COLITE QUIMICAMENTE INDUZIDA EM RATOS WISTAR ADULTOS: EFEITOS DO ÁCIDO VANÍLICO SOBRE O ÍLEO TERMINAL

Breno Augusto Santana Caldeira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Luiza Russo Duarte (Coorientadora), Maria Raquel Marçal Natali (Orientadora). E-mail: mrmnatali@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Morfologia/Histologia.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; histologia; parede intestinal.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por um processo inflamatório crônico e exacerbado no intestino, mediado por células do sistema imune. Os efeitos da inflamação podem acarretar alterações em regiões distantes dos sítios das lesões, sendo o íleo terminal o mais comumente comprometido nas DIIs. Produtos naturais surgem como alternativas terapêuticas, uma vez que moléculas com propriedades anti-inflamatórias, como o ácido vanílico (VA), são facilmente encontradas em compostos aromatizantes e utilizadas em grande escala pela indústria farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório, antioxidante e tecidual do VA em ratos com colite quimicamente induzida por TNBS. Foram utilizados 28 ratos Wistar machos adultos distribuídos em quatro grupos experimentais (n=7/grupo). Os animais receberam dose única, via enema, de solução salina (0,9%) (grupos Ctrl) e dose única de TNBS (grupos Col). Como tratamento, os grupos Ctrl+VA e Col+VA receberam doses diárias de VA (50mg/kg de massa corporal). Os animais foram eutanasiados após tratamento agudo de 7 dias. A colite foi induzida de forma correta. No período de 7 dias, não foi possível identificar alterações ileais significativas que pudessem ser revertidas pelo tratamento diário de VA.

INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs), vem se destacando como condições crônicas e incuráveis, caracterizado por um processo inflamatório exacerbado, mediado por células da imunidade inata e adquirida, resultando no aumento da permeabilidade e acesso de antígenos luminais à lâmina própria, a qual é densamente povoada de células imunes (BESSON et al., 2017). As DIIs são objeto de extensas pesquisas, principalmente nos últimos anos, pois ainda há indefinição sobre etiologia e tratamentos eficazes. Diante disso, o ácido vanílico surge como uma alternativa em potencial, visto que trata-se de um composto fenólico de plantas e frutas comestíveis, possui propriedades antibacterianas, antimicrobianas e também exibe efeito anti-inflamatório (NI et al., 2024).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de idade (CEUA/UEM nº 4839120724). A colite foi induzida, via enema, com 0,3 mL de TNBS + 0,3 mL de etanol 30% (grupos Col), enquanto os controles receberam solução salina 0,9% (Ctrl). Os animais receberam diariamente, por gavagem, água filtrada (Ctrl e Col) ou ácido vanílico (VA; 50 mg/kg; Ctrl+VA e Col+VA). Durante os 7 dias de tratamento agudo, foi monitorado a massa corporal e o índice de desenvolvimento da doença (IDD). Os animais foram eutanasiados (Tiopental sódico® - 120mg/Kg), o sangue foi coletado e realizada laparotomia vertical para a coleta e mensuração do intestino delgado e o íleo terminal e pesagem dos tecidos adiposos. Foram realizadas análises bioquímicas séricas de AST, ALT, GGT, ALP e determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) no íleo terminal. Amostras teciduais foram fixadas em paraformaldeído 4%, incluídas em parafina e realizados cortes semi-seriados (5µm) corados por HE e reação histoquímica PAS. Na análise morfométrica foram mensuradas a espessura da parede intestinal total e de suas túnicas (mucosa, submucosa e muscular), além da altura dos vilos e profundidade das criptas (100 mensurações/animal). O percentual de células caliciformes PAS+ foi determinado pelo Índice (n° de células caliciformes/2500 células epiteliais)x100. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 8.0. Os escores histológicos foram submetidos ao teste de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's e expressos como mediana ± percentis 25-75%. As demais variáveis foram avaliadas por two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey e expressas como média ± desvio-padrão. Foi considerado significativo $p<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais que receberam enema com TNBS apresentaram características da colite, o IDD indicou aumento significativo nos grupos colíticos em relação aos grupos controle (Fig. 1A). A Figura 1B representa a variação de massa diária dos animais, onde é possível notar a sugestiva perda de massa corporal após a indução de colite, resultados também obtidos por Antoniou et al. (2016).

Os parâmetros biométricos (Tabela 1) evidenciam que, mesmo que os grupos colíticos tenham apresentado variação negativa de peso, não houve diferenças significativas. Também houve manutenção nos demais parâmetros, como índice de Lee, comprimento do intestino delgado, largura do íleo e depósitos de tecido adiposo.

Os parâmetros bioquímicos de AST, ALT, GGT, FA e MPO também não diferiram entre si, indicando que a colite aguda não foi capaz de alterar as enzimas hepáticas ou indicar inflamação na parte terminal do intestino delgado (Tabela 2).

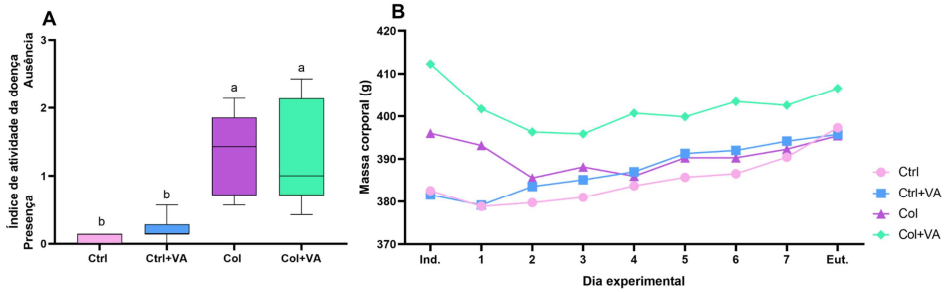


Figura 1 - **Avaliação clínica da colite.** **(A)** Escore do índice de desenvolvimento da doença. **(B)** Evolução da massa corporal. Kruskall-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn's. Resultados expressos em mediana ± percentis 25-75%. (n=7).

Tabela 1. Parâmetros biométricos. Variação de massa corporal (ΔMC) (g), índice de Lee (IL) (g/cm³), comprimento do intestino delgado (CID) (cm) e largura do íleo (LI) (cm) e depósitos de tecido adiposo (g/100 de massa corporal) mesentérico (ME), retroperitoneal (RE), periepididimal (PE), inguinal (IN) e índice de adiposidade (IA) no tratamento agudo (7 dias), da colite de ratos controle (Ctrl), controle tratado com ácido vanílico (Ctrl+VA), colítico (Col) e colítico tratado com ácido vanílico (Col+VA).

	Ctrl	Ctrl+VA	Col	Col+VA
ΔMC	14.71 ± 11.51	14.14 ± 17.22	-0.57 ± 32	-5.71 ± 36.28
IL	3.03 ± 0.03	3.05 ± 0.06	3.01 ± 0.10	3.04 ± 0.10
CID	74.79 ± 4.96	75.14 ± 3.30	78 ± 10.05	73.57 ± 9.83
LI	1.39 ± 0.11	1.36 ± 0.11	1.23 ± 0.09	1.29 ± 0.12
ME	0.74 ± 0.12	0.73 ± 0.13	0.71 ± 0.18	0.76 ± 0.25
RE	1.66 ± 0.38	1.88 ± 0.64	1.62 ± 0.37	1.77 ± 0.42
PE	1.44 ± 0.17	1.48 ± 0.39	1.43 ± 0.25	1.59 ± 0.38
IN	1.55 ± 0.31	1.54 ± 0.49	1.71 ± 0.38	1.58 ± 0.44
IA	5.39 ± 0.72	5.63 ± 1.59	5.46 ± 0.92	5.70 ± 1.38

Two-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expresso em média ± desvio padrão. (n=7).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos. Aspartato aminotransferase (AST) (U/L), alanina aminotransferase (ALT) (U/L), gama glutamil transferase (GGT) (U/L), fosfatase alcalina (FA) (U/L) e enzima mieloperoxidade ileal (MPO) (mD.O./mg de proteína) de ratos Wistar no tratamento agudo da colite de ratos controle (Ctrl), controle tratado com ácido vanílico (Ctrl+VA), colítico (Col) e colítico tratado com ácido vanílico (Col+VA).

	Ctrl	Ctrl+VA	Col	Col+VA
AST	77.58 ± 18.18	68.43 ± 7.52	66.21 ± 7.82	69.86 ± 8.12
ALT	45.33 ± 10.82	49.5 ± 9.21	47.07 ± 5.43	41.86 ± 11.75
GGT	2 ± 0	1.71 ± 0.76	1.43 ± 0.97	1.71 ± 0.76
FA	135.50 ± 51.47	165.43 ± 68.79	107.29 ± 9.89	101.29 ± 20.18
MPO	6.48 ± 1.51	7.91 ± 2.46	7.26 ± 0.98	8.53 ± 3.57

Two-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expresso em média ± desvio padrão. (n=7).

Os parâmetros morfométricos avaliados não diferiram significativamente entre os grupos (Figs. 2A-D e F). A submucosa do grupo Ctrl+VA apresentou espessura aumentada em relação ao grupo Col+VA (Fig. 2E), os demais grupos se mantiveram

iguais. O Índice de Células Caliciformes PAS+ (Fig. 2J), não diferiu entre os grupos (Fig. 2G). A morfologia do íleo manteve a organização histológica característica de suas túnicas nos grupos controles (Fig. 2H), no entanto pode ser visualizado discreta desorganização dos vilos e criptas nos grupos colíticos (Fig. 2I).

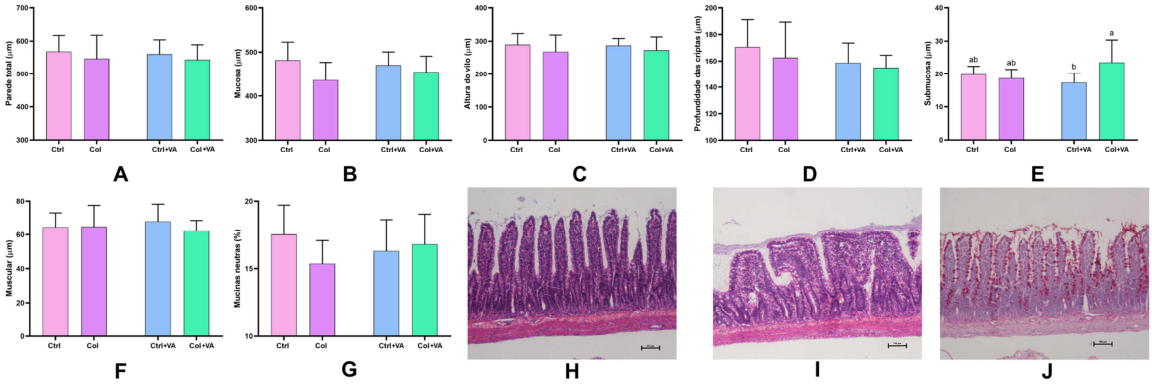


Figura 2 – Parâmetros morfométricos, percentual de células caliciformes e fotomicrografias da parede ileal. **(A)** Parede total (µm). **(B)** Mucosa (µm). **(C)** Altura do vilo (µm). **(D)** Profundidade da cripta (µm). **(E)** Submucosa (µm). **(F)** Muscular (µm). **(G)** Percentual de células caliciformes de mucinas neutras (%). **(H)** Grupo controle (Ctrl) (HE). **(I)** Grupo colítico (Col) (HE). **(J)** Grupo controle (Ctrl) (PAS). 10X. Barra de escala = 100µm. Two-way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. (n=7).

CONCLUSÕES

A colite quimicamente induzida por TNBS foi capaz de mimetizar as características da doença. Não foi possível identificar alterações significativas no íleo terminal que pudessem ser revertidas pelo tratamento diário de ácido vanílico proposto.

AGRADECIMENTOS

À UEM, ao PIBIC e ao CNPq pelo apoio institucional e concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

ANTONIOU, E. et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of medicine and surgery**, 11, 9–15, 2016.

BESSON, J. C. F.; et al. Methyl jasmonate: a phytohormone with potential for the treatment of inflammatory bowel diseases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 70, 178-190, 2018.

NI, J.; et al. Vanillic acid restores homeostasis of intestinal epithelium in colitis through inhibiting CA9/STIM1-mediated ferroptosis. **Pharmacological Research**, 202, 1-14, 2024.