



PERFIL INFLAMATÓRIO DA PROTEÍNA FITOREGULADORA METIL JASMONATO (MEJA) NA COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS) EM RATOS

Bruna Colombo Cordeiro (PIBIC/CNPq/UEM), Jean Carlos Fernando Besson, Leonardo Beni Gomes, Paulo Teixeira da Costa, Ciomar Aparecida Bersani Amado, Graciette Matioli, Maria Raquel Marçal Natali (Orientadora),
e-mail: brucolombobio@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR

Ciências Biológicas - Morfologia

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal, fitoterápicos, mieloperoxidase

Resumo:

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) são caracterizadas como um processo inflamatório crônico e exacerbado, mediado por células do sistema imune e, têm sido objeto de extensas pesquisas. Produtos naturais como o metil jasmonato (MeJa), proteína fitoreguladora da família dos jasmonatos, é originada a partir da resposta de defesa imunitária com comprovadas propriedades anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiinflamatório em ratos com colite experimental induzida por TNBS. Foram utilizadas amostras do colo distal de 15 ratos eutanasiados após 7 dias de aplicação de enema e tratamento por gavagem, formando os seguintes grupos: CC: animais controle; TNBS: receberam enema com solução de 15 mg de TNBS (0,3 ml) dissolvidos em 0,3 ml de etanol a 30%, e ausência de tratamento e TMeJa: 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. Os resultados foram submetidos análise estatística utilizando o teste K-S, seguidos por Análise de Variância e pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O modelo de colite experimental por TNBS foi comprovado por ocorrência de diarreia, sangue nas fezes e áreas necróticas na superfície da amostra. Houve aumento na concentração da enzima mieloperoxidase, caracterizando uma inflamação transmural por meio da análise histológica do colo distal corado pelo método de Hematoxilina-eosina. O tratamento com MeJA foi positivo para as variáveis analisadas.



Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) incluem duas formas principais, a Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), que embora distintas, compartilham muitas características em comum. São doenças inflamatórias crônicas que afetam o trato gastrointestinal (TGI) e apresentam um curso alternado por episódios de remissão e ativação da doença com manifestações clínicas de dor abdominal, diarreia severa, sangramento retal, febre, perda de peso e potencial para complicações sistêmicas e extra-intestinais (JUDGE et al, 2002). Sua etiologia envolve uma complexa interrupção na homeostasia do microambiente na mucosa intestinal em indivíduos geneticamente predispostos e gera uma resposta imune agressiva de células T contra um subgrupo de bactérias entéricas comensais, ocasionando a inflamação.

A inflamação pode atingir toda espessura da parede intestinal com envolvimento das suas túnicas, resultando em fissuras profundas, levando a formação de fístulas (BOGLIOLO; BRASILEIRO-FILHO, 2000). A análise histológica dos tecidos, obtidos de indivíduos com DC ativa, revela um grande infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos no interstício colônico coincidente com extensiva lesão transmural, incluindo edema, perda das células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia críptica, erosões e ulcerações (FIOCCHI, 2006). O modelo de DII induzido pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) apresenta características químicas semelhantes a DII humana, especialmente a DC.

A proteína fitorreguladora da família dos jasmonatos, o metil jasmonato (MeJa), reduz respostas nociceptivas associadas a condições inflamatórias em animais por inibir a liberação de mediadores inflamatórios, em particular, prostaglandinas, inibindo a formação de mediadores pró-inflamatórios estas descobertas sugerem que o MeJa possui atividade antinociceptiva e pode servir como um agente terapêutico no tratamento da dor inflamatória.

Materiais e métodos

Animais e tratamento

Foram utilizadas amostras do colo distal de 15 ratos machos Wistar, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Foram constituídos os seguintes grupos (n=5): CC: animais controle, grupo TNBS: animais que receberam enema com solução de 15 mg de TNBS (0,3 ml) dissolvidos em 0,3 ml de etanol a 30% e grupo TMeJa: 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. Os animais foram eutanasiados 7 dias após aplicação do enema.

Avaliação clínica

Diariamente, após a indução da colite, foi verificado o peso corporal, a consistência e ocorrência de sangue nas fezes e a vitalidade dos animais.

Dosagem da mieloperoxidase (MPO)

Amostras do colo distal foram fragmentadas e suspensas em detergente tampão HTAB, em seguida submetidas a banho de ultrassom por 30 s e mantidos por 2h em banho-maria a 60 °C. Posteriormente o homogenato foi submetido a outro ciclo de 30 s no banho ultrassom e centrifugado (5000 rpm) a 25 °C por 10 min. O sobrenadante foi pipetado e posto para reação em placa ELISA e testado para a atividade da MPO utilizando-se solução de dihidroclorato de *o*-dianizidina e peróxido de hidrogênio a 1% o qual é convertido em um composto colorido.

A atividade da mieloperoxidase foi calculada pelas alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) espectrofotômetro (LionheartDiagnostics).

Análise microscópica

Amostras do colo distal foram lavadas em solução salina, fixadas em paraformaldeído (4%) por 6 h, desidratadas em séries ascendentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina para a obtenção de cortes histológicos transversais (semi-seriados de 5µm). Posteriormente foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) e pela técnica histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.), destinados para a caracterização morfológica e quantificação de células calciformes, respectivamente. A análise morfológica foi realizada por amostragem de imagens em microscópio óptico Olympus. A quantificação das células calciformes foi realizada em 50 campos microscópicos/animal.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o teste K-S, seguidos por Análise de Variância e pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

O modelo de colite foi comprovado pela presença de sangue nas fezes dos animais e ocorrência de diarreia, além da ocorrência de áreas necróticas na



superfície do colo distal no grupo TNBS. A concentração da enzima mieloperoxidase encontrava-se significativamente elevada no grupo TNBS, com efeito positivo do metil jasmonato sobre este parâmetro (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa no número de células caliciformes entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração média da enzima mieloperoxidase, e quantificação das células caliciformes no colo distal de ratos

GRUPO	CC	TNBS	TNBS-MeJa
MPO	0,2003±0,08	0,7111±0,02	0,2426±0,10
Quantificação células caliciformes	224,2±15,01	154,96±17,42	143,96±17,89

Média expressa em nanômetros (nm) para MPO e em μm para quantificação.

A análise histológica revelou que a indução da colite pelo TNBS gerou total desestruturação da morfologia do colo distal, aumento na espessura das túnicas intestinais e infiltração de células inflamatórias (polimorfonucleares, linfócitos e monócitos), inclusive no interior dos gânglios mioentéricos. Constatamos influência positiva do metil jasmonato, levando a preservação das criptas da mucosa e organização das túnicas submucosa, muscular externa e serosa.

Conclusões

Constatou-se atividade anti-inflamatória do Metil Jasmonato na colite experimental induzida por TNBS.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

Referências

- BOGLIOLO, L., BRASILEIRO-FILHO, G, **Patologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis, **Gastroenterology**, v 115, p 182-205, 1998.
- JUDGE, T.A., LEWIS, J. D., LICHTENSTEIN, G.R. Colonic dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease, **Gastrointest Endosc Clin N Am**, v 12, p 495-523, 2012