



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

HUMBERTO BARBOSA DA COSTA FILHO

**EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 NA
INTEGRIDADE EPITELIAL CÓLICA EM MODELO DE COLITE CRÔNICA
INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

FORTALEZA - CE

2019

**EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 NA
INTEGRIDADE EPITELIAL CÓLICA EM MODELO DE COLITE CRÔNICA
INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique
Loiola Ponte de Souza

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis
Barbosa

FORTALEZA - CE

2019

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)

- C872e Costa Filho, Humberto Barbosa da.
Efeito da inibição seletiva das ciclooxigenases 1 e 2 na integridade epitelial cólica em modelo de colite crônica induzida por TNBS em ratos / Humberto Barbosa da Costa Filho. – 2019.
65 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza.
Coorientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.
1. Doença de Crohn. 2. Integridade epitelial. 3. Ácido acetilsalicílico. 4. Ciclooxigenase 1. 5. Ciclooxigenase 2. I. Título.

CDD 615.1

HUMBERTO BARBOSA DA COSTA FILHO

**EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 NA
INTEGRIDADE EPITELIAL CÓLICA EM MODELO DE COLITE CRÔNICA
INDUZIDA POR TNBS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará - UFC (Orientador)**

**Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará – UFC**

**Prof. Dr. Renan Oliveira Silva
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE**

Ao meu irmão, Jones Barbosa Lima Neto.

A minha esposa, Náyla Barbosa.

Aos meus pais, Humberto e Ilze.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jeová, pelo dom da vida e por me dar forças para sempre suportar momentos de aflições e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

A meus pais, Humberto e Ilze, pela educação, carinho e segurança. Pela fé que demonstram em mim e por sempre me ajudarem em momentos difíceis sendo sempre meu porto seguro.

A minha esposa, Náyla, por sempre me apoiar, me fazer sorrir e a encarar sempre o lado bom das coisas. Por dar razão a minha vida e fazê-la mais feliz.

Ao meu irmão, Jones, pela grande amizade, exemplo e incentivo de sempre. Por ter sido um grande irmão e espelho para mim. Todas as minhas conquistas são para ele.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me deu em me orientar. Pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, incentivando-me e colaborando no desenvolvimento das pesquisas.

Ao meu coorientador, prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa, pela ajuda, pelas suas correções, disponibilidade quando sempre precisei e por todo o apoio nesta minha caminhada.

Aos meus primeiros orientadores e pais na iniciação científica, prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e prof^ª. Dra. Cláudia Ferreira dos Santos do Laboratório Fisiofarmacologia Cárdio-Renal (LFCC) – UECE, pela motivação, ensinamentos e grande amizade.

Ao prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pela atenção que demonstra a todos os alunos do LEFFAG e cordialidade de sempre.

Ao prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, por toda ajuda, pela disponibilidade, cordialidade e atenção em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos, por abrir sempre as portas do seu laboratório e pela determinação de sempre querer ajudar.

Ao prof. Dr. Renan Oliveira Silva, pela disponibilidade em compor minha banca de defesa e realizar considerações bastante pertinentes sobre meu trabalho.

Ao Thiago Meneses, pela amizade, companheirismo, parceria nos experimentos e por ajudar fazer o dia a dia no laboratório mais alegre.

A Suliana, pela amizade, grandes ajudas nos cálculos e experimentos e pelo apoio emocional no ramo da pesquisa.

Ao Rodrigo, pela prontidão em me ajudar nos experimentos e pela dedicação como

meu aluno de iniciação científica.

Ao João, Rudy e Lucas pelo convívio, boas conversas e incentivo.

A todos os componentes do LEFFAG: Carlos, Álvaro, Marcos, Genilson, Tiago, Bárbara, Jhonatan, Patrícia, Fabrícia, Samara, Kerolayne, Kaira, Cecília, Larissa, Katia, Klayre, Renata, Victor, Lorena, Paulo, Elane, Sarah Leyenne, Sarah Calixto, Vitória, Lucas, Thais, Géssica, Eliane e Gutierrez.

A todos os funcionários do Centro de Biomedicina da UFC.

A UFC e a Pós-Graduação em Farmacologia, por terem me dado a chance e todos os instrumentos que me possibilitaram chegar ao final desse ciclo.

A FUNCAP e a CAPES, pelo incentivo à pesquisa e suporte financeiro que me ofereceram durante o meu mestrado.

RESUMO

EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DAS CICLOOXIGENASES 1 E 2 NA INTEGRIDADE EPITELIAL CÓLICA EM MODELO DE COLITE CRÔNICA INDUZIDA POR TNBS EM RATOS

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória transmural da mucosa que pode acometer qualquer região do trato gastrointestinal (TGI). Pacientes portadores de DC normalmente apresentam condições associadas a esta doença onde o uso de anti-inflamatórios inibidores de ciclooxigenase (COX) se faz necessário. Entretanto, há contradições a respeito do uso benéfico desses fármacos na integridade epitelial dos portadores de DC. Na tentativa de elucidar essa divergência, o presente estudo avaliou o efeito das COX-1 e 2 na integridade do tecido cólico de ratos induzidos a colite por meio do ácido 2,4,6- Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Foi possível observar o grau de inflamação do tecido cólico desses animais após 7 (colite 7º dia), 14 (colite 14º dia) e 28 (colite 28º dia) dias de indução. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e considerados diferentes estatisticamente quando $p < 0,05$. A avaliação histopatológica mostrou que o grupo Colite 7º dia foi o que apresentou maiores alterações quando comparado ao grupo Sham, em contraste ao grupo Colite 14º dia, que demonstrou menos alterações de escores microscópicos que o grupo Colite 7º dia quando comparados ao grupo Sham e o grupo Colite 28º dia não teve alterações morfológicas quando comparado ao grupo Sham. Além dos critérios de escores microscópicos, foram também avaliados os escores macroscópicos, peso úmido e mieloperoxidase (MPO) desses grupos, sendo o grupo Colite 7º dia o único grupo que demonstrou esses critérios de análise aumentados em relação ao grupo Sham. A mucosa cólica dos animais do grupo Colite 7º dia apresentou uma menor resistência elétrica transepitelial (RET) basal ($32,0 \pm 1,9 \Omega/\text{cm}^2$) quando comparados ao grupo Sham ($36,4 \pm 1,6 \Omega/\text{cm}^2$), diferentemente do observado nos grupos Colite 14º dia e Colite 28º dia, que não demonstraram diferença para o grupo Sham. Escolhemos o grupo Colite 7º dia, por demonstrar resultados mais expressivos de inflamação, para testar o efeito de inibidores de COX-1 e COX-2 na integridade da mucosa cólica desses animais. Após serem expostas em modelo ex-vivo de câmara de Üssing ao ácido acetilsalicílico (AAS), as mucosas cólicas dos animais do grupo Colite 7º dia demonstram uma queda da RET ao compará-las as do grupo Sham também expostas ao AAS ($76,85 \pm 4,66$ e $91,21 \pm 2,79$ %, $*p < 0,05$, respectivamente). Outra diferença observada foi o aumento da permeabilidade à fluoresceína no grupo Colite 7º dia AAS, em comparação ao grupo Sham AAS ($397,6 \pm 75,62$ e $198,4 \pm 49,43$ %, $*p < 0,05$, respectivamente). Ao avaliar a ação de inibidores específicos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (Celecoxibe), foi possível observar que houve uma queda da RET do grupo Colite 7º dia exposto ao SC-560 quando comparada ao grupo Colite 7º dia ($73,6 \pm 3,5$ e $94,1 \pm 4,16$ %, $*p < 0,05$, respectivamente), entretanto, não houve diferença da RET ao serem comparados os grupos Colite 7º dia expostos ao celecoxibe e Colite 7º dia ($92,81 \pm 5,03$ e $94,1 \pm 4,16$ %, $*p < 0,05$, respectivamente). Outro dado obtido foi a queda da RET do grupo Colite 7º dia SC-560 ($73,6 \pm 3,5$ %) quando comparada ao grupo Sham SC-560 ($90,9 \pm 3,02$ %), condizendo com os resultados de permeabilidade à fluoresceína, onde o grupo Colite 7º dia SC-560 ($294,8 \pm 41,97$) obteve uma maior passagem de fluoresceína, quando comparado ao grupo Sham SC-560 ($116,8 \pm 34,51$). Diferentemente dos resultados observados com o inibidor de COX-1, o grupo colite 7º dia Celecoxibe não demonstrou diferença estatística na queda da RET quando comparada ao grupo Sham celecoxibe ($92,81 \pm 5,03$ e $93,19 \pm 3,12$ %, respectivamente), condizendo com os resultados de permeabilidade à fluoresceína, onde o grupo Colite 7º dia Celecoxibe, quando comparado ao grupo Sham Celecoxibe, não apresentou diferença de passagem de fluoresceína ($228,8 \pm 51,71$ e $258,3 \pm 87,41$, respectivamente). Esses dados em conjunto revelam os efeitos deletérios dos inibidores de COX-1 na integridade do tecido cólico de animais com colite.

Palavras-chaves: Doença de Crohn. Integridade Epitelial. Ácido Acetilsalicílico. Ciclooxigenase 1. Ciclooxigenase 2.

ABSTRACT

EFFECT OF SELECTIVE INHIBITION OF CYCLOOXYGENASE 1 AND 2 ON COLONIC EPITHELIAL INTEGRITY IN A TNBS-INDUCED CHRONIC COLITIS MODEL

Crohn's disease (CD) is a transmural inflammatory disease of the mucosa that can affect any region of the gastrointestinal tract (GIT). Patients with CD usually present conditions associated with this disease where the use of anti-inflammatory cyclooxygenase inhibitors (COX) is necessary. However, there are contradictions regarding the beneficial use of these drugs in the epithelial integrity of patients with CD. In the attempt to elucidate this divergence, the present study evaluated the effect of COX-1 and 2 on the colonic tissue integrity of rats induced by colitis using 2,4,6-Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). It was possible to observe the degree of inflammation of the colonic tissue of these animals after 7 (colitis 7th day), 14 (colitis 14th day) and 28 (colitis 28th day) days of induction. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean and were considered statistically different when $p < 0.05$. The histopathological evaluation showed that the Colitis group 7th day presented the greatest alterations when compared to the Sham group, in contrast to the Colitis group 14th day, which showed fewer changes of microscopic scores than the Colitis group 7th day when compared to the Sham group and the group Colitis 28th day had no morphological changes when compared to the Sham group. In addition to the microscopic score criteria, the macroscopic, wet weight and myeloperoxidase (MPO) scores of these groups were also evaluated, and the Colitis group 7th day was the only group that demonstrated these increased analysis criteria in relation to the Sham group. The colonic mucosa of the animals of the Colitis group 7th presented a lower transient electrical resistance (TEER) at baseline ($32.0 \pm 1.9 \Omega/\text{cm}^2$) when compared to the Sham group ($36.4 \pm 1.6 \Omega/\text{cm}^2$) differently from those observed in the groups Colitis 14th day and Colitis 28th day, which showed no difference for the Sham group. We chose the Colitis group 7th day for demonstrating the most expressive inflammation results to test the effect of COX-1 and COX-2 inhibitors on the colonic mucosa integrity of these animals. After being exposed in an ex-vivo chamber model of Üssing to acetylsalicylic acid (ASA), the colonic mucosa of the animals of the Colitis group 7th day showed a decrease of TEER when compared to those of the Sham group also exposed to ASA ($76.85 \pm 4.66\%$ and $91.21 \pm 2.79\%$, $*p < 0.05$, respectively). Another difference observed was the increase in the permeability to fluorescein in the Colitis 7th day AAS group, compared to the Sham AAS group (397.6 ± 75.62 and 198.4 ± 49.43 , $*p < 0.05$, respectively). When evaluating the action of specific inhibitors of COX-1 (SC-560) and COX-2 (Celecoxib), it was possible to observe that there was a decrease in the TEER of the Colitis group 7th day exposed to SC-560 when compared to the Colitis group 7th day ($73.6 \pm 3.5\%$ and $94.1 \pm 4.16\%$, $*p < 0.05$, respectively), however, there was no difference in TEER when the 7th day colitis groups exposed to celecoxib and Colitis 7th day (92.81 ± 5.03 and $94.1 \pm 4.16\%$, $*p < 0.05$, respectively). Another data obtained was the decrease in the TEER of the Colitis 7th day SC-560 ($73.6 \pm 3.5\%$) when compared to the Sham SC-560 group ($90.9 \pm 3.02\%$), in agreement with the results of fluorescein permeability, where the Colitis 7th day SC-560 (294.8 ± 41.97) had a higher fluorescein flux than the Sham SC-560 group (116.8 ± 34.51). Differently from the results observed with the COX-1 inhibitor, the colitis group 7th day Celecoxib did not show a statistical difference in the fall in TEER when compared to the Sham celecoxib group (92.81 ± 5.03 and $93.19 \pm 3.12\%$ respectively), in agreement with the fluorescein permeability results, where the Colite group 7th day Celecoxib, when compared to the Sham Celecoxib group, did not present a difference in the passage of fluorescein (228.8 ± 51.71 and 258.3 ± 87.41 , respectively). These data together reveal the deleterious effects of COX-1 inhibitors on the integrity of colonic tissue in animals with colitis.

Keywords: Crohn's disease. Epithelial integrity. Acetylsalicylic acid. Cyclooxygenase 1. Cyclooxygenase 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e prevalência mundial de doença de Crohn.....	18
Figura 2. Representação diagramática da barreira mucosa no cólon do camundongo mostrando a espessura da barreira mucosa secretada e a relação entre a microbiota luminal e o epitélio.....	22
Figura 3. Uma micrografia eletrônica e desenho correspondente ao complexo juncional de uma célula epitelial intestinal.....	23
Figura 4. Apresentação esquemática das relações das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2).....	25
Figura 5. Representação esquemática do estudo da RET em câmara de Üssing.....	36
Figura 6. Representação esquemática do estudo da permeabilidade à fluoresceína na câmara de Üssing.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curso temporal das alterações inflamatórias cólicas no modelo de colite induzida por TNBS.....	42
Gráfico 2: Avaliação da integridade da mucosa cólica por meio da RET basal no modelo de colite induzida por TNBS.....	43
Gráfico 3: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com AAS, por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	44
Gráfico 4: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com AAS, por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS.....	45
Gráfico 5: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	46
Gráfico 6: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	47
Gráfico 7: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS.....	48
Gráfico 8: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	49
Gráfico 9: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.....	32
Tabela 2 – Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal...	34
Tabela 3: Escores das alterações microscópicas cólicas no modelo de colite induzida por TNBS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AAS	Ácido Acetilsalicílico
AINES	Antiinflamatórios Não-Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
CARD 15	Proteína 15 Contendo Domínio de Recrutamento de Caspases
COX	Ciclooxigenase
DC	Doença de Crohn
DIIs	Doenças Inflamatórias Intestinais
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
etOH	Etanol
FCT-β	Fator de Crescimento Transformador- β
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
JEs	Junções Estreitas
MDP	Muramil Dipeptídeo
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear κ B
PG	Prostaglandina
RCU	Retocolite Ulcerativa
RET	Resistência Elétrica Transepitelial
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	T helper
TNBS	2,4,6- Trinitrobenzeno sulfônico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TX	Tromboxano
ZO	Zônula de Oclusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais: descrição e epidemiologia.....	17
1.2 Fisiopatologia da doença de Crohn.....	19
1.3 Modelo experimental de colite induzida por TNBS.....	20
1.4 Permeabilidade intestinal.....	21
<i>1.4.1 Componentes e funções da barreira intestinal.....</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2 Funções da barreira intestinal na doença de Crohn.....</i>	<i>24</i>
1.5 Importância das ciclooxigenases como alvos terapêuticos nas DIIs.....	25
1.6 Anti-inflamatórios não-esteroidais.....	26
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Reagentes.....	30
4.2 Aspectos éticos envolvendo pesquisa animal.....	30
4.3 Animais.....	30
4.4 Indução da colite por TNBS.....	31
4.5 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão.....	31
4.6 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais com ou sem colite.....	32

4.7	Avaliação dos escores microscópicos de lesão.....	32
4.8	Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	34
4.9	Protocolo executado na câmara de Üssing.....	35
4.9.1.	<i>Montagem do tecido na câmara.....</i>	35
4.9.2.	<i>Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET).....</i>	35
4.9.3.	<i>Avaliação da permeabilidade à fluoresceína.....</i>	36
4.10	Grupos experimentais.....	38
4.11	Análises estatísticas.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Colite induzida por TNBS altera os critérios microscópicos de lesão.....	40
5.2	Curso temporal das alterações inflamatórias cólicas no modelo de colite induzida por TNBS.....	41
5.3	Avaliação da integridade da mucosa cólica por meio da RET basal no modelo de colite induzida por TNBS.....	43
5.4	Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com AAS, por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	44
5.5	Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com AAS, por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS.....	44
5.6	Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	45
5.7.	Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	46

5.8 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com inibidor de COX-1 (SC-560), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS	47
5.9 Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS.....	48
5.10 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com inibidor de COX-2 (Celecoxibe), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS.....	49
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO I.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais: descrição e epidemiologia

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são caracterizadas pela inflamação crônica da mucosa do intestino e tem como principais representantes a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), que se diferem em diversos aspectos, como por exemplo, na localização e distribuição da inflamação e nas populações celulares da mucosa envolvidas na reação imunológica (BILLMEIER et al., 2016)

Além de envolver o trato intestinal, as DIIs também podem se manifestar de forma extra-intestinal (35% dos pacientes), afetando outros órgãos, de forma a influenciar significativamente na qualidade de vida e no estado funcional do paciente (MUHVÍČ-UREK et al., 2016; ELIA et al., 2007).

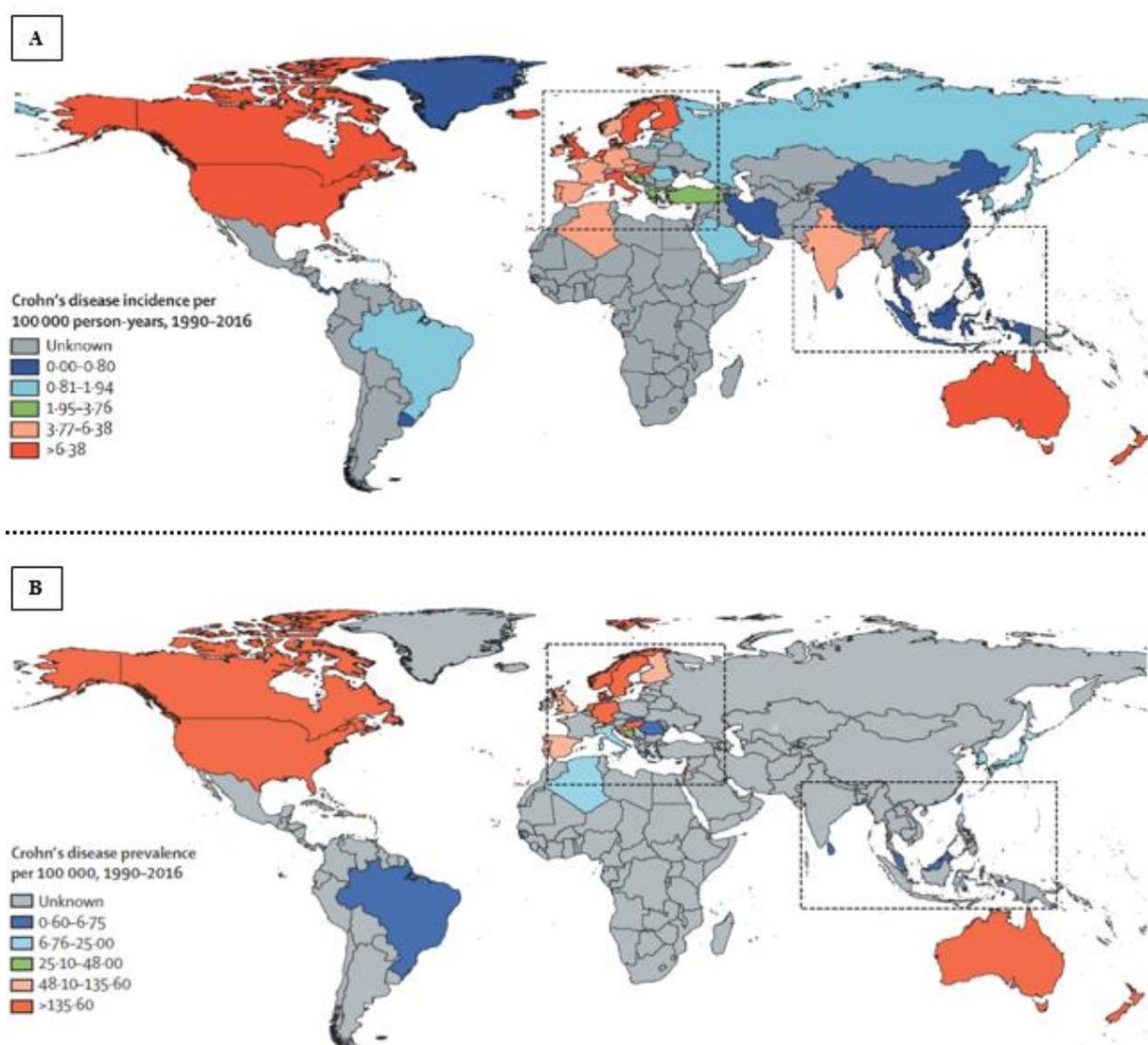
A DC é uma doença inflamatória transmural da mucosa que pode acometer qualquer região do trato gastrointestinal (TGI), sendo as principais áreas afetadas o íleo terminal e a região perianal. Apresenta-se de forma descontínua, atingindo várias porções do TGI e associada a complicações, como fístulas, estenoses e abscessos (BAUMGART; CARDING, 2007). Os principais sintomas dessa afecção são: diarreia crônica, dor abdominal, associados ou não a presença de sangue e/ou muco nas fezes, perda ponderal, fístulas abdominais e perianais, fissuras e abscessos anorretais (HUGOT et al., 1996). Além das manifestações no trato intestinal, a DC pode acometer outros órgãos com manifestações fora do sítio do intestino, sendo as mais comuns as oftalmológicas, as de cunho dermatológico e as reumatológicas (HANAUER; SANDBORN, 2001).

Apesar da etiologia ser desconhecida, alguns fatores contribuem para o aumento da probabilidade de desenvolvimento da DC, dentre eles, a presença de histórico familiar e de fatores ambientais predisponentes, como por exemplo, os antígenos derivados da microbiota e da dieta, o grau de exposição aos patógenos intestinais, o consumo de tabaco e o uso de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), parecem estar ligados ao desenvolvimento das DIIs (OLIVEIRA et al., 2010).

Foi então postulado que a associação de genes que conferem susceptibilidade à patologia com fatores endógenos ou exógenos inicia alterações na modulação da resposta imune (OLIVEIRA et al., 2010).

A DC é considerada um problema de saúde pública em muitos países e importantes trabalhos retrospectivos sobre a epidemiologia da DC realizados demonstraram a sua importância. Siew e colaboradores (2017) fornecem uma revisão sistemática de uma visão abrangente global da incidência e da prevalência das DIIs no período de 1990 a 2016, identificando uma mudança substancial na epidemiologia dessas doenças. Foi demonstrado nesse estudo que desde 1990, a incidência das DIIs se estabilizou no mundo ocidental, mas a prevalência permanece alta. No entanto, os países recentemente industrializados estão enfrentando uma incidência crescente, diferentemente do observado nas tendências do mundo ocidental durante a última parte do século XX (Figura 1).

Figura 1. Incidência e prevalência mundial de doença de Crohn.



Fonte: Modificada de Siew e colaboradores (2017).

Outras pesquisas demonstram, que as DIIs apresentam uma maior incidência em etnia branca (nórdicos europeus), tendo uma distribuição semelhante em ambos os sexos, sendo que a DC afeta mais comumente a população feminina, com idade mais frequente em adultos jovens, na faixa etária entre 20 a 40 anos, tendo ainda uma maior prevalência em áreas urbanas em relação às rurais e em classes econômicas mais altas, em fumantes e parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos (SALVIANO et al., 2007).

No Brasil há escassez de estudos epidemiológicos disponíveis sobre a incidência e a prevalência da DC, devido não ser considerada uma doença de notificação compulsória, podendo por esse motivo estar sendo subdiagnosticada, contribuindo, dessa forma, para o atraso no diagnóstico e aumento da sua morbidade (BELASCO et al., 2008).

1.2 Fisiopatologia da doença de Crohn

As respostas imunes inatas oferecem a primeira linha de defesa contra qualquer agressão e são mediadas por uma variedade de diferentes tipos celulares, incluindo células imunológicas clássicas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como células não imunes, como epiteliais, endoteliais e mesenquimais (SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A DC tem como principal característica patológica, a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares na parte afetada do intestino. À medida que a doença se torna mais estabelecida, os neutrófilos infiltram criptas isoladas, formando abscessos na mucosa afetada e nas camadas de tecido subjacentes. Os neutrófilos, assim como outros leucócitos, produzem substâncias nocivas, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e protease (ALZOGHAIBI, 2013; SOUZA; FIOCCHI, 2016; ABRAHAM; CHO, 2009).

A DC é também caracterizada por um desequilíbrio de respostas da célula T helper (Th), com predominância de respostas Th1 e IL-17 enquanto há deficiência de respostas de Th2 e de linfócito T regulatório. Portanto, essa resposta imunitária inadequada contribui para uma maior atuação do sistema imune na DC (GUO et al., 2013). No entanto, a interleucina-10 (IL-10), potente imunorregulador de citocina, foi relatado como sendo produzido nas mesmas quantidades ou em quantidades aumentadas no intestino de pacientes com DC, em comparação com o intestino saudável (SOUZA; FIOCCHI, 2016).

Outra resposta imunológica envolvida na DC é a sinalização da interleucina-23 (IL-23). Esta sinalização é mediada pelo engajamento do heterodímero de IL-23 com o seu receptor

heterodímero, esse engajamento ativa a via de sinalização JAK-STAT que regula a transcrição de vários genes (ABRAHAM; CHO, 2009).

Fica evidenciado também a importância de respostas para as bactérias intestinais, que se encontram realçadas pela associação entre a DC e o gene NOD2, que codifica um sensor intracelular de peptidoglicano, um componente da parede celular bacteriana (ABRAHAM; CHO, 2009). Um gene de susceptibilidade à doença, ligado à resposta imunológica, foi identificado. Esse gene é descrito como sendo a proteína 15 contendo domínio de recrutamento de caspases (CARD 15), que codifica NOD2, e que está localizado no cromossoma 16q12 como observado na DC (STROBER et al., 2007).

Células epiteliais, células de Paneth epiteliais intestinais, macrófagos e células dendríticas expressam NOD2. (ABRAHAM; CHO, 2009). Esse membro da família do receptor tipo NOD, o NOD2, codifica o receptor primário para muramil dipeptídeo (MDP) encontrado em todas as bactérias gram-negativas e gram-positivas. A sinalização NOD2 é essencial para o reconhecimento bacteriano, sendo dessa forma importante na resposta imune inata e na regulação do comportamento comensal da microbiota (SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A ativação da proteína NOD2 por peptidoglicano, presente na parede celular bacteriana, ativa o fator nuclear kB (NF-kB) e a proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase, das vias de sinalização, o que leva a produção de citocinas (por exemplo, TNF e interleucina 1 β) e péptidos antimicrobianos (ABRAHAM; CHO, 2009).

1.3 Modelo experimental de colite induzida por TNBS

Embora os resultados da investigação clínica da DC sejam mais facilmente explorados e associados à prática clínica, a pesquisa básica, em especial, modelos animais adequados, forneceram informações valiosas a nível molecular e permitiram aos pesquisadores manipular fatores para estudar seu papel (ANTONIOU et al., 2016).

Existem algumas formas de indução experimental de DC. Estes modelos variam desde a indução por produtos químicos, de transferência adotiva, até o modelo de animais geneticamente modificados (RANDHAWA et al., 2014).

Uma das formas de indução experimental da DC é por meio do reagente 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), introduzida para esse fim por Morris e colaboradores (1989). Após o protocolo induzido em 1989, várias alterações nos aspectos técnicos do protocolo principal foram desenvolvidos (ANTONIOU et al., 2016). A administração intra-retal de TNBS

induz uma colite erosiva auto-limitante. A utilização de TNBS para esse fim vem sendo usada com frequência nas últimas duas décadas (JONES-HALLA; GRISHAM, 2014).

Segundo o relatório original de Morris e colaboradores (1989), etanol e TNBS (100mg/Kg) são administrados associados pela via intra-retal em ratos. O etanol é necessário para interromper a barreira da mucosa, permitindo assim a translocação do TNBS solúvel em água no compartimento submucoso, permitindo a interação do TNBS com as proteínas do tecido do cólon (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALLA; GRISHAM, 2014).

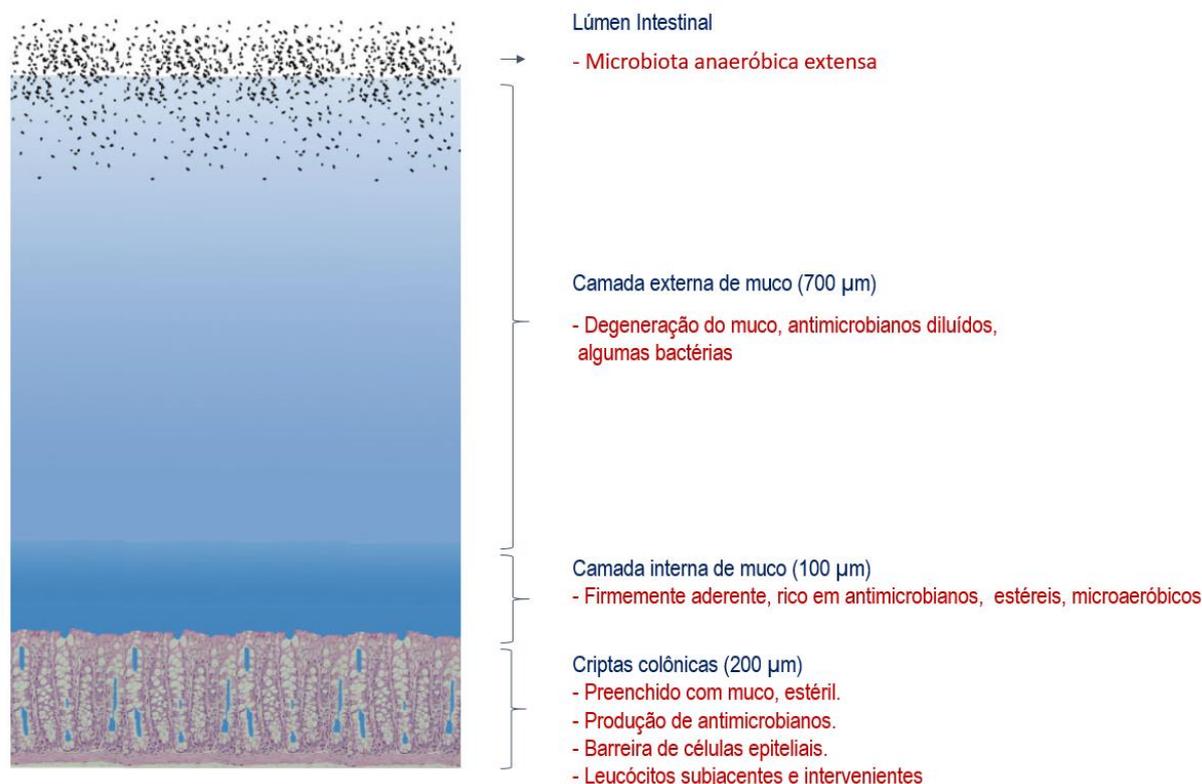
Apenas com uma única administração dessas substâncias combinadas pela via intra-retal ocorre o desenvolvimento de resposta imune excessiva mediada por células Th1, refletindo em inflamação aguda, apresentando os sinais clínicos referentes a essa fase, dentre eles diarreia, até mesmo sanguinolenta, e prolapso retal. Com o passar das semanas, o peso corporal aumenta, mas as diarreias persistem (ANTONIOU et al., 2016; JONES-HALLA; GRISHAM, 2014).

Estudar a etiopatogenia da DC pela indução por TNBS é uma forma importante pelo fato de se assemelhar com a DC em humanos, por ser pouco dispendiosa e permitir a avaliação de compostos com potenciais efeitos terapêuticos, tais como anti-TNF- α , corticosteróides, compostos naturais e medicina tradicional (ANTONIOU et al., 2016).

1.4 Permeabilidade intestinal

A barreira intestinal é composta por uma camada espessa de muco secretado, uma camada de células epiteliais e as células não epiteliais da mucosa subjacentes, principalmente leucócitos, com grande quantidade de funções, tanto reguladoras quanto efetoras (FIGURA 2). Os elementos da barreira mudam em diferentes regiões do intestino e podem responder dinamicamente aos desafios ambientais.

Figura 2. Representação diagramática da barreira mucosa no cólon do camundongo mostrando a espessura da barreira mucosa secretada e a relação entre a microbiota luminal e o epitélio.



Fonte: Figura adaptada de McGuckin e colaboradores (2009).

1.4.1 Componentes e funções da barreira intestinal

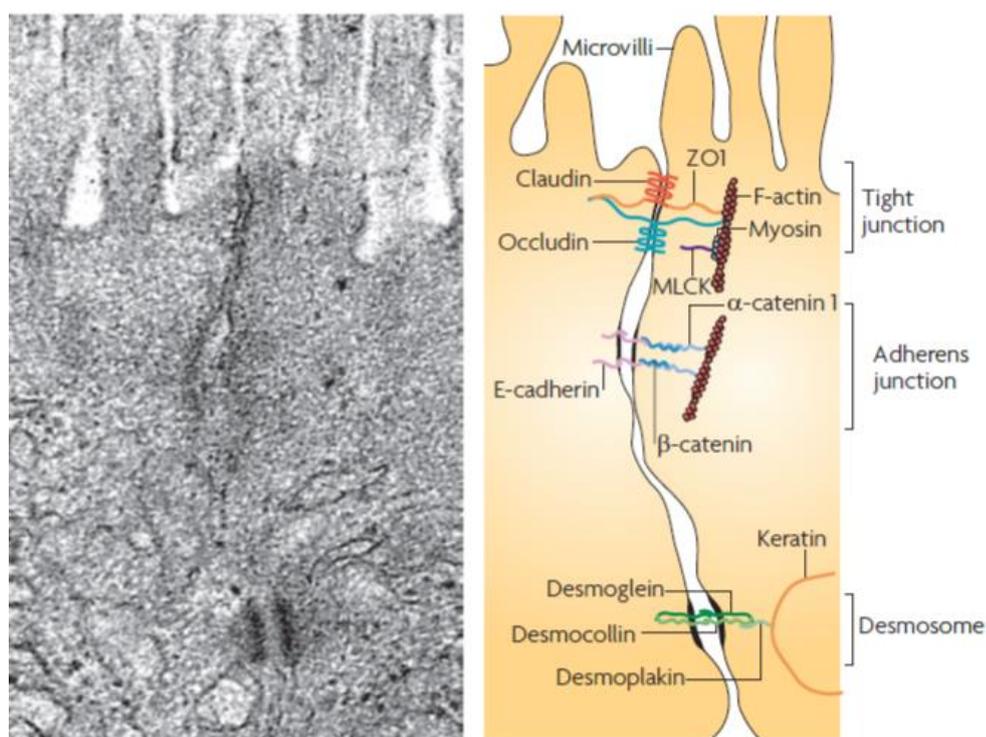
Um dos componentes da barreira intestinal é o muco, sendo este secretado na forma de mucina pelas células caliciformes. O muco age como barreira física e química contra os micróbios, além de manter a superfície da mucosa bem hidratada e fornecer lubrificação, permitindo o fluxo contínuo do conteúdo luminal (MCGUCKIN et al., 2009).

Outro componente da barreira intestinal é a camada de células epiteliais. Estas células, por sua vez, fornecem barreira estrutural, fabricam a maioria dos componentes da barreira secretada, são sensores do ambiente externo e emitem sinais que regulam a imunidade inata e adaptativa subjacente (MCGUCKIN et al., 2009).

As junções estreitas (JEs) são complexos de múltiplas proteínas localizados nas extremidades apicais das membranas laterais das células epiteliais intestinais. Quatro proteínas

transmembranares integrais têm sido identificadas: ocludina, claudinas, moléculas de adesão juncional e tricelulina (FIGURA 3) (LEE, 2015). Os domínios intracelulares dessas proteínas transmebranares interagem com as proteínas do arcabouço citosólico, como as proteínas zônula de oclusão (ZO), que por sua vez ancoram as proteínas transmembrana ao citoesqueleto de actina. A interação das proteínas das JEs com o citoesqueleto de actina é vital para a manutenção da estrutura das JEs, permitindo sua regulação citoesquelética da integridade da barreira (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003). A contração circunferencial e a tensão na actina são reguladas pela ativação da cadeia leve da miosina (do inglês, *myosin light-chain*, MLC). A indução da fosforilação de MLC por quinases, como a quinase de MLC e quinase associada a Rho (Rho-quinase), causa a contração da actina, resultando na abertura das vias paracelulares (TURNER et al., 1997; WALSH et al., 2001).

Figura 3. Micrografia eletrônica e desenho correspondente ao complexo juncional de uma célula epitelial intestinal.



Fonte: Figura adaptada de Turner, 2009.

Sabendo da importância das JEs na fisiologia intestinal, vários pesquisadores estão estudando o papel das citocinas na regulação das JEs intestinais sob condições fisiopatológicas. A disfunção mediada por citocinas da barreira das JEs, resultando em ativação imunológica e

inflamação tecidual, é considerada importante no início e/ou desenvolvimento de várias doenças intestinais e sistêmicas (TURNER, 2009). Dentre essas citocinas que desempenham importantes papéis nas JEs intestinais, destacam-se o interferon- γ (IFN- γ), o fator de necrose tumoral- α , a interleucina-1 β (IL- β), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-17 (IL-17). Além dessas citocinas, outros componentes são importantes na manutenção da barreira das JEs, como o fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento transformador- β (LEE, 2015).

1.4.2 Funções da barreira intestinal na doença de Crohn

As alterações existentes na função de barreira nas DIIs humana incluem redução nas secreções de barreira e atividades antimicrobianas, número reduzido de células secretoras, permeabilidade aumentada, JEs deficientes, e redução substancial, chegando até a uma perda completa do epitélio onde ocorre a ulceração (MCGUCKIN et al., 2009).

Pesquisas recentes têm abordado, com maior frequência, a importância das células de Paneth na DC devido aos dados indicando menor produção de defensina, expressão de NOD2 nas células de Paneth, e demonstração de que o ligante microbiano NOD2, Muramildipeptídeo (MDP), aumenta a transcrição dos genes da defensina (WEHKAMP et al., 2007; OGURA et al., 2003; VOSS et al., 2006).

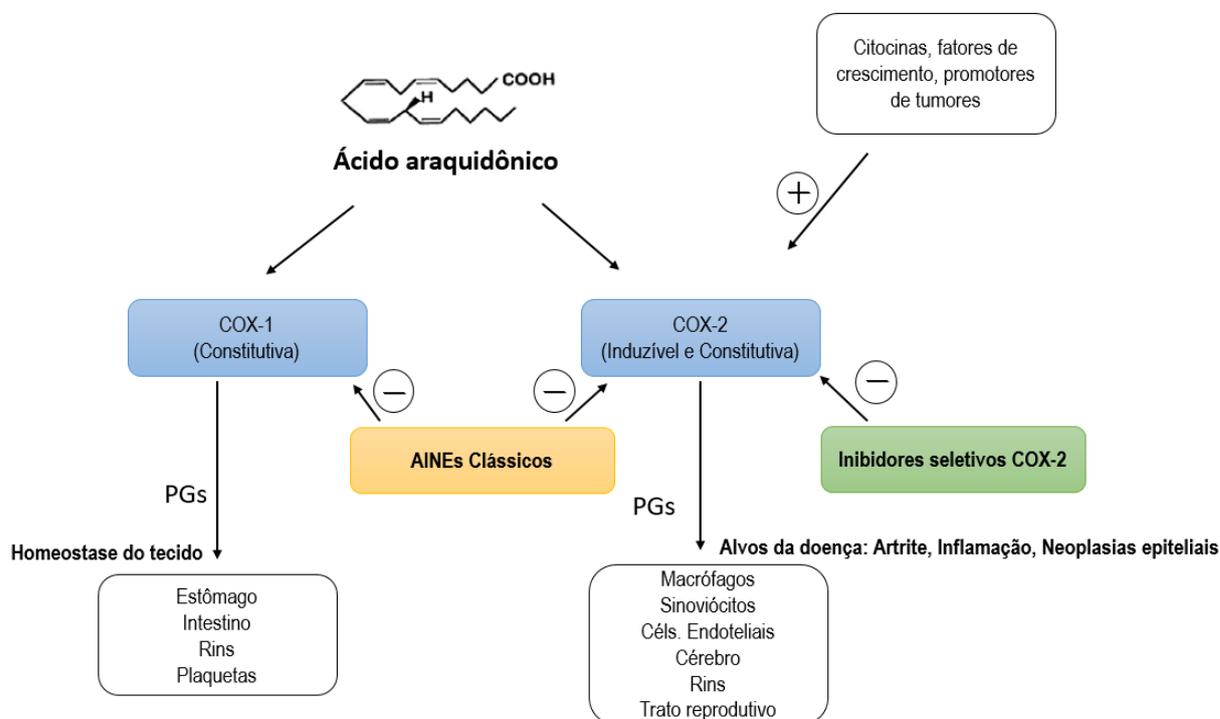
Alguns métodos experimentais são empregados para avaliar a permeabilidade epitelial, dentre esses métodos existe a Câmara de Üssing, que utiliza a resistência elétrica transepitelial (soma da resistência transcelular e da resistência paracelular) e a permeabilidade à fluoresceína (permeabilidade paracelular) (VIDYASAGAR S.; MACGREGOR G., 2016).

Pesquisas recentes, demonstraram aumento da permeabilidade intestinal na DC (LIBERTUCCI et al., 2018; CHANG et al., 2017). Embora o mecanismo e o local celular da permeabilidade aumentada, medidos em humanos, não sejam precisamente conhecidos, é provável que esteja ligado às ações das citocinas Th1, TNF e IFN, que são características desta doença e conhecidas por aumentarem a permeabilidade (PRASAD et al., 2005). Acompanhando esses resultados de permeabilidade aumentada, há redução de JEs, expressão reduzida e realocação de isoformas de claudina envolvidas em JEs na DC ativa (ZEISSIG et al., 2007). A translocação bacteriana é frequentemente relatada na DC, sugerindo que a permeabilidade alterada a pequenas moléculas e as JEs interrompidas são funcionalmente significativas (MARTIN et al., 2004; RYAN et al., 2004; KEITA et al., 2018).

1.5 Importância das ciclooxigenases como alvos terapêuticos nas DIIs

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que possui três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é uma enzima constitutivamente expressa (DEININGER et al., 1999) por estar mais envolvida em uma variedade de atividades fisiológicas gerais. Acredita-se que ela mantenha a integridade celular do trato gastrointestinal, incluindo a defesa da mucosa no trato gastrointestinal superior, a regulação do fluxo sanguíneo através dos rins e a agregação plaquetária (DEININGER et al., 1995; SMITH et al., 2000). A COX-2 é uma enzima induzida em resposta à ativação celular mediada por hormônios, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento. É um importante mediador do processo inflamatório e da carcinogênese (FIGURA 4). (SU et al., 2016). A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, uma vez que é derivada do mesmo gene, foi demonstrada in vitro em linhagens de macrófagos e é encontrada principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, não sendo, por sua vez, encontrada no intestino (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Figura 4. Apresentação esquemática das relações das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2).



Fonte: Figura adaptada de Zarghi, 2011.

Foi observado pela primeira vez, há mais de 30 anos, uma associação entre a inibição da COX e a recaída nas DIIs, ocorrendo recidiva, caracterizada por aumento da

frequência de evacuações, sangramento retal e deterioração da aparência da mucosa na sigmoidoscopia, ocorrendo logo após a administração oral de um agente anti-inflamatório não-esteroidal e a remissão sendo restabelecida dentro de 4 semanas após a interrupção do medicamento. (RAMPTON et al., 1981). A distinção simples de COX-1 como constitutiva e COX-2 como indutível tem sido questionada com base em evidências recentes da expressão constitutiva da COX-2 em tecidos saudáveis, incluindo vasos sanguíneos, cérebro, rim e intestino. A COX-2 foi inicialmente considerada uma enzima induzida por uma variedade de estímulos inflamatórios e responsável pela produção de altas concentrações de prostanoídes envolvidos em vias pró-inflamatórias. A expressão constitutiva da COX-2 foi identificada no tecido gastrintestinal, mais precisamente no estômago e cólon humanos e murinos, onde acredita-se que modula as funções neuromusculares normais (WARNER et al., 2004; BERNARDINI et al., 2006; JACKSON et al., 2000; PORCHER et al., 2002; FORNAI et al., 2005; PORCHER et al., 2004).

A importância da expressão constitutiva da COX-2 está ganhando reconhecimento com relação ao controle dos processos gastrintestinais em humanos e outros animais, dessa forma, os papéis da COX-1 e COX-2 na manutenção e reparo gastrintestinal podem ser relevantes para muitas DIIs (WALLACE et al., 2005).

1.6 Anti-inflamatórios não-esteroidais

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) atuam inibindo a COX, que é a principal enzima pela qual as prostaglandinas são formadas a partir do ácido araquidônico (SMITH et al., 1998). As prostaglandinas são mediadoras da dor, inflamação e febre. Portanto, os AINEs comumente exibem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas.

Devido a associação entre a inibição de COX e a recaída nas DIIs, pesquisas são realizadas com o intuito de avaliar a ligação entre os AINEs e a exacerbação das DIIs. Estudos laboratoriais demonstraram que o cólon inflamado tem um aumento significativo de prostaglandina (PG) E2, PGI2 e tromboxano (TX) A2, causado pelo aumento da expressão de COX-2 (HAMABATA et al., 2018).

Wallace e colaboradores (2011) também tentam comprovar a associação do uso de AINEs e as DIIs, por demonstrarem que a inibição da produção de prostaglandinas no cólon devido à ingestão de AINE provoca uma ruptura em suas funções fisiológicas, levando à recaída das DIIs. No cólon, as prostaglandinas estão envolvidas em processos como produção de muco,

proliferação celular e regulação da permeabilidade da barreira epitelial (WANG et al., 2005). Como estas prostaglandinas são geralmente aumentadas na DII, pensa-se que é este mecanismo que leva a uma exacerbação dos sintomas da DII. Atualmente, reconhece-se que há considerável variação inter-agente dentro da classe geral de inibidores da ciclooxigenase, não apenas no modo de ação, mas também em efeitos da COX (ARICO et al., 2002; DOVIZIO et al., 2012).

O aumento na produção de prostanoides pode contribuir para a inflamação da mucosa, mas acredita-se que alguns dos mediadores contribuam para o mecanismo de proteção para evitar mais danos ao tecido inflamado. O papel de muitos dos mediadores derivados de ácidos graxos que podem melhorar a inflamação da mucosa (tais como protectins ou resolvinas) na DII, e as interações com os AINEs não foram suficientemente explorados neste ponto (LEVY et al., 2010).

As informações disponíveis, atualmente, são muito confusas e contraditórias, e isso levou muitos gastroenterologistas, e outros profissionais da área da saúde a aconselharem contra o uso de inibidores de COX em pacientes com DIIs. No entanto, os AINEs são úteis para pacientes com DIIs, pois estas afecções estão associadas a condições como artralgia, artrite, sacroileíte e espondilite anquilosante, com incidência relatada entre 4% e 23% (JOSE et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A DC é considerada um problema de saúde pública em muitos países, apresentando alta prevalência no mundo ocidental e uma incidência crescente nos países recentemente industrializados.

Pesquisas demonstram que vários fatores podem acarretar no desenvolvimento da DC, dentre eles as alterações existentes na função de barreira, incluindo a redução nas secreções de barreira e atividades antimicrobianas, número reduzido de células secretoras, permeabilidade aumentada, JEs deficientes, e redução substancial, chegando até a uma perda completa do epitélio onde ocorre a ulceração.

Uma vez que os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) agem por inibir de forma não-seletiva a COX, inibindo tanto a COX -1 (constitutiva) quanto a COX-2 (induzível), eles comumente exibem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, sendo a sua utilização de grande importância para o tratamento de doenças de caráter inflamatório. Ao contrário dessas ações benéficas dos AINEs, pesquisadores afirmam que o uso dessa classe farmacológica causa retrocesso no quadro de pacientes com DIIs, sendo a recidiva, caracterizada por aumento da frequência de evacuações, sangramento retal e deterioração da aparência da mucosa na sigmoidoscopia.

A utilização de AINEs é útil para o combate às DIIs (dentre elas a DC) pois estas afecções podem vir associadas a distúrbios fora do trato gastrointestinal (dentre eles a artralgia, a artrite, a sacroileíte e a espondilite anquilosante). Porém, visto que essa classe farmacológica age inibindo de forma não-seletiva tanto a isoforma de COX-1 quanto COX-2, acredita-se que o efeito de perda da integridade epitelial cólica se dá pela inibição da enzima constitutiva, enquanto o uso de inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibes) não demonstra esse efeito. Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o papel da inibição das enzimas COX 1 e 2 na integridade do tecido cólico de portadores dessa afecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da inibição seletiva das ciclooxigenases 1 e 2 na integridade epitelial cólica em modelo de colite crônica induzida por TNBS em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento do processo inflamatório da colite crônica induzida por TNBS em ratos, comparando peças de cólon distais desses animais pertencentes aos grupos (Sham, Colite 7º dia, Colite 14º dia e Colite 28º dia) por meio da avaliação de peso úmido, dos escores macroscópicos, dos escores microscópicos, e de MPO.
- Avaliar a integridade da mucosa cólica, por meio da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) e da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite crônica induzida por TNBS em ratos.
- Avaliar o efeito do inibidor não seletivo de COX (AAS), na integridade do tecido cólico de ratos no modelo de colite crônica induzida por TNBS, por meio da RET e da permeabilidade à fluoresceína.
- Avaliar o efeito do inibidor seletivo de COX-1 (SC-560) na integridade cólica de ratos no modelo de colite crônica induzida por TNBS, por meio da RET e da permeabilidade à fluoresceína.
- Avaliar o efeito do inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe) na integridade cólica de ratos no modelo de colite crônica induzida por TNBS, por meio da RET e da permeabilidade à fluoresceína.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

- Ácido acetilsalicílico (Sigma[®], São Paulo, Brasil)
- SC-560 (Sigma[®], São Paulo, Brasil)
- Celecoxibe (Pfizer[®])
- Fluoresceína (Sigma[®], São Paulo, Brasil)
- Etanol absoluto (Sigma[®], São Paulo, Brasil)
- Ácido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfônico (Sigma[®], São Paulo, Brasil)
- Cloreto de sódio - NaCl (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Cloreto de potássio - KCl (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Cloreto de cálcio - CaCl₂ (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Sulfato de magnésio - MgSO₄ (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico - NaH₂PO₄ (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Bicarbonato de sódio - NaHCO₃ (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)
- Glicose - C₆H₁₂O₆ (Dinâmica[®], São Paulo, Brasil)

4.2 Aspectos éticos envolvendo pesquisa animal

Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo número 128/2017 (Anexo 1).

4.3 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos heterogênicos Wistar, machos, pesando 180 - 200 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno com maravalha e sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (equivalente a $22 \pm 2^\circ \text{C}$). As caixas foram

alocadas em racks e foram fornecidos, aos animais, água e alimentação ad libitum.

4.4 Indução da colite por TNBS

Inicialmente, os animais passaram por um processo de preparação do cólon, com a realização de enema (10 ml de solução salina 0,9% via retal/ animal) antes da indução da colite. Para a indução da colite os animais foram previamente anestesiados com cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), posicionados em decúbito lateral esquerdo e, em seguida, foi realizada a administração de trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (20 mg) diluído em etanol 50% em um volume total de 0,8 ml por animal (MORRIS et al., 1989). O grupo controle recebeu apenas solução salina 0,9% em um volume de 0,8 ml. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 até 8 cm da margem anal para a administração das soluções e cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 2 minutos para evitar o retorno do conteúdo administrado.

4.5 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão

Os animais foram eutanasiados pela utilização de uma dose letal de Cetamina (240 mg/kg) combinada com Xilazina (30 mg/kg) (Guazelli et al., 2013). Em seguida, foi realizada uma incisão mediana com abertura na cavidade peritoneal. Após a identificação do cólon dos animais, foi isolada uma extensão de 5 cm dele. A peça foi então aberta longitudinalmente, lavada com solução fisiológica e distendida sobre uma superfície plana para a avaliação dos escores macroscópicos (correspondente a soma dos valores individuais dos escores) seguindo a técnica descrita por Morris (1989), conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentada em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Fonte: Morris, 1989. Adaptado.

4.6 Avaliação do peso úmido dos cólons de animais com ou sem colite

Após eutanásia dos animais para análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite, foram retirados fragmentos de cólon, de cada animal, medindo (5cm) de comprimento e, posteriormente, foram realizadas as pesagens desses fragmentos e os resultados foram expressos pela unidade peso úmido /cm de lesão.

4.7 Avaliação dos escores microscópicos de lesão

Para a avaliação dos escores microscópicos, foram confeccionadas lâminas histológicas a partir de fragmentos de tecidos cólicos de animais com ou sem colite. Inicialmente as amostras passaram pela inclusão, que consiste em: uma primeira etapa, que corresponde à desidratação (quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool através da imersão em álcoois que possuem concentrações crescentes), uma segunda etapa, a diafanização, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol, e, uma última etapa, a impregnação, que consiste em substituição do xilol por parafina fundida a 80°

em pequenos blocos.

A etapa da microtomia consiste, basicamente, em utilizar um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Este aparelho é formado por uma lâmina de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente.

As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água do banho-maria estava a 53°C. Nesta etapa, foram retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente e álcool 70% e previamente secas. Antes da utilização das lâminas, estas foram revestidas com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão da peça. As lâminas com os cortes aderidos foram separadas para secagem por 24 horas.

A coloração consiste em uma etapa muito importante para a visualização das estruturas do tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessária, deste modo, a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro. Os corantes utilizados nos procedimentos histológicos foram a Hematoxilina e a Eosina (HE).

A montagem final da lâmina consistiu em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que estava aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. A resina depois de seca garantiu uma lâmina permanente que poderá durar anos. Após 24 horas da montagem das lâminas, as mesmas foram levadas ao microscópio para análises e atribuições de escores conforme a Tabela 2, sendo analisada toda a lâmina e os resultados expressos como mediana, além do mínimo valor encontrado e o máximo valor encontrado por critério, entre parênteses. Estas análises foram realizadas por um patologista sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais (SOARES, 2019).

Tabela 2 – Escores microscópicos para avaliação de fragmentos de tecido intestinal.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células caliciformes	0 – 1

Fonte: Appleyard e Wallace, 1995

4.8 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Amostras de cólon foram coletadas, pesadas e maceradas em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Aldrich, EUA), pH 6,0, na proporção de 500 µL de solução para 50 mg de tecido. Posteriormente, o macerado foi centrifugado (5000 rpm, 7 min, 4°C). Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços em duplicata. Em cada poço, adicionaram-se 200 µL de solução contendo O-dianisidina (Sigma Aldrich, EUA), 5 mg diluída em 3 mL tampão fosfato. A essa solução foram ainda adicionados 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma Aldrich, EUA) a 1%. Determinou-se a absorvância em leitor de absorvância (BMG Labtech, Espanha) no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada leitura no tempo zero e 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C (BRADLEY et al., 1982).

4.9 Protocolo executado na câmara de Üssing

4.9.1. Montagem do tecido na câmara

Após a abertura longitudinal do cólon de animais sem colite e com colite (nos dias 7, 14 e 28 após a indução por TNBS), o mesmo foi distendido em uma placa petri contendo solução de Krebs (composta por 145 mM de NaCl, 0,4 mM de KH_2PO_4 , 1,6 mM de K_2HPO_4 , 5 mM de glicose, 1 mM de MgCl_2 e 1,2 mM de CaCl_2 , pH 7,4) e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi realizada a dissecação do tecido, sendo retirado a camada muscular. Um fragmento da mucosa cólica dissecada foi posicionado na câmara de Üssing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha), entre duas semicâmaras separadas por um adaptador com uma área exposta de $0,017\text{cm}^2$. Foi então colocado Krebs (3,5 ml/semicâmara), sendo este mantido aerado com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e com uma temperatura constante de 37°C .

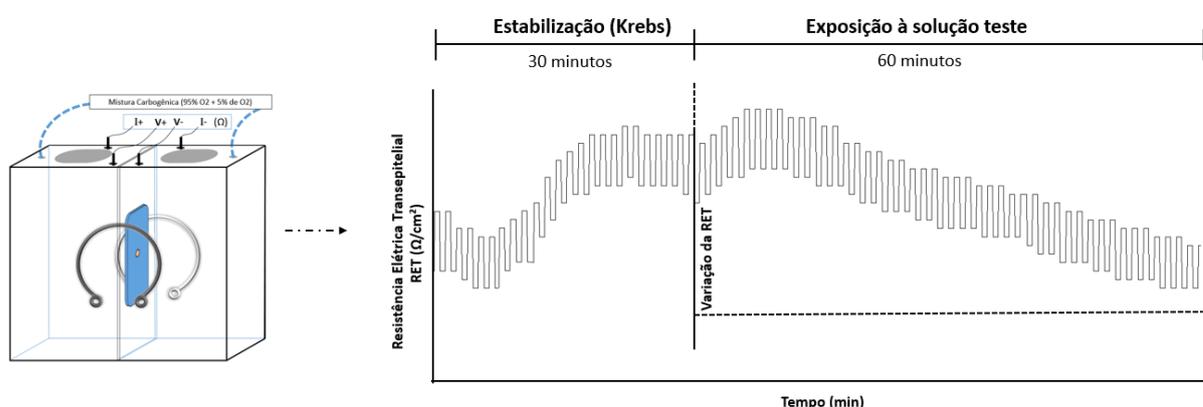
4.9.2. Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET)

A correção da resistência elétrica do meio e do circuito foi realizada inicialmente e acompanhada permanentemente por meio de eletrodos Ag/AgCl. Em seguida, foi realizada a montagem do tecido na câmara de Üssing, conforme descrito anteriormente. A RET basal foi calculada de acordo com a lei de Ohm, a partir das deflexões de voltagem induzidas por pulsos bipolares de corrente de $50\ \mu\text{A}$, com duração de 200 ms, a cada 6 s, aplicados por meio de fios de platina. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de circuito aberto. Após 30 minutos, o sistema obteve então a estabilidade, sendo possível estabelecer a RET basal, representada por Ω/cm^2 .

Após a estabilização, os tecidos cólicos dissecados foram expostos, no lado luminal, a uma solução diferente da que mimetiza a fisiológica (solução de Krebs). Essa solução não-fisiológica é denominada de “solução teste”, composta por Krebs contendo AAS (30,8 mM) (KEITA et al., 2018), inibidor de COX-1 (SC-560, 500 nM) ou inibidor de COX-2 (Celecoxibe, 500 nM) (JENSEN et al., 2018), sendo cada uma dessas substâncias diluída em etanol (etOH), fazendo-se necessário o uso de etOH no grupo Sham. A RET foi então avaliada durante os próximos 60 minutos e representada como Ω/cm^2 (TOBEY et al., 2004). Os resultados foram

expressos como percentual (%) de variação da resistência nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, correspondendo o tempo zero (momento da exposição do tecido à solução teste) a 100% (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do estudo da RET em câmara de Üssing.

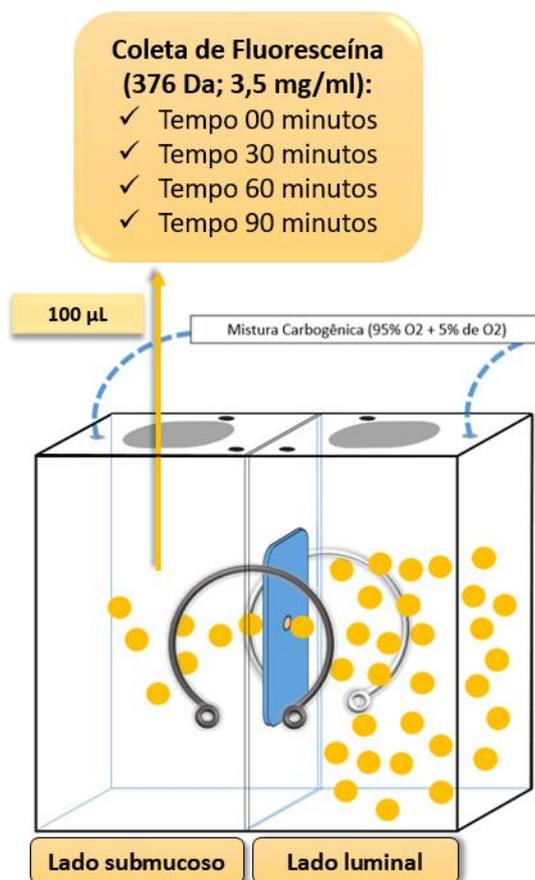


Fonte: Adaptado de Woodland, P. e colaboradores, 2013.

4.9.3. Avaliação da permeabilidade à fluoresceína

Após a exposição do tecido à “solução teste”, foi analisada a permeabilidade epitelial paracelular. Para este protocolo, os tecidos cólicos foram mantidos nas câmaras de Ussing e a solução do lado luminal foi substituída por uma solução contendo fluoresceína (1 mg/ml, 376 Da, diluído em Krebs pH 7,4), um traçador fluorescente permeável que passa através das camadas da mucosa (FARRÉ et al., 2008). A permeabilidade foi avaliada em intervalos de 30 min, durante 90 min a partir de amostras (100 µl) coletadas do lado não luminal. A quantificação de fluoresceína foi realizada utilizando um leitor de fluorescência (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores do fluxo de fluoresceína foram expressos em razão de intensidade de fluoresceína T_n/T_0 , a partir de uma curva padrão feita para cada análise, onde T_0 é o tempo inicial e T_n o tempo analisado (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática do estudo da permeabilidade à fluoresceína na câmara de Üssing.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.10 Grupos experimentais

→ **Curso temporal das alterações inflamatórias cólicas no modelo de colite induzida por TNBS:**

- Grupo controle (Sham)
- 7º dia após indução da colite (Colite 7º dia)
- 14º dia após indução da colite (Colite 14º dia)
- 28º dia após indução da colite (Colite 28º dia)

→ **Avaliação da integridade da mucosa cólica na câmara de Üssing após desafio com AAS:**

- Sham + etOH
- Sham + AAS
- Colite 7º dia + etOH
- Colite 7º dia + AAS

→ **Avaliação do papel das ciclooxygenases 1 e 2 na mucosa cólica na câmara de Üssing:**

- Sham + etOH
- Sham + SC-560
- Sham + Celecoxibe
- Colite 7º dia + etOH
- Colite 7º dia + SC-560
- Colite 7º dia + Celecoxibe

4.11 Análises estatísticas

O teste Shapiro Wilk foi realizado para verificar a normalidade das amostras. Para os dados paramétricos foram utilizados os testes estatísticos t de Student e análise de variância (ANOVA) seguido de pós teste Bonferroni (para dados paramétricos) e teste de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Dunn´s (para dados não-paramétricos). Os dados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Colite induzida por TNBS altera os critérios microscópicos de lesão

A avaliação histopatológica mostra que o grupo Colite 7º dia e Colite 14º dia apresentaram alterações estatísticas nos critérios microscópicos quando comparados ao grupo Sham. Uma dessas alterações observadas no Colite 7º dia foi a perda da arquitetura da mucosa e o espessamento da muscular. Outras alterações foram encontradas tanto grupo Colite 7º dia quanto no grupo Colite 14º dia, como infiltração celular e ausência de células caliciformes. Entretanto, não houve formação de abscesso em cripta em nenhum dos grupos experimentais. O grupo Colite 28º dia não apresentou diferença estatística de critérios microscópicos de inflamação em relação ao grupo Sham (Tabela 1).

Tabela 3: Escores das alterações microscópicas cólicas no modelo de colite induzida por TNBS

Grupos experimentais	Critérios analisados				
	Perda da arquitetura da mucosa (0 – 3)	Infiltração celular (0 – 3)	Espessamento da muscular (0 – 3)	Formação de abscesso em cripta (0 – 1)	Ausência de células caliciformes (0 – 1)
Sham	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (0-1)	0 (0-0)
Colite 7º dia	3 (1-3)*	3 (2-3)*	3 (2-3)*	1 (1-1)	1 (0-1)*
Colite 14º dia	3 (1-3)	3 (1-3)*	2 (1-3)	1 (1-1)	1 (0-1)*
Colite 28º dia	1,5 (1-2)	1 (1-2) [#]	1 (0-2) [#]	1 (0-1)	0 (0-0)

Nota: Os resultados são expressos como mediana com mínimo e máximo representado entre parênteses ($n \geq 5$ por grupo). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs. grupo Sham. [#] $p < 0,05$ vs. grupo Colite 7º dia.

5.2 Curso temporal das alterações inflamatórias cólicas no modelo de colite induzida por TNBS

Nestas análises experimentais, o grupo dos animais que foram induzidos à colite e eutanasiados após 7 dias (Colite 7º dia), apresentou índice significativamente maior ($p < 0.05$) de escores macroscópicos de danos quando comparado ao grupo não induzido (Sham) ($20,37 \pm 1,21$ vs. $0,5 \pm 0,22$ escores de danos, $*p < 0,05$, respectivamente). Ainda foi possível observar que os grupos eutanasiados após 14 dias (Colite 14º dia) e 28 dias (Colite 28º dia) de indução retornaram ao estado basal, não apresentando diferença estatística quando comparado ao grupo Sham ($1,67 \pm 0,9$ e $2,2 \pm 1,1$ escores de danos, respectivamente) (Gráfico 1A).

Analisando ainda o curso temporal da inflamação, foi possível observar que o grupo Colite 7º dia apresentou aumento significativo de peso úmido quando comparado ao grupo Sham ($0,45 \pm 0,06$ vs. $0,13 \pm 0,01$ g/cm de cólon, $*p < 0,05$, respectivamente). Com o decorrer da doença, nos dias 14 e 28 após a indução, foi possível observar redução do peso úmido do cólon desses animais, não tendo, dessa forma, diferença estatística quando comparados ao grupo controle (Colite 14º dia: $0,21 \pm 0,03$ e Colite 28º dia: $0,19 \pm 0,01$ g/cm de cólon) (Gráfico 1B).

Ao realizar o teste bioquímico de MPO, foi possível observar que amostras de tecidos cólicos no Colite 7º dia ($73,5 \pm 10,2$ U/mg de tecido) obtiveram, significativamente, $*p < 0,05$, maiores índices quando comparado ao Sham ($13,6 \pm 2,6$ U/mg de tecido). Entretanto, os resultados de MPO dos grupos Colite 14º dia ($26,5 \pm 8,7$ U/mg de tecido) e Colite 28º dia ($17,6 \pm 4,7$ U/mg de tecido) não se mostraram diferentes do grupo controle, ficando claro a redução da inflamação nesses grupos (Gráfico 1C).

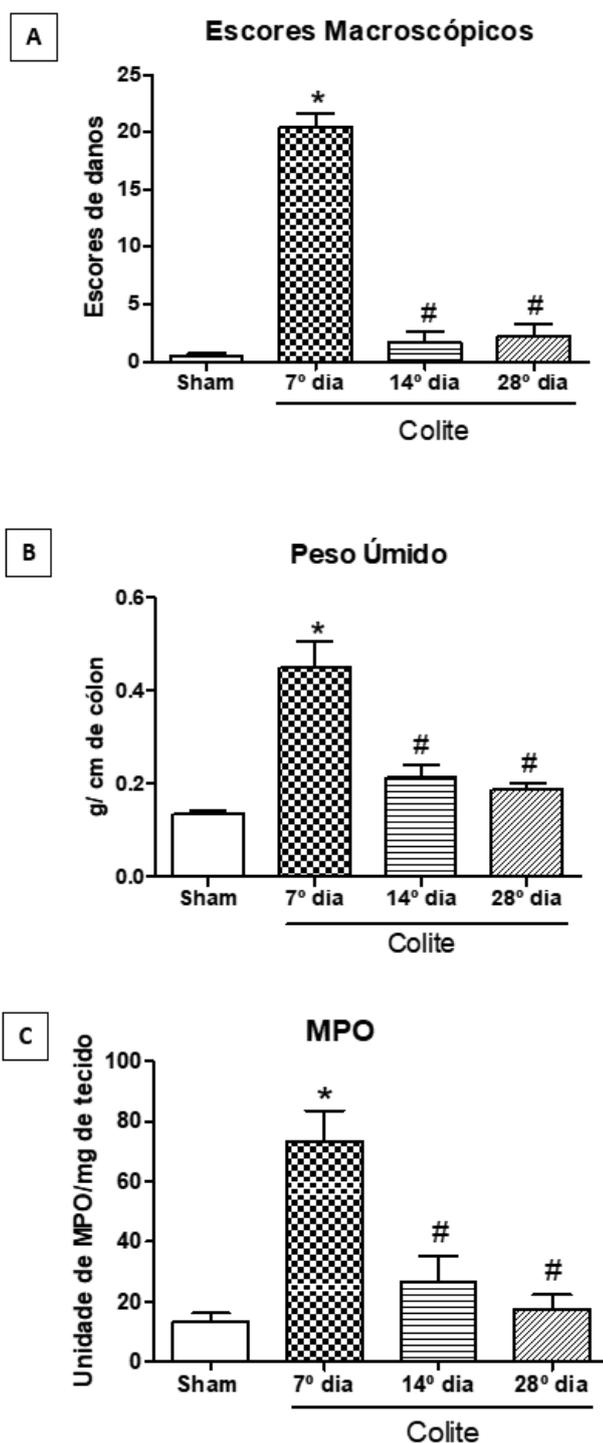


Gráfico 1: Curso temporal das alterações inflamatórias cólicas no modelo de colite induzida por TNBS. Análise dos escores macroscópicos (A), peso úmido (B) e MPO (C). Foram avaliados os grupos Sham e Colite (no 7º dia, 14º dia e 28º dia da doença). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 6$ animais por grupo) e foram avaliados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ comparado com o grupo Colite 7º dia.

5.3 Avaliação da integridade da mucosa cólica por meio da RET basal no modelo de colite induzida por TNBS

A mucosa cólica de animais induzidos à colite e eutanasiados 7 dias após, demonstrou menor resistência elétrica transepitelial basal ($32,0 \pm 1,9 \Omega/\text{cm}^2$) quando comparados ao grupo Sham ($36,4 \pm 1,6 \Omega/\text{cm}^2$), $*p < 0,05$ (Figura A). Diferentemente desse resultado, os grupos Colite 14º dia ($36,3 \pm 2,1 \Omega/\text{cm}^2$) e Colite 28º dia ($34,5 \pm 4,2 \Omega/\text{cm}^2$) não obtiveram resultados estatísticos diferentes do grupo controle (Gráfico 2 B e C).

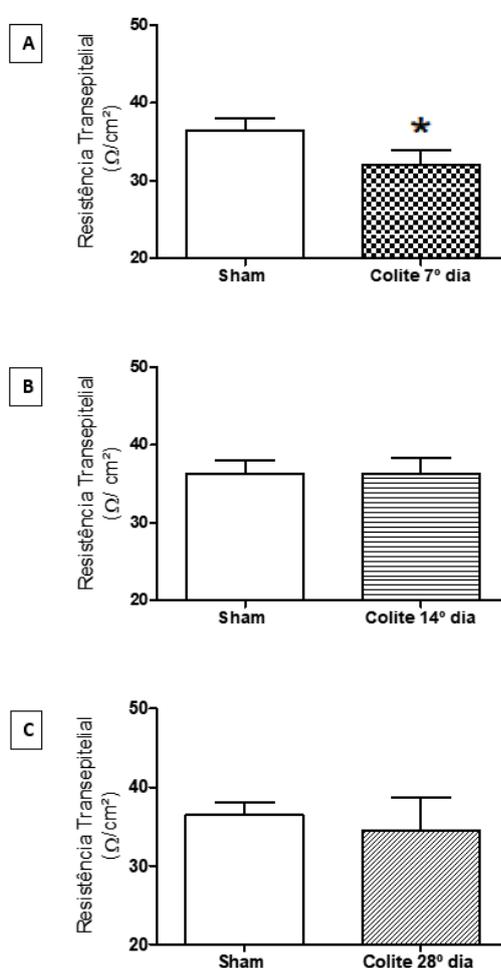


Gráfico 2: Avaliação da integridade da mucosa cólica por meio da RET basal no modelo de colite induzida por TNBS. A resistência elétrica transepitelial (RET) basal foi avaliada no momento do equilíbrio das biópsias em animais Sham comparados com animais induzidos a colite e eutanasiados nos dias 7 (A); 14 (B) e 28 (C) após a indução. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 8$ por grupo) e foram analisados pelo teste t Student não pareado. $*p < 0,05$.

5.4 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com AAS, por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS

Como pode ser observado no Gráfico 3 (A), a mucosa cólica dos animais induzidos a colite, eutanasiados no 7º dia e expostos *in vitro* ao AAS demonstrou queda da RET, sendo esta significativa no tempo 60 minutos (B), ao ser comparada com a RET do grupo Sham também exposto ao AAS ($76,85 \pm 4,66$ e $91,21 \pm 2,79$ %, $*p < 0,05$, respectivamente).

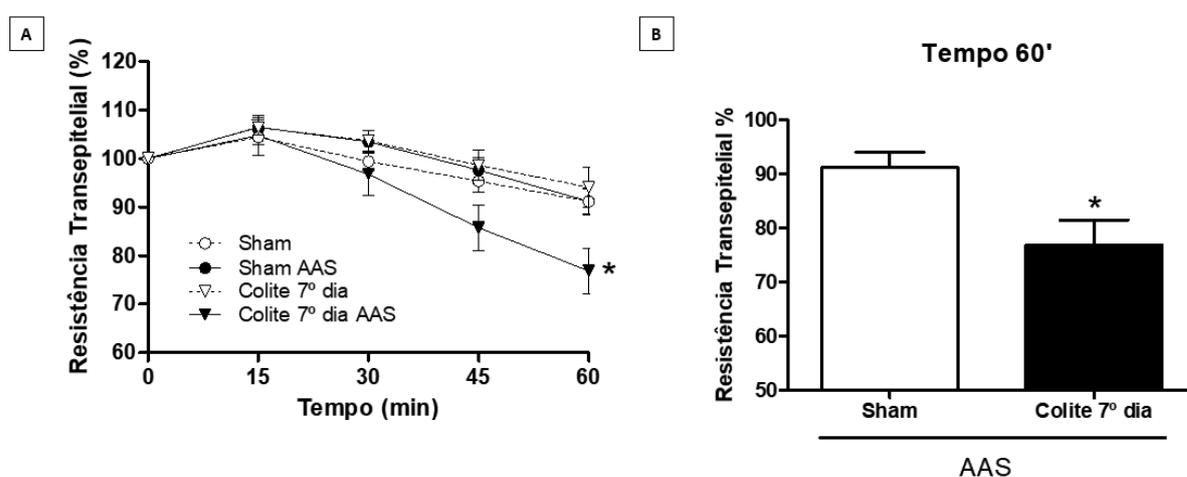


Gráfico 3: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com AAS, por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS. A RET foi avaliada após a exposição da mucosa ao ácido acetilsalicílico (AAS) e aferidas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 minutos (A) e a diferença entre os grupos no tempo de 60 minutos após a exposição (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 8$ por grupo) e foram analisados pelo teste two-way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni e teste t Student não pareado, respectivamente. $*p < 0,05$.

5.5 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com AAS, por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS

Nessa análise experimental, foi avaliado a integridade da mucosa cólica por meio da passagem de fluoresceína do lado luminal para o lado não-luminal nos grupos 7º dia após indução da colite e Sham, ambos expostos ao AAS. Foi possível observar um aumento da permeabilidade à fluoresceína no tempo 60 minutos no grupo Colite 7º dia AAS quando comparado ao grupo Sham AAS ($339,7 \pm 61,88$ e

159,8 ± 40,71, *p<0,05, respectivamente) (Gráfico 4A). Além do tempo 60 minutos, foi observado também um aumento da permeabilidade no tempo 90 minutos, após exposição à fluoresceína, no grupo Colite 7º dia AAS quando comparado ao grupo Sham AAS (397,6 ± 75,62 e 198,4 ± 49,43, expressos como razão de intensidade de fluoresceína Tn/T0, *p<0,05, respectivamente) (Gráfico 4B).

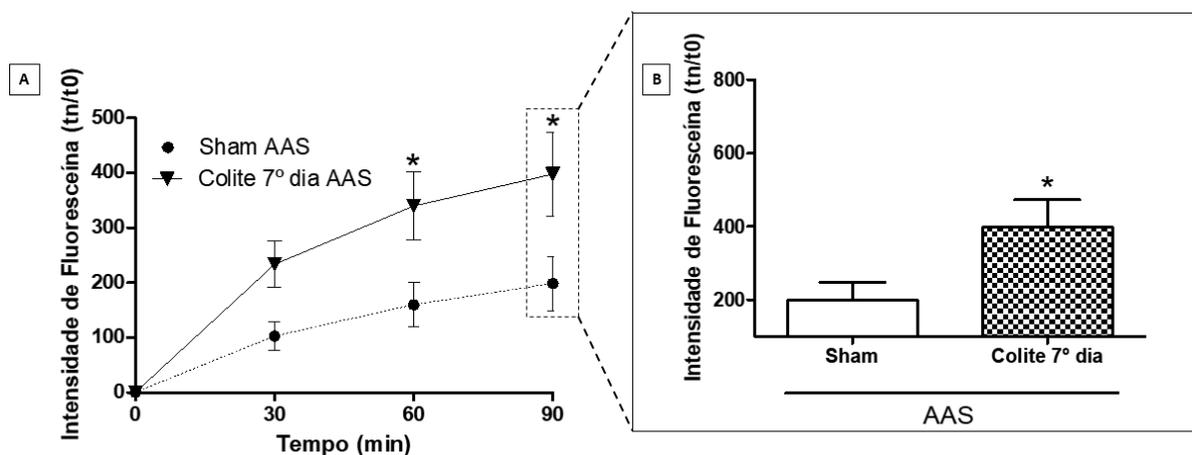


Gráfico 4: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com AAS, por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS. A permeabilidade à fluoresceína foi avaliada em animais saudáveis (Sham) e animais com 7 dias após a indução da colite (Colite 7º dia), depois da exposição de 60 minutos ao AAS, sendo realizadas coletas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos (A) e a diferença entre os grupos representada no tempo 90 minutos (B). Os resultados são expressos como média ± EPM (n ≥ 9 por grupo) e foram analisados pelo teste two-way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni e teste t Student não pareado, respectivamente. *p<0,05.

5.6 Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS

Ao avaliar a ação de inibidores de COX-1 e COX-2 na integridade da mucosa cólica, não foi possível observar uma queda da RET do tecido dos animais com 7 dias após indução da colite quando exposto ao celecoxibe e comparado ao grupo Colite 7º dia após 60 minutos (92,81 ± 5,03 e 94,1 ± 4,16 %, respectivamente). Entretanto, foi possível observar uma queda significativa da RET do grupo Colite 7º dia quando exposto ao SC-560 ao comparar com o grupo Colite 7º dia nos tempos 30 minutos (86,9 ± 2,6 e 103,7 ± 2,11 %, *p<0,05,

respectivamente), 45 minutos ($81 \pm 3,1$ e $98,64 \pm 3,1$ %, $*p < 0,05$, respectivamente) e 60 minutos ($73,6 \pm 3,5$ e $94,1 \pm 4,16$ %, $p < 0,05$, respectivamente) (Gráfico 5 A e B).

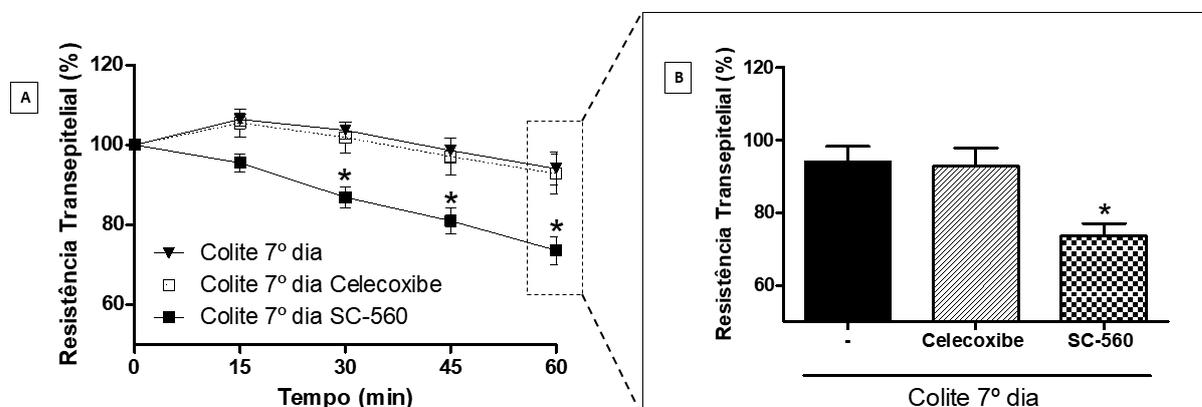


Gráfico 5: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS. A RET foi avaliada após a exposição da mucosa aos inibidores de COX-1 e 2 e aferidas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 minutos (A) e a diferença entre os grupos no tempo de 60 minutos após a exposição (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 5$ por grupo) e foram analisados pelo teste two-way ANOVA e teste one-way ANOVA, respectivamente, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. $*p < 0,05$.

5.7 Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS

Para avaliar a ação do inibidor de COX-1 na RET dos animais com colite e dos animais saudáveis, foi realizada a exposição do tecido cólico, tanto dos animais do grupo Colite 7º dia quanto dos animais do grupo Sham, ao SC-560, sendo possível observar maior queda da RET nos animais com colite quando comparados aos animais saudáveis nos tempos 45 minutos ($81 \pm 3,1$ e $93,3 \pm 3,1$ %, $*p < 0,05$, respectivamente) e 60 minutos ($73,6 \pm 3,5$ e $90,9 \pm 3,02$ %, $*p < 0,05$, respectivamente) (Gráfico 6 A e B).

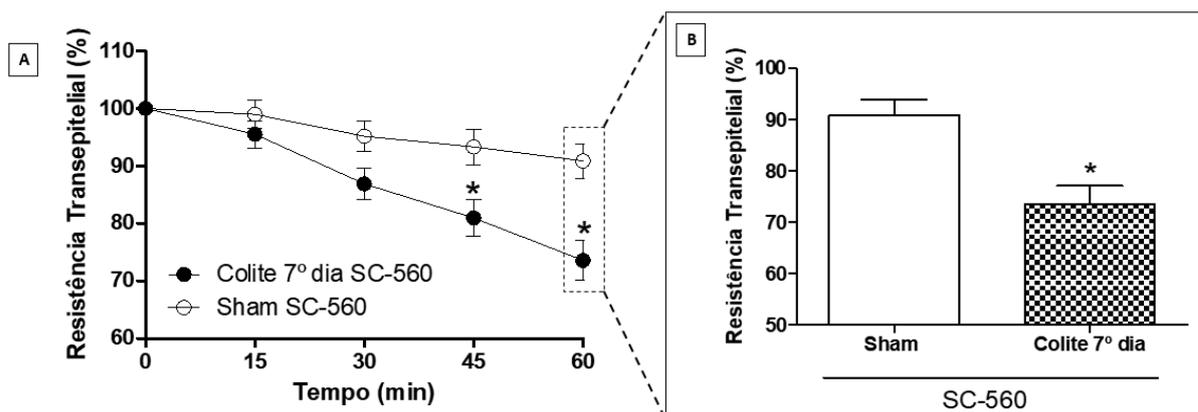


Gráfico 6: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS. A RET foi avaliada após a exposição da mucosa ao inibidor de COX-1 e aferida nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 minutos (A) e a diferença entre os grupos no tempo de 60 minutos após a exposição (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 6$ por grupo) e foram analisados pelo teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni e teste t Student não pareado, respectivamente. * $p < 0,05$.

5.8 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS

Nessa análise experimental, foi avaliado a integridade da mucosa cólica por meio da passagem de fluoresceína do lado luminal para o lado não-luminal nos grupos 7º dia após indução da colite e Sham, ambos expostos ao inibidor de COX-1 (SC-560). Foi possível observar um aumento da permeabilidade no tempo 60 minutos no grupo Colite 7º dia SC-560 quando comparado ao grupo Sham SC-560 ($215,4 \pm 43,03$ e $82,63 \pm 25,44$, * $p < 0,05$, respectivamente) (Gráfico 7A). Além do tempo 60 minutos, foi observado também um aumento da permeabilidade no tempo 90 minutos, após exposição à fluoresceína, no grupo Colite 7º dia SC-560 quando comparado ao grupo Sham SC-560 ($294,8 \pm 41,97$ e $116,8 \pm 34,51$, expressos como razão de intensidade de fluoresceína T_n/T_0 , * $p < 0,05$, respectivamente) (Gráfico 7B).

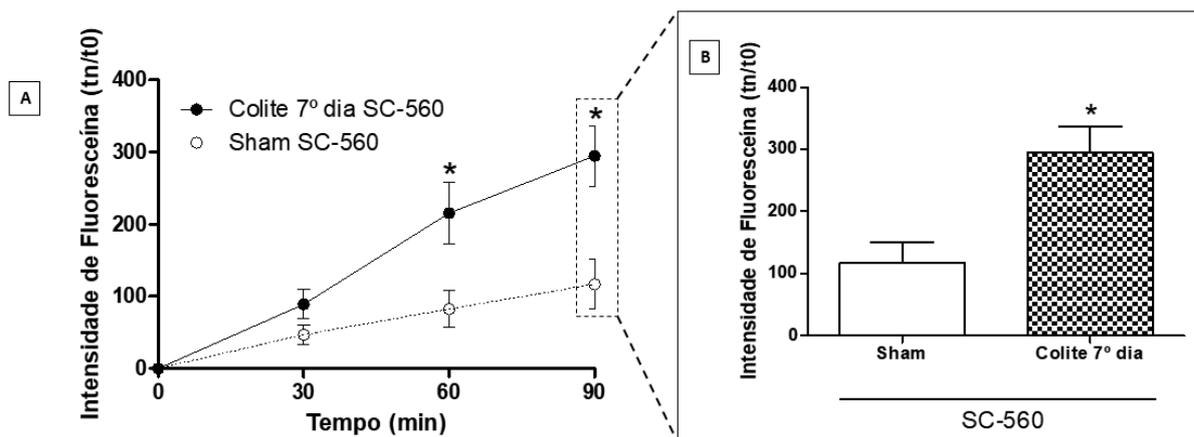


Gráfico 7: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-1 (SC-560), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS. A permeabilidade à fluoresceína foi avaliada em animais saudáveis (Sham) e animais com 7 dias após a indução da colite (Colite 7º dia), depois da exposição de 60 minutos ao inibidor de COX-1 (SC-560), sendo realizadas coletas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos (A) e a diferença entre os grupos representada no tempo 90 minutos (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 7$ por grupo) e foram analisados pelo teste t Student não pareado. * $p < 0,05$.

5.9 Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS

Para avaliar a ação do inibidor de COX-2 na RET dos animais com colite e dos animais saudáveis, foi realizada a exposição do tecido cólico, tanto dos animais do grupo Colite 7º dia quanto dos animais do grupo Sham, ao Celecoxibe, não sendo possível observar diferença estatística entre esses dois grupos no tempo 60 minutos ($92,81 \pm 5,03$ e $93,19 \pm 3,12$ %, respectivamente) (Gráfico 8 A e B).

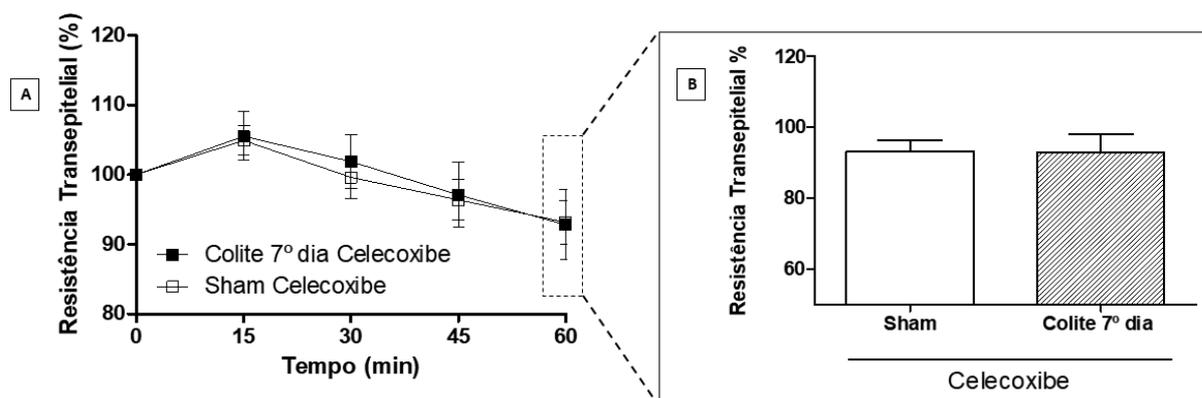


Gráfico 8: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da RET, no modelo de colite induzida por TNBS. A RET foi avaliada após a exposição da mucosa ao inibidor de COX-1 e aferida nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 minutos (A) e a diferença entre os grupos no tempo de 60 minutos após a exposição (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 6$ por grupo) e foram analisados pelo teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni e teste t Student não pareado, respectivamente. * $p < 0,05$.

5.10 Avaliação da integridade da mucosa cólica desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS

Para avaliar a ação do inibidor de COX-2 na permeabilidade à fluoresceína dos animais com colite e dos animais saudáveis, foi realizada a exposição do tecido cólico, tanto dos animais do grupo Colite 7º dia quanto dos animais do grupo Sham, ao Celecoxibe, não sendo possível observar diferença estatística entre esses dois grupos no tempo 60 minutos ($228,8 \pm 51,71$ e $258,3 \pm 87,41$, expressos como razão de intensidade de fluoresceína T_n/T_0 , respectivamente) (Gráfico 9 A e B).

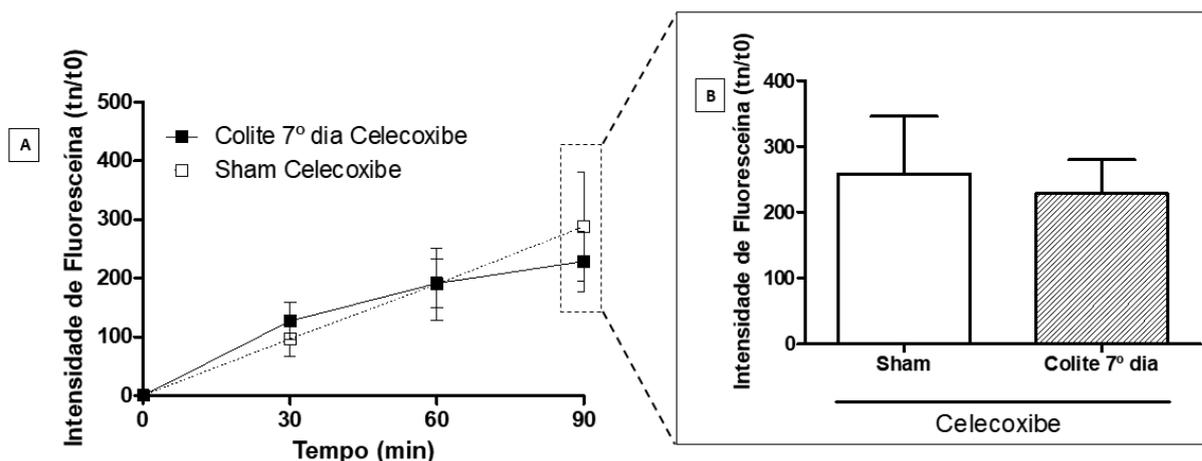


Gráfico 9: Avaliação da integridade da mucosa cólica, desafiada com inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe), por meio da permeabilidade à fluoresceína, no modelo de colite induzida por TNBS. A permeabilidade à fluoresceína foi avaliada em animais saudáveis (sham) e animais com 7 dias após a indução da colite (Colite 7º dia), depois da exposição de 60 minutos ao inibidor de COX-2 (Celecoxibe), sendo realizadas coletas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos (A) e a diferença entre os grupos representada no tempo 90 minutos (B). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n \geq 7$ por grupo) e foram analisados pelo teste t Student não pareado. * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

As DIIs são caracterizadas por inflamação crônica na mucosa do intestino, sendo a RCU e a DC seus principais representantes. A DC é uma doença inflamatória transmural crônica da mucosa, induzida por respostas imunes anormais do hospedeiro contra a flora comensal tolerada pelo intestino. Essa afecção se apresenta de forma descontínua, podendo acometer qualquer região do TGI, sendo as principais áreas afetadas o íleo terminal e a região perianal, estando associadas a complicações, como fístulas, estenoses e abscessos (BAUMGART; CARDING, 2007). Defeitos genéticos nas JEs epiteliais intestinais e lesão da barreira epitelial intestinal também foram relatados como envolvidos na ocorrência e desenvolvimento de DC (WU, et al., 2000).

Vários fatores compõem a fisiopatologia da DC, dentre eles estão a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, o desequilíbrio de respostas Th (com predominância de Th1 e deficiência de Th2), aumento de IL-10, a presença do gene CARD 15, que codifica NOD 2, e a ativação deste por peptídeoglicano presente na parede celular bacteriana (ABRAHAM; CHO, 2009; GUO et al., 2013; SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A indução de colite por TNBS é um modelo bem reconhecido, tanto no Brasil quanto no exterior, sendo o modelo de indução dessa doença, de forma experimental, mais amplamente utilizado. O modelo é simples na modelagem, reprodutível, com excelentes sinais de inflamação e baixo preço, por isso é adequado para pesquisa imunológica das DIIs (MORRIS et al., 1989).

Vários grupos de fármacos são utilizados no intuito de elucidar ou apenas abrandar os sintomas das DIIs, mas sempre apresentam efeitos colaterais que acabam agravando o quadro do paciente. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), por exemplo, inibem, de modo seletivo, incluindo celecoxibe, ou não-seletivo, dentre eles o ácido acetilsalicílico (AAS), as enzimas ciclooxigenases (COX) 1 e 2, levando, em consequência, à diminuição da concentração das prostaglandinas protetoras na mucosa. Além disso, os AINES também alteram a microvasculatura intestinal e medeiam a disfunção endotelial, que são eventos potencialmente importantes na patogênese associada à DII (MUSUMBA et al., 2009). A partir desses efeitos associados às ações inibitórias das enzimas COX, nosso grupo decidiu investigar o papel das ciclooxigenases 1 e 2 na manutenção da integridade epitelial colônica na colite induzida por TNBS em ratos.

No presente estudo, foi possível observar que o modelo de indução de colite por

meio de TNBS foi reproduzido, conforme a técnica introduzida por Morris e colaboradores (1989) e modificada por Antoniou e colaboradores (2016), sendo comprovada por alterações morfológicas, como observado nos escores macroscópicos e microscópicos; alteração bioquímica, como MPO; alterações inflamatórias, por meio da aferição do peso úmido (aumentado devido a presença de edema); e na integridade do tecido cólico, ao obter resultados da RET basal. Tendo em vista esses critérios de análise, o grupo de animais no sétimo dia após indução demonstrou maiores parâmetros inflamatórios quando comparados ao 14º e ao 28º dia após a indução.

Ao avaliar o curso temporal da colite, foi possível observar que o sétimo dia após a indução demonstrou resultados mais acentuados nas alterações inflamatórias e morfológicas do cólon de animais com colite quando comparados aos animais saudáveis, demonstrando maiores índices de escores macroscópicos, ficando evidente a presença de hiperemia, espessamento da parede colônica e grande área de lesão, encontrando-se, algumas vezes, ulcerada. Além dos escores macroscópicos, ficou evidente também um aumento do processo inflamatório ao realizar a análise histológica, na qual observou-se perda da arquitetura da mucosa e espessamento da muscular apenas no 7º dia após indução; infiltração celular e ausência de células caliciformes, tanto no 7º quanto no 14º dia após a indução da colite. Entretanto, o grupo avaliado após 28 dias de indução, não demonstrou, em nenhuma avaliação, diferença estatística em comparação ao Sham, sendo possível concluir que no 28º dia de colite os cólons dos animais retornam ao seu estado fisiológico.

Resultados similares também foram observados por Zhao e colaboradores (2019) que demonstram alterações histológicas de animais com sete dias após a indução da doença de colite com TNBS, como grande perda da arquitetura da mucosa, hiperplasia atípica e necrose, ficando claro a severa ação do TNBS associado ao etOH na arquitetura do tecido cólico dos animais induzidos à colite. Outro estudo que comprova o efeito inflamatório desse agente agressor, no cólon, demonstra aumento nos escores macroscópicos, sendo possível observar hiperemia, inflamação, erosão e necrose; além de escores histológicos elevados e altos níveis de MPO, quando comparados com o grupo que não teve indução da colite (XU et al., 2018), demonstrando características patológicas semelhantes às observadas em humanos portadores dessa doença (MORRIS et al., 1989).

As citocinas pró-inflamatórias induzem alterações na microvasculatura, levando ao extravasamento de proteínas plasmáticas e ao recrutamento de neutrófilos. Uma concentração crítica de neutrófilos é necessária para eliminar bactérias invasoras, e imediatamente após a penetração bacteriana da mucosa há competição direta entre replicação bacteriana e

recrutamento de neutrófilos (o que explica o aumento de MPO em casos em que há maior inflamação) e fagocitose bacteriana, seguida de morte (SEGAL, 2018).

A avaliação funcional da integridade da mucosa pode ser representada pela aferição da RET, sendo esta avaliação analisada em nosso estudo e o resultado obtido neste foi a redução da RET basal, do tecido cólico, observada no 7º dia após indução da colite quando comparado com o grupo Sham, comprovando a ação deletéria da colite induzida por TNBS na integridade epitelial do tecido cólico. Essa redução da RET basal demonstra que há alteração na integridade da mucosa cólica dos animais com colite, diferentemente dos resultados observados no 14º e 28º dias após a indução, onde não foi possível observar diferença estatística. Esse decréscimo da RET associado à colite pode estar aliado ao rompimento de JEs e a mudanças sutís na estrutura do citoesqueleto resultando em um consequente aumento da permeabilidade paracelular da camada epitelial (Ji et al., 2016).

Essa queda na RET basal pode ser explicada também devido à barreira do epitélio intestinal ser facilmente interrompida durante a inflamação do intestino, como RCU ou DC (MARTINI et al., 2017). As células epiteliais intestinais, como componentes importantes da barreira física intestinal, desempenham um papel fundamental na resistência a substâncias nocivas (como microrganismos patogênicos e toxinas), e na manutenção da homeostase intestinal (MARCHIANDO et al., 2010). Evidências recentes sugerem que a característica patológica crucial da DII é a disfunção da barreira epitelial do cólon aumentada e a translocação bacteriana, seguida pela estimulação da resposta inflamatória na mucosa do cólon (MARTINI et al., 2017). Além disso, o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal agrava os sintomas intestinais e prejudica a cicatrização da mucosa em pacientes com DII (CHANG et al., 2017).

Os mediadores inflamatórios têm sido hipotetizados como fatores indutores elementares para a ruptura das JEs intestinais e, conseqüentemente, a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana, o que ficou evidente nos resultados descritos por Ribeiro e colaboradores (2018), onde os animais apresentaram disfunção da barreira epitelial intestinal, caracterizada por aumento da permeabilidade e translocação bacteriana, alterações nas JEs (abertura e alteração da expressão de proteínas constituintes) e hiperativação da resposta inflamatória, fatos que explicam a queda da RET basal associada à inflamação na colite.

Ficou evidenciado também neste estudo, o efeito do AAS, um AINE e inibidor inespecífico de COX, na manutenção da integridade do tecido cólico, avaliado tanto por meio da RET, quanto por meio da permeabilidade à fluoresceína, demonstrando um efeito deletério na mucosa cólica de animais com colite. Isso fica claro ao observarmos a diferença na RET do grupo Colite 7º dia em relação ao grupo Sham, demonstrando uma queda mais pronunciada da

resistência elétrica transepitelial em animais com colite e refletindo em um aumento da permeabilidade à fluoresceína quando comparados ao grupo controle, após ambos serem expostos ao AAS.

Os AINEs, incluindo o AAS, apesar de seus efeitos benéficos citados em algumas pesquisas, como a profilaxia de tromboembolismo e a redução do risco de adenoma colorretal e câncer (CHAN et al., 2011; HAYKAL et al., 2019), estão associados à lesão da mucosa gastrintestinal e são descritos como uma possível causa para o desenvolvimento das DIIs (HUANG et al., 2011). Os efeitos adversos dos AINEs na mucosa gastrintestinal incluem erosões, ulceração, inflamação, perfuração e sangramento, que podem ocorrer devido às propriedades ácidas e lipofílicas, ocasionando mudanças na estrutura das membranas das células lipídicas (presentes na camada epitelial) (BJARNASON et al., 2007); ou por consumirem o gradiente eletroquímico de H^+ mitocondrial (necessário para geração de ATP), causando morte celular (SOMASUNDARAM et al., 1997; SOMASUNDARAM et al., 2000); ou por afetarem a síntese de prostaglandinas, o que acarreta em efeitos sobre processos inflamatórios, fluxo sanguíneo mesentérico e crescimento celular. Essas características deletérias podem ser agravadas pelo uso de AAS, visto que este anti-inflamatório age inibindo de forma não-seletiva e irreversível a enzima COX por meio do bloqueio estérico do seu canal de sítio ativo, o que leva a uma produção deficiente de prostaglandina H_2 (PGH_2 , precursor da prostaglandina que desempenha funções anti-inflamatórias), ocasionando danos aos pacientes portadores de DIIs (LOLL et al., 1995; LEVY et al., 2001; MILES et al., 2002). O AAS, ao inibir a COX, leva a uma diminuição da síntese de PGH_2 e, conseqüentemente, de prostaglandina D_2 (PGD_2) e prostaglandina E_2 (PGE_2). A PGE_2 tem efeitos pró-inflamatórios, mas também tem várias propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e interleucina 1 ($IL-1$), e promove a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a $IL-10$ (JING et al., 2003; XU et al., 2008; SERHAN et al., 2008) e, hipoteticamente, uma síntese diminuída poderia induzir a DC.

Um estudo realizado com humanos portadores de DC, constatou que RET dos cólons biopsiados desses pacientes teve um decréscimo do seu valor após o uso de AAS na câmara de Üssing, indicando um enfraquecimento da barreira epitelial. Da mesma forma, foi observado um aumento da permeabilidade paracelular das biópsias (após uso de AAS) dos indivíduos com DC, quando comparados aos não portadores da doença, sendo comprovada a alteração, da integridade da mucosa, proveniente desse AINE, estando essa alteração associada a um decréscimo no nível de claudina-1, claudina-5 e tricelulina, componentes das JEs, o que

está intimamente relacionado com a entrada de antígenos na mucosa (KEITA et al., 2018).

Também foi avaliado neste trabalho, o comprometimento da integridade cólica de animais com colite por meio do uso de um inibidor específico de COX-1 (SC-560), ficando evidente o seu efeito deletério na manutenção epitelial desse tecido, devido ao decréscimo observado na RET e o consecutivo aumento da permeabilidade à fluoresceína, quando comparados ao grupo Sham associado ao mesmo inibidor.

O ácido araquidônico (AA), substância oriunda da degradação de fosfolipídeos de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂, é metabolizado pela COX, dando origem a prostaglandinas e tromboxanos. A PGE₂, a prostaglandina gastrointestinal mais abundante, regula várias funções homeostáticas normais do intestino, incluindo a motilidade e a secreção (STENSON et al., 2007). A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos; enquanto a COX-2 é induzida nas inflamações. A COX-1 é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas (VANE et al., 1998; ANTMAN et al., 2005; GROSSER et al., 2006). Esses efeitos colaterais resultam do bloqueio da COX-1 na mucosa gastrointestinal e na consequente inibição da produção de prostaciclina, PGE₂ e PGD₂ no estômago (LANAS et al., 2007). Essas prostaglandinas servem como agentes citoprotetores da mucosa gastrintestinal; inibem a secreção ácida pelo estomago, aumentam o fluxo sanguíneo local e a secreção de muco citoprotetor (OFMAN et al., 2002).

Diferentemente dos resultados observados com o inibidor seletivo de COX-1, o uso de um inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe) nos grupos Colite 7º dia e Sham não apresentaram diferença estatística da RET e nem da permeabilidade à fluoresceína.

Esses resultados podem ser explicados pelas propriedades da COX-2 e dos efeitos ocasionados, após o seu bloqueio, ao organismo. Diferentemente da COX-1, a COX-2 não é constitutiva nos tecidos, e sim induzida nas inflamações. Esta enzima é induzida na inflamação por vários estímulos, dentre eles estão: citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento; ainda é responsável por originar prostaglandinas indutoras, que contribuem para o desenvolvimento dos sinais de inflamação, edema, rubor, febre e hiperalgesia. A COX-2 é expressa também nas células vasculares endoteliais normais, que secretam prostaciclina em resposta ao estresse de cisalhamento. O bloqueio da COX-2 resulta em inibição da síntese de prostaciclina (TOPPER et al., 1996; FITZGERALD et al., 1984; FITZGERALD, 2004).

Estudos realizados com o intuito de elucidar o efeito da imunoexpressão de COX-1 e COX-2 em tecidos de pacientes com RCU, DC e epitélio normal, observaram a

imunexpressão da COX-1 em células epiteliais e em células mononucleares da lâmina própria na mesma proporção (SINGER et al., 1998). Foi encontrado também nesse estudo, uma maior imunexpressão da COX-2 na RCU e na DC, sugerindo que a expressão persistente dessa enzima no epitélio cólico está correlacionada ao estado inflamatório ocasionado por essas afecções, concordando com Romero e colaboradores (2008) que indicaram que a elevada imunexpressão de COX-2 em DC possivelmente desempenha um papel na patogênese da inflamação.

Alguns estudos mostram-se divergentes em relação à presença de COX-2 no epitélio normal. Alguns estudos relatam a ausência de imunexpressão da COX-2 no epitélio saudável (JOO et al., 2002; SINGER et al., 1998), mas outros, como Jackson e colaboradores (2000) observaram a expressão de COX-2 na mucosa gástrica normal. Ribardo e colaboradores (2001) relataram altos níveis de enzima fosfolipase ativa e COX-2 em biópsias de pacientes com processo inflamatório na mucosa intestinal. Outros pesquisadores, ao avaliarem a expressão de COX-2 em biópsias de pacientes com DII, detectaram a presença dessa enzima na parede arterial em todos os casos (TABERNERO et al., 2003), sugerindo que, possivelmente, a COX-2 exerça um efeito vasoconstritor nas artérias mesentéricas de pacientes com DC, o que acarretaria em isquemia e hipóxia e poderia explicar o motivo da morte celular.

Devido à alta expressão de COX-2 (responsável pela origem de prostaglandinas a partir de AA) nas DDIs, faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados sobre PGE₂ (prostaglandina mais abundante no trato gastrointestinal) na DC, devido essa via poder fornecer informações importantes sobre seus efeitos biológicos na patogênese dessa doença.

Uma limitação que encontramos em nosso estudo foi o uso de apenas uma concentração dos inibidores de COX-1 (SC-560) e 2 (celecoxibe), mas acreditamos que isso não acarretou problemas, visto que essa mesma concentração de 500nM também foi utilizada por outros pesquisadores, demonstrando resultados semelhantes aos encontrados em nossa pesquisa (JENSEN et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

- ✓ Reprodução do modelo de colite induzida por TNBS é viável.
- ✓ A utilização de inibidor inespecífico de COX (AAS) é deletéria à integridade epitelial do cólon de animais com colite (Queda da RET e aumento da permeabilidade).
- ✓ Inibição de COX-1 é deletéria à integridade epitelial do cólon de animais com colite (Queda da RET e aumento da permeabilidade à fluoresceína), demonstrando o papel constitutivo desta enzima no organismo.
- ✓ Inibição de COX-2 não alterou a integridade epitelial do cólon de animais com colite, demonstrando o papel induzível desta enzima para essa alteração experimental.
- ✓ Esses achados podem ajudar a revelar a associação de AINEs no tratamento da DC, bem como abre portas para futuros estudos que queiram relacionar a via das ciclooxigenases, incluindo seus subprodutos, à DIIs, sendo necessários para a adoção de melhores táticas terapêuticas no combate dessas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Disease. **The new england journal of medicine**. v. 21, p.2066-2078, 2009.
- ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World J Gastroenterol**. v. 19, p. 6540-6547, 2013.
- ANTMAN, E.M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**. v. 112, p. 759-770, 2005.
- ANTONIOU, E.; MARGONIS, G. A.; ANGELOU, A.; PIKOULI, A.; PARASKEVI ARGIRI, P.; KARAVOKYROS, I.; PAPALOIS, A.; PIKOULIS, E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of Medicine and Surgery**. v.11, p. 9-15, 2016.
- APPLEYARD, C.B.; WALLACE, J.L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol.* v. 269, p. 119-25. 1995.
- ARICO, S.; PATTINGRE, S.; BAUVY, C.; GANE, P.; BARBAT, A.; CODOGNO, P.; OGIER-DENIS, E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. **J. Biol. Chem**. v. 277, p. 27613–27621, 2002.
- BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**. v.369, p.1641-1657, 2007.
- BELASCO, A. G. S.; SOUZA, M. M.; NASCIMENTO, J. E. A. Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença Inflamatória Intestinal do Estado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Coloproct**. v.28, p.324-328, 2008.
- BERNARDINI, N.; COLUCCI, R.; MATTII, L. et al. Constitutive expression. of cyclooxygenase-2 in the neuromuscular compartment of normal human colon. **Neurogastroenterol Motil**. v.18, p.654–662, 2006.
- BILLMEIER, U.; DIETERICH, W.; NEURATH, M. F.; ATREYA, R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**. v.22, p.9300-9313, 2016.

BJARNASON, I.; SCARPIGNATO, C.; TAKEUCHI, K.; RAINSFORD, K.D. Determinants of the short-term gastric damage caused by NSAIDs in man. **Aliment Pharmacol Ther**; v.26, p. 95–106, 2007.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, p. 618–622, 1982.

CHAN, A.T.; GIOVANNUCCI, E.L.; MEYERHARDT, J.A.; SCHERNHAMMER, E.S.; CURHAN, G.C.; FUCHS, C.S. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. **JAMA**. v. 294, p.914–923, 2005.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci**. v.99, p.13926- 13931, 2002.

CHANG, J.; LEONG, R.W.; WASINGER, V.C.; IP, M., YANG, M.; PHAN, T.G. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. **Gastroenterology**. v.153, p.723-731, 2017.

DEININGER, M.H.; WELLER, M.; STREFFER, J.; MITTELBRONN, M.; MEYERMANN, R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. **Acta Neuropathol**; v. 98, p.240-244, 1999.

DOVIZIO, M.; TACCONELLI, S.; SOSTRES, C.; RICCIOTTI, E.; PATRIGNANI, P. Mechanistic and pharmacological issues of aspirin as an anticancer agent. **Pharmaceuticals**, v. 5, p.1346–1371, 2012.

ELIA, P.P.; FOGAÇA, H.S.; BARROS, R.G.G.R.; ZALTMAN, C.; ELIA, C.S.C. Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro. **Arq Gastroenterol** v. 44, p.332-339, 2007.

FARRÉ, R.; VOS R.D.; GEBOES K.; VERBECKE K.; BERGHE P.V.; DEPOORTERE I.; BLONDEAU K.; TACK J.; SIFRIM D. Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces. **Gut**, v. 56, p. 1191–1197, 2007.

FITZGERALD, G.A.; SMITH, B.; PEDERSEN, A.K.; BRASH, A.R. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. **N Engl J Med.**; v. 310, p.1065-1068, 1984.

FITZGERALD, G.A. Coxibs and cardiovascular disease. **N Engl J Med.** v.351: p. 1709-1711, 2004.

FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; COLUCCI, R. et al. Role of cyclooxygenases 1 and 2 in the modulation of neuromuscular function in the distal colon of humans and mice. **Gut.** v.54, p. 608–616, 2005.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; BETANZOS, A.; NAVA, P.; JARAMILLO, B.E. Tight junction proteins. Review. **Biophysics and Molecular Biology.** v. 81, p. 1-44, 2003.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest.** v. 116, p. 4-15, 2006.

GUO, Y.; LU, N.; BAI, A. Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update. **BioMed Research International.** v.13, p. 1-9, 2013.

HAMABATA, T.; NAKAMURA, T.; MASUKO, S.; MAEDA, S.; MURATA, T. Production of lipid mediators across different disease stages of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **J Lipid Res.** v. 59, p.586-595, 2018.

HANAUER, S. B.; SANDBORN, W. The Practice Parameters Committee of The American College of Gastroenterology. Management of Crohn's Disease in Adults. **Am J Gastroenterol.** v. 96, p. 635-643, 2001.

HAYKAL, T.; KHEIRI, B.; ZAYED, Y.; BARBARAWI, M.; MIRAN, M.S.; CHAHINE, A.; KATATO, K.; BACHUWA, G. Aspirin for venous thromboembolism prophylaxis after hip or knee arthroplasty: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Orthopaedics.** v. 16, p. 312-319, 2019.

HUANG, E.S.; STRATE, L.L.; HO, W.W.; LEE, S.S.; CHAN, A.T. Long-term use of aspirin and the risk of gastrointestinal bleeding. **Am J Med.** v. 124(5), p. 426-433, 2011.

HUGOT, J. P.; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; OLSON, J. M.; LEE, J. C.; BEAUGERIE, L. ET AL. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. **Nature**. v. 379, p.821-823, 1996.

JACKSON, L.M.; WU, K.C.; MAHIDA, Y.R.; JENKINS, D.; HAWKEY, C.J. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. **Gut**. v.47, p.762-770, 2000.

JENSEN, T.S.R.; MAHMOOD, B.; DAMM, M.B.; BACKE, M.B.; DAHLLÖF, M.S.; POULSEN, S.S.; HANSEN, M.B.; BINDSLEV, N. Combined activity of COX-1 and COX-2 is increased in non-neoplastic colonic mucosa from colorectal neoplasia patients. **BMC Gastroenterology**. v. 18, p.1-10, 2018.

JING, H.; VASSILIOU, E.; GANEA, D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. **J Leukoc Biol**. v. 74, 868–879, 2003.

JONES-HALLA, Y. L.; GRISHAM, M. B. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. **Pathophysiology**. v. 21, p.267-288, 2014.

JOO, Y.E.; OH, W.T.; REW, J.S.; PARK, C.S.; CHOI, S.K.; KIM, S.J. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. **Digestion**. v. 66, p. 222-229, 2002.

JOSE, F.A.; HEYMAN, M.B. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** v. 46, p. 124–133, 2008.

KEITA, V.A.; LINDQVIST, C.M.; ÖST, A.; MAGANA, C.D.L.; SCHOULTZ, I.; HALFVARSON, J. Gut barrier dysfunction – a primary defect in twins with Crohn's disease predominantly caused by genetic predisposition. **J Crohns Colitis**. v. 12(10), p. 1200-1209, 2018.

LANAS, A.; SCHEIMAN, J. Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. **Curr Med Res Opin.**; v. 23, p. 163-73, 2007.

LEE, S.H. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. **Intestinal Research**. v. 13(1), p. 11-18, 2015.

LEVY, B.D.; CLISH, C.B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C.N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat Immunol.** v. 2, p. 612–619, 2001.

LEVY, B.D. Resolvins and protectins: Natural pharmacophores for resolution biology. Prostaglandins Leukot. **Essent Fatty Acids.** v. 82, p. 327–332, 2010.

LIBERTUCCI, J.; DUTTA, U.; KAUR, S.; JURY, J.; ROSSI, L.; FONTES, M.E.; SHAJIB, M.S.; KHAN, W.I.; SURETTE, M.G.; VERDU, E.F.; ARMSTRONG, D. Inflammation-related differences in mucosa-associated microbiota and intestinal barrier function in colonic Crohn's disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 315, p. 420-431, 2018.

LOLL, P.J.; PICOT, D.; GARAVITO, R.M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. **Nat Struct Biol.** v. 2, p. 637–643, 1995.

MARCHIANDO, A.M.; GRAHAM, W.V.; TURNER, J.R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. **Annu Rev Pathol.** v. 5, p. 119–144, 2010.

MARTIN, H.M.; CAMPBELL, B.J.; HART, C.A. et al. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. **Gastroenterology.** v. 127, p. 80 –93, 2004.

MARTINI, E.; KRUG, S.M.; SIEGMUND, B.; NEURATH, M.F.; BECKER, C. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.** v. 4, p. 33–46, 2017.

MCGUCKIN, M.A.; ERI, R.; SIMMS, L.A.; FLORIN, T.H.J.; RADFORD-SMITH, G. Intestinal Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis.** v. 15, p.100 –113, 2009.

MILES, E.A.; ALLEN, E.; CALDER, P.C. In vitro effects of eicosanoids derived from diferente 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. **Cytokine.** v. 20, p. 215–223, 2002.

MORRIS, G.P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology.** v. 96, p. 795-803, 1989.

MUHVIĆ-UREK, M.; TOMAC-STOJMENović, M.; MIJANDRUŠIĆ-SINČIĆ, B. Oral

pathology in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.** v. 22, p.5655-5667, 2016.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D.M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 30, p. 517–531, 2009.

OFMAN, J.J.; MACLEAN, C.H.; STRAUS, W.L.; MORTON, S.C.; BERGER, M.L.; ROTH, E.A., et al. A meta-analysis of severe upper gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Rheumatol.** v. 29, p. 804-812, 2002.

OGURA, Y.; LALA, S.; XIN, W., et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. **Gut.** v. 52, p. 1591–1597, 2003.

OLIVEIRA, F. M.; EMERICK, A. P. C.; SOARES, E. G. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, p.1031-1037, 2010.

PRASAD, S.; MINGRINO, R.; KAUKINEN, K., et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. **Lab Invest.** v. 85, 1139 – 1162, 2005.

RAMPTON, D.S.; SLADEN, G.E. Relapse of ulcerative proctocolitis during treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Postgrad Med J.** v. 57, p. 297–299, 1981.

RANDHAWA, P.K.; SINGH, K.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **Korean J Physiol Pharmacol.** v. 18, p. 279-288, 2014.

RIBARDO, D.A.; CROWE, S.E.; KUHL, K.R.; PETERSON, J.W.; CHOPRA, A.K. Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D. **J Biol Chem.** v. 276, p. 5467-5475, 2001.

RIBEIRO, A.B.; GIUSTI, H.; SOUZA, A.P.T.; FRANCI, C.R.; SAIA, R.S. Dexamethasone Prevents Lipopolysaccharide-Induced Epithelial Barrier Dysfunction in Rat Ileum. **Shock.** v. 49(3), p. 334-344, 2018.

ROMERO, M.; ARTIGIANI, R.; COSTA, H.; OSHIMA, C.T.F.; MISZPUTEN, S.; FRANCO, M. Evaluation of the immunoexpression of COX-1, COX-2 and p53 in Crohn's disease. **Arq Gastroenterol.** v. 45, p. 295-300, 2008.

RYAN, P.; KELLY, R.G.; LEE, G., et al. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease—detection by laser capture microdissection and PCR. **Am J Gastroenterol.** v. 99, p. 1539–1543, 2004.

SALVIANO, F. N.; BURGOS, M. G. P. A.; SANTOS, E. C. Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internados em um hospital universitário. **Arq Gastroenterol.** v. 44, p.99-106, 2007.

SEGAL, A.W. The role of neutrophils in the pathogenesis of Crohn's disease. **Clinical Investigation Journal Foundation.** v. 48, p. 1-12, 2018.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VANDYKE, T.E. Resolving inflammation: dual antiinflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol.** v. 8, p. 349–361, 2008.

SINGER, I.I.; KAWKA, D.W.; SCHLOEMANN, S.; TESSNER, T.; RIEHL, T.; STENSON, W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.** v. 115, p. 297-306, 1998.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem.** v. 69, p. 145- 182, 2000.

SOMASUNDARAM, S.; RAFI, S.; HAYLLAR, J., et al. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. **Gut.** v. 41, p. 344–353, 1997.

SOMASUNDARAM, S.; SIGTHORSSON, G.; SIMPSON, R.J., et al. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID enteropathy in the rat. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 14, p. 639–650, 2000.

SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the rat. **Gastroenterology and Hepatology.** v. 13, p. 13-27, 2016.

STENSON, W. F. Prostaglandins and epithelial response to injury. **Current opinion in gastroenterology**. v. 23, p. 107-110, 2007.

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, p.514-521, 2007.

SU, C.W.; ZHANG, Y.; ZHU, Y.T. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. **Crit Rev Oncol Hematol**. v. 107, p. 36-38, 2016.

TABERNERO, A.; REIMUND, J.M.; CHASSEROT, S.; MULLER, C.D.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Cyclooxygenase-2 expression and role of vasoconstrictor prostanoids in small mesenteric arteries from patients with Crohn's disease. **Circulation**. v. 107, p. 1407-1410, 2003.

TOBEY, N.A.; HOSSEINI S.S.; ARGOTE, C.M.; DOBRUCALI, A.M.; AWAYDA, M.S.; ORLANDO, R.C. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. **Am J Gastroenterol**, v. 99, p. 13–22, 2004.

TOPPER, J.N.; CAI, J.; FALB, D.; GIMBRONE, M.A. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. **Proc Natl Acad Sci**. v. 93, p. 10417-10422, 1996.

TURNER, J.R.; RILL, B.K.; CARLSON, S.L.; et al. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. **Am J Physiol**. v. 273, p. 1378-1385, 1997.

TURNER, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**. v. 9, p. 799-809, 2009.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Am J Med**. v. 104, p. 2-8, 1998.

VIDYASAGAR, S.; MACGREGOR, G. Ussing Chamber Technique to Measure Intestinal Epithelial Permeability. **Gas Physiology and Diseases**. v.1422, p. 49-61, 2016.

VOSS, E.; WEHKAMP, J.; WEHKAMP, K., et al. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. **J Biol Chem**. v. 281, p. 2005–2011, 2006.

WALLACE, J.L.; DEVCHAND, P.R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Br J Pharmacol.** v. 145, p. 275–282, 2005.

WALSH, S.V.; HOPKINS, A.M.; CHEN, J.; NARUMIYA, S.; PARKOS, C.A.; NUSRAT, A. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. **Gastroenterology.** v. 121, p. 566-579, 2001.

WANG, D.; MANN, J.R.; DUBOIS, R.N. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology.** v. 128, p. 1445-1461, 2005.

WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **Faseb J.** v. 18, p. 790– 804, 2004.

WEHKAMP, J.; SCHMID, M.; STANGE, E.F. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol.** v. 23, p. 370 –378, 2007.

WOODLAND, P.; LEE C.; DURAYSAMI, Y.; FARRÉ, R.; DETTMAR, P.; SIFRIM, D. Assessment and Protection of Esophageal Mucosal Integrity in Patients With Heartburn Without Esophagitis. **Am J Gastroenterol.** v. 108, p. 535–543, 2013.

XU, X.J.; REICHNER, J.S.; MASTROFRANCESCO, B.; HENRY, W.L.; ALBINA, J.E. Prostaglandin E2 suppresses lipopolysaccharide-stimulated IFN-beta production. **J Immunol.** v. 180, p. 2125–2131, 2008.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research.** v. 10 (4), p. 655-683, 2011.

ZEISSIG, S.; BURGEL, N.; GUNZEL, D., et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. **Gut.** v. 56, p. 61–72, 2007.

ZHAO, J.; LIU, Y.; ZHENG, H.; HUANG, Y.; QI, Q.; LIU, H.; SHI, Y.; MA, X.; LU, Y.; WU, L. Effect of Herb-Partitioned Moxibustion on Autophagy and Immune-Associated Gene Expression Profiles in a Rat Model of Crohn's Disease. **Evid Based Complement Alternat Med.** v.2019, p. 1-13, 2019.

ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de aprovação do projeto pelo CEUA-UFC.



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 "AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO LASSBIO-294 E DO LASSBIO-596 NO MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TNBS", protocolo nº 128/2017, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza, 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 nº11.794, de 8 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 adotados 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 realizada em 26 de outubro de 2017.

Vigência do projeto	01/11/2017 a 01/08/2019
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	456
Peso/Idade	180-200g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de outubro de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 166902