

CARACTERIZAÇÃO DE MODELO DE COLITE EXPERIMENTAL AGUDA INDUZIDA E ATIVIDADES ANTINEUROINFLAMATÓRIA E TECIDUAL COLONICA DO METIL JASMONATO EM RATOS

Alefe Caliani Carrera¹, Isabela Ferraro Moreno², Jean Carlos Fernando Besson³

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UniCesumar. Bolsista PIC-ICETI UniCesumar.

alefe_luiz@hotmail.com

²Acadêmica do curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá – UniCesumar. isabelaferrom@gmail.com

³Orientador. Doutor em ciências biológicas (UEM). Professor do curso de medicina veterinária – UniCesumar.

jeanbesson2012@gmail.com

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são caracterizadas por processo inflamatório crônico, nesse cenário, produtos naturais surgem como alternativas terapêuticas e o metil jasmonato (MeJA) por apresentar comprovadas propriedades anti-inflamatórias e antiproliferativas vem a ser uma provável alternativa de tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito tecidual do MeJA em ratos Wistar adultos com colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Foram utilizadas amostras do colo distal de 20 animais, distribuídos em quatro grupos eutanasiados após um período de sete dias e tratados via gavagem com metil jasmonato 300 mg/Kg. Serão avaliados a partir de material coletado previamente: a caracterização do modelo de colite quimicamente induzido e o perfil antineuroinflamatório no plexo mientérico. Acreditamos que a administração oral do metil jasmonato será capaz de promover a restauração das túnicas intestinais e diminuir a neuroinflamação do colo distal, ambas características que mantêm as lesões transmuralis nas DIIs.

PALAVRAS-CHAVE: Colite; MeJA; Neurônio Entérico; Tratamento.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são consideradas as principais doenças inflamatórias intestinais em acometimento humano, sendo elas doenças de desordem inflamatória intestinal, porém sua etiologia ainda não é completamente elucidada. Há ação direta de fatores genéticos, ambientais e imunológicos contra a flora microbiana simbiótica (SANCHEZ-MUÑOZ, DOMINGUEZ-LOPEZ, YAMAMOTO-FURUSHO, 2008), que promovem inflamação crônica do cólon e reto em decorrência de alterações imunes, a qual gera produção exagerada de mediadores inflamatórios e substâncias oxidantes, causando lesões principalmente na camada mucosa intestinal (SANTOS et al., 2014). Em humanos, DIIs atingem principalmente pessoas entre 15 e 35 anos de idade, e dentre os fatores ambientais predisponentes, pode-se destacar o tabagismo (KANDHARE et al., 2012), sendo os indivíduos acometidos mais predispostos à ocorrência de câncer de cólon e reto, e também de displasia nos mesmos (SERIL, 2003).

Os macrófagos e as APC's da camada mucosa são as principais células inflamatórias envolvidas, sendo responsáveis pela produção em alta escala de citocinas inflamatórias que culminam com a piora do quadro clínico, tendo ainda participação de linfócitos T (T auxiliares 1 e 2, e também T citotóxico) infiltrados na mucosa intestinal. A resposta Th1 relaciona-se com a DC, enquanto Th2, com RCU (FIOCCHI, 1998). Há produção inicial de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais objetivam causar a morte celular através do estresse oxidativo (EREJUWA, SULAIMAN, WAHAB, 2012), com interação dos radicais livres e membrana celular lipídica, culminando com sua ruptura (ESMAILY et al., 2009), destacando-se o TNF- α , que também induz produção de mais citocinas (LIU, WANG, 2011), onde o principal dano será a destruição das células epiteliais intestinais (ARAB et al., 2014), gerando inflamação e até úlceras de mucosa (HARTMANN et al., 2012). Histologicamente, tem-se infiltrado celular inflamatório de neutrófilos, monócitos e linfócitos, principalmente; ulcerações e edema; redução da produção de muco (FIOCCHI, 1998). O principal sinal clínico é a diarreia (MARTÍN et al., 2004). Tais eventos estão associados com a degeneração do Sistema Nervoso Entérico (SNE), resultando em:

alteração na secreção de substâncias, aumento do peristaltismo, dor, hiperplasia e hipertrofia de células e fibras nervosas, e dilatação dos plexos nervosos (GEBOES, COLLINS, 1998).

O uso experimental do ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS), diluído em solução alcoólica a 50%, como forma de mimetizar a ocorrência das DIIs, foi proposto inicialmente por Morris et al. em 1989, apresentando características teciduais semelhantes. O MeJA foi isolado primeiramente a partir do óleo essencial de *Jasminum glandiflorum* (FAROOQI, BUTT, RAZZAQ, 2012). Como alternativa terapêutica, apresenta propriedades anticancerígenas e antiproliferativas, com benéfica ação em leucemia, tumores de próstata e mama, e também de melanoma, inibindo hormônios de crescimento tumoral e induzindo apoptose celular por ação em mitocôndrias (FINGRUT et al., 2005; FAROOQI, BUTT, RAZZAQ, 2012), antioxidante (WANG, BOWMAN, DING, 2007), antinociceptiva (UMUKORO, OLUGBEMIDE, 2011), anti-inflamatória (DANG et al., 2008) e antiparasitária (OFER, GOLD, FLESCHER, 2008).

Este presente estudo tem como objetivo analisar o efeito anti-inflamatório do mesmo, avaliar o perfil histológico das camadas intestinais afetadas pelo modelo experimental e comparar a resposta das túnicas intestinais para reparação através da terapêutica com MeJA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo obedece às normas e recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e a utilização de animais segundo a metodologia deste foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, segundo parecer 074/2014. Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem *Wistar*, machos, adultos, com noventa dias de idade. Os animais foram mantidos no biotério central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em caixas de polipropileno, quatro animais por caixa e com temperatura controlada (23°C/ 25° C) e ciclos de iluminação de claro e escuro de 12h no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM).

Os animais receberam ração padronizada e água *ad libidum*, distribuídos em quatro grupos, que foram eutanasiados em diferentes tempos, organizados nos seguintes grupos: GRUPO CC - animais controle; (n=5); GRUPO CJ - animais que receberam enema de 0,6 ml de solução salina 0,9% e doses diárias de solução metil jasmonato via gavagem; (n=5); GRUPO TN - animais que receberam enema com solução de 15 mg de TNBS (0,3 ml) dissolvidos em 0,3 ml de etanol a 30%, sem nenhuma forma de tratamento; (n=5). GRUPO TJ - animais que receberam enema com solução de 15 mg de TNBS (0,3 ml) dissolvidos em 0,3 ml de etanol a 30% e tratamento diário de metil jasmonato (300 mg/kg) via gavagem. (n=5).

Previamente a indução do modelo de colite experimental os animais permaneceram em jejum por 12 horas com livre acesso a água. Posteriormente, os animais, foram anestesiados com tiopental sódico® (40 mg/kg) e receberam aplicação intrarretal de 0,6 ml de solução contendo 0,3 ml de TNBS (Sigma-Aldrich® St Louis/MO, USA) (15 mg) dissolvido em 0,3 ml de etanol 30%. A aplicação foi realizada em dose única por meio de cateter de polietileno, inserido de 6 a 8 cm a partir do ânus, com os ratos suspensos pela cauda. A solução foi instilada lentamente e os animais foram mantidos nesta posição por mais 30 segundos após o término da aplicação para evitar o refluxo da solução aplicada (MORRIS et al., 1989).

Cortes histológicos longitudinais semi-seriados com 5 µm de espessura serão corados pelo método de Hematoxilina; Eosina, e utilizados para avaliar a intensidade microscópica da inflamação, a qual será graduada qualitativamente. Para a quantificação dos leucócitos polimorfonucleares, será realizada a contagem microscópica de 30 gânglios

localizados nos plexos nervosos entéricos por animal, totalizando cento e cinquenta gânglios por grupo. Será utilizada lentes objetivas com aumento de 100 vezes e ocular com aumento de 10 vezes totalizando ampliação final de 1000 vezes, para tal análise será ainda utilizado óleo de emersão. Para caracterização dos tipos de leucócitos polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócito, neutrófilo e outros) serão utilizados os mesmos gânglios nervosos entéricos como descritos na quantificação anterior.

3. RESULTADOS ESPERADOS E DISCUSSÃO

Através desta avaliação prática, é esperado comprovar o efeito anti-inflamatório em SNE alcançado pelo MeJA e, também, a capacidade de potencializar a regeneração das túnicas entéricas, visto tais efeitos já anteriormente elucidados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecendo-se a dificuldade terapêutica relacionada às DIIs, a busca por soluções alternativas mostra-se necessária, visando a redução dos danos à saúde dos pacientes. Portanto, o MeJA, com suas propriedades anteriormente relatadas, pode ser uma opção a ser introduzida na terapia, através da comprovação de sua eficácia citológica e histológica intestinal.

5. REFERÊNCIAS

ARAB, Hany H. et al. Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via downregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 69, p.294-302, jul. 2014. Elsevier BV.

DANG, Hung The et al. New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 16, n. 24, p.10228-10235, 15 dez. 2008. Elsevier BV.

EREJUWA, Omotayo O.; SULAIMAN, Siti A.; WAHAB, Mohd S. Ab. Honey: A Novel Antioxidant. **Molecules**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.4400-4423, 12 abr. 2012. MDPI AG.

ESMAILY, Hadi et al. On the benefits of silymarin in murine colitis by improving balance of destructive cytokines and reduction of toxic stress in the bowel cells. **Open Life Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.204-213, 1 jan. 2009. Walter de Gruyter GmbH.

FAROOQI, Ammad Ahmad; BUTT, Ghazala; RAZZAQ, Zubia. Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: choreographers of 'the dance macabre'. **Cancer Cell International**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.50-56, 2012. Springer Nature.

FINGRUT, Orit et al. Jasmonates induce nonapoptotic death in high-resistance mutant p53-expressing B-lymphoma cells. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 146, n. 6, p.800-808, nov. 2005. Wiley.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology** [S.l.], v. 115, n. 1, p. 182-205, 1998.

GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterol Motil** [S.l.], v. 10, n. 3, p. 189-202, 1998.

HARTMANN, Renata Minuzzo et al. Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Rats Induced by Acetic Acid. **Digestive Diseases And Sciences**, [s.l.], v. 57, n. 8, p.2038-2044, 27 mar. 2012. Springer Nature.

ISIK, F. et al. Protective Effects of Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil on TNBS-Induced Experimental Colitis in Rats. **Digestive Diseases And Sciences**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.721-730, 24 jul. 2010. Springer Nature.

KANDHARE, Amit D et al. Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. leaves in experimental colitis in rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.337-344, maio 2012. Medknow.

LIU, Xin; WANG, Jianming. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 133, n. 2, p.780-787, jan. 2011. Elsevier BV.

MARTÍN, Antonio Ramón et al. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 67, n. 7, p.1399-1410, abr. 2004. Elsevier BV.

MOREELS, Tom G et al. Effect of TNBS-induced morphological changes on pharmacological contractility of the rat ileum. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 423, n. 2-3, p.211-222, jul. 2001. Elsevier BV.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology** [S.l.], v. 96, n. 3, p. 795-803, 1989.

OFER, Kinneret; GOLD, Daniel; FLESCHER, Eliezer. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **International Journal For Parasitology**, [s.l.], v. 38, n. 8-9, p.959-968, jul. 2008. Elsevier BV.

SANCHEZ-MUÑOZ, Fausto; DOMINGUEZ-LOPEZ, Aaron; YAMAMOTO-FURUSHO, Jesus K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 14, n. 27, p.4280-4288, 2008. Baishideng Publishing Group

SANTOS, Marilia da S. Nascimento et al. Effect of Glucans from *Caripia montagnei* Mushroom on TNBS-Induced Colitis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.2368-2385, 10 fev. 2014. MDPI AG.

SERIL, D. N.. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.353-362, 1 mar. 2003. Oxford University Press (OUP).

UMUKORO, Solomon; OLUGBEMIDE, Abimbola S.. Antinociceptive effects of methyl jasmonate in experimental animals. **Journal Of Natural Medicines**, [s.l.], v. 65, n. 3-4, p.466-470, 9 mar. 2011. Springer Nature.

WANG, S; BOWMAN, L; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, [s.l.], p.1261-1269, 1 out. 2007. Elsevier BV.