também foi observado que os animais tratados com luzindol e LPS apresentaram menor razão vilo/cripta quando comparado ao salina, apesar de não haver alteração na profundidade da cripta. De forma semelhante, Deng et al. (2016), observaram no duodeno, jejuno e íleo de leitões, que o tratamento agudo com LPS (100 mg/kg) causa alterações morfológicas, vistos a partir da atrofia dos vilos e diminuição da razão vilo/cripta, mesmo sem afetar a profundidade da cripta (DENG et al., 2016). O estudo de Han et al. (2016), com ratos tratados com LPS (4 mg/kg) e eutanasiados após 4 horas, demonstrou uma redução dos vilos e da razão vilo/cripta, porém, com maior profundidade da cripta, diferente dos nossos achados (HAN et al., 2016).

A falta de potenciação de lesão da mucosa observada na combinação luzindol + LPS possivelmente envolve mecanismos de ação ainda desconhecidos. Até o presente momento, estudo semelhante avaliando o efeito agudo combinado do luzindol e LPS sobre a mucosa intestinal são escassos para comparação.

Nessa linha, uma mediação através do receptor MT3 pode explicar a ação protetora da MEL endógena e a ausência de potenciação observada nesse modelo. Em concordância parcial, um estudo prévio mostrou que o luzindol não inibiu os efeitos anti-inflamatórios da MEL, sugerindo que a MEL pode atenuar os efeitos da colite através de vias independentes do bloqueio dos receptores MT1 e MT2 (ZIELIŃSKA et al., 2016).

O estudo atual não avaliou a distribuição preferencial de receptores específicos em diferentes segmentos do intestino. Os receptores MT (MT1, MT2 e MT3) são encontrados no intestino (CHEN et al., 2011). Apresentam uma variedade e especificidade regional e celular acrescentando à complexidade da sua sinalização (ANISIMOV; POPOVIC, 2004).

Previamente, foi visto que o receptor MT1 apresenta maior expressão no duodeno quando comparado ao jejuno e íleo (ANISIMOV; POPOVIC, 2004). Isso pode ser explicado através da “espécie específico”, pois no intestino de patos, foi mostrado

que os locais de ligação, diferentemente, apresentam a seguinte ordem decrescente de densidade: íleo e jejuno > duodeno e cólon > ceco (LEE; PANG, 1993).

Foi demonstrado ainda que a distribuição subcelular da ligação da MEL é maior na fração nuclear seguida das frações microssômicas e mitocondriais e as densidades mais baixas na fração citosólica (PARIENTE et al., 2017).

A MEL pode também atuar diretamente sobre proteínas intracelulares como a calmodulina, calreticulina e/ou tubulina, reafirmando a versatilidade desse hormônio ancestral e a necessidade de mais estudos sobre o assunto (BENÍTEZ-KING, 2006; MACÍAS et al., 2003).

A superfície apical do epitélio intestinal é revestida por um componente viscoelástico rico em carboidratos complexos, chamado de muco, que pode ser secretado pelas células caliciformes. Esse muco, em forma de gel, atua como uma importante barreira física, proporcionando proteção contra agentes invasores, como bactérias gram-negativas (HOFFMANN, 2005; PIÉ et al., 2004).

No presente estudo, as células caliciformes foram quantificadas a partir da imunomarcagem com PAS, que detecta complexo glicoproteico de mucina. Observou-se que os grupos tratados com luzindol, LPS e luzindol + LPS apresentaram menor quantidade de células caliciformes quando comparado ao grupo salina. De forma contrária, o estudo de Han et al. (2016) observou que ratos tratados com LPS (4 mg/kg) não apresentaram diferença estatística no número de células caliciformes quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, um estudo com embriões de frango demonstrou que o tratamento com MEL resultou no aumento da população de células caliciformes (LI et al., 2017).

Nos animais tratados com luzindol, a imunomarcagem para Iba-1, uma proteína específica para microglia/macrófagos, foi mais acentuada quando comparada ao grupo salina. O aumento da marcação pela Iba-1 também foi constatada nos grupos tratados com LPS e luzindol+LPS.

O aumento da imunomarcagem por Iba-1 associada ao luzindol indica que o mesmo, através de um bloqueio dos receptores MT1 e MT2 da MEL, aumentou o recrutamento de células imunes do tipo macrófagos. Em corroboração aos nossos achados, estudo anterior utilizando a MEL por tempo mais prolongado, até 3 horas, após o uso de LPS, mostrou que esse hormônio reduziu as alterações da

microvasculatura intestinal e da inflamação, provavelmente, por uma redução do recrutamento local de células imunes (LANSINK et al., 2017).

Dado que os escores de criptas necróticas foram maiores no grupo LPS e a imunomarcagem para Iba-1 foi mais predominante no grupo luzindol, pode-se teorizar que nesse modelo agudo, o LPS produziu mais lesão tecidual e o luzindol mais alteração imune. Em acordo com estudo anterior, todos os tratamentos apresentaram toxicidade para a mucosa intestinal expressa no conjunto dos achados (TRIVEDI; JENA, 2013) .

Apesar dos resultados apresentados confirmarem que o tratamento agudo com luzindol e LPS resultam em toxicidade para a mucosa intestinal, a combinação luzindol+LPS nem sempre foi potenciada. Pode ser argumentado que a atividade protetora da MEL não é inteiramente bloqueada pelo luzindol. A MEL endógena pode agir através de outros mecanismos já identificados e independente da ação de receptores e, portanto, teria atividade apesar do bloqueio de MT1 e MT2. Estudos anteriores confirmam que a atividade da MEL tanto depende do receptor específico quanto parte das suas ações são mediadas de forma independente do receptor (LI et al., 2017; WINCZYK et al., 2009; ZIELIŃSKA et al., 2016).

Em corroboração ao exposto anteriormente, um estudo prévio relata que a MEL tem a sua atividade parcialmente justificada por uma ação modulatória sobre a liberação de 5-hidroxitriptamina na mucosa colônica (KOJIMA; TOHEI; IKEDA, 2011).

Além disso, a ação da MEL em um órgão específico é influenciada por fatores diversos, como a idade do animal ou indivíduo (THOR et al., 2007). Uma interação com oligoelementos já foi relatada anteriormente (POPOVIĆ et al., 2018). Diversos fatores como a especificidade do órgão estudado e a duração da exposição influenciam as ações da MEL e, por consequência, os efeitos após o bloqueio com luzindol.

Após a aplicação do luzindol, observou-se um efeito pró-oxidante e pró-inflamatório registrado através de diversos marcadores específicos. Nesse estudo, o uso do luzindol de forma aguda causou efeitos imediatos e profundos sobre a atividade inflamatória e antioxidante da mucosa intestinal, semelhante a relatos anteriores (REQUINTINA; OXENKRUG, 2007).

Nesse estudo, a atividade inflamatória foi examinada através dos níveis de IL-1 β , TNF- α , NF κ B, iNOS e MPO. O grupo tratado com luzindol apresentou aumento da IL-1 β assim como TNF- α , um regulador da cascata de citocinas, e NF κ B.

Utilizando um modelo agudo semelhante ao desse estudo, porém, com doses mais elevadas (30mg/kg), um estudo demonstrou que em camundongos C57BL/6, o LPS promoveu níveis elevados de citocinas com apenas uma hora entre o desafio e o sacrifício (YANG et al., 2018).

Nesse trabalho, o aumento pronunciado e consistente das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e também NF κ B, no grupo tratado com luzindol está em concordância com os efeitos protetores da MEL que se associam com a inibição da NF κ B e redução da expressão de citocinas (FERNANDEZ-GIL et al., 2017).

De forma semelhante, um estudo avaliando a mucosite induzida por radiação, apresentou aumento da atividade da NF κ B e inibição desse efeito pela MEL. Os autores demonstraram que na mucosite também ocorre dano na mitocôndria e nas proteínas juncionais. Deve ser ressaltado que a IL-1 β é um dos mediadores inflamatórios, largamente, liberado durante uma lesão da mucosa. Recentemente, foi demonstrado que a ativação da ASC/caspase-1 e consequente produção da IL-1 β é fundamental na mucosite associada à radiação. O fato de que a MEL inibe essa mucosite é um achado importante para os pacientes que sofrem com frequência desse distúrbio grave (FERNANDEZ-GIL et al., 2017).

A ação do LPS, ora demonstrada, pode relacionar-se com o fato de que apenas o efeito agudo foi testado. Estudo anterior mostra que a maior atividade do LPS pode ocorrer nos momentos iniciais pós exposição (YANG et al., 2018). Em oposição, Xia et al. (2012), utilizando 2 μ g/mL de LPS, em cultura de células, observaram que os níveis de IL-1 β foram maiores após maior tempo decorrido (6h) do que tempos mais curtos (2h), apesar do TNF- α se comportar de forma contrária (XIA et al., 2012). Portanto, o tempo decorrido após o tratamento influencia os níveis de marcadores de forma complexa e isso pode ser “órgão específico”.

Nos grupos estudados, não houve diferença na imunomarcação para iNOS no jejuno. O iNOS, pode ser expresso a partir de uma resposta inflamatória local ou difusa diante de algum dano tecidual. Nesse estudo não houve diferença entre os grupos, apesar de uma tendência de maior elevação no grupo luzindol. Em concordância

parcial, Xia et al. (2012), mostraram que o tratamento com LPS induziu uma maior imunomarcção para iNOS que foi superior após 6h quando comparado após 2h (XIA et al., 2012).

O infiltrado neutrofílico, mensurado pela atividade da enzima MPO, foi diferente no grupo LPS quando comparado ao salina e luzindol. Em parcial concordância com os resultados aqui encontrados, Li et al. (2011) observaram que camundongos desafiados com LPS na dose de 18 mg/kg e sacrificados 12 horas após injeção apresentam elevações da MPO em comparação ao grupo salina. Zielinska et al. (2016), utilizando uma dose superior ao presente estudo evidenciou que o luzindol (5 mg/kg, i.p) administrado 15 min antes da MEL aumentou a atividade da MPO no intestino de camundongos (LI et al., 2011; ZIELIŃSKA et al., 2016).

No trabalho atual, a seleção do intestino como órgão alvo para a investigação deveu-se ao fato de que o TGI tem uma alta concentração de MEL, em concentrações superiores a glândula pineal. Tal característica sugere que a MEL exerce papel fundamental na estrutura e função do intestino. Na verdade, esse hormônio parece desempenhar uma influência sobre as doenças gastrointestinais acompanhadas de inflamação (POZO et al., 2010).

De maneira geral e com uma certa frequência, fenômenos não totalmente compreendidos ocorrem nas terapias. Por exemplo, um ensaio clínico utilizando a MEL na síndrome/doença do cólon irritável evidenciou uma melhora na qualidade de vida e redução de sintomas dolorosos mas não mostrou efeitos sobre a motilidade intestinal e reação anti-inflamatória (SIAH; WONG; HO, 2014). Tais achado clínicos apontam para a complexidade dos efeitos da MEL.

Recentemente, usando mucosa intestinal de embriões de frangos, foi demonstrado que o tratamento com MEL aumentou a população de células caliciformes do epitélio, a expressão de mucinas, a migração do epitélio e as funções absorptivas do intestino delgado envolvendo a expressão de receptores NOTCH (LI et al., 2017). Mais uma vez a ação da MEL não parece depender somente da mediação de receptores.

Previamente, no estudo realizado por Li et al. (2018), a MEL, administrada durante duas semanas, apresentou um efeito atenuante da inflamação induzida pelo LPS. Observou-se uma redução da permeabilidade ao dextran e um aumento das

junções de adesão refletindo uma melhor resposta da barreira juncional. Esse efeito foi mediado pela inativação Rac induzida por melhores níveis de IL-1 β (LI et al., 2018).

No presente estudo, os efeitos do luzindol foram estudados 90 minutos após a sua administração. No geral, os trabalhos que avaliam a administração de MEL utilizam um tempo prolongado. Liu et al. (2017) mostraram que o uso de MEL em frangos na dose de 0.625 mg/kg durante duas semanas resultou no aumento da produção de ovos. Em várias outras circunstâncias, a administração da MEL, examinando seus efeitos sobre a mucosa intestinal, tem sido realizada de forma prolongada (DRAGO; MACAUDA; SALEHI, 2002; LI et al., 2017).

Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, o trabalho atual mostra que nos grupos tratados com luzindol e luzindol + LPS, a enzima antioxidante CAT apresentou menor atividade que no grupo salina. Também pode ser visto que o GSH foi mais elevado no grupo luzindol comparado ao salina.

Uma possível explicação para a redução da atividade da CAT nos grupos luzindol e luzindol + LPS pode estar relacionado aos efeitos danosos causados por essas substâncias à mucosa, podendo assim, reduzir fatores protetores, como o muco e a CAT, por exemplo. Efeitos similares foram vistos no estômago de ratos submetidos ao uso de etanol (SIEGMUND et al., 2003).

Além disso, resultados entre os marcadores enzimáticos de estresse oxidativo nem sempre são obtidos de forma inteiramente consonante. Estudos anteriores avaliaram isso através da possível influência de oligoelementos, na expressão dos marcadores de estresse oxidativo CAT e GSH (LOUI et al., 2010).

Também foi observado que não houve alterações significativas de produtos de peroxidação lipídica entre os grupos, mensurado a partir dos níveis de MDA.

Um estudo *in vitro* analisou o efeito do luzindol sobre a peroxidação lipídica induzida pelo LPS (400 mg/mL). Os autores observaram que diferentes concentrações de luzindol (50-800 μ M) foi capaz de inibir a formação de MDA e esse efeito foi dose dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior a inibição (REQUINTINA; OXENKRUG, 2007). De forma contrária, um estudo com ratos observou que a dose de luzindol (0,25 mg/kg i.p), em três diferentes tempos (30 min, 6h e 12h), administradas após a indução da colite reverteu o efeito protetor da MEL, apesar de não alterar os níveis de MDA e GSH (DRAGO; MACAUDA; SALEHI, 2002).

Tais resultados sugerem que as variações de medidas da peroxidação lipídica, assim como alguns resultados referentes a sinais do estresse oxidativo nem sempre se apresentam em total consonância. Isso também pode estar relacionado ao efeito agudo que não foi suficiente para induzir estresse oxidativo.

No presente estudo não foram observadas alterações significativas dos níveis de nitrato/nitrito, um marcador endógeno de óxido nítrico (NO). Isso também pode ser estar relacionado ao pouco tempo entre o desafio e o sacrifício, e principalmente, com a dose utilizada insuficiente para promover uma alteração significativa. Diferente disso, Theobaldo et al. (2012), utilizando LPS em diferentes tempos (1,5h, 8h e 24h), observaram que os níveis NO no intestino foram superiores no primeiro momento quando comparado aos demais, com dose de 10 mg/kg via i.p em ratos (THEOBALDO et al., 2012).

Limitações do estudo devem ser reconhecidas. Esse estudo avaliou apenas os efeitos agudos do luzindol e do LPS. Possivelmente, uma comparação entre efeitos agudos e uma ação prolongada forneceria maiores informações.

7. CONCLUSÕES

O estudo atual diferencia-se de estudos anteriores pois avalia efeitos agudos e isolados do LPS e do luzindol sobre a mucosa intestinal. Portanto, tanto quanto pudemos avaliar, é um estudo original. Esse trabalho mostra que o bloqueio agudo da MEL através do luzindol associa-se a alterações morfológicas e de marcadores inflamatórios e pró-oxidantes de curto prazo. Tais achados comprovam o efeito essencial e imediato da MEL como reguladora da homeostase da mucosa intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, E. et al. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **NeuroReport**, v. 10, n. 8, p. 1799–1800, 1999.

ANISIMOV, S. V.; POPOVIC, N. Genetic aspects of melatonin biology. **Reviews in the Neurosciences**, v. 15, n. 3, p. 209-230, 2004.

ARAÚJO, C. V. et al. Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 6, p. 493-501, 2015.

ATES, B. et al. Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage. **Journal of Pineal Research**, v. 37, n. 3, p. 149–152, 2004.

BECKER, C. E.; O'NEILL, L. A. J. Inflammasomes in inflammatory disorders: The role of TLRs and their interactions with NLRs. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 3, p. 239-248, 2007.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–140, 1952.

BENITEZ-KING, G. et al. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 1, p. 151–159, 2003.

BENÍTEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: Implications for cell physiology and disease. **Journal of Pineal Research**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2006.

BERNARD, M. et al. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. **Reproduction, nutrition, development**, v. 39, n. 3, p. 325–334, 1999.

BOUDRY, G. et al. Effect of Milk Formula Protein Content on Intestinal Barrier Function in a Porcine Model of LBW Neonates. **Pediatric Research**, v. 69, n. 1, p. 4-9, 2011.

BOURNE, R. S.; MILLS, G. H. Melatonin: Possible implications for the postoperative and critically ill patient. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 3, p. 371-379, 2006.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

- BRANDENBURG, K.; SCHROMM, A. B.; GUTSMANN, T. Endotoxins: Relationship between structure, function, and activity. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 53–67, 2010.
- BREALEY, D. et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 219-223, 2002.
- BRZOZOWSKI, T. et al. The role of melatonin and L-tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress, ethanol, ischemia, and aspirin. **Journal of pineal research**, v. 23, n. 2, p. 79–89, 1997.
- BUBENIK, G. A. et al. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. **Brain Research**, v. 81, n. 2, p. 233–242, 1974.
- BUBENIK, G. A. et al. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. **Journal of Pineal Research**, v. 26, n. 1, p. 56–63, 1999.
- BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. **Digestive Diseases and Sciences**, v.47, n. 10, p. 2336-2348, 2002.
- BUBENIK, G. A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, p. 33-51, 2008.
- BUBENIK, G. A.; BROWN, G. M. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. **NeuroSignals**, v. 6, n. 1, p. 40–44, 1997.
- BUELNA-CHONTAL, M.; ZAZUETA, C. Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword? **Cellular Signalling**, v. 25, n. 12, p. 2548-2557, 2013.
- CARDINALI, D. P. et al. Melatonin site and mechanism of action: Single or multiple? **Journal of Pineal Research**, v. 23, n. 1, p. 32–39, 1997.
- CARDINALI, D. P. et al. Melatonin effects on bone: Experimental facts and clinical perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 2, p. 81-87, 2003.
- CARDINALI, D. P.; ROSNER, J. M. Retinal localization of the hydroxyindole-o-methyl transferase (hiomt) in the rat. **Endocrinology**, v. 89, n. 1, p. 301–303, 1971.
- CARNEIRO-FILHO, B. A. et al. Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate-Induced Rat Intestinal Mucositis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 1, p. 65–72, 2004.
- CARNEIRO, R. C. G. et al. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 257, n. 1-2, p. 73-77, 1994.

CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.

CARRILLO-VICO, A et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 10, p. 2272–8, 2003.

CARTON, Y.; NAPPI, A. J. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of drosophila against parasitoids. **Immunogenetics**, v. 52, n. 1-3, p. 157-164, 2001.

CARVALHO, P. R. A; TROTTA, E. D. A. Advances in sepsis diagnosis and treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p.195-204, 2003.

CHAMPIER, J. et al. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. **Life Sci**, v. 60, n. 24, p. 2191–2197, 1997.

CHEN, C. Q. et al. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 34, p. 3888–3898, 2011.

CHUFFA, G. G. A. et al. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, 2015.

CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, 2015.

DE MEY, J. R.; FREUND, J.-N. Understanding epithelial homeostasis in the intestine. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 2, p.24965, 2013.

DENG, Q. H. et al. The prolonged effect of glucagon-like peptide 2 pretreatment on growth performance and intestinal development of weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, p. 28, 2016.

DI BELLA, L.; GUALANO, L. Key aspects of melatonin physiology: thirty years of research. **Neuro endocrinology letters**, v. 27, n. 4, p. 425-432, 2006.

DOBROVOLSKAIA, M. A et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappa B signaling pathway components. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 508-519, 2003.

DONG, W. G. et al. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 6, p. 1307-1311, 2003.

DRAGO, F.; MACAUDA, S.; SALEHI, S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 9, p. 1969–1974, 2002.

DUBOCOVICH, M. L. et al. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel(1a) and Mel(1b) recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML(1) presynaptic heteroreceptor. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 355, n. 3, p. 365–375, 1997.

DUBOCOVICH, M. L. et al. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB Journal**, v. 12, n. 12, p. 1211–20, 1998.

EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60, n. 3, p. 97–108, 2006.

ERRIDGE, C. et al. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286–1292, 2007.

ESPOSITO, E. et al. Matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2 activity and expression is reduced by melatonin during experimental colitis. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 2, p. 166-173, 2008.

FERNANDEZ-GIL, B. et al. Melatonin protects rats from radiotherapyinduced small intestine toxicity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 242- 253, 2009.

GALANO, A. et al. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: A physicochemical analysis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 107–116, 2015.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245-257, 2013.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. **RSC Advances**, v. 4, n. 10, p. 5220–5227, 2014.

GAO, D.; LI, W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. **Proteins**, v. 85, n. 1, p. 3-9, 2017.

GARCÍA, J. J. et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 408, n. 3, p. 297–300, 1997.

GARCÍA, J. J. et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: A review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 3, p. 225-237, 2014.

GOOLEY, J. J. et al. Exposure to room light before bedtime suppresses melatonin onset and shortens melatonin duration in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 3, p. 463-472, 2011.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUO, S. et al. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 2, p. 375–387, 2013.

HAN, C. et al. The Role of Probiotics in Lipopolysaccharide-Induced Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 2464–2478, 2016.

HIROTANI, Y. et al. Protective effects of lactoferrin against intestinal mucosal damage induced by lipopolysaccharide in human intestinal Caco-2 cells. **Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 128, n. 9, p. 1363–8, 2008.

HOFFMANN, W. TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 24, p. 2932-2938, 2005.

HRNCIR, T. et al. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: Studies in germ-free mice. **BMC Immunology**, v. 9, 2008.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 1349–1353, 1981.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 665-670, 1993.

HUSSON, I. et al. Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. **Annals of Neurology**, v. 51, n. 1, p. 82–92, 2002.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 11-12, p. 1723-1729, 2004.

KASIMAY, Ö. et al. Exogenous melatonin delays gastric emptying rate in rats: Role

of CCK 2 and 5-HT₃ receptors. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 543–553, 2005.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of intestinal absorption and secretion. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 2, p. 145-159, 2016.

KIESSLICH, R. et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 61, n. 8, p. 1146-1153, 2012.

KOJIMA, S.-I.; TOHEI, A.; IKEDA, M. Melatonin inhibits tachykinin NK 2 receptor-triggered 5-HT release from guinea pig isolated colonic mucosa. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, p. 1179, 2011.

LANSINK, M. O. et al. Melatonin reduces changes to small intestinal microvasculature during systemic inflammation. **The Journal of surgical research**, v. 211, p. 114–125, maio 2017.

LARANJEIRA-SILVA, M. F. et al. Melatonin attenuates Leishmania (L.) amazonensis infection by modulating arginine metabolism. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 478–487, 2015.

LEE, K. M. et al. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 3375–3381, 2004.

LEE, P. P.; PANG, S. F. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. **Biol Signals**, v. 2, n. 4, p. 181-193, 1993.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.

LI, H. M. et al. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via alpha 2 adrenoceptor-independent mechanisms. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 11, p. 1364–1372, 2011.

LI, J. et al. Effect of melatonin on renewal of chicken small intestinal mucosa. **Poultry Science**, v. 96, n. 8, p. 2942–2949, 2017.

LI, R. X. et al. Attenuating effect of melatonin on lipopolysaccharide-induced chicken small intestine inflammation. **Poultry science**, v. 97, n. 7, p. 2295–2302, jul. 2018.

LIU, C. et al. Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. **Cell and tissue research**, v. 315, n. 2, p. 197–201, 2004.

LIU, J. et al. MT 1 and MT 2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, p. 8.1-8.23, 2016.

LIU, J. J. et al. Mind the gaps: Confocal endomicroscopy showed increased density of small bowel epithelial gaps in inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 3, p. 240-245, 2011.

LIU, S. et al. Melatonin prevents neural tube defects in the offspring of diabetic pregnancy. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 508–517, 2015.

LOUI, A. et al. Trace elements and antioxidant enzymes in extremely low birthweight infants. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 24, n. 2, p. 111-118, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MACÍAS, M. et al. Calreticulin-melatonin: An unexpected relationship. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 5, p. 832- 840, 2003.

MAITRA, U. et al. Molecular Mechanisms Responsible for the Selective and Low-Grade Induction of Proinflammatory Mediators in Murine Macrophages by Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 1014–1023, 2012.

MAKOVEC, F. et al. Pharmacological properties of lorglumide as a member of a new class of cholecystokinin antagonists. **Arzneimittel-Forschung**, v. 37, n. 11, p. 1265–8, 1987.

MALDONADO, M. D. et al. Possible Involvement of the Inhibition of NF- κ B Factor in Anti-Inflammatory Actions That Melatonin Exerts on Mast Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1926–1933, 2016.

MANOCHA, M.; KHAN, W. I. Serotonin and GI disorders: An update on clinical and experimental studies. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 3, n. 4, p. 13, 2012.

MARTIROSYAN, A. et al. Lipopolysaccharides with Acylation Defects Potentiate TLR4 Signaling and Shape T Cell Responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

MEI, Q. et al. Melatonin reduces colon immunological injury in rats by regulating activity of macrophages. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 10, p. 882-886, 2002.

MOZAFFARI, S.; ABDOLLAHI, M. Melatonin, a promising supplement in inflammatory bowel disease: a comprehensive review of evidences. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4372-4378, 2011.

MULDER, H. et al. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel

type 2 diabetes gene. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1240–1249, 2009.

NAIK, E.; DIXIT, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 3, p. 417–420, 2011.

NDUHIRABANDI, F.; DU TOIT, E. F.; LOCHNER, A. Melatonin and the metabolic syndrome: A tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? **Acta Physiologica**, v. 205, n. 2, p. 209-223, 2012.

NEVES, A. L. et al. Metabolic endotoxemia: A molecular link between obesity and cardiovascular risk. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 2, p. 51-64, 2013.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, 2003.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G.A.C. **Sistema digestório: integração básico-clínica**. 1ª edição, cap.12, p. 289-290, 2016.

OXENKRUG, G. F.; REQUINTINA, P. J. N-acetyldopamine inhibits rat brain lipid peroxidation induced by lipopolysaccharide. **New York Academy of Sciences**, v. 1053, p. 394, 399, 2005.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335-353, 2008.

PAPPOLLA, M. A. et al. The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer β -protein are not mediated by melatonin membrane receptors. **Journal of Pineal Research**, v. 32, n. 3, p. 135–142, 2002.

PARIENTE, R. et al. Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 985-998, 2017.

PARIHAR, A. et al. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 34, n. 1, p. 6-17, 2008.

PARLATO, M.; YERETSSIAN, G. NOD-like receptors in intestinal homeostasis and epithelial tissue repair. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9594-9627, 2014.

PERREAU-LENZ, S. et al. In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 130, n. 3, p. 797-803, 2005.

PIÉ, S. et al. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of

Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. **Nutritional immunology**, v. 134, n. 3, p. 641-647, 2004.

PIRES, A. L. G.; SILVEIRA, T. R. DA; SILVA, V. D. DA. Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente and malnourished children with persistent diarrhea. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 4, p. 329–336, 2003.

POIREL, V. J. et al. MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. **Neuroendocrinology Letters**, v. 24, n. 1–2, p. 33–38, 2003.

POPOVIĆ, B. et al. The influence of ageing on the extrapineal melatonin synthetic pathway. **Experimental gerontology**, v. 110, p. 151–157, set. 2018.

POZO, M. J. et al. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological conditions and aging. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4150–65, 2010.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, 2002.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Meta-analysis technique confirms the effectiveness of anti-TNF-alpha in the management of active ulcerative colitis when administered in combination with corticosteroids. **Med Sci.Monit.**, v. 13, n. 7, p. 13-18, 2007.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 6, p. 444-458, 2000.

REITER, R. J. et al. Neurally-mediated and neurally-independent beneficial actions of melatonin in the gastrointestinal tract. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 54, p. 113-125, 2003.

REQUINTINA, P. J.; OXENKRUG, G. F. Effect of luzindole and other melatonin receptor antagonists on iron- and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1122, p. 289–294, 2007.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

RUAN, Z. et al. Chlorogenic acid decreases intestinal permeability and increases expression of intestinal tight junction proteins in weaned rats challenged with LPS. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 16981-17004, 2015.

SANTELLLO, F. H. et al. Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 3, p. 291–296, 2008.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. ANALYSIS OF INFLAMMATION. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 93–151, 2006.

SCHOLTENS, R. M. et al. Physiological melatonin levels in healthy older people: A systematic review. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 86, p. 20-27, 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1968.

SIAH, K. T. H.; WONG, R. K. M.; HO, K. Y. Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 10, p. 2492–2498, 2014.

SIEGMUND, S. et al. Animal models in gastrointestinal alcohol research - A short appraisal of the different models and their results. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular Mechanics and Dynamics of Leukocyte Recruitment During Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 151–185, 2005.

SIMONNEAUX, V. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SJÖBLOM, M.; JEDSTEDT, G.; FLEMSTRÖM, G. Peripheral melatonin mediates neural stimulation of duodenal mucosal bicarbonate secretion. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 4, p. 625–33, ago. 2001.

SLOMINSKI, A. et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **The FASEB journal**, v. 16, n. 8, p. 896–898, 2002.

SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 125-166, 2012.

SÖDERQUIST, F.; HELLSTRÖM, P. M.; CUNNINGHAM, J. L. Human gastroenteropancreatic expression of melatonin and its receptors MT1 and MT2. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

SOMMANSSON, A. et al. Long-term oral melatonin administration reduces ethanol-induced increases in duodenal mucosal permeability and motility in rats. **Acta**

Physiologica, v. 212, n. 2, p. 152–165, 2014.

SOMMANSSON, A.; NYLANDER, O.; SJÖBLOM, M. Melatonin decreases duodenal epithelial paracellular permeability via a nicotinic receptor-dependent pathway in rats in vivo. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 282–291, 2013.

SONG, G. H. et al. Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: A randomised, double blind, placebo controlled study. **Gut**, v. 54, n. 10, p. 1402–1407, 2005.

STUMPF, I.; MÜHLBAUER, E.; PESCHKE, E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic β -cells. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 3, p. 318–327, 2008.

SUGAWARA, T. et al. The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 39, n. 12, p. 2458–2465, 1998.

SUGDEN, D. et al. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: A moving story. **Pigment Cell Research**, v. 17, n. 5, p. 454-460, 2004.

TAHAN, G. et al. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 3, p. 715-720, 2011.

TÄHKÄMÖ, L.; PARTONEN, T.; PESONEN, A.-K. Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. **Chronobiology International**, v. 00, n. 00, p. 1–20, 2018

TEKBAS, O. F. et al. Melatonin as an antibiotic: New insights into the actions of this ubiquitous molecule. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 2, p. 222–226, 2008.

THEOBALDO, M. C. et al. Hypertonic saline solution reduces the inflammatory response in endotoxemic rats. **Clinics**, v. 67, n. 12, 2012.

THOR, P. J. et al. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, p. 97-103, 2007.

TRAN, AX; WHITFIEL, C. Lipopolysaccharides (Endotoxins). In: **In Encyclopedia of Microbiology**. 3a. ed. [s.l.] Oxford: Academic Press, 2009. p. 513–528.

TRENT, M. S. et al. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. **Journal of Endotoxin Research**, v. 12, n. 4, p. 205–223, 2006.

TRIVEDI, P. P.; JENA, G. B. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: investigation on possible mechanisms. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 12, p. 3460–74, 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2017.

WANG, L.-S. et al. Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Environmental toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

WILLIAMS, J. M. et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 6, p. 1388–1399, 2013.

WINCZYK, K. et al. Luzindole but not 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) diminishes the inhibitory effect of melatonin on murine Colon 38 cancer growth in vitro. **Neuro endocrinology letters**, v. 30, n. 5, p. 657–62, 2009.

WITT-ENDERBY, P. A. et al. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: Potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 4, p. 297,305, 2006.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.

XIA, M. Z. et al. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 4, p. 325–334, 2012.

XU, Y. et al. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. **Autophagy**, v. 4, n. 1, p. 110-112, 2008.

YADAV, U. C. S.; RAMANA, K. V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p.1-17, 2013.

YANG, X.-J. et al. Tanshinone IIA Sodium Sulfonate Attenuates LPS-Induced Intestinal Injury in Mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

YU, L. C. H. et al. SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? **The FASEB Journal**, v. 19, n. 13, p. 1822–1835, 2005.

YUAN, X. et al. Melatonin inhibits IL-1 β -induced monolayer permeability of human umbilical vein endothelial cells via Rac activation. **Journal of Pineal Research**, v.

51, n. 2, p. 220–225, 2011.

ZIELIŃSKA, M. et al. Melatonin, but not melatonin receptor agonists Neu-P11 and Neu-P67, attenuates TNBS-induced colitis in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 5, p. 511–519, 2016.

ANEXO

ANEXO 1 – Folha de aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa Animal

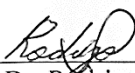
Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DO LUZINDOL SOBRE A LESÃO INTESTINAL INDUZIDA PELO LPS", protocolo nº 117/2016, sob responsabilidade da Profa. Dra. Veralice Meireles Sales de Bruin, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 20 de dezembro de 2016

Vigência do projeto	10/11/2016 a 15/06/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	48
Peso/Idade	40g - 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 21 de dezembro de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734