

INFLAMAÇÃO INTESTINAL AGUDA EM MODELO ANIMAL INDUZIDO POR ÁCIDO TNBS E TRATADO COM NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA

Lucimara Rodrigues Carobeli (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Débora dos Anjos Weber Luz, Ana Paula Santi Rampazzo, Beatriz Petroncine Martins, Odinei Hess Gonçalves, Ciomar Aparecida Bersani Amado, Maria Raquel Marçal Natali (Orientador), e-mail: mrmnatali@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas - Maringá, PR.

Ciências Biológicas - Morfologia - Histologia

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal, TNBS, curcumina

Resumo:

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) têm etiologia multifatorial, causam prejuízos tanto funcionais como estruturais e terapias com anti-inflamatórios naturais devem ser investigadas. Nosso objetivo é avaliar o efeito da nanopartícula de curcumina sobre a inflamação do colo distal de ratos Wistar. Os animais dos grupos controles receberam enema com salina e os colíticos com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), ambos foram subdivididos em tratamento com água, nanopartícula vazia (Nano) ou nanopartícula de curcumina (CurNano), por sete dias. Nas análises macroscópica e microscópica das amostras do colo distal, constatou-se diferenças significativas entre os grupos Salina e TNBS ($p < 0,05$), devido acentuada lesão tecidual com desenvolvimento de inflamação transmural no grupo TNBS, persistindo em todas as formas de tratamento. A atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) apenas no grupo induzido com TNBS e tratado com água, tal fato indica que a CurNano pode ter contribuído para redução do processo inflamatório nos animais tratados. Conclui-se que o modelo de colite experimental induzida por TNBS exhibe padrões semelhantes à doença humana e é útil para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, sendo um deles a nanopartícula de curcumina, promissora na minimização da inflamação intestinal.

Introdução

A Doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) são inflamações idiopáticas do trato gastrointestinal, sendo denominadas coletivamente como Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs). Caracterizam-se pela alternância entre remissão e ativação da doença, com manifestações clínicas de dor abdominal, diarreia severa, sangramento retal, febre e perda de peso.

O tratamento com anti-inflamatórios usuais tem eficácia limitada e gera efeitos adversos, por isso produtos naturais com ação anti-inflamatória, como a *Curcuma longa* podem ser promissores como terapia alternativa (Rocha et al., 2014).

Uma vez que a curcumina apresenta baixa solubilidade e biodisponibilidade, o encapsulamento em nanopartículas aumenta sua disponibilidade no organismo, permite o uso de doses menores, reduz a toxicidade e otimiza o tratamento.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer a inflamação intestinal através do modelo experimental induzido por ácido TNBS e avaliar o tratamento da inflamação aguda com nanopartículas de curcumina (CurNano) em ratos Wistar.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 22342171116). Utilizou-se 35 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram distribuídos em 7 grupos (n=5): C: Controle; SA: enema salina, gavagem água; SN: enema salina, gavagem nanopartículas vazias; SCN: enema salina, gavagem CurNano; TA: enema TNBS, gavagem água; TN: enema TNBS, gavagem nanopartículas vazias e TCN: enema TNBS, gavagem CurNano. A colite foi induzida pela aplicação retal de solução alcoólica de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS, 15 mg) de acordo com o modelo descrito por Morris et al. (1989).

Realizou-se tratamento diário via gavagem e após 7 dias os animais foram eutanasiados sendo coletadas amostras do colo distal. As características macroscópicas teciduais foram pontuadas de 0 a 13 de acordo com o nível crescente de lesão, baseado no escore de Appleyard e Wallace (1995). Realizou-se o processamento histológico do colo distal com coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliou-se semi-quantitativamente a intensidade da inflamação, utilizando-se critérios modificados de Boyer et al. (2005). Quantificou-se a atividade enzimática da mieloperoxidase tecidual (MPO), na presença de peróxido de hidrogênio e do indicador tetrametilbenzidina (TMB). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (620 nm), expressando os resultados em densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

Através do software Graph Pad Prism® 5.0, verificou-se a normalidade dos dados pelo teste Kolmogorov-Sminov. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, enquanto os paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Sete dias após a indução com solução salina (SA, SN, SCN), a superfície do colo distal desses animais apresentava apenas hiperemia leve e localizada e ausência de ulcerações, contrastando com o obtido nos grupos induzidos com TNBS ($p < 0,05$), que apresentaram escores elevados, danos teciduais extensos e vários sítios de inflamação e ulceração (Tabela 1). O TNBS também provocou em alguns animais presença de megacolo, regiões necróticas e adesão serosa aos órgãos adjacentes.

De forma semelhante, a avaliação microscópica resultou em baixos escores para os grupos Salina e altos escores para os que receberam enema com TNBS, como expresso na Tabela 1. O colo distal dos grupos controles, apresentava características histológicas padrão, com nódulos linfáticos na túnica submucosa e dilatação de vasos sanguíneos do colo distal de alguns animais. Os animais colíticos, tratados ou não, apresentaram características de inflamação tecidual severa, que permitiram diferir estatisticamente dos grupos controles ($p < 0,05$), tais como extensa destruição da arquitetura mucosa, vasodilatação, hemorragias, alterações na morfologia das criptas, abscessos, além da presença de células polimorfonucleares nos plexos submucoso e mioentérico, caracterizando uma inflamação transmural.

Através da dosagem da mieloperoxidase (MPO), enzima armazenada nos grânulos azurófilos de células inflamatórias como neutrófilos, avaliou-se bioquimicamente o processo inflamatório. Houve aumento significativo na atividade da MPO no grupo TA ($p < 0,05$), correlacionado com a presença de extenso infiltrado inflamatório nestes tecidos. Nos grupos TN e TCN a atividade foi semelhante aos controles ($p > 0,05$), indicando uma tendência à redução da atividade inflamatória nestes tratamentos, que em período de tratamento mais prolongado poderia ser ainda mais expressiva, contribuindo também na melhora dos aspectos morfológicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação semi-quantitativa macroscópica e microscópica da inflamação e atividade da mieloperoxidase (MPO) do colo distal de ratos induzidos com salina (SA, SN, SCN) e com TNBS (TA, TN, TCN) e tratados com água (SA, TA), nanopartículas vazias (SN, TN) e CurNano (SCN, TCN). Resultados expressos em média \pm erro padrão ($n=5$ /grupo).

Grupos	Avaliação macroscópica	Avaliação microscópica	Atividade MPO (D.O/mg de proteína)
CONTROLE	0,0 \pm 0,0 a	0,40 \pm 0,40 a	2,707 \pm 0,502 a
SA	0,55 \pm 0,17 a	1,80 \pm 0,73 a	1,816 \pm 0,240 a
TA	8,04 \pm 0,46 b	6,80 \pm 0,37 b	5,006 \pm 0,362 b
SN	0,67 \pm 0,17 a	2,60 \pm 1,03 a	2,838 \pm 0,436 a
TN	7,83 \pm 0,35 b	4,80 \pm 0,86 b	1,549 \pm 0,084 a
SCN	0,89 \pm 0,11 a	1,60 \pm 0,40 a	1,606 \pm 0,172 a
TCN	8,27 \pm 0,34 b	4,00 \pm 0,84 b	1,543 \pm 0,215 a

Resultados seguidos por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's para avaliação macroscópica; Análise de Variância (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey para avaliação microscópica e atividade MPO ($p < 0,05$).

Estes resultados permitem inferir que o modelo de colite experimental induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico causa alterações e quadro clínico similares à doença de Crohn, caracterizada pela inflamação severa e transmural do colo distal. Porém, a susceptibilidade dos animais ao TNBS pode variar de acordo com a idade, o sexo e a linhagem utilizados (Morris et al., 1989).

Com sete dias de tratamento não foi possível diferenciar os tratamentos com nanopartículas vazias e nanopartículas de curcumina. Ambas causaram redução na atividade da MPO, justificada pela recuperação natural da fase aguda da doença, indicando que para comprovar a ação anti-inflamatória da curcumina em nanopartículas deve-se prolongar o tratamento.

Conclusões

O modelo de colite experimental em ratos, induzida por ácido TNBS é eficiente e adequado para o desenvolvimento de novas terapias. A eficácia das nanopartículas de curcumina na minimização da inflamação intestinal pode estar associada à maior período de tratamento.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica, a professora Dr^a Maria Raquel Marçal Natali pela orientação e ao Laboratório de Histologia (DCM-UEM).

Referências

APPLEYARD C. B., WALLACE J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 269, n. 1, 1995. PMID:7631788.

BOYER L., et al. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Autonomic Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 41-53, 2005. DOI:10.1016/j.autneu.2004.10.006.

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

ROCHA B. A., et al. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 2, n. 4, p. 62-73, dez. 2014. ISSN: 2354-2152.