Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

HSP70, Heparanase e HPRT participam da resposta inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

Ana Elisa Valencise Quaglio
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração Farmacologia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre

Botucatu
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Quaglio, Ana Elisa Valencise.
HSP70, Heparanase e HPRT participam da resposta inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos / Ana Elisa Valencise Quaglio. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Capes: 21005001

1. Farmacologia. 2. Intestinos - Doenças.

Palavras-chave: HSP70; Heparanase; HPRT; Inflamação intestinal; TNBS.

Auxílio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Quem somos nós, quem é cada um de nós, senão uma combinação de experiências, de informações de leituras, de imaginações? Cada vida é uma enciclopédia, uma biblioteca, um comentário de objetos, uma amostragem de estilos, onde tudo pode ser continuamente remexido e reordenado de todas as maneiras possíveis.

(Ítalo Calvino)

Dedicatória

A Deus pelas dádivas e pelas oportunidades de crescimento concedidas a cada dia;

Aos meus pais Regina e Juverci, que me ensinaram que o estudo é o bem mais precioso que alguém pode ter; por terem me permitido sonhar, crescer e aprender e por me ensinarem a ter fé em mim mesma e em Deus;

Aos meus irmãos e cunhadas, Claudio e Juliana, Juliano e Juliana que sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram a seguir em frente;

À minha família, por sempre torcer por mim e entender minha ausência em alguns momentos;

Aos meus amigos, mesmo aqueles mais distantes, pela amizade, pelas alegrias e risadas e principalmente paciência nas horas mais complicadas;

Ao Eduardo, por todo apoio e paciência, principalmente nessa fase final do mestrado;

Agradecimentos

Aos meus amigos do laboratório, Leo, Tarina, Patrícia, Adriana, Laura, Juliana, Adriano, Alexandre e Luiz pelo apoio e ensinamentos constantes.

À Aline, pela amizade, paciência e ensinamentos nesses dois anos.

A todos os professores e funcionários do departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da Pós Graduação.

Ao professor Dr José Buratini Jr por ceder seu laboratório para realização dos experimentos moleculares.

Ao Anthony pela ajuda e ensinamentos durante os experimentos.

Ao professor Dr Marcelo Nogueira por me ajudar a encontrar o caminho a seguir depois de um momento de desorientação.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

Ao professor Dr Luiz Claudio Di Stasi, por abrir as portas de seu laboratório e acreditar no meu potencial mesmo sem me conhecer; por todo o conhecimento e sabedoria transferidos...

Sumário

Introdução.....1
1. Doença Inflamatória Intestinal.....2
2. Epidemiologia.....3
3. Etiologia.....4
3.1. Fatores ambientais.....5
3.1.1. Dieta.....5
3.1.2. Tabagismo.....6
3.1.3. Fármacos.....7
3.1.4. Aspectos geográficos e sociais.....8
3.1.5. Estresse.....9
3.1.6. Alterações na microbiota intestinal.....10
3.1.7. Permeabilidade intestinal.....11
3.2. Fatores Imunológicos.....12
3.3. Fatores genéticos.....14
4. Modelos experimentais de Doença Inflamatória Intestinal.....16
5. Principais fármacos utilizados na Doença Inflamatória Intestinal.....18
5.1. Glicocorticóides.....18
5.2. Aminossalicilatos.....19
5.3. Imunossupressores.....21
6. Busca por novos marcadores moleculares.....21
6.1. "Heat Shock Protein" (HSP) 70.....22
6.2. Heparanase.....24
6.3. Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HPRT).....25
Objetivos.....2
Material e Métodos.....29
1. Animais.....31
2. Delineamento experimental.....31
3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal in vivo.....32
3.1. Avaliação macroscópica.....32
3.2. Determinações bioquímicas.....34
3.2.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase.....34
3.2.2. Determinação do conteúdo de glutationa total.....35
3.2.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.....36
3.3. Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen ®).....36
3.4. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real.....37
4. Análise estatística.....39
Resultados.....31
1. Avaliações Macroscópicas.....41
2. Avaliações Bioquímicas.....44
3. Avaliações Moleculares.....47
Discussão.....51
1. Validação do modelo experimental.....52

2. "Heat shock protein" 70 56
3. Heparanase 57
4. Hipoxantina Fosforribosiltransferase 58
Conclusão 61
Bibliografia 63

Siglas e Abreviaturas

5-ASA = ácido 5-aminosalicílico

AINEs = antiinflamatórios não esteroidais

AP-1 = proteína ativadora 1

COX = ciclooxigenase

DC = Doença de Crohn

DII = Doença Inflamatória Intestinal

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNAse = desoxiribonuclease

dNTP = Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

DSS = dextran sulfato de sódio

DTNB = ditiobisnitrobenzóico

DTT = ditiotreitol

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM = erro padrão da média

FA = fosfatase alcalina

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx = glutationa peroxidase

GSH = glutatona

GSHred = glutationa redutase

GSSG = glutationa oxidada

HPRT = Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase

HSP = "heat shock protein" (proteína do choque térmico)

HTAB = brometo de hexadeciltrimetilamônio

IL = interleucina

INF-γ = interferon gama

iNOS = óxido nítrico sintetase induzível

LPS = lipopolissacarídeos

MPO = mieloperoxidase

mRNA = RNA mensageiro

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB = fator de transcrição nuclear kappa B

PBS = tampão fosfato-sódico

RCU = Retocolite Ulcerativa

RNA = ácido ribonucléico

RNAse = Ribonuclease

TCA = ácido tricloroacético

TGI = trato gastrointestinal

TNBS = Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

TNF-α =fator de necrose tumoral alfa

Lista de Figuras

Figura1: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais.....47

Figura 2: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em Δ peso corporal.....48

Figura 3: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidade (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....49

Figura 4: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....49

Figura 5: Avaliação dos níveis de glutationa colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....50

Figura 6: Avaliação da expressão relativa de HSP70 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....51

Figura 7: Avaliação da expressão relativa de HPRT em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....52

Figura 8: Avaliação da expressão relativa de Heparanase em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.....52

Figura 9: Avaliação da expressão relativa de NF-κB em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em p<0.05.....53

Lista de tabelas

Tabela 1: Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.....33

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos utilizados para a amplificação dos genes alvos.....38

Tabela 3: Média das eficiências de amplificação individuais de cada amostra analisada.....39

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de prednisolona (2mg/Kg), sulfassalazina (50mg/Kg) e azatioprina (2mg/kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.....42

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (CU), ambas caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas. Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida e a principal limitação no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos desta doença é a disponibilidade de modelos experimentais adequados que mimetizem o caráter crônico e de recidiva da DII em humanos e que possam ser de baixo custo, reprodutível, fácil de induzir e que apresente características clínicas e histopatológicas, respostas terapêuticas e mediadores inflamatórios similares ao que ocorre com a doença em humanos. Dentre os vários modelos experimentais disponíveis, o modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos tem sido considerado o mais adequado para a avaliação de novos fármacos, assim como aquele que melhor mimetiza esta doença em humanos. Assim sendo, a caracterização do papel de diferentes mediadores do processo inflamatório intestinal neste modelo permitiria a determinação de novos alvos terapêuticos, assim como geraria informações importantes da fisiopatologia desta doença. Neste sentido, o presente projeto teve como objetivo determinar a participação da HSP70, Heparanase e HPRT, mediadores do processo inflamatório intestinal em humanos, na fase aguda do processo inflamatório intestinal induzido TNBS em ratos, assim como estudar os efeitos de fármacos das três principais classes farmacológicas usadas no tratamento da DII em humanos, os aminossalicilatos (sulfassalazina), os glicocorticóides (prednisolona) e os imunomoduladores (azatioprina) sobre esses mediadores. Este estudo demonstrou que HSP70, Heparanase e HPRT podem ser considerados mediadores do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS uma vez que estes mediadores se encontram aumentados nos animais colíticos quando em comparação aos animais sadios. O tratamento com prednisolona foi capaz de reduzir a expressão tanto da HSP70 quanto da HPRT; o tratamento com sulfassalazina foi capaz de reduzir a expressão da Heparanase e da HPRT e o tratamento com azatioprina foi capaz de alterar a expressão da HSP70, Heparanase e HPRT. Esses resultados demonstram que o mecanismo de ação desses fármacos pode estar relacionado a alterações provocadas sobre esses mediadores uma vez que se pode correlacionar uma melhora na inflamação intestinal com alterações na expressão desses genes.

Abstract

The idiopatic inflammatory bowel diseases comprise two types of chronic intestinal disorders: Crohn's disease and ulcerative colitis that are characterized by a chronic inflammation of the intestine, with periods of remission and reactivation of the inflammatory process. Although IBD is the subject of research for several decades, its etiology remains unknown, and the major limitation to understanding the IBD pathophysiology is the availability of experimental models that mimic the chronic and relapse of human IBD. Is still important that experimental models can be inexpensive, reproducible, easy to induce and present clinical and histopathological features, therapeutic responses and inflammatory mediators similar to what occurs in humans. Among experimental models available, the model of colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) in rats has been considered the most suitable for the evaluation of new drugs, as well as the one that best mimics the disease in humans. Therefore, the involvement of different IBD mediators in this experimental model would allow the determination of new therapeutic targets, as well as generate important information on the pathophysiology of this disease. In light of this, the aim of present study was to determine the participation of HSP70, Heparanase and HPRT, mediators of intestinal inflammatory process in humans, in acute phase of inflammatory process induced by TNBS in rats, as well as, to study the effects of drugs of the three main classes used in the treatment of human IBD, i.e., aminosalicylates (sulphasalazine), glucocorticoids (prednisolone) and immunomodulators (azathioprine) on these mediators. This study showed that HSP70, Heparanase and HPRT participate as mediators of intestinal inflammation induced by TNBS since these mediators are increased in colitic animals when compared to healthy animals. Treatment with prednisolone was effective in reducing the expression of both HSP70 and HPRT; treatment with sulphasalazine was able to reduce the expression of Heparanase and HPRT and treatment with azathioprine was able to alter the expression of HSP70, Heparanase and HPRT. These results demonstrate that the mechanism of action of these drugs may be related to changes on these mediators since it can correlate an improvement in intestinal inflammation with altered expression of these genes.

Introdução

1. Doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcada pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarréia e constipação (Singh *et al*., 2003), no entanto, ocorrem algumas diferenças quanto às características e distribuição do processo inflamatório.

A Retocolite Ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal restrita ao cólon e que dependendo da extensão e localização da inflamação pode ser classificada em proctite (parte inferior do cólon e reto), colite distal (cólon sigmóide com ou sem envolvimento do cólon descendente) ou pancolite (envolvimento de todo o cólon) (Baumgart & Sandborn, 2007). Histologicamente, a inflamação na retocolite ulcerativa se restringe a camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos e granulócitos e presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos (Collins & Croitoru, 1994).

Já Doença de Crohn é uma inflamação transmural do trato gastrointestinal (TGI) que pode afetá-lo por completo, desde a boca até o ânus. Normalmente se apresenta de forma descontínua em várias porções do TGI e pode promover complicações como estenoses, abscessos ou fístulas. Esta doença caracteriza-se ainda pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose (Collins & Croitoru, 1994; Baumgart & Sandborn, 2007).

Clinicamente, a RCU é caracterizada pela ocorrência de diarréia severa com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal e perfuração. Já na doença de Crohn, a apresentação clínica depende do local da

inflamação, podendo incluir dor abdominal intensa, diarréia, febre, ocorrência de estreitamento do lúmen intestinal (estenoses), desenvolvimento de fístulas e até mesmo sinais de obstrução intestinal (Bouma & Strober, 2003; Baumgart & Sandborn, 2007).

As doenças inflamatórias intestinais são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, uma vez que geram repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico e profissional (Carter *et al.*, 2004).

2. Epidemiologia

A epidemiologia da Doença Inflamatória Intestinal está sendo analisada em diversos estudos e apesar das tendências para o aparecimento da DII estarem mudando, certos padrões demográficos parecem ser semelhantes. A Doença de Crohn se mostra mais presente em mulheres enquanto a Retocolite Ulcerativa é mais comum em homens. Além disso, DC e RCU são mais comuns em populações brancas do que em outras raças (Thukkani *et al.*, 2010).

As maiores taxas de incidência são normalmente relatadas em países do Norte e Oeste Europeus assim como na America do Norte, enquanto baixas taxas são encontradas na África, America do Sul e Ásia. As incidências são maiores em países desenvolvidos e mais industrializados, indicando a urbanização como um fator de risco (Lakatos, 2006).

Em países industrializados a taxa de incidência varia de 6.5-16/100.000 pessoas/ano e a prevalência de 26-214/100.000 pessoas/ano (Victoria *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos estima-se que 1.4 milhões de pessoas apresentem a doença (Abraham & Cho, 2009). Atualmente, as taxas de incidência da DII são

praticamente estáveis em países em que já é considerada alta e aumenta em países em que normalmente era baixa (Victoria *et al*, 2009).

No Brasil, poucos estudos analisam os aspectos epidemiológicos da DII, sendo que a maioria apenas descreve os aspectos clínicos e a freqüência de admissão em hospitais em função dessa enfermidade, sem qualquer tipo de referência quanto à incidência ou prevalência na população. Um estudo de Souza *et al.* (2002) realizado em um hospital público no interior de São Paulo, mostrou que a admissão em hospitais em função da DII é mais freqüente para casos de DC e que ocorreu um aumento nas doenças inflamatórias intestinais de 40 para 61 casos para cada 10.000 atendimentos realizados, em um período de cinco anos.

Victoria *et al.* (2009) constataram no hospital da Universidade Estadual Paulista – Botucatu –SP que a maioria dos pacientes atendidos era branca e morava em centros urbanos e que a incidência de RCU chegava a 65% dos atendimentos enquanto que de DC era de aproximadamente 25%. A ocorrência das doenças inflamatórias intestinais observada foi de 14,81 casos para a retocolite ulcerativa e 5,65 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes. Apesar destes números estarem abaixo da prevalência mundial, representam um aumento considerável no número de casos.

3. Etiologia

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida. Um único agente ou mecanismo isolado não parecem ser suficientes para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais, em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativam células de origem imune e não-imune que compõem o sistema de

defesa da mucosa intestinal, de modo que sua origem é considerada multifatorial (Fiocchi, 1998).

3.1.Fatores ambientais

Dentre os fatores necessários para o desenvolvimento e progressão da DII um dos menos conhecidos e mais difíceis de determinar é o envolvimento dos fatores ambientais. Esses fatores são provavelmente tão importantes quanto os fatores genéticos.

Fatores ambientais potencialmente relevantes incluem eventos pré-natais, aleitamento materno, infecções durante a infância, agentes microbianos, tabagismo, contraceptivos orais, dieta, higiene, ocupação, educação, clima, poluição, estresse além de diversos outros como apendectomia, transfusões sanguíneas, contato com animais e atividades físicas (Fiocchi *et al.*, 1998).

3.1.1. Dieta

Considerando-se o local de ocorrência das doenças inflamatórias intestinais, uma potencial relação entre os componentes da dieta e a patofisiologia da doença devem ser consideradas. Diversos mecanismos imunológicos acabaram sendo postulados ligando os antígenos dos alimentos com o desenvolvimento da inflamação intestinal (Danese *et al.*, 2004).

Além disso, deficiências nutricionais na DII estão bem documentadas, particularmente em relação ao zinco na doença de Crohn associada a uma disfunção imunológica. A efetividade de dietas especiais em reduzir o sintoma ou induzir a remissão dessas doenças é proposta, porém não universalmente aceita até mesmo porque muitas destas dietas apresentam efetividade muito menor quando comparadas aos tratamentos com corticosteróides ou aminossalissilatos.

Além disso, as taxas de reincidência não parecem diferir entre os tratamentos farmacológicos e nutricionais, até mesmo quando dietas mais rigorosas são utilizadas (Fiocchi, 1998).

Alguns alimentos específicos podem estar relacionados com o desenvolvimento da inflamação intestinal, atuando como um antígeno. Dentre estes podemos citar o açúcar refinado (Vind *et al.,* 2008), o álcool, o café (Boyko *et al*., 1989), o leite de vaca (Yamamoto *et al*., 2009) e um aumento no consumo de carboidratos (Martini & Brandes, 1976).

Por outro lado, existem alguns alimentos que são relatados como preventivos do processo inflamatório intestinal, como por exemplo, produtos ricos em ômega-3, que tem demonstrado atividade antiinflamatória (McCall *et al.,* 1989), bem como uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras (Targan & Shanahan, 1994).

Os fatores da dieta são parâmetros difíceis de serem estudados, pois não atuam sozinhos, mas associados a alterações genéticas e do sistema imune.

3.1.2. Tabagismo

Curiosamente, o tabagismo possui efeitos opostos na doença de Crohn e na Retocolite Ulcerativa, reforçando a idéia que mecanismos distintos são responsáveis por cada uma dessas enfermidades. Sabe-se que o cigarro é um fator de risco para a Doença de Crohn, aumentando a freqüência das recidivas e a necessidade de cirurgia, e a sua descontinuidade melhora o curso da doença. Em contraste, na retocolite ulcerativa o cigarro está relacionado com menor risco de ocorrência da doença, sendo esta incidência de apenas 40% em relação às pessoas não fumantes (Targan & Shanahan, 1994). A nicotina pode ser maléfica para pacientes com Doença de Crohn por contribuir com o estado de hipercoagulação presente nesta condição (Fiocchi 1998).

O mecanismo pelo qual o cigarro atua na retocolite ulcerativa ainda não está esclarecido, porém pode estar relacionado com alterações do muco colônico (Targan & Shanahan, 1994). Cope & Heatley (1986) demonstraram que a produção de muco em pacientes fumantes com retocolite ulcerativa é semelhante ao de pessoas saudáveis. Em adição, sabe-se que esse hábito afeta tanto a imunidade sistêmica quanto da mucosa, alterando uma gama de funções tanto da resposta imune inata quanto adaptativa. Por exemplo, em fumantes estão reduzidos os níveis de imunoglobulinas, a capacidade de proliferação de células T e os níveis de IL-1β, IL-2, IL-8 e TNF-α (Karban & Eliakim, 2007, Aldhours *et al.*, 2008).

Apesar dos componentes do tabaco, responsáveis por essas observações, não serem conhecidos ainda, adesivos de nicotina utilizados junto com o tratamento convencional melhoram os sintomas em pacientes com RCU leve a moderada (Fiocchi, 1998, Danese *et al.*, 2004).

Dessa forma, esses efeitos divergentes do tabagismo na DII indicam um impacto complexo e ainda indeterminado desse fator sobre a inflamação intestinal (Danese *et al.*, 2004).

3.1.3. Fármacos

Contraceptivos orais e antiinflamatórios não-esteroidáis (AINEs) são as duas principais classes de fármacos extensivamente estudadas como fatores que predispõe o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais. O risco relativo de doença de Crohn em mulheres tomando anticoncepcionais orais é aproximadamente duas vezes maior que em controles (Danese *et al.*, 2004; Carbonnel *et al.*, 2009). Diferentes estudos analisados por Cornish *et al.,* (2008) evidenciaram a associação dos contraceptivos orais e o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais. O mecanismo pelo qual essa classe de medicamentos atua ainda não está claro, mas atribui-se esta propriedade

principalmente a sua atividade trombogênica. Estudos morfológicos demonstram que o infarto multifocal microvascular do TGI pode estar envolvido com a doença de Crohn (Wakefield *et al.,* 1989). Considerando-se que a propriedade trombogênica pode causar isquemia, alteração na integridade da mucosa pode ocorrer e conseqüentemente facilitar a entrada de antígenos no lúmen (Targan & Shanahan, 1994).

Essa situação é menos ambígua no caso dos AINEs, pois seu uso está claramente associado a um aumento no risco de desenvolvimento destas doenças. Inicialmente, pacientes em remissão clínica podem desenvolver novamente a doença através da administração de AINEs. Camundongos knockout para IL-10 que desenvolvem colite através da administração de algum AINE exibem uma forma mais rápida e severa de inflamação, associada ao bloqueio das prostaglandinas protetoras e uma alteração da imunidade da mucosa, sugerindo um possível mecanismo pelo qual os antiinflamatórios não-esteroidais podem agravar a DII (Danese *et al.* 2004). Adicionalmente, essa classe de fármacos pode causar um aumento da permeabilidade vascular e lesão local acarretando em alterações na permeabilidade colônica e conseqüentemente no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (Targan & Shanahan, 1994).

3.1.4. Aspectos geográficos e sociais

A DII é mais comumente observada em países ocidentais e também naqueles mais desenvolvidos (Bernstein *et al.,* 2010), porém há um notável aumento no número de casos no Japão e em outros países orientais, fato este que pode estar associado ao aumento no consumo de gorduras e proteínas de origem animal, ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos, entre outros (Yamamoto *et al.,* 2009). Em adição, encontra-se uma a incidência é maior em áreas urbanas que em áreas rurais (Carbonnel *et al.*, 2009). Tradicionalmente, DII é mais freqüente

entre os grupos socioeconômicos mais altos, sem distinção entre DC e RCU. Curiosamente, trabalhadores rurais possuem um risco menor de desenvolver DII, enquanto indivíduos com trabalhos em escritórios acabam sendo mais suscetíveis a DC e RCU (Danese *et al.*, 2004).

Diversas teorias estão sendo desenvolvidas para tentar explicar essas diferenças. Uma delas diz respeito a um trânsito intestinal mais lento associado ao sedentarismo e dessa forma o tempo prolongado de contato dos antígenos dos alimentos com a parede intestinal, resultando em uma estimulação inapropriada e uma reação inflamatória (Danese *et al.*, 2004).

Outra teoria seria a "hipótese da higiene" que sugere que crianças menos expostas a infecções ou condições não-sanitárias ("sujeira") desenvolvem menos o sistema regulatório das células-T e o sistema imune, fato este que pode estar associado a um aumento na incidência de doenças imunes crônicas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (Bernstein *et al.,* 2010).

Essas variações geográficas na ocorrência destas doenças podem ser reflexos da variação na exposição aos diferentes fatores etiológicos e/ou das variações sócio-demográficas da população (Declercq *et al.,* 2009).

3.1.5. Estresse

A idéia generalizada de que o estresse possa desencadear a DII é típica entre as pessoas que sofrem tanto de DC quanto de RCU, porém sugere-se que o estresse atue modulando as manifestações clínicas da doença, e não seja por si só, o fator inicial e desencadeador (Danese *et al.*, 2004).

Foi demonstrado em pacientes com DII que o estresse pode alterar a permeabilidade intestinal. Alguns estudos relatam ainda que os diversos eventos da vida e o estresse desencadeado por eles podem aumentar o risco de recidiva em pacientes em remissão (Carbonnel *et al.*, 2009).

Poucos estudos analisam a influência do estresse psicológico em pacientes com DII. No entanto, sabe-se que pacientes com RCU ou DC têm maior propensão a quadros de depressão e ansiedade, aspectos que podem agravar os sintomas da inflamação, até mesmo causando recidivas (Hisamatsu *et al.*, 2007; Brandi *et al.*, 2009).

O estresse estimula o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal), promovendo como consequência a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e levando à liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária. Esse hormônio por sua vez estimula a secreção de cortisol pela adrenal. Dependente da concentração, o cortisol pode agir estimulando a produção de diversas substancias como, por exemplo, IL-6, IFN-γ e TNF- α, os quais estão envolvidos com uma maior incidência das DII (Mawdsley & Rampton, 2005).

3.1.6. Alterações na microbiota intestinal

A microbiota bacteriana intestinal é um importante fator na etiologia das doenças inflamatórias intestinais (Ott *et al.,* 2004), muitos dos quais mostram evidências claras de que as bactérias comensais entéricas e seus produtos estão envolvidos com a iniciação e perpetuação do processo inflamatório intestinal característico destas doenças (Papadakis & Targan, 1999).

Diversos estudos em modelos animais demonstram que a flora entérica normal é necessária para o desenvolvimento da DII. De fato, a inflamação intestinal só se desenvolve em animais mantidos em ambientes normais e não em ambientes "germ-free", supostamente porque uma resposta imune direcionada às bactérias entéricas seja necessária para o desenvolvimento da doença (Danese & Fiocchi, 2006). O aumento nos níveis de anticorpos contra as bactérias intestinais em indivíduos com DII corrobora a importância da microbiota intestinal na etiologia destas doenças (Hyun & Mayer, 2006). Foi reportado um grande número de

bactérias associadas a biópsias de pacientes com DC e com RCU quando comparados com controles. Esse aumento, tanto de bactérias anaeróbicas quanto bactérias facultativas, pode ser devido em partes, a uma disfunção da barreira epitelial em indivíduos suscetíveis (Chichlowski & Hale, 2008). Diversos microorganismos como, por exemplo, *Listeria monocytogenes, Chlamydia tracomatis, Escherichia coli, Cytomegalovirus, Saccharomyces cerevisiae*, e outros estão sendo estudados como possíveis agentes desencadeantes da DII (Danese *et al.*, 2004).

Por outro lado, existem as bactérias consideradas benéficas, como por exemplo, a *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus salivarius* spp. e *S. Thermophilus.* Um estudo realizado utilizando um produto contendo todas essas bactérias benéficas como probióticos, demonstrou que elas podem normalizar a função fisiológica e a integridade da barreira, reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a integridade das *tight junctions* entre as células epiteliais (Madsen *et al.,* 2001).

Neste aspecto, é importante constar que o balanço entre o número de bactérias benéficas e de espécies patogênicas no intestino poderá determinar a homeostase intestinal e esse balanço pode ser manipulado por antibióticos, probióticos e prebióticos usados para o tratamento e para a prevenção das recidivas das doenças inflamatórias intestinais (Sartor, 2008).

3.1.7. Permeabilidade intestinal

A camada epitelial é essencial para o funcionamento correto do trato gastrointestinal, e um aumento de sua permeabilidade para antígenos luminais pode levar a processos inflamatórios e danos na mucosa como observados na DII. Fatores que alteram a eficácia dessa barreira incluem a presença de bactérias

patogênicas (por exemplo, *Helicobacter* spp.), disponibilidade de determinados nutrientes e outros. Defeitos na permeabilidade desta barreira podem facilitar o contato de antígenos bacterianos e adjuvantes com células da resposta imune inata e adaptativa gerando respostas inflamatórias prolongadas (Chichlowski & Hale, 2008).

A função de barreira seletiva é mantida pela formação de complexos que ligam uma célula a outra através de desmossomos, junções de aderência e *tight junctions* (Chichlowski & Hale, 2008). Alterações patológicas no intestino podem permitir a abertura destes complexos, especialmente das *tight junctions* e permitir a passagem de grandes antígenos (Snoeck *et al.*, 2005).

É amplamente descrito na literatura que pacientes com DII possuem um aumento na permeabilidade intestinal, que é conseqüência da ulceração da mucosa e de apoptose, o que acarreta em uma diminuição na função de barreira deste epitélio (Fries *et al*., 2005; Edelblum & Turner, 2009; Groschwitz & Hogan, 2009). Pacientes com a doença clinicamente ativa apresentam um aumento da permeabilidade intestinal, e em pacientes com a doença inativa, esse aumento da permeabilidade é um sinal da recidiva clínica. A diminuição da função protetora em pacientes com DII leva a um infiltrado inflamatório e um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores que podem alterar ainda mais a permeabilidade intestinal (Groschwitz & Hogan, 2009).

Esse aumento na permeabilidade do epitélio intestinal pode ser o fator etiológico mais importante no desenvolvimento, progressão e recidiva destas doenças em humanos (Secondulfo *et al.*, 2001).

3.2.Fatores Imunológicos

O sistema imune intestinal é considerado o maior e mais complexo do organismo humano, possuindo a capacidade de discriminar claramente organismos

invasivos de substâncias inócuas, como proteínas alimentares e bactérias comensais. A resposta imune intestinal tem a função de proteger o organismo da entrada de agentes patogênicos, sendo essencial para a manutenção da fisiologia e para a prevenção de infecções. Por outro lado, quando a imunidade inata ou adquirida responde contra o material não-patogênico, como antígenos da dieta ou bactérias não-patogênicas, pode causar respostas inflamatórias como o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (Mowat, 2003). Tais aspectos permitem ainda a classificação destas doenças como doenças autoimunes (Arseneau *et al.*, 2007; Abraham, 2009).

O denominado sistema imune intestinal é um importante mecanismo de defesa imunológico constituído por distintas células e moléculas, cuja função é evitar a entrada de agentes estranhos, sendo que a resposta desencadeada pelo sistema imune intestinal pode ser do tipo inata ou adquirida (Plevy, 2002).

A imunidade inata é uma forma mais primitiva de imunidade sem grande especificidade e memória para patógenos, sendo responsável pelos estágios iniciais da resposta imune em que a localização e erradicação de patógenos invasores se tornam críticas para a sobrevivência do hospedeiro. No intestino, a imunidade inata inclui a barreira epitelial e as células fagocíticas presentes na lâmina própria (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) sendo demonstrado que pacientes com alterações genéticas na resposta imune inata tem uma incidência maior de DII (Mayer, 2010).

A imunidade adquirida se desenvolve em situações em que a imunidade inata não é eficiente no controle de um determinado patógeno. Sua ativação normalmente leva dias, e a especificidade da resposta decorre da mobilização de uma série de diferentes receptores encontrados nas células T e B. A sobrevivência de algumas destas células T e B (células de memória), depois da erradicação do patógeno, permite uma resposta rápida em uma infecção subseqüente pelo mesmo agente (Ince *et al.*, 2007).

Células dendríticas ativadas e macrófagos secretam diversas citocinas que, quando ativadas, regulam a resposta inflamatória tanto na DC quanto na RCU. Uma vez secretadas pelas células apresentadoras de antígenos, essas citocinas desencadeiam e diferenciam várias células T ativando a resposta imune (Sanchez-Muñoz *et al.*, 2008).

Estudos em humanos e em animais levaram ao conhecimento de que diferentes tipos celulares estão envolvidos na DC e na RCU (Mayer, 2010). Análises em amostras de tecidos intestinais e de sangue durante a fase ativa da doença de Crohn mostraram que níveis de citocinas como TNF-α, INF-γ, IL-12 e IL-1 se encontram aumentados, diferentemente da retocolite ulcerativa em que a secreção de IL-5, IL-4, IL-10 e IL-13 é que estão alteradas. Sendo assim, caracteriza-se a DC como típica resposta Th1 e RCU uma resposta atípica de Th2 (Papadakis & Targan, 2000; Sanchez-Muñoz *et al.*, 2008; Šventoraitytė *et al.*, 2008).

3.3.Fatores genéticos

Existem diversas evidências mostrando que a freqüência da DII em determinados grupos étnicos é maior, por exemplo, é observada uma incidência maior de RCU entre os caucasianos e menor entre os hispânicos e asiáticos (Cavanaugh & Pavli, 1997).

Um estudo realizado com gêmeos homozigotos mostrou que em aproximadamente 50% dos casos ambos desenvolviam DC, mas apenas 10% desencadeavam RCU, sugerindo que o fator genético tem maior influência na DC do que na RCU (Cavanaugh & Pavli, 1997).

Em 2001, foi descoberto que mutações no gene NOD2/CARD15 tornam a pessoa mais susceptível a Doença de Crohn. NOD2 é uma proteína citosólica que reconhece componentes da parece bacteriana e desencadeia a produção de NF-κB. Não se sabe se essas mutações resultam em ganho ou perda da função desse gene,

porém essa descoberta levou a um novo meio de se estudar a relação entre alterações genéticas e alterações na resposta imune, principalmente no que se diz respeito à resposta imune inata (Henckaerts & Vermeire, 2007; Scaldaferri & Fiocchi, 2007).

Aproximadamente 40% dos pacientes do Oeste europeu e da América no Norte carregam pelo menos uma das três principais variantes desse gene (L1007fsinsC, G908R, R702W) comparadas a voluntários saudáveis em que essa porcentagem cai para 0.5%-20%. Indivíduos que apresentam essas variantes têm um risco maior de desenvolver DC, sendo este risco relativo de 2-4 vezes maior em indivíduos heterozigotos para qualquer uma dessas variantes e chega a mais de 20 vezes em homozigotos ou heterozigotos com mais de uma variante (Henckaerts & Vermeire, 2007). Heliö *et al.,* (2003) descrevem que a variação 1007fs é a mais observada em pacientes com DC e está relacionada com a deficiência em induzir a ativação do NF-κB mediada pelo LPS, o que aumenta o risco de DC na região do íleo.

Sabe-se que uma diminuição na ativação do NF-κB, devido à mutação do gene NOD2 pode resultar em um desbalanço da homeostase, com conseqüente desequilíbrio na quantidade das bactérias patogênicas intestinais, sendo necessária outra via de ativação do sistema imune, ocasionando um aumento na produção de outras citocinas pró-inflamatórias, o que pode culminar com o desenvolvimento da DC (Ishirara *et al.,* 2009).

Atualmente tem-se pesquisado a influência do papel da região IBD5 do cromossomo 5q31 em associação principalmente à DC. Diversos estudos mostram variações nesses genes conhecidos como transportadores de cátion orgânico OCTN1 e OCTN2 (SLC22A4 e SLC22A5, respectivamente) (Waller, *et al*, 2006). Tem sido sugerido que essas variantes alteram o transporte de substancias através das barreiras celulares e interagem com variantes de outro gene associado às DII, NOD2, aumentando o risco de se desenvolver essas doenças (Peltekova *et al.,* 2004, Waller *et al.*, 2006).

O estudo do fator genético na DII é um importante passo para o entendimento dessa complexa doença e a associação deste com a compreensão das alterações do sistema imune intestinal são os pontos críticos para o entendimento de sua cronicidade e patofisiologia, bem como uma das estratégias para o desenvolvimento de novos medicamentos.

4. Modelos experimentais de Doença Inflamatória Intestinal

A maior parte do progresso recente no entendimento da imunidade da mucosa intestinal e da patofisiologia do intestino foi alcançado graças ao desenvolvimento de novos modelos animais de inflamação intestinal. Apesar desses modelos não representarem a complexidade da doença no ser humano e não substituírem estudos com pacientes, eles são uma ferramenta valiosa para o estudo dos diversos aspectos da doença. Em adição, questões de complexa análise em pacientes, tais como as fases iniciais da inflamação e a efetividade de novas estratégias terapêuticas, podem ser analisadas com grande confiabilidade em modelos animais (Wirtz & Neurath, 2000).

Os modelos de DII em animais podem ser divididos em quatro classes principais de ensaios biológicos: aqueles que envolvem animais transgênicos e knockout; modelos de inflamação espontânea; modelos de inflamação induzida; modelos de transferência em animais imunologicamente comprometidos (Blumberg, 1999; Wirtz & Neurath, 2000; Jurjus *et al.*, 2004).

A administração do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) por via intraretal, classificada como um modelo de inflamação induzida é considerada o modelo mais adequado para o estudo dos efeitos de novos compostos sobre a doença inflamatória intestinal, sendo a técnica considerada mais adequada por simular de forma muito parecida o que ocorre com a DII em humanos (Jurjus *et al.,* 2004). A

inflamação intestinal aguda em ratos promovida pela administração do TNBS está associada com um aumento na permeabilidade da mucosa intestinal como conseqüência de uma necrose epitelial e um aumento na atividade da mieloperoxidade. Um dano severo pode ser observado, o qual é aparentemente relacionado a um aumento no número de macrófagos e granulócitos. O modelo de colite induzida por TNBS também tem sido muito utilizado para estudar vários aspectos da inflamação intestinal, incluindo os padrões de secreção de citocinas, mecanismos de tolerância, adesão celular e imunoterapia (Wirtz & Neurath, 2000).

O TNBS atua com um hapteno, que ao associar-se com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, é capaz de desencadear uma resposta imunológica. No cólon, essa reação leva a uma inflamação caracterizada por um infiltrado de células T e macrófagos em todas as camadas do epitélio intestinal semelhante ao que ocorre na Doença de Crohn (Strober *et al.*, 1998). Bioquimicamente, é observado um aumento da atividade de enzimas como a mieloperoxidase (Sánches-Fidalgo *et al.,* 2007) e a fosfatase alcalina (Sánchez de Medina, 2004), além do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α e IFN-γ (Sánches-Fidalgo *et al.,* 2007) e de interleucinas, como IL-1β, IL-2, IL-6 e IL-12 (Strober *et al.*, 1998; Strober *et al.*, 2002; Strober *et al.*, 2004; Alex *et al.*, 2009)

Após a administração do TNBS, as proteínas são processadas e apresentadas a células T por células apresentadoras de antígeno através da lâmina própria, levando a um aumento excessivo da secreção de diversas interleucinas como IL-12, e a um desbalanço na resposta Th1 (Strober *et al.*, 1998). Por fim, as citocinas Th1 agem sobre os macrófagos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais, como TNF-α, IL-1β e IL-6, que causam uma inflamação aguda no local (Strober *et al.*, 1998).

5. Principais fármacos utilizados na Doença Inflamatória Intestinal

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores (Yamomoto-Furusho, 2007) e a terapia biológica (Morrison *et al*., 2009). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII e os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os corticosteróides, e/ou são de alto custo, como por exemplo, o infliximabe, aspectos que limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes.

5.1.Glicocorticóides

Os glicocorticóides tais como prednisolona, prednisona e outros são utilizados na terapia primária para DII moderada a severa, no entanto a dependência e os efeitos colaterais causados com o uso destes compostos influenciam diretamente a segurança e a tolerabilidade desses agentes (Navarro & Hanauer, 2003).

Jani *et al.* (2002) mostraram que a taxa de remissão em pacientes com RCU chegou a 75% para casos mais moderados e em casos mais severos a apenas 31% de remissão, porém a manutenção da remissão não é efetiva. Diversos estudos mostram que após um ano de tratamento, de 50% a 60% dos pacientes mantidos com glicocorticóides voltaram a apresentar a doença.

Em adição, vários efeitos colaterais de curto e longo prazo surgem, como por exemplo, retenção de líquidos, ganho de peso, instabilidade emocional e visão

turva. Efeitos a longo prazo mais sérios, que podem se desenvolver em função da administração repetida ou prolongada, incluem catarata, osteoporose e miopatias (Jani *et al.*, 2002; Navarro & Hanauer, 2003).

O mecanismo geral de ação destes fármacos consiste na ligação da molécula dos glicocorticóides com os receptores intracelulares que controlam a transcrição gênica. O complexo receptor-glicocorticóide promove a formação de dímeros que migram para o núcleo da célula e ligam-se ao DNA, modificando a transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas, como por exemplo, a lipocortina-1, e inibindo a síntese de outras, como da AP-1 e do NF-κB (Marx, 1995). Devido a este mecanismo, os glicocorticóides afetam a função de várias células envolvidas no processo inflamatório e conseqüentemente a expressão de várias citocinas, quimiocinas, cininas, diminuição das moléculas de adesão, do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e da ciclooxigenase (COX-2) (Rogler, 2010).

Sabe-se também que a administração de glicocorticóides reduz de maneira significativa a incidência de diarréia, provavelmente devido a capacidade de melhorar a absorção de sódio e de água no cólon de pacientes colíticos (Sandle *et al.*, 1986).

5.2.Aminossalicilatos

Os aminossalicilatos (5-ASA), sulfassalazina, olsalazina e mesalazina representam a primeira terapia de escolha no tratamento da doença inflamatória intestinal leve a moderada, assim como para a manutenção da remissão na RCU. Os derivados do 5-ASA são menos efetivos em manter a remissão em pacientes com DC e por isto menos utilizados nesses casos (Duricova *et al.*, 2010). A sulfassalazina é amplamente prescrita em função de seu baixo custo, eficácia comprovada e boa tolerabilidade deste agente, assim como de outros derivados do

grupo, depende principalmente da concentração do agente no lúmen intestinal (Ryan *et al.*, 2003).

Apesar desta classe de medicamentos ser considerada o tratamento de primeira escolha, estas preparações têm o potencial de causar efeitos adversos em todo o organismo. Os efeitos mais comuns, que chegam a levar a intolerância, incluem dores de cabeça, dispepsia, náuseas, vômitos, anorexia e fadiga em até 45% dos pacientes. Estas ocorrências parecem estar relacionadas com a dose administrada e com predisposições genéticas e os efeitos adversos podem ser diminuídos pela administração da medicação com alimento, pela redução temporária da dose e reintrodução gradual de doses maiores, ou ainda pela substituição por outros tipos de formulações farmacêuticas (Navarro & Hanauer, 2003).

Sulfassalazina contem o ácido 5-aminosalicilico (5-ASA) ligado a uma sulfapiridina por meio de uma ligação azo chegando intacta ao intestino. No cólon, a ligação azo é quebrada por bactérias azo-redutases liberando sulfapiridina e o 5-ASA. A sulfapiridina é absorvida sistemicamente e é a principal responsável pela toxicidade e efeitos colaterais apresentados pelo fármaco. O 5-ASA é o composto antiinflamatório ativo (Jani *et al.*, 2002).

Os derivados do 5-ASA são compostos antiinflamatórios que agem inibindo as vias da ciclooxigenase e da 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, resultando em redução nos níveis de leucotrieno B4 e prostaglandinas (Jani *et al.*, 2002; Whittle *et al.*, 2010).

Apesar de se não saber o mecanismo preciso pelo qual os aminossalicilatos agem na inflamação, acredita-se que possam apresentar também alguns efeitos imunomodulatórios. Estudos mostram que podem agir inibindo a produção de imunoglobulinas, IL-1, IL-2 e NF-κB, além de prejudicarem a função de linfócitos e monócitos e agirem como seqüestradores de radicais livres (Jani *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2003; Whittle *et al.*, 2010).

5.3.Imunossupressores

A eficácia dos análogos de purina Azatioprina e 6-mercaptopurina já está bem estabelecida na DII. A azatioprina é uma pró-droga rapidamente clivada a 6-mercaptopurina, após exposição com nucleófilos como a glutationa. Como produto resultante, a 6-mercaptopurina age como um antagonista de purinas, inibindo a síntese de proteínas, RNA e DNA, dessa forma inibindo o crescimento celular (Ardizzone & Porro, 2002).

Cuffari *et al.*, (2001) demonstram que o tratamento com Azatioprina ou 6-mercaptopurina é eficaz em manter a remissão em 70% dos pacientes de DC dependentes de corticóides e é capaz de eliminar a necessidade de glicorticóides em aproximadamente 75% dos pacientes. Quando em combinação com prednisolona, é capaz de induzir a remissão, mais rápido e mais freqüentemente, utilizando-se doses muitos menores do glicocorticóide. Seus efeitos imunossupressores melhoram a qualidade de vida de pacientes com DC através da diminuição das complicações perianais (Cuffari *et al.*, 1996; Derijks *et al.*, 2006).

Apesar desse importante efeito imunossupressor, aproximadamente 20% dos pacientes tratados com os análogos das purinas têm que interromper o tratamento em função da ocorrência de efeitos adversos (Derijks *et al.*, 2006), tais como reações alérgicas, infecções, hepatites, supressão medular e pancreatites (Cuffari *et al.*, 1996).

6. Busca por novos marcadores moleculares

Avaliar a participação de mediadores da DII em um modelo experimental amplamente utilizado e bem estabelecido é uma ferramenta farmacológica importante para a geração de dados que ampliem os conhecimentos da fisiopatologia desta doença ainda sem cura e tratamento, assim como na

identificação de novos alvos terapêuticos para a ação de novos produtos com atividade antiinflamatória intestinal.

Neste sentido, alguns mediadores recentemente apontados como importantes na iniciação e perpetuação do processo inflamatório intestinal em humanos, mas pouco conhecidos nos diferentes modelos experimentais, foram selecionados: a HSP70 ("Heat shock proteins"), heparanase e HPRT *(*hipoxantina guanina fosforibosiltransferase).

6.1."Heat Shock Protein" (HSP) 70

Altamente conservada em todas as espécies, as "Heat shock protein" (HSP) são uma família de proteínas de estresse que existem em todos os organismos vivos, desde os procariontes até os seres humanos (O Petrof *et al.*, 2004; Otaka *et al*., 2006). Elas são amplamente classificadas em diversas famílias de acordo com seu peso molecular, seqüência de aminoácidos e função. Levando-se em consideração seu peso molecular se dividem em família HSP 90, família HSP 70, família HSP 60 e família das HSP pequenas (O Petrof *et al.*, 2004). Adicionalmente, podem ainda ser dividida em dois grupos maiores, de acordo com suas funções: HSPs constitutivas, como HSC70 e HSP60 e, HSP induzíveis, como HSP70 e HSP25 (Hu *et al.*, 2009).

As HSPs induzíveis são normalmente sintetizadas sob condições de estresse, conferindo uma proteção celular por meio da capacidade de estabilizar proteínas celulares essenciais, prevenindo assim a desnaturação das mesmas e preservando sua função (O Petrof *et al.*, 2004; Arya *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

A expressão das HSPs pode ser induzida nas células via diversas formas de estresse, como hipertermia (febre), privação de nutrientes, estresse oxidativo ou

tóxico e exposição a citocinas inflamatórias (Jin *et al.*, 1997; Wieten *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2009).

As formas mais induzidas por estresse pertencem à família da HSP70, que incluem tanto a forma constitutiva (HSC70), essencial para as funções celulares e, a forma induzível (HSP70) que aumenta em resposta ao estresse ambiental (Ludwig *et al.*, 1999; O Petrof *et al.*, 2004; Wieten *et al.*, 2010). Durante os períodos de injúria dos tecidos ocorre liberação das "heat shock protein" no sangue ativando as defesas imunes do organismo através da otimização do processamento e apresentação do antígeno (Niinistö *et al.*, 2010).

Sabe-se que ocorre um aumento na indução e na expressão dessas proteínas em biópsias de tecidos inflamados e não inflamados de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal (Ludwig *et al.*, 1999; O Petrof *et al.,* 2004; Tanaka, *et al.*, 2007), além de um aumento significativo de sua expressão em alguns modelos animais de DII como o modelo de DSS (dextran sulfato de sódio) em que pode-se notar um aumento na quantidade de mRNA (RNA mensageiro) encontrado. (Tanaka *et al.*, 2007).

Ludwig *et al.*, 1999 demonstraram que a expressão da HSP70 está aumentada em doenças inflamatórias intestinais, independentemente do grau de lesão, atuando como um indicador de lesão celular. Musch *et al.*, 1996, demonstraram que as células epiteliais do intestino são mais resistentes ao estresse celular quando existe uma indução primária da síntese de HSP70, indicando seu papel protetor. A expressão colônica de HSP70 é importante para manter a homeostase colônica, tornando as células da mucosa menos suscetíveis a injúrias causadas por estresse e patógenos e desta forma aumentando a proteção e preservando as funções da mucosa.

Em estudos *in vitro*, fármacos antiinflamatórios como os glicocorticóides induzem a produção de HSP70 (Pratt, 1993). No entanto, não existem estudos que detalham o envolvimento destas proteínas nas diferentes fases do processo

inflamatório induzido por TNBS, assim como os efeitos de diferentes fármacos antiinflamatórios sobre estas proteínas.

6.2.Heparanase

A Heparanase é uma endo-β-glucuronidase capaz de clivar cadeias laterais de heparan-sulfato de proteoglicanos presentes na matriz extracelular e nas superfícies das células, apresentando um importante papel na estrutura celular, na neurovascularização e processo de autoimunidade (Nadir *et al.*, 2006; Naomoto *et al.*, 2007; Waterman *et al.*, 2007; Ben-Zaken *et al.*, 2008; Barash *et al.*, 2010). Segundo Zhang *et al*. (2010) esta enzima é capaz de ativar fatores de crescimento que promovem a proliferação celular e a angiogênese. O mecanismo pelo qual a heparanase facilita tanto a proliferação celular quanto a angiogênese é atribuído principalmente à sua capacidade de liberar mediadores biológicos que estão ligados às cadeias de heparan-sulfato como, por exemplo, IL-2, IL-8 e IL-10 (Ben-Zaken *et al.*, 2008; Li & Vlodavsky, 2009; Barash *et al.*, 2010).

Além disso, essa enzima induz a maturação de células dendríticas e ativa macrófagos, liberando fatores como IL-1, IL-6 e prostaglandinas E2, fatores que modulam a resposta imune (Dempsey *et al.*, 2000).

Em condições normais, a atividade da heparanase está restrita à placenta, tecidos da pele e em células sangüíneas como plaquetas, neutrófilos, monócitos, mastócitos e linfócitos T e B (Freeman & Parish 1998; Behzad & Brenchley, 2003; Gigis-Velitski *et al.*, 2004; Nadir *et al.*, 2006), mediando o extravasamento e mobilização destas células para os locais da inflamação (Freeman & Parish 1998). Naomoto *et al.* (2007) demonstraram que a heparanase parece agir como um fator de transcrição envolvido na indução da COX-2, mediador inflamatório.

Estudos clínicos mostraram que a expressão da heparanase não foi detectada em tecidos de cólon em condições normais, porém em tecidos

danificados por retocolite ulcerativa e doença de Crohn se detectou um aumento significativo da expressão dessa proteína (Waterman *et al*., 2007; Li & Vlodavsky, 2009). Vários autores têm sugerido que a heparanase pode representar um importante alvo terapêutico para novos fármacos, especialmente em doenças crônicas e/ou autoimunes como a Doença Inflamatória Intestinal, em outros processos inflamatórios e também no câncer (Nasser, 2008; McKenzie, 2007).

McKenzie, 2007 sugere claramente que a estratégia de monitorar por modelos experimentais *in vivo* a inibição da atividade ou expressão da heparanase é crucial para a avaliação de novos fármacos com diferentes atividades biológicas, especialmente em processos inflamatórios, assim como Waterman *et al.* (2007) que considera essa enzima um alvo extremamente importante para o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias.

6.3.Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HPRT)

A HPRT é uma enzima responsável pela reciclagem de purinas, pois converte as bases purínicas livres, hipoxantina e guanina, em nucleotídeos re-utilizáveis. Esta enzima é expressa na maioria dos organismos, desde as bactérias até os mamíferos. Em mamíferos, se expressa em praticamente todas as células desde o desenvolvimento, começando nos estágios iniciais de blastocistos (Stout & Caskey, 1981; Albertini, 2001; Ceballos-Picot *et al.*, 2009).

A reação catalisada pela HPRT foi inicialmente descrita como uma simples função de reciclagem na cadeia do metabolismo das purinas (Arnold & Kelley, 1991). Essa reação permite que bases livres sejam reutilizadas em sínteses de nucleotídeos novos. Função importante uma vez que mais de 90% das bases utilizadas em vertebrados são recicladas (Sculley *et al.*, 1992).

A expressão basal dessa enzima parece ser semelhante em todos os tecidos e células, porém níveis elevados de mRNA parecem estar presentes em diversas

enfermidades; mais atualmente, foi demonstrado que esses níveis podem ser afetados pela presença de purinas e nucleotídeos livres no intestino de ratos (Walsh *et al.*, 1990).

Com base nestas considerações, o presente projeto se baseou na análise e validação de duas hipóteses:

HIPÓTESE 1: A HSP70, heparanase e HPRT são mediadores do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.

Estratégia de teste: avaliar a participação destes mediadores nas fases aguda e crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.

HIPÓTESE 2: A HSP70, heparanase e HPRT são alvos farmacológicos para a avaliação de efeitos de fármacos com atividade anti-inflamatória intestinal.

Estratégia de teste: avaliar a atividade farmacológica de três diferentes fármacos usados no tratamento da DII em humanos (sulfassalazina, prednisolona e azatioprina) e seus efeitos sobre os diferentes mediadores no modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.

A validação destas hipóteses, portanto, permitiria em um primeiro momento uma melhor caracterização e padronização do modelo experimental de colite induzida por TNBS em ratos, permitindo assim identificar a participação de mediadores da DII em humanos neste importante modelo experimental e, em um segundo momento, mas não menos importante, identificar se os efeitos antiinflamatórios intestinais de três dos fármacos mais comumente utilizados no tratamento da DII estão relacionados com ações farmacológicas sobre a expressão destes marcadores.

Objetivos

Com base nestas informações foram objetivos deste trabalho:

1. Avaliar a participação da HSP70, heparanase e HPRT no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos;

2. Avaliar a atividade farmacológica de três diferentes fármacos usados no tratamento da DII em humanos (sulfassalazina, prednisolona e azatioprina) e seus efeitos sobre a expressão de desses mediadores no modelo de inflamação intestinal induzido por TNBS em ratos.

Material e Métodos

1. Animais

Ratos machos albinos da Cepa Wistar de 180 a 220 g de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo foram usados para os testes de atividade antiinflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de 21 ± 2ºC e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos forma alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo sete animais por caixa e alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

2. Delineamento experimental

A indução do processo inflamatório intestinal foi realizada pelo método descrito por Morris *et al*., (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e, posteriormente, anestesiados com éter. O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) foi preparado a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v), onde 0,25 mL de uma solução de 10 mg de TNBS em etanol a 50% (v/v). O TNBS foi administrado via retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os

animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e se realizaram às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite. Como padrão de comparação se utilizou o grupo controle (com colite e sem tratamento farmacológico) e o grupo Branco (sem colite e sem tratamento farmacológico). Os animais dos grupos controle e branco receberam salina por via oral. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite.

Na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

1. Animais Não Colíticos:
    a. Brancos: animais sem tratamento
    b. Prednisolona: animais tratados com 2mg/Kg
    c. Sulfassalazina: animais tratados com 50mg/kg
    d. Azatioprina: animais tratados com 2mg/kg
2. Animais Colíticos:
    a. Controle-TNBS: animais sem tratamento
    b. Prednisolona: animais tratados com 2mg/Kg
    c. Sulfassalazina: animais tratados com 50mg/Kg
    d. Azatioprina: animais tratados com 2mg/Kg

3. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal in vivo

3.1.Avaliação macroscópica

Durante o desenvolvimento dos distintos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de

alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. Ao final dos experimentos os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995 (Tabela 01).

Tabela 1. Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significante
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em cinco fragmentos longitudinais, três deles foram congelados a –30ºC para determinação de proteínas e atividade da fosfatase alcalina, avaliação da atividade da mieloperoxidase e determinação dos níveis de glutationa total. Este último fragmento foi pesado e congelado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltranspeptidase (Anderson, 1985). Os fragmentos restantes foram armazenados a -80ºC para as análises moleculares.

3.2.Determinações bioquímicas

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro de 10 ml de capacidade.

3.2.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz *et al*., 1984. A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular. A determinação foi realizada em fragmentos de cólon (150-300 mg), os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras e com 1ml de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), durante 15 segundos. O tampão HTAB, ao funcionar como um detergente, facilita a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, nos quais está armazenada. Em seguida o material picado foi transferido para um tubo de vidro, adicionando-se o restante de tampão, de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v), homogeneizando-se durante 45 segundos a frio, usando o homogeneizador Heidoph. O homogeneizado resultante foi dividido em duas alíquotas de 1,0ml, armazenadas em *eppendorff*. O material foi sonicado por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento durante 1-2 dias. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 7000G por 5 minutos a 4ºC. Em uma placa de 96 canais, foi adicionado 100μl do sobrenadante de cada amostra em pocilhos distintos, 150μl do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina).

Em seguida, se determinou o incremento de absorbância a 450nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) foi considerada como aquela que degrada 1nmol/min de peróxido de hidrogênio a 25ºC. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

3.2.2. Determinação do conteúdo de glutationa total.

A determinação do conteúdo de glutationa total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985) que está baseado na oxidação total do glutation reduzido (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutation redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorbância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutation (GSH+GSSG).

Para efetuar a determinação do conteúdo de glutationa total, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador Heidoph. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 2000G por 5 minutos a 4ºC. Do sobrenadante se utilizou 20μl que foi colocado em uma placa de 96 canais, onde se adicionou 140μl de NADPH, 5μl de PBS e 20μl DTNB. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30ºC. Após este

período adicionou-se 15µl de glutation redutase e registrou-se o incremento de absorbância a 412nm no espectrofotômetro. A concentração de glutation foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com Glutationa (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

3.2.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foram realizadas pelos métodos clássicos descritos por Smith *et al.,* (1984) e Bessey *et al.,* (1946).

3.3.Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen ®)

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo Trizol Invitrogen®. Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-1000, NANODROP).

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNAse antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNAse I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNAse foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNAse, 1µl de DNAse I (1unidade/µl) e água "RNAse free" suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura

ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o "kit" SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNAse, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 ul de água estéril. Essa solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minutos. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4µl de tampão "First Strand" 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de "RNAse OUT Inhibitor" (40unidades/µl). Na seqüência, foi acrescido 1µl (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e se iniciou a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no PCR.

3.4.Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos correspondentes (Tabela 02).

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra em questão utilizando o software "LinRegPCR" (Ramakers *et al*., 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo quatro pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram delimitados e a média desses valores determinou o Threshold para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências

individuais de cada amostra analisada (tabela 03).

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela freqüência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno (GAPDH, HPRT ou β-actina). A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos utilizados para a amplificação dos genes alvos.

Gene	Seqüência	Temperatura de anelamento (ºC)	Concentração de oligo (nM)
GAPDH	F TGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA R ACGACATACTCAGCACCAGCATCA	60	200
β-actina	F TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA R ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT	60	100
HPRT	F AGGGAAGTGACAATCTACCTGACG R GAAATGTCTGTTGCTGCGTCCCTT	60	100
HSP70	F ACTCCTTCGTTCGGTCTGCAATCA R CTGGGAATGCAAAGCACACGTGAA	60	200
Heparanase	F TGTCAAGAGTGAAAGGCCCAGACA R GCAGCTTCAAGTGCTTGGTGACAT	60	200
NF-κB	F AAACCAAAGCCCTGAAAGGCCATC R TCGGAAGGCCTCGAATGACATCAA	60	200

Tabela 3: Média das eficiências de amplificação individuais de cada amostra analisada.

Eficiência dos genes alvos	
Genes	Eficiência (%)
GAPDH	90,5
β-actina	99,1
HPRT	97,0
Heparanase	93,7
HSP70	97,2
NF-κB	96,2

4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e analisados pelo teste de Kruscal-Wallis. Dados descontínuos foram analisados pelo teste X^2. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

Resultados

1. Avaliações Macroscópicas

Conforme esperado, nos animais não colíticos, nenhum dos parâmetros de lesão macroscópica foi afetado pelos diferentes tratamentos utilizados. No grupo dos animais colíticos não tratados (Controle), a administração intracolônica de TNBS resultou em inflamação no epitélio colônico, evidenciada após 48 horas com uma necrose na camada mucosa. Esta lesão estendeu-se por 2.5 – 5.6 cm ao longo do cólon, e promoveu a ocorrência de espessamento e hiperemia na parede intestinal, acompanhada ainda por uma diferença significativa da relação peso-comprimento (mg/cm), incidência de diarréia e aderências em relação ao grupo branco (Tabela 4). Apenas a relação peso/comprimento foi afetada pelo tratamento com 2mg/kg prednisolona, os demais tratamentos não foram capazes de reverter nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 04).

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de prednisolona (2mg/Kg), sulfassalazina (50mg/Kg) e azatioprina (2mg/kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Tratamento	Escore (0-10)[x]	Extensão Lesão (cm)[y]	Relação Peso/Comprimento (mg/cm)[y]	Diarréia (%)[z]	Aderência (%)[z]
Não Colítico (Branco)	Veículo	0^{a}	0^{a}	105.02 ± 2.55^{ac}	0^{a}	0^{a}
Colítico (Controle TNBS)	Veículo	$7\ (7\text{-}9)^{b}$	$3.58 \pm 0,35^{b}$	147.09 ± 6.43^{b}	87.5^{b}	25^{a}
Não Colítico	Prednisolona	0^{a}	0^{a}	95.619 ± 4.77^{a}	0^{a}	0^{a}
Não Colítico	Sulfassalazina	0^{a}	0^{a}	99.448 ± 8.42^{ad}	0^{a}	0^{a}
Não Colítico	Azatioprina	0^{a}	0^{a}	96.722 ± 10.11^{a}	0^{a}	0^{a}
Colítico	Prednisolona	$6\ (3\text{-}7)^{ab}$	$2.75 \pm 0,37^{b}$	126.29 ± 4.29^{cd}	83.3^{b}	0^{a}
Colítico	Sulfassalazina	$7\ (1\text{-}8)^{b}$	$3.20 \pm 0,76^{b}$	134.75 ± 13.26^{bc}	100^{b}	0^{a}
Colítico	Azatioprina	$6\ (5\text{-}8)^{b}$	$3.00 \pm 0,38^{b}$	132.56 ± 3.17^{bc}	83.3^{b}	0^{a}

[x] Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), [y] extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M., [z] diarréia e aderência foram analisadas pelo teste X^2. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

Após a administração do TNBS, pode-se notar uma diminuição na quantidade de alimento ingerida. Os animais não colíticos restabelecem normalmente o consumo após o jejum e diferiram estatisticamente na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle. Apenas os animais tratados com prednisolona foram capazes de restabelecer o consumo de alimento após a indução do processo inflamatório colônico ($p < 0.05$, diferença estatística não demonstrada no gráfico) (Figura 01).

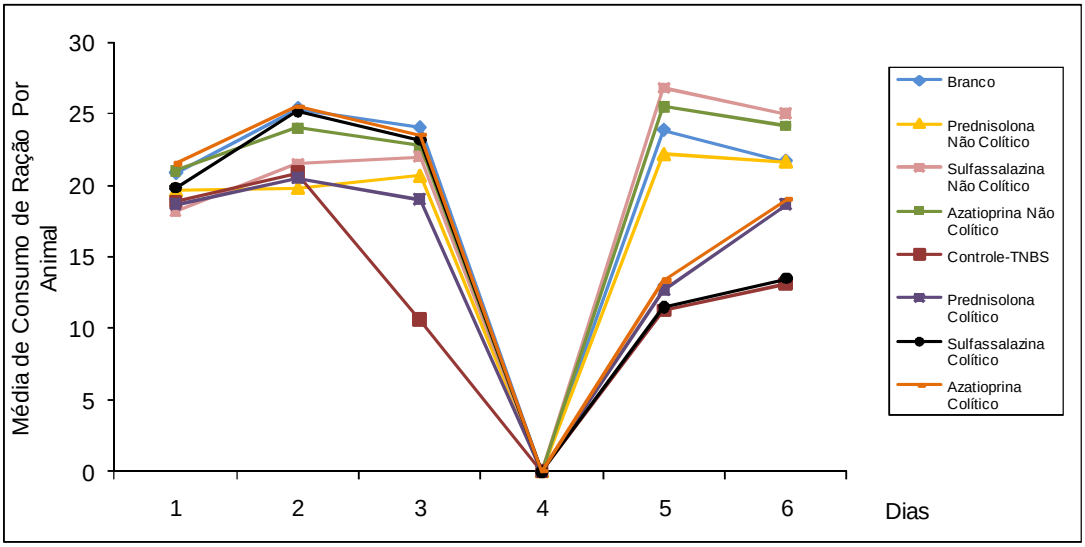

Figura1: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais.

Como conseqüência da redução no consumo de alimento ocorre também uma redução do peso corpóreo. Os animais não colíticos foram capazes de restabelecer o ganho de peso de antes do jejum. Nenhum dos tratamentos foi capaz de restabelecer o ganho de peso nos animais colíticos quando comparados com o grupo controle-TNBS (figura 02).

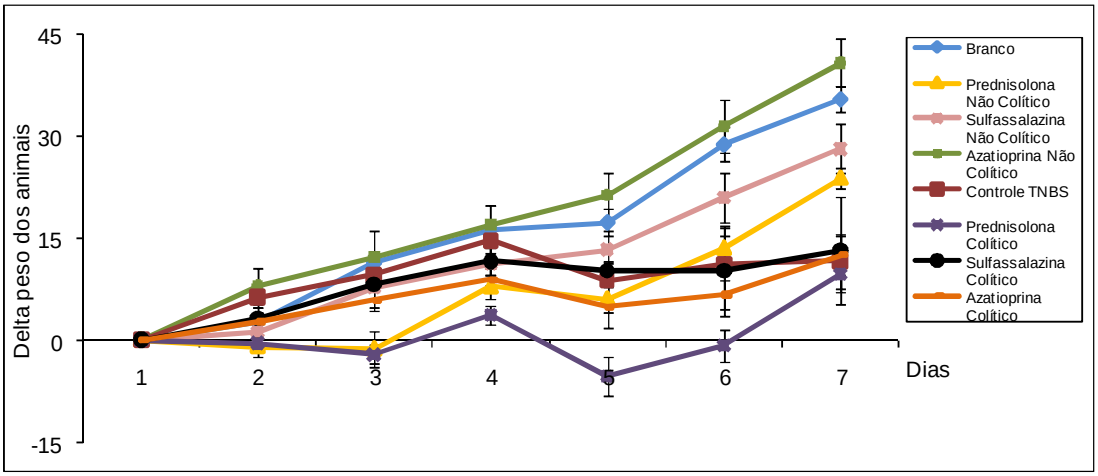

Figura 2: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em Δ peso corporal.

2. Avaliações Bioquímicas

Após a administração do TNBS diversos parâmetros bioquímicos se encontram alterados no cólon, como por exemplo, aumento da atividade da MPO (figura 03) e da fostatase alcalina (figura 04) e depleção dos níveis de glutationa total (figura 05) quando se comparam os animais do grupo controle TNBS com os animais do grupo branco.

Nos animais não colíticos, nenhum destes parâmetros foi afetado após o tratamento com prednisolona, sulfassalazina e azatioprina. No entanto, o pré-tratamento dos animais colíticos com prednisolona, sulfassalazina e azatioprina evitou a depleção nos níveis de glutationa colônica, quando comparado ao grupo

controle TNBS (Figura 05). Adicionalmente, estes tratamentos promoveram diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase (Figura 03). No entanto, apenas o pré-tratamento dos animais colíticos com prednisolona e azatioprina promoveu uma diminuição da atividade da fosfatase alcalina quando comparados ao controle TNBS (figura 04), diferentemente dos animais colíticos tratados com sulfassalazina que não diferiram significativamente do grupo controle TNBS.

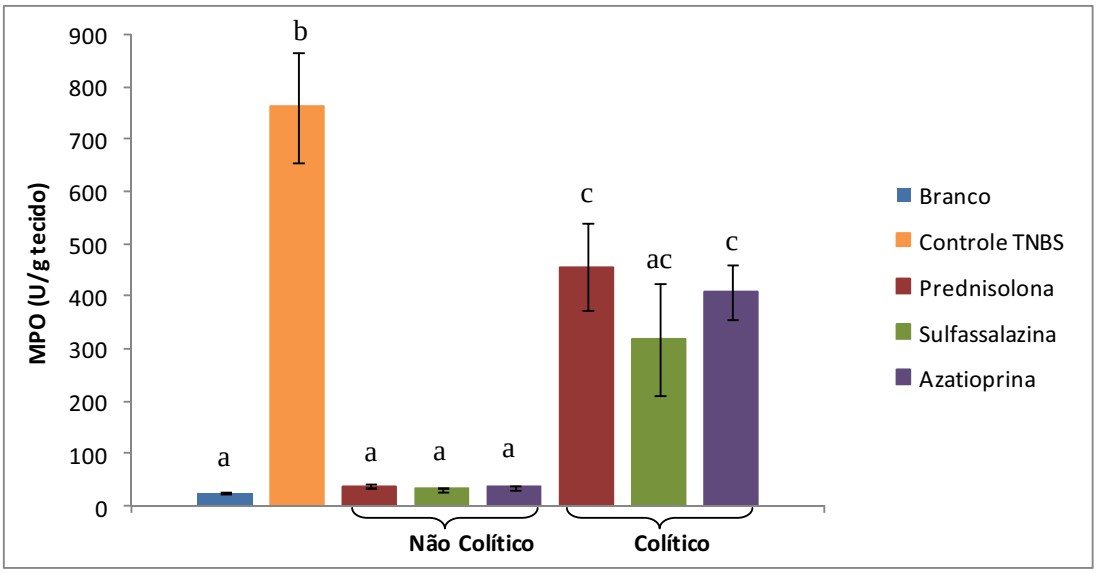

Figura 3: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidade (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

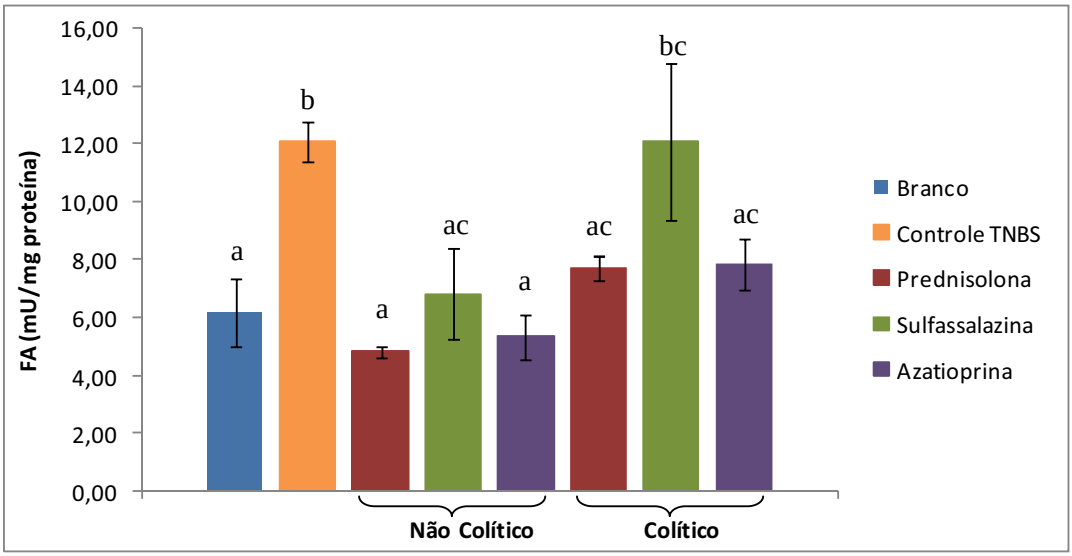

Figura 4: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em p<0.05.

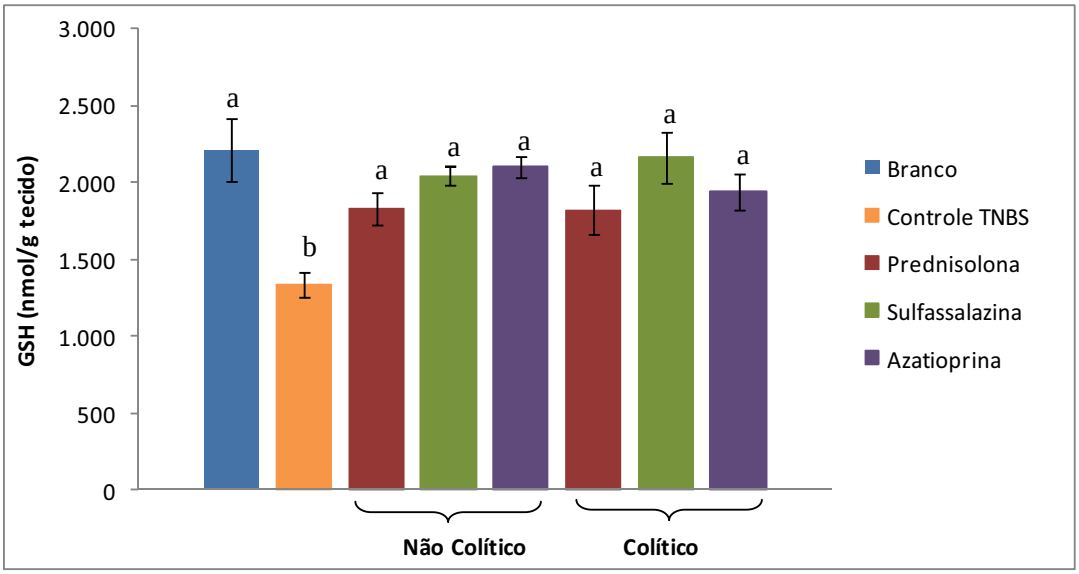

Figura 5: Avaliação dos níveis de glutationa colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em p<0.05.

3. Avaliações Moleculares

Em relação à expressão relativa do gene da HSP70, observamos inicialmente que esta expressão foi alterada após a administração de TNBS. Observou-se ainda que nos animais não colíticos, o grupo tratado com azatioprina diferiu significativamente do grupo branco, promovendo um aumento de aproximadamente 80% nos valores dessa expressão, enquanto que o pré-tratamento com sulfassalazina e prednisolona não interferiram com esta expressão nos animais saudáveis. Nos animais colíticos o tratamento com prednisolona promoveu uma diminuição significativa em relação ao grupo controle TNBS ($p<0.05$), sendo que os demais tratamentos não promoveram alterações na expressão desse gene (figura 06).

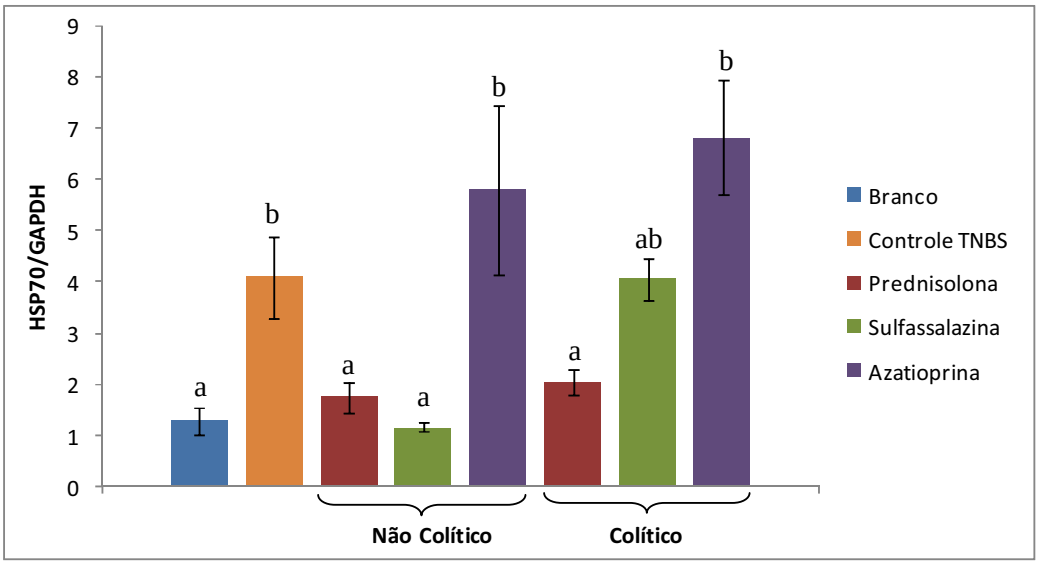

Figura 6: Avaliação da expressão relativa de HSP70 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

Na expressão relativa do gene HPRT (figura 07) observa-se um aumento no grupo controle TNBS em comparação ao grupo branco ($p<0.01$). A administração dos diferentes fármacos aos animais não colíticos não alterou a expressão basal dessa enzima. Já nos animais colíticos, o pré-tratamento com prednisolona, sulfassalazina e com azatioprina foi capaz de reduzir de maneira significativa a expressão deste gene ($p<0.05$, $p<0.01$ e $p<0.05$ respectivamente).

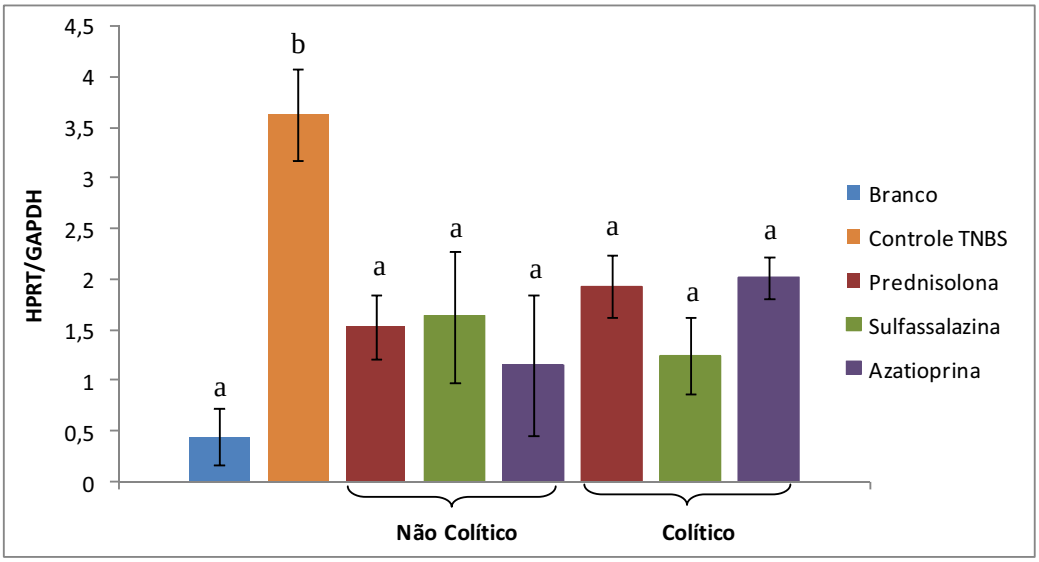

Figura 7: Avaliação da expressão relativa de HPRT em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

Na análise da expressão relativa da heparanase (figura 08) foi possível observar um aumento significativo nos animais do grupo controle TNBS quando comparados aos animais do grupo branco ($p<0.05$). O pré-tratamento dos animais não colíticos com prednisolona, sulfassalazina ou azatioprina não alterou a expressão basal dessa enzima. Os animais colíticos tratados com sulfassalazina e azatioprina apresentaram uma expressão diminuída deste gene em relação ao grupo controle TNBS, mas o pré-tratamento com prednisolona não reduziu a expressão deste gene ($p<0.01$ e $p<0.05$ respectivamente).

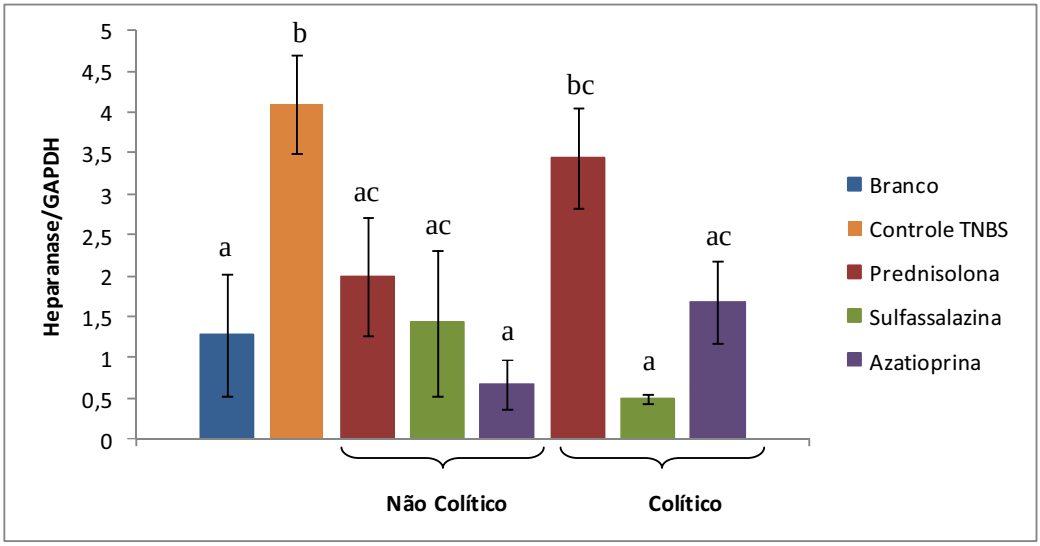

Figura 8: Avaliação da expressão relativa de Heparanase em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

Quanto à expressão relativa do gene NF-κB (figura 09) é possível observar um aumento de três vezes nos animais do grupo controle TNBS em relação aos animais do grupo branco ($p<0.05$). A administração dos fármacos de referência nos animais não colíticos não altera a expressão basal deste fator de transcrição. Somente os animais colíticos pré-tratados com sulfassalazina apresentaram uma diminuição na expressão deste gene ($p<0.05$).

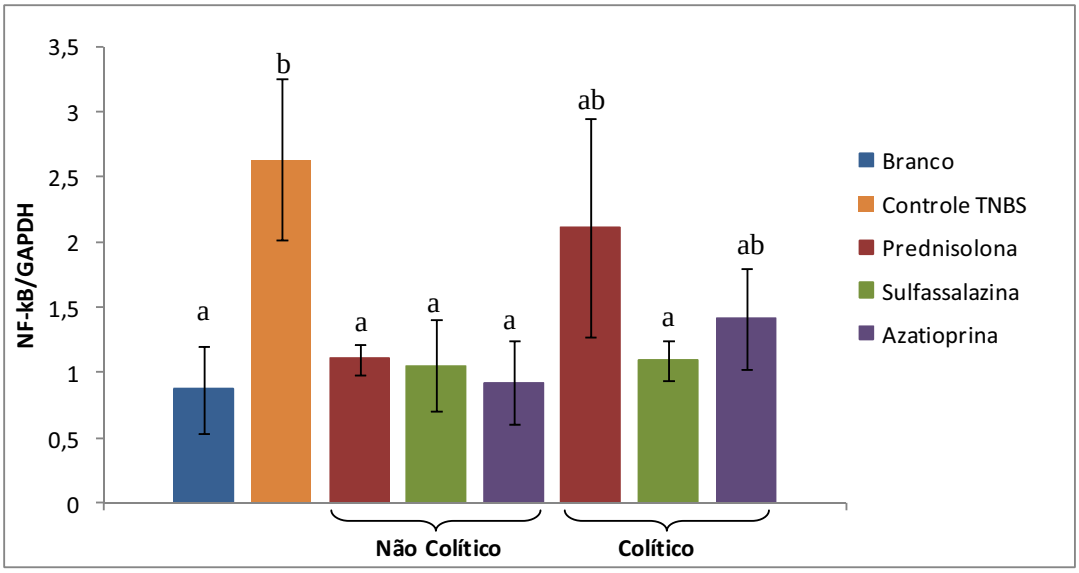

Figura 9: Avaliação da expressão relativa de NF-κB em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores sem letras em comum diferem em $p<0.05$.

Discussão

1. Validação do modelo experimental

Para investigar a patofisiologia da DII, diversos modelos experimentais de inflamação têm sido desenvolvidos. Um dos mais utilizados é o modelo de colite induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Acredita-se que este modelo assemelha-se à DC uma vez que a inflamação resultante é mediada por uma resposta Th1 com uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IFN-γ, TNF-α e IL-12 (Jurjus *et al.*, 2004; Velde *et al.*, 2006; Alex *et al.*, 2008).

A colite induzida por TNBS se desenvolve rapidamente caracterizando-se por perda de peso dos animais e danos na mucosa colônica. Histologicamente, a inflamação é caracterizada por infiltração de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, tanto na mucosa quanto na submucosa, além de linfócitos e fibroblastos (Hoffmann *et al.*, 2001; Fiorucci *et al.*, 2004). Jurjus *et al.* (2004) demonstraram ainda diminuição na absorção de água na mucosa inflamada, podendo ser este fator responsável pela ocorrência de diarréia que ocorre não apenas em animais colíticos como também em pacientes com DII.

Bioquimicamente, é observado um aumento da atividade de enzimas como a mieloperoxidase (Sánches-Fidalgo *et al.*, 2007) e a fosfatase alcalina (Sánchez de Medina, 2004), bem como alterações nos sistemas antioxidantes da mucosa intestinal. Kim & Berstad (1992) demonstraram que a inflamação caracteriza-se por uma diminuição nos níveis de glutationa (GSH), provavelmente devido à produção de metabolitos reativos de oxigênio pelo TNBS.

A GSH é predominantemente a primeira defesa antioxidante intracelular contra os produtos tóxicos de oxigênio (Deleve & Kaplowitz, 1991). Após a exposição da GSH em sua forma reduzida ao agente oxidante, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ocorre sua oxidação à sua forma oxidada (GSSG),

cuja reação é catalisada pela glutationa peroxidase (GPx). A recuperação da GSSG é feita pela enzima glutationa redutase (GSHred), na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para manutenção da integridade do sistema protetor celular (Wang & Ballatori, 1998). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, há recuperação da GSH, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que acarreta em estresse oxidativo (Shan *et al.,* 1990; Gilbert, 1990; Halliwel, 1993). Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela glutationa total (GSH+GSSG).

Ao analisarmos os níveis de glutationa total nos animais controles podemos notar uma depleção em seus níveis em 40% quando comparados aos animais brancos, confirmando o aumento do estresse oxidativo no local da aplicação do TNBS. Todos os tratamentos foram eficazes em evitar a depleção dos níveis de GSH indicando uma função antioxidante dos fármacos utilizados.

A enzima mieloperoxidase, encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, é considerada um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração desse tipo celular e a inflamação tecidual (Winterbourn & Brennan, 1997). A redução na atividade da enzima mieloperoxidase pode ser interpretada como uma propriedade antiinflamatória de determinado composto indicando uma diminuição na migração de neutrófilos para a área inflamada (Krawisz *et al.,* 1984).

Em nosso experimento pode-se observar um aumento na atividade da MPO quando comparamos os animais do grupo controle TNBS com os animais do grupo branco indicando uma migração aumentada de neutrófilos no local da inflamação. Os tratamentos com os fármacos de referência foram eficazes em diminuir a atividade dessa enzima diminuindo assim a inflamação tecidual mesmo após a administração do TNBS.

O terceiro marcador avaliado foi a atividade da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e compreende uma família de enzimas que quelam radicais fosfato em pH alcalino. Essa enzima pode ser encontrada em diferentes tipos celulares, incluindo os neutrófilos (Karlsson *et al.,* 1995) e leucócitos (Smith *et al.,* 1984). Sua função fisiológica é ainda desconhecida, mas sabe-se que esta enzima fica aumentada no processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina *et al.,* 1996; Gonzalez *et al.,* 2001; Sanchez de Medina *et al.,* 2004). Desta forma, a redução na atividade da fosfatase alcalina pode ser interpretada como uma manifestação da atividade antiinflamatória das substâncias em estudo (Sanchez de Medina *et al.,* 2004).

Os resultados observados neste estudo demonstram um aumento da atividade da fosfatase alcalina em aproximadamente 50% quando comparamos os animais controles com os animais do grupo branco. Esse aumento reflete o aumento da atividade inflamatória local. O tratamento com prednisolona e azatioprina foi eficaz em diminuir a atividade desta enzima indicando uma diminuição do processo inflamatório.

Outro marcador analisado neste estudo foi a expressão gênica do fator de transcrição nuclear (NF-κB). Uma variedade grande de sinais como, por exemplo, citocinas pro-inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, estresse oxidativo e infecções virais podem causar a ativação do NF-κB. Esse fator de transcrição ativado induz a transcrição de vários outros genes como, por exemplo, citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão além de genes anti-apoptose (Badr *et al.*, 2009). Visto sua capacidade de induzir a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios, o NF-κB tem sido descrito como um dos fatores chave na patofisiologia de diversas doenças inflamatórias crônicas (Wullaert, 2010).

A ativação deste fator ocorre principalmente por duas vias de sinalização conhecidas como via clássica (canônica) e alternativa. A primeira via afeta primariamente diversos dímeros do NF-κB, dos quais o mais comum é o heterodímero Re1A(p65)-p50, por meio de fosforilação induzida por proteólise de

quinases responsáveis pela ativação do NF-κB, chamadas de quinases Iκ-B (IKK), enquanto que a segunda via afeta somente a ativação do dímero Re1B-p52, por meio da fosforilação induzida por proteínas precursoras (Karin, 2005). Há amplas evidências sugerindo que a via clássica é a mais importante para a iniciação e propagação da resposta inflamatória (Senftleben *et al*., 2001), enquanto a segunda é mais importante para o desenvolvimento de órgãos linfóides secundários e imunidade adaptativa (Bonizzi & Karin, 2004). Tem sido considerado improvável que a simples ativação desta via seja suficiente para a iniciação da resposta inflamatória, visto que muitos dos promotores estudados, tais como o INF-γ, necessitam da assistência de outros fatores (Karin, 2004).

Hollenbach *et al*. (2004), Fichtner-Feigl *et al.*, (2005) e Joh *et al.* (2010) demonstraram que no modelo de colite induzida por TNBS são encontrados níveis elevados desse fator de transcrição e que a administração de inibidores de NF-κB podem levar a uma melhora dessa inflamação.

Neste estudo, semelhante ao encontrado na literatura, os animais do grupo controle TNBS apresentaram um aumento de três vezes nos níveis de NF-κB quando em comparação aos do grupo branco e a administração dos fármacos de referência não aumentou a expressão basal desse gene. A administração de prednisolona e azatioprina aos animais colíticos não foi capaz de alterar esse parâmetro.

Assim como demonstrado por diversos autores, a administração de sulfassalazina foi capaz de diminuir a expressão de NF-κB. Wahl *et al.* (1998), Weber *et al.* (2000) e Zhao *et al.* (2010) demonstraram que a administração de sulfassalazina é capaz de reduz ou até mesmo inibir a expressão desse fator de transcrição tanto *in vitro* quanto em modelos animais de colite como a colite induzida por DSS demonstrando que a cascata de ativação do NF-κB pode fazer parte de seu mecanismo de ação.

Com os resultados obtidos nestes parâmetros analisados, validamos o modelo experimental em estudo e iniciou-se o estudo para a avaliação da

expressão de alguns genes neste modelo experimental. Foram selecionados para este estudo a HSP70 e a Heparanase, além da expressão da HPRT que fora inicialmente escolhido como um gene endógeno.

2. "Heat shock protein" 70

A HSP70 é conhecida como uma proteína do estresse e confere resistência a vários tecidos sendo sintetizada rapidamente após a exposição por apenas alguns minutos ao agente estressor. É útil na manutenção da homeostase, facilitando o reparo de áreas danificadas e fornecendo proteção contra injúrias (Kaufmann, 1990; Liu *et al.*, 2010)

Alguns estudos têm sugerido que a expressão e síntese da HSP70 são induzidas quando as células são expostas a situações como temperatura elevada, agentes químicos, infecções, inflamação e hipóxia podendo assim agir como marcadora de danos celulares (Jin *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1999; Matsuo *et al.*, 2009; Wieten *et al.*, 2010).

Diversos autores têm demonstrado que tanto em pacientes com DC quanto em pacientes com RCU a expressão desse gene está aumentada. Além disso, modelos animais de indução de colite como a administração de DSS faz com que ocorra um aumento da síntese e da expressão desse gene na mucosa colônica (Ludwig *et al.*, 1999; O Petrof *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2007).

Por outro lado sabe-se que as células intestinais epiteliais são mais resistentes ao estresse celular quando ocorre uma indução primária das "heat shock protein" corroborando a função protetora desta proteína. Esse acúmulo de HSP70 faz com que proteínas que venham a ser danificadas sejam prontamente recuperadas ou então sofram proteólise tornando o local menos propenso a danos (Ludwig *et al.*, 1999; Noonan *et al.*, 2008).

Em nossos experimentos a expressão da HSP70 se mostrou três vezes maior nos animais do grupo controle em comparação aos do grupo branco, indicando um dano significativo no local da administração do TNBS semelhante ao que ocorre em pacientes com DII. O pré-tratamento dos animais com os diferentes fármacos demonstrou que apenas a azatioprina foi capaz de aumentar a expressão desta proteína reparadora tanto em animais saudáveis como em animais colíticos. O tratamento dos animais saudáveis com sulfassalazina e prednisolona não interferiu com a expressão deste gene, no entanto, o tratamento com prednisolona impediu o aumento da expressão de HSP70 induzido pela administração de TNBS. Este efeito é similar aos produzidos pela sulfassalazina, apesar de se verificar uma tendência não significativa de aumento da expressão de HSP70 nos animais colíticos.

3. Heparanase

A Heparanase é uma endo-β-glucoronidase capaz de clivar as ligações das cadeias de heparan-sulfato em locais pré-determinados liberando fragmentos e desestabilizando o local. Tradicionalmente sua atividade foi relacionada com a invasão celular associada à angiogênese, inflamação, autoimunidade e metástase, sendo relacionada atualmente à malignidade de um número cada vez maior de tumores (Bame *et al.*, 1998; Behzad & Brenchley, 2003; McKenzie, 2007).

Acredita-se que sua ativação possa liberar diversos mediadores que estavam ligados às cadeias de heparan-sulfato. Esses mediadores podem ser fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, dessa forma afetando as funções tanto das células quanto dos tecidos (Doviner *et al.*, 2006; Ben-Zaken *et al.*, 2008).

Um estudo de Li & Vlodavskym (2009) demonstrou que em tecidos normais de cólon não havia expressão dessa enzima e nos poucos casos em que se encontrou uma expressão, esta era fraca e restrita à superfície do epitélio luminal. Quando pode se observar um aumento o mesmo estava relacionado à inflamação

colônica provavelmente devido a uma maior vascularização no local e à degradação da membrana basal subendotelial do tecido (Li & Vlodavskym, 2009). Outro estudo realizado por Waterman *et al.* (2007) demonstrou um grande aumento na expressão da heparanase em amostras provenientes de biópsias de pacientes com doença inflamatória intestinal e que a administração de um inibidor de heparanase foi eficaz no tratamento destes pacientes, sugerindo que a heparanase está intimamente relacionada a essa patologia e dessa forma deve ser considerada como um alvo para o desenvolvimento de novas terapias antiinflamatória.

No presente estudo, semelhante ao que ocorre em humanos com DII, pode-se notar um aumento da expressão da heparanase nos animais do grupo controle sugerindo que também no modelo de colite induzida por TNBS essa enzima esteja alterada. Esse aumento chegou a aproximadamente 70% nos animais controles, devido provavelmente, a clivagem da matriz das células presentes no intestino aumentando o dano encontrado no local da inflamação.

O tratamento de animais sadios com os diferentes fármacos não alterou sua expressão basal, indicando que não houve uma indução primária de sua expressão, porém quando comparamos os animais do grupo controle com os animais colíticos tratados com sulfassalazina e azatioprina notamos uma diminuição nos níveis de heparanase, dessa forma sugerindo que esses fármacos sejam pelo menos em parte, inibidores dessa enzima. No caso do tratamento com prednisolona não encontramos diferenças significativas entre os animais do grupo controle e animais colíticos tratados com esse corticóide sugerindo que seu mecanismo de ação não esteja correlacionado com a expressão desta enzima.

4. Hipoxantina Fosforribosiltransferase

Hipoxantina Fosforribosiltransferase (HPRT) é uma enzima responsável pela reciclagem de purinas, convertendo as bases livres, hipoxantina e guanina, em

nucleotídeos purínicos utilizáveis (Arnold & Kelley, 1971; Ceballos-Picot *et al.*, 2009). Essa reciclagem permite a utilização dessas bases em novas sínteses de nucleotídeos e ácido nucléico, sendo que 90% das purinas utilizadas são de origem reciclada, o que possibilita uma diminuição no gasto energético celular (Sculley *et al.*, 1992).

Pouco se sabe sobre a influência de alterações na expressão da HPRT em pessoas saudáveis, porém foi relatado que a ausência funcional da mesma leva a um quadro de retardo mental e em casos graves a uma síndrome conhecida como Síndrome de Lesch–Nyhan (Arnold *et al.*, 1991; Albertini, 2001).

Em nosso estudo, inicialmente o objetivo da avaliação da expressão da HPRT estava relacionado com a escolha de um gene endógeno para futuras comparações, porém, ao analisarmos os resultados, observamos que sua expressão estava aumentada nos animais colíticos. Desta forma a HPRT transformou-se de um simples gene endógeno em um gene com significância funcional neste modelo experimental.

Através da análise dos nossos resultados podemos notar um aumento de aproximadamente 88% na expressão da HPRT nos animais colíticos quando comparamos os animais do grupo branco. Esse resultado pode significar um aumento significativo no dano àquele sitio de inflamação. Ao administrarmos o TNBS grande quantidade de células é danificada, restando uma grande quantidade de bases purínicas livres e prontas para a "reciclagem". Walsh *et al.*,(1990) demonstrou que os níveis de mRNA de HPRT podem ser afetados pelo simples aumento dos níveis de purinas e nucleotídeos livres no intestino de ratos. Esse aumento na disponibilidade de bases no local da inflamação provavelmente levou ao aumento na expressão gênica da HPRT encontrado em nosso experimento.

A administração dos três fármacos de referência foi eficaz em reduzir a expressão desse gene, indicando um papel do mesmo no mecanismo de ação da sulfassalazina, da prednisolona e da azatioprina, uma vez que a diminuição da expressão desse gene foi acompanhada da diminuição da inflamação local.

Com base nestes resultados podemos considerar validadas as duas hipóteses levantadas, visto que foi possível verificar a participação da HSP70, heparanase e HPRT no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos, assim como determinar os efeitos de forma diferenciada da azatioprina, sulfassalazina e prednisolona sobre estes marcadores moleculares. Estes resultados indicam claramente que estes genes podem ser utilizados como marcadores do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS, similarmente ao que ocorre, especialmente para HSP70 e heparanase em humanos. Da mesma forma, estes genes se mostraram como alvos farmacológicos, indicando a importâncias dos mesmos na pesquisa e avaliação de atividade antiinflamatória intestinal de novos fármacos.

Conclusão

Com base nos objetivos propostos, nos resultados e discussões apresentadas, foi possível concluir que:

1) A HSP70, heparanase e HPRT são três importantes marcadores do processo inflamatório no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos, uma vez que se apresentam aumentados nos animais submetidos à indução do processo inflamatório quando em comparação aos animais sadios, podendo assim ser utilizados como marcadores moleculares no modelo de colite induzida por TNBS em ratos.
2) A prednisolona foi capaz de reduzir a expressão tanto da HSP70 quanto da HPRT, sugerindo que esses genes façam parte de seu mecanismo de ação antiinflamatório.
3) A sulfassalazina foi capaz de diminuir a expressão da HPRT e da Heparanase, sugerindo que a inibição desses genes possa ser em partes, responsável por sua atividade.
4) A azatioprina foi capaz de alterar de modo significativo os três genes estudados, diminuindo a expressão da HPRT e da Heparanase e pré-induzindo a expressão da HSP70, demonstrando que sua atividade sobre a inflamação intestinal possa estar relacionada a esses marcadores.

Bibliografia

Abraham, C. & Cho, J.H. Inflammatory Bowel Disease. The New *England* Journal of Medicine, Vol.361, No.21, november 19, 2009

Albertini, R.J. HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. Mutation Research, Vol.489, pp.1–16, 2001

Aldhous, M.C. *et al*. Does Nicotine Influence Cytokine Profile and Subsequent Cell Cycling/Apoptotic Responses in Inflammatory Bowel Disease? Inflammatory Bowel Disease. Vol.14, No.11, 2008

Alex, P. *et al.* Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-induced Colitis. Inflammatory Bowel Disease, Vol.15, No.3, March 2009

Anderson, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods in Enzymology, Vol.113, pp.548-555, 1985.

Ardizzone, S. & Porro G.B. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. Journal of Internal Medicine; Vol.252, pp.475–496, 2002

Arnold, W.J. & Kelley, W.N. Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Purification and Subunit Structure. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 246, No. 23, pp. 7398-7404, 1971

Arseneau, K.O. *et al*. Innate and Adaptive Immune Responses Related to IBD Pathogenesis. Current Gastroenterology Reports, Vol.9, pp.508–512, 2007

Arya, R. *et al*. Heat shock genes – integrating cell survival and death. Journal of Biosciences. Vol.32, No.3, pp.595–610, April 2007

Badr, C. *et al.* Real-time monitoring of NF-kappaB activity in cultured cells and in animal models. Molecular Imaging. Vol.8, No.5, pp.278–290, 2009

Bakkar, N. & Guttridge, D.C. NF-κB Signaling: A Tale of Two Pathways in Skeletal Myogenesis. Physiological Review, Vol.90, pp.495–511, 2010

Bame, K.J. Heparanase: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. Glycobiology, Vol.11, No.6, pp.91R-98R. 1998

Barash, U. Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. FEBS Journal. Vol.277, pp.3890–3903, 2010

Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. Lancet, Vol.369, pp.1641–57, 2007

Behzad, F. & Brenchley, P.E.C. A multiwall format assay for heparanase. Analytical Biochemistry 320 (2003) 207–213

Bell CJ, *et al*. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. American Journal of Physiology. Vol.268, pp.G622-G630, 1995

Ben-Zaken, O. *et al.* Low and high affinity receptors mediate cellular uptake of heparanase. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol.40, No.3, pp.530–542. 2008

Bernstein, C.N. *et al.* World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. Inflammatory Bowel Disease. Vol.16, No.1, January 2010.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. The Journal of Biological Chemistry. Vol.164, pp.321-329, 1946.

Blumberg, R.S. *et al.* Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. Current Opinion in Immunology, Vol.11, pp.648–656, 1999

Bonizzi G. & Karin M. The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends in Immunology, Vol.25, pp.280-288, 2004.

Bouma G & Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nature Review Immunology, Vol.3, No.7. pp.521-533, 2003

Boyko, E.J. *et al.* Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. American Journal of Gastroenterology, Vol.84, No.5, pp.530-534. 1989

Brandi, M.T. *et al.* Psychological distress in Brazilian Cohn's disease patients: Screening, prevalence, and risk factors. Medical Science Monitor, Vol.15, No.8, pp.101-108. 2009

Burress, G.C. Effects of Mesalamine on the hsp72 Stress Response in Rat IEC-18 Intestinal Epithelial Cells. Gastroenterology. Vol.113, pp.1474–1479, 1997

Carbonnel, F.; *et al.* Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. Gastroentérologie Clinique et Biologique, Vol.33, Suppl.3, pp.S145—S157, 2009

Carter *et al.* Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. Gut, Vol.53: pp.v1-v16, 2004

Cavanaugh, J.A. & Pavli, P. Ulcerative colitis: a genetic disease? Baillière's Clinical Gastroenterology, Vol.11, No.1, March 1997

Ceballos-Picot, I. *et al.* Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. Human Molecular Genetics, Vol. 18, No.13, pp.2317–2327, 2009

Chichlowski, M. & Hale, L.P. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease — an alliance gone bad. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, Vol.295, pp.G1139–G1149, 2008.

Collins, S.M. & Croitoru, K. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: effect of inflammation on intestinal function. In: Targan SR, Shanahan F (eds) Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 194-209. 1994

Cope, G.F. & Heatley, R.V. Cigarette smoking and intestinal defenses. Gut, Vol.33, pp.721-723, 1992

Cornish, J.A. *et al.* The Risk of Oral Contraceptives in the Etiology of Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. The American Journal of Gastroenterology, Vol.103, pp.2394–2400, 2008

Cuffari, C. *et al.* 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. Gut, Vol.39, pp.401-406, 1996

Cuffari, C. *et al.* Utilization of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimize azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. Gut, Vol.48, pp.642-646, 2001

Danese, S. & Fiocchi, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. World Journal of Gastroenterology, Vol.12, No.30, pp.4807-4812, 2006

Danese, S. *et al.* Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. Autoimmunity Reviews. Vol.3, pp.394– 400, 2004

Declercq, C. *et al.* Mapping of Inflammatory Bowel Disease in Northern France: Spatial Variations and Relation to Affluence. Inflammatory Bowel Disease, DOI 10.1002/ibd.21111, 2009

Deleve, L.D. & Kaplowitz, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. Pharmacology & Therapeutics, Vol.52, No.3, pp.287-305, 1991

Dempsey, L.A. *et al.* Heparanase, a potential regulator of cell–matrix interactions. TIBS Vol.25 – AUGUST 2000.

Derijks, L.J.J. *et al.* Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. Alimentary Pharmacological Therapy, Vol.24, pp.715–729. 2006

Doviner, V. *et al.* Spatial and temporal heparanase expression in colon mucosa throughout the adenoma-carcinoma sequence. Modern Pathology, Vol.19, pp.878–888, 2006

Duricova, D. *et al.* 5-Aminosalicylic acid dependency in Crohn's disease: A Danish Crohn Colitis Database study. Journal of Crohn's and Colitis, doi:10.1016/j.crohns. 2010.06.002, 2010

Edelblum, K.L. & Turner, J.R. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. Current Opinion in Pharmacology, Vol.9, pp.715–720, 2009

Fichtner-Feigl, S. *et al.* Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-κB decoy oligonucleotides. The Journal of Clinical Investigation, Vol.115, No.11, November 2005

Fiocchi, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. Gastroenterology, Vol.115, pp.182–205, 1998

Fiorucci, S. *et al.* A β-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. PNAS, vol.101, no. 44, 2004

Freeman, C. & Parish, C.R. Human platelet heparanase: purification, characterization, and catalytic activity. Biochemical Journal, Vol.330, pp.1341–1350, 1998

Fries, W.; *et al.* Intestinal Permeability and Genetic Determinants in Patients, First-Degree Relatives, and Controls in a High-Incidence Area of Crohn's Disease in Southern Italy. American Journal of Gastroenterology, doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00325.x, 2005

Gilbert, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. Advances in Enzymology & *Related Areas* of Molecular *Biology.* Vol.63, pp.69-172, 1990

Gitnick, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. Scandinavian Journal of Gastroenterology, Vol.31, Suppl.220, pp.83-86, 1996.

González, R. *et al*. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *International Journal* for *Vitamin* and *Nutrition* Research, Vol.71, No.4, pp.243-50, 2001

Greten, F.R. *et al.* IKKβ Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. Cell, Vol.118, pp.285–296, 2004

Groschwitz, K.R. & Hogan, S.P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038, 2009

Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. Haemostasis, Vol.23, No.1, pp.118-26, 1993

Heliö, T. *et al.* CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. Gut, Vol.52, pp.558–562, 2003

Henckaerts, L. & Vermeire,S. NOD2/CARD15 Disease Associations Other Than Crohn's Disease. Inflammatory Bowel Disease, Vol.13, No.2, February 2007

Hisamatsu, T. *et al.* Psychological aspects of inflammatory bowel disease. Journal of Gastroenterology, Vol.42, Suppl. XVII, pp.34–40, 2007

Hoffmann, J.C. *et al.* Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after γδT cell depletion and no effect of αβT cell depletion. Gut, Vol.48, pp.489–495, 2001

Hollenbach, E. *et al.* Inhibition of p38 MAP kinase - and RICK/NF-κB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. The FASEB Journal express article 10.1096/fj.04-1642fje. Published online August 2, 2004

Hu, S. *et al.* Inflammation-induced, 3-UTR-dependent translational inhibition of Hsp70 mRNA impairs intestinal homeostasis. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, Vol.296, pp.G1003–G1011, 2009.

Hyun, J.G. & Mayer, L. Mechanisms underlying inflammatory bowel disease. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms | Gastrointestinal disorders, Vol.3, No.4, 2006

Ince, M.N. & Elliott, D.E. Immunologic and Molecular Mechanisms in Inflammatory Bowel Disease. Surgical Clinics of North America, Vol.87, pp.681–696, 2007

Ishihara, S. *et al.* Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. Journal of Gastroenterology, Vol.44, pp.1097–1108, 2009

Jani, N. *et al.* Medical therapy for ulcerative colitis. Gastroenterology Clinics of North America, vol.31, pp.147–166, 2002

Jin, M. *et al.* Effect of pre-induction of heat shock proteins on indomethacin-induced small-intestinal lesion in rats. Journal of Gastroenterology, Vol.32, pp.34-39, 1997

Joh, E. *et al.* Lancemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF-κB activation in TNBS-induced colitis mice. International Journal of Colorectal Diseases, Vol.25, pp.545–551, 2010

Jurjus, A.R. *et al.* Animal models of inflammatory bowel disease. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol.50, pp.81– 92, 2004

Karban, A. & Eliakim, R. Effect of smoking on inflammatory bowel disease: Is it disease or organ specific? World Journal of Gastroenterology. Vol.13, No.15, pp.2150-2152, 2007

Karin M. Mitogen activated protein kinases as targets for development of novel anti-inflammatory drugs. Annals of Rheumatic Diseases, Vol.63, Suppl. II, pp.ii62–ii64, 2004.

Karin M. Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. Proceedings of the American Thoracic Society, Vol.2, pp.386-390, 2005.

Karlsson, A. *et al.* Neutrophil Alkaline Phosphatase Activity Increase in Bacterial Infections Is Not Associated with a General Increase in Secretory Vesicle Membrane Components. Infection and Immunity, Vol.63, No.3, p.911–916, 1995

Kaufmann, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. Immunology Today, Vol.11, pp.129-136, 1990

Kim, H. & Berstad, A. Experimental Colitis in Animal Models. Scandinavian Journal of Gastroenterology, Vol.27, pp.529-537. 1992

Krawisz, J.E., *et al*. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. Gastroenterology, Vol.87, pp.1344-1350, 1984.

Lakatos, P.L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? World Journal of Gastroenterology, Vol.12, No.38, pp.6102-6108, 2006

Li, J. & Vlodavsky, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. doi:10.1160/TH09-02-0091, 2009

Liu, X. *et al.* Swimming exercise effects on the expression of HSP70 and iNOS in hippocampus and prefrontal cortex in combined stress. Neuroscience Letters, Vol.476, pp.99–103, 2010

Ludwig, D. *et al.* Enhanced Intestinal Expression of Heat Shock Protein 70 in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. Digestive Diseases and Sciences, Vol.44, No.7, pp.1440-1447, 1999

Madsen, K. *et al.* Probiotic Bacteria Enhance Murine and Human Intestinal Epithelial Barrier Function. Gastroenterology, Vol.121, pp.580–591, 2001

Martini, G.A. & Brandes, J.W. Increased Consumption of Refined Carbohydrates in Patients with Crohn's Disease. Journal of Molecular Medicine, Vol.54, pp.367-371, 1976

Marx, J. How the glucocorticoids suppress the immunity. Science, Vol.270, No.13, 1995

Matsuo, K. *et al.* Acute stress-induced colonic tissue HSP70 expression requires commensal bacterial components and intrinsic glucocorticoid. Brain, Behavior, and Immunity, Vol.23, pp.108–115, 2009

Mawdsley, J.E. & Rampton, D.S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. Gut, Vol.54, pp.1481-1491, 2005

Mayer, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. Journal of Gastroenterology, Vol.45, pp.9–16, 2010

McCall TB, *et al.* Therapeutic potential of fish oil in the treatment of ulcerative colitis. Alimentary Pharmacological Therapy. Vol.3 No.5, pp.415-24, 1989

McKenzie, E.A. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. British Journal of Pharmacology, Vol.151, pp.1–14, 2007

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

Morrison, G. *et al.* Update in inflammatory bowel disease. Australian Family Physician, Vol.38, No.12, December 2009

Mowat, A.M. Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens. Nature Reviews: Immunology, Vol.3, 2003

Musch, M.W. *et al.* Induction of heat shock protein 70 protects intestinal epithelial IEC-18 cells from oxidant and thermal injury. American Journal of Physiology, Vol.270, pp. C429-C436, 1996.

Nadir, W. *et al.* Heparanase induces tissue factor expression in vascular endothelial and cancer cells. Journal of Thrombosis and Haemostasis, Vol.4, pp.2443–2451, 2006

Naomoto, Y. *et al.* Heparanase promotes angiogenesis through Cox-2 and HIF1α. Medical Hypotheses, Vol.68, pp.162–165, 2007

Nasser, N.J. *et al.* Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.354, pp.33–38, 2007

Navarro, F. & Hanauer, S.B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. The American Journal of Gastroenterology, Vol.98, No.12, 2003

Niinistö, K.E. *et al.* Plasma levels of heat shock protein 72 (HSP72) and b-endorphin as indicators of stress, pain and prognosis in horses with colic. The Veterinary Journal, Vol.184, pp.100–104, 2010

Noonan, E. *et al.* Hsp70B' and Hsp72 form a complex in stressed human colon cells and each contributes to cytoprotection. Experimental Cell Research, Vol.314, pp.2468 – 2476, 2008

O'Petrof, E. *et al.* Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. Chinese Journal of Digestive Diseases, Vol.5, pp.45–50, 2004

Ohkawara, T. *et al.* Resistance to experimental colitis depends on cytoprotective heat shock proteins in macrophage migration inhibitory factor null mice. Immunology Letters, Vol.107, pp.148–154, 2006

Otaka, M. *et al.* Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.348, pp.1–5, 2006

Ott, S.J., *et al.* Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. Gut, Vol.53, pp.685-693, 2004

Papadakis, K.A. & Targan, S.R. Current Theories on the Causes of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology Clinics of North America, Vol.28, No.2, June 1999

Papadakis, K.A. & Targan, S.R. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Annual Review of Medicine, Vol.51, pp.289–298, 2000

Peltekova , V.D. *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nature Genetics, Vol.36, No.5, 2004

Pfaffl, M. W. A New mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Research, Vol.29, No.9, 2001

Plevy, S. The immunology of inflammatory bowel disease. Gastroenterology Clinics of North America, Vol.31, pp.77–92, 2002

Pratt, W. B. The Role of Heat Shock Proteins in Regulating the Function, Folding, and Trafficking of the Glucocorticoid Receptor. The Journal of Biological Chemistry, Vol.268 No.29, pp.21455-21458, 1993

Ramakers, C., *et al*. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neuroscience Letters, Vol.339, No.1, pp.62-66, 2003

Rogler, G. *et al.* Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Vol.24, pp.157–165, 2010

Ryan, B.M. *et al.* Aminosalicylates and Colorectal Cancer in IBD: A Not-So Bitter Pill to Swallow. The American Journal of Gastroenterology, Vol.98, No.8, 2003

Sánchez de Medina, F. *et al.* Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. Biochemical Pharmacology, Vol.68, pp.2317–2326, 2004

Sanchez de Medina, F. *et al.* Effect of Quercitrin on Acute and Chronic Experimental Colitis in the Rat. The journal of pharmacological and experimental therapeutics. Vol.278, No.2, 1996

Sánchez-Fidalgo, S. *et al.* PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. European Journal of Pharmacology, Vol.563, Iss.1-3, pp.216-223, 2007

Sanchez-Muñoz, F. *et al.* Role of cytokines in inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology, Vol.14, No.27, pp.4280-4288, 2008

Sandle, G.I. *et al.* Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. Gut, Vol.27, pp.309-316, 1986

Sartor, R.B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology, Vol.134, pp.577–594, 2008

Scaldaferri, F. & Fiocchi. C. Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. Journal of Digestive Diseases, Vol.8, pp.171–178, 2009

Sculley, D.N. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. Human Genetics, Vol.90, pp.195-207, 1992

Secondulfo, M.; *et al.* Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relatives. Digestive and Liver disease. Vol.33, pp.680-685, 2001

Senftleben, U. *et al*. Activation by IKKa of a second, evolutionary conserved, NF-κB signaling pathway. Science, Vol.293, pp.1495-1499, 2001.

Shan, X.Q. *et al*. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. Pharmacology & Therapeutics, Vol.47, No.1, pp.61-71, 1990

Singh, V.P., *et al*. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. Prostaglandins & Other Lipid Mediators Vol.71, pp.163-175, 2003.

Smith, *et al*. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. Clinica Chimica Acta, Vol. 142, No.2, pp.221-230, 1984

Snoeck, V. *et al.* The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. Microbes and Infection, Vol.7, pp.997–1004, 2005

Souza, M.H.L.P., *et al.* Evolução Da Ocorrência (1980-1999) Da Doença De Crohn E Da Retocolite Ulcerativa Idiopática E Análise Das Suas Características Clínicas Em Um Hospital Universitário Do Sudeste Do Brasil. Arquivos de Gastroenterologia. Vol.39, No.2, 2002.

Stout, J.T. & Caskey, C.T. HPRT: Gene Structure, Expression, and Mutation. Annual Review of Genetics, Vol.19, pp.127-48, 1985

Strober, W. *et al*. Insights into the Mechanism of Oral Tolerance Derived from the Study of Models of Mucosal Inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.1029, pp.115–131, 2004.

Strober, W. *et al*. The Immunology of Mucosal Models of Inflammation. Annual Review of Immunology, Vol.20, pp.495–549, 2002

Strober, W. *et al.* The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. Annals of Internal Medicine , Vol.128, No.10, 1998

Šventoraitytė, J. *et al.* Immune system alterations in patients with inflammatory bowel disease during remission. Medicina (Kaunas), Vol.44, No.1, 2008

Tanaka, K. *et al.* Genetic Evidence for a Protective Role for Heat Shock Factor 1 and Heat Shock Protein 70 against Colitis. The Journal of Biological Chemistry, Vol.282, No.32, pp.23240–23252, 2007

Targan S.R. & Shanahan F. Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. Retford D.C., editor. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.

Thukkani, N., *et al.* Epidemiologic Characteristics of Patients with Inflammatory Bowel Disease Undergoing Colonoscopy. Inflammatory Bowel Disease, DOI 10.1002/ibd.21513, 2010

Velde, A. *et al.* Critical Appraisal of the Current Practice in Murine TNBS-induced Colitis. Inflammatory Bowel Disease, Vol.12, No.10, 2006

Victoria, C.R. *et al.* Incidence and Prevalence Rates of Inflammatory Bowel Diseases, In Midwestern of São Paulo State, Brazil. Arquivos em Gastroenterologia, Vol.46, No.1, 2009.

Vind,I *et al.* Genetic and environmental factors as predictors of disease severity and extent at time of diagnosis in an inception cohort of inflammatory bowel disease, Copenhagen County and City 2003–2005. Journal of Crohn's and Colitis, Vol.2, pp.162–169, 2008

Wahl, C. *et al.* Sulfasalazine: a Potent and Specific Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B. The Journal of Clinical Investigation, Vol.101, No.5, pp.1163–1174, 1998

Wakefield AJ, *et al.* Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. Lancet, Vol.2, No.8671, pp.1057-1062, 1989

Waller, S. *et al.* Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. Gut, Vol.55, pp.809–814, 2006

Walsh, M.J. *et al.* A Regulatory Element Is Characterized by Purine-Mediated and Cell-Type-Specific Gene Transcription. Molecular and Cellular Biology, Vol.10, No.8, p.4356-4364, 1990

Wang, W. & Ballatori, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. Pharmacological Reviews, Vol.50, No.3, 1998

Waterman, M. *et al.* Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. Modern Pathology, Vol.20, pp.8–14, 2007

Weber, C.K. *et al.* Suppression of NF-κB Activity by Sulfasalazine Is Mediated by Direct Inhibition of IκB Kinases α and β. Gastroenterology, Vol.119, pp.1209–1218, 2000

Whittle, B.J.R. & Varga, C. New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosalicylates: the role of heme oxygenase. Pharmacological Reports, Vol.62, pp.548-556, 2010

Wieten, L., *et al.* Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: A role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators? FEBS Letters, Vol.581, pp.3716–3722, 2007

Wieten, L. *et al.* A Novel Heat-Shock Protein Coinducer Boosts Stress Protein Hsp70 to Activate T Cell Regulation of Inflammation in Autoimmune Arthritis. Arthritis & Rheumatism, Vol.62, No.4, pp.1026–1035, 2010

Winterbourn, C.C. & Brennan, S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. Biochemical Journal, Vol.15, No.326, pp.87-92, 1997

Wirtz, S. & Neurath, M.F. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. International Journal of Colorectal Disease, Vol.15, pp.144–160, 2000

Wullaert, A. Role of NF-kB activation in intestinal immune homeostasis. International Journal of Medical Microbiology, Vol.300, pp.49–56, 2010

Yamamoto, T. *et al.* Review article: diet and inflammatory bowel disease-epidemiology and treatment. Alimentary Pharmacological Therapy, Vol.30, pp.99–112, 2009

Yamamoto-Furusho, J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology, Vol.13, No.13, pp.1893-1896, 2007

Zhang, Y. *et al.* Focus on Molecules: Heparanase. Experimental Eye Research, Vol.91, pp.476-477, 2010

Zhao, W. *et al.* Amelioration of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis by sulfasalazine salicylazosulfapyridine via reducing NF-kappaB transcription factor p65 recruitment to ICAM-1 gene promoters. Yakugaku Zasshi, Vol.130, No.9, pp.1239-1249, 2010