

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/02/2019.

EVOLUÇÃO DOS PERFIS ELÉTRICOS E MECÂNICOS DA MOTILIDADE COLÔNICA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional.

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2017**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EVOLUÇÃO DOS PERFIS ELÉTRICOS E MECÂNICOS DA
MOTILIDADE COLÔNICA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL

MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI

JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional.

José Ricardo de Arruda Miranda

BOTUCATU – SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Calabresi, Marcos Felipe de Freitas.

Evolução dos perfis elétricos e mecânicos da motilidade colônica em modelo animal de doença inflamatória intestinal / Marcos Felipe de Freitas Calabresi. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda
Capes: 20903006

1. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 2. Intestinos - Inflamação. 3. Sistema gastrointestinal. 4. Cólon (Anatomia) - Motilidade.

Palavras-chave: Biosusceptometria de Corrente Alternada; Contratilidade colônica; Doença inflamatória intestinal; Motilidade colônica; TNBS.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 20 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 08:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA - Orientador(a) do(a) Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. FERNANDO GOMES ROMEIRO do(a) Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. ARMÊNIO DOS SANTOS AGUIAR do(a) Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Faculdade de Medicina - UFC, Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI do(a) Departamento de Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. JOEL MESA HORMAZA do(a) Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI, intitulada **Evolução dos perfis elétricos e mecânicos da motilidade colônica em modelo animal de doença inflamatória intestinal**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

José Ricardo de Arruda Miranda

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Fernando Gomes Romeiro

Prof. Dr. FERNANDO GOMES ROMEIRO

Armênio dos Santos Aguiar

Prof. Dr. ARMÊNIO DOS SANTOS AGUIAR

Luiz Claudio di Stasi

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Joel Mesa Hormaza

Prof. Dr. JOEL MESA HORMAZA

Agradecimentos

À minha noiva Emília, pela inspiração de todos os dias. Sua atenciosa correção, força, paciência, cumplicidade e amor foram fundamentais para o sucesso nessa jornada.

À minha mãe, Deucelia, que sempre apoiou minhas escolhas, me mostrou o mundo e ensinou a vivê-lo. Por todo carinho, dedicação, incentivo, paciência, confiança e amor.

Aos meus irmãos, Henrique e Flávia, meus eternos exemplos de vida, idoneidade, cumplicidade e amizade.

Aos meus amigos-irmãos, novos e velhos, distantes ou não vocês sempre serão parte dos alicerces de tudo o que foi e será construído.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biomagnetismo e do Laboratório de Física Aplicada ao Radiodiagnóstico pelo ótimo ambiente de trabalho, convivência, conselhos e cafés.

Ao Prof. José Ricardo, pela orientação, dedicação, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Luiz Claudio Di Stasi e ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia pela parceria e apoio na concepção e desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Física e Biofísica e aos professores, pela infraestrutura e pela formação, sem as quais este trabalho não teria sido escrito.

À FAPESP, pelo financiamento deste projeto (Processo nº 2013/09095-4).

Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença idiopática do trato gastrointestinal que acomete grande parcela da população mundial e tem seus sintomas relacionados com alterações na motilidade do cólon. No entanto, a evolução dessas alterações não é completamente compreendida, e pode estar relacionada com sintomas que aparecem em fases quando a doença é aparentemente controlada. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação a longo prazo dos aspectos mecânicos e elétricos da contratilidade colônica durante o modelo de modelo de inflamação induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos.

Este trabalho aplicou uma metodologia eficiente e de baixa invasividade associando informações mecânicas, elétricas, químicas e histológicas. A contratilidade e parâmetros inflamatórios foram adquiridos no mesmo animal em seis momentos diferentes: antes da indução de TNBS (controle) e 2, 5, 8, 11 e 14 dias depois. As atividades mecânicas foram adquiridas pela Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) e subdivididas em Ondulações de Propagação Rítmica (RPR) e no Complexo Motor Propulsivo Rítmico (RPMC). Registramos a atividade elétrica por eletromiografia (EMG) e avaliamos os processos de inflamação determinando a atividade da mieloperoxidase (MPO) nas fezes. Adicionalmente, comparamos a espessura de camadas de cólon ao longo da inflamação por meio de análises histopatológicas.

Nossos resultados mostraram alterações transitórias nos níveis de atividade da MPO e na frequência de contração de RPMC, enquanto RPR e atividade elétrica sofreram alterações permanentes. Além disso, a associação desses resultados com a análise da espessura da camada tecidual revelou a possível influência da fibrose e a profundidade de lesão nos diferentes tipos de Células Intersticiais de Cajal (ICCs).

A análise geral dos resultados mostrou uma clara relação entre os diferentes perfis das alterações contráteis, graus de inflamação intestinal, morfologia dos danos teciduais e sintomas clássicos das DIIs. A abordagem aqui desenvolvida, abre horizontes para que novos trabalhos explorem a interdependência entre diferentes tipos de modelo inflamatório, aplicação de drogas e suas consequências motoras.

Palavras-chave: motilidade colônica, doença inflamatória intestinal, TNBS, contratilidade colônica, biosusceptometria de corrente alternada.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is an idiopathic gastrointestinal tract disease that affects a large part of the world population and has its symptoms related to changes in colon motility. However, the evolution of these changes is not completely understood, and may be related to symptoms that appear in stages when the disease is apparently controlled. The objective of this work was to perform a long-term evaluation of the mechanical and electrical aspects of colonic contractility during the model of inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats.

This work applied an efficient and low invasive methodology associating mechanical, electrical, chemical and histological information. The contractility and inflammatory parameters were acquired in the same animal at six different times: before induction of TNBS (control) and at 2, 5, 8, 11 and 14 days thereafter. The mechanical activities were acquired by Alternating Current Biosusceptometry (ACB) and subdivided in Rhythmic Propagation Ripples (RPR) and Rhythmic Propulsive Motor Complex (RPMC). We recorded the electrical activity by electromyography (EMG) and evaluated the inflammation processes determining the myeloperoxidase activity (MPO) in the feces. Additionally, we compared the thickness of colon layers throughout the inflammation by histopathological analyzes.

Our results showed transient changes in MPO activity levels and frequency of RPMC contraction, while RPR and electrical activity underwent permanent changes. In addition, the association of these results with tissue layer thickness revealed the possible influence of fibrosis and depth of lesion on the different types of Cajal Interstitial Cells (ICCs).

The general analysis of the results showed a clear relationship between the different profiles of the contractile alterations, degrees of intestinal inflammation, tissue damage morphology and classic IBD symptoms. The approach developed here opens new horizons for new work exploring the interdependence between different types of inflammatory model, drug application and its motor consequences.

Key words: colonic motility, inflammatory bowel disease, TNBS, colonic contractility, alternating current biosusceptometry.

Lista de Abreviaturas

BAC – Biosusceptometria de Corrente Alternada

CMMC – Complexo Motor Migratório Colônico

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

EMG – Eletromiografia

FFT – Transformada Rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*)

GMC – Contrações Migratórias Gigantes (Giant Migration Contractions)

Hz – Hertz (ciclos por segundo)

ICC – Células Intersticiais de Cajal (*Interstitial Cells of Cajal*)

ICC-MI – Células Intersticiais de Cajal Intra Musculares

ICC-MY – Células Intersticiais de Cajal associadas ao Plexo Mioentérico

ICC-SM – Células Intersticiais de Cajal associadas ao plexo Submucoso

IL – Interleucina

MPO – Mieloperoxidase

RCU – Retocolite Ulcerativa

RPMC – Complexo Motor Propulsivo Rítmico (Rhythmic Propulsive Motor Complex)

RPR – Ondulações de Propagação Rítmica (Rhythmic Propagating Ripples)

SNE – Sistema Nervoso Entérico

TGI – Trato Gastrintestinal

TNBS – Ácido Trinitro Benzenosulfônico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α (Tumor Necrosis Factor- α)

Lista de Figuras

Figura 1: Camadas e estruturas do cólon e indicação (em vermelho) da posição da ICC-SM e ICC-MY. Adaptado de http://fisiologiadadigestao.blogspot.com.br/	18
Figura 2: Configuração de um sistema BAC mono sensor.	22
Figura 3: Cronograma do experimento, no qual observa-se o dia de cada medida (M1, M2, M3, M4, M5 e M6) tendo como base o momento da indução do modelo de inflamação (dia 0).....	26
Figura 4: Posicionamento do sensor BAC para aquisição dos sinais, dos implantes cirúrgicos e da lesão no cólon do animal.....	27
Figura 5: Exemplo de sinais simulados e seus respectivos espectros de Fourier (FFT). (A) Sinal com frequência de 100 mHz. (B) Sinal com frequência de 20 mHz. (C) Soma dos sinais A e B, contendo ambas as frequências, 100 e 20 mHz.....	29
Figura 6: Exemplo de sinal de atividade mecânica colônica. As flechas vermelhas indicam os complexos motores propulsivos rítmicos (RPMC), e as chaves amarelas indicam as ondulações de propagação rítmica (RPR).	30
Figura 7: Relação entre os dias de medida e os dias de análise histopatológica. Onde: “IND”, indica o momento da indução; “M”, indica os momentos de medida; e “FM”, indica os momentos das fotomicrografias.	31
Figura 8: Massa corporal dos animais ao longo das seis medidas. A indução do processo inflamatório está demarcada pelo traço vermelho. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	33
Figura 9: Atividade de MPO medida durante o experimento. O traço vermelho mostra o momento a indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	34
Figura 10: Exemplos de sinais magnéticos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) relativos à atividade mecânica do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).	35
Figura 11: Frequência da contração mecânica RPCM ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	36
Figura 12: Frequência da contração mecânica RPR ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	36

Figura 13: Exemplos de sinais elétricos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).....	38
Figura 14: Frequências da atividade elétrica ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório * $p < 0,05$, em comparação com M1.....	39
Figura 15: Fotomicrografias do cólon de ratos em 4 situações do experimento. (A) Controle, sem indução de inflamação intestinal. (B) 2 dias após a indução da inflamação intestinal. (C) 7 dias após a indução da inflamação. (D) 14 dias após a indução da inflamação. Símbolos: * indica infiltrado de leucócitos; & indica formação de tecido conjuntivo frouxo e denso; e # indica edema.	40
Figura 16: Espessuras das camadas do cólon ao longo da duração do experimento: (A) mucosa; (B) muscular da mucosa; (C) submucosa; e (D) muscular externa. Quando houve pontos de ulceração visíveis, foram quantificadas áreas (E). * $p < 0,05$, em comparação com o Controle. Em (E), a comparação foi feita entre o 2º e o 7º dias após a indução.	41

Sumário

Introdução	9
Fundamentos Teóricos.....	14
I. Motilidade Colônica	14
II. Marcadores Inflamatórios	20
III. Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)	21
IV. Eletromiografia (EMG).....	23
Objetivos.....	24
Metodologia.....	25
I. Planejamento experimental.....	25
II. Animais	25
III. Cronograma do experimento	25
IV. Implante dos marcadores	26
V. Indução e avaliação de processo inflamatório colônico	27
VI. Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	28
VII. Medidas da motilidade colônica	28
VIII. Definição das contrações.....	30
IX. Análises histopatológicas.....	30
X. Análise Estatística.....	32
Resultados.....	33
Discussão	42
Conclusão	48
Referências	49
APÊNDICE A – Testes preliminares de motilidade colônica em ratos	56
APÊNDICE B – Artigo	63

Introdução

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação crônica do trato intestinal associada a um desequilíbrio da microbiota intestinal. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são os tipos mais conhecidos de DII e têm sido foco de atenção devido à sua incidência crescente [1]. Crônicas, recidivantes e idiopáticas, essas DIIs possuem características clínicas e patológicas sobrepostas e distintas [2, 3]. A RCU típica é a inflamação superficial limitada à mucosa do cólon, enquanto que a DC é caracterizada por lesões transmurais descontínuas que ocorrem em qualquer parte do trato gastrintestinal (TGI) [4].

Ambas se caracterizam por inflamação do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos de remissão dos sintomas, e são marcadas também por ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação [5, 6].

As DIIs acometem grande parcela da população mundial, tendo prevalência maior nos países desenvolvidos, atingindo cerca de 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 2,2 milhões na Europa [7]. No Brasil, devido às dificuldades diagnósticas e reduzido número de amostras, os dados disponíveis são restritos, mas pode-se afirmar que há uma tendência crescente no número de casos no país [8]. Segundo um recente estudo realizado na região centro-oeste do estado de São Paulo, as doenças inflamatórias intestinais apresentam baixa incidência, igualando-se aos países da América Latina e do sul da Europa, entretanto sua crescente prevalência torna necessária a abordagem desse problema através de estudos detalhados e políticas de saúde [9].

O ambiente e estilo de vida ocidentalizado, como o tabagismo, dietas ricas em gordura e açúcar, uso de medicamentos e estresse, estão ligados ao aparecimento de DII [10]. A causa precisa da doença inflamatória intestinal é desconhecida, entretanto

indivíduos geneticamente suscetíveis parecem ter uma resposta imune desregulada em relação à microbiota intestinal comensal, o que resulta em inflamação [11]. Estudos genéticos indicam variações, específicas e não específicas, associadas com as DIIs. Entretanto, devido ao grande número de genes implicados e o pequeno efeito referente a cada um deles, o mapeamento genético não é indicado para avaliar o risco do desenvolvimento dessas doenças [12].

O intestino, principalmente o cólon, é o órgão que detém o maior e mais diverso número de microrganismos do corpo humano. O sistema imune do intestino é geralmente tolerante a esta carga microbiana, e uma quebra nessa tolerância é postulada como fator importante para a patogênese da doença inflamatória intestinal [13]. Alterações na composição da flora intestinal, defeitos de imunidade das mucosas, ou os dois fatores combinados podem levar a DII. No entanto, as evidências que fundamentam essa afirmação ainda são escassas [12].

Pacientes com DII apresentam diarreia, tenesmo, ou urgência em defecar. A patogênese desses sintomas ainda não é completamente compreendida. Discrepâncias entre os sintomas e o grau de inflamação, acessado via endoscopia, sugerem que os sintomas podem, em parte, serem atribuídos a outros mecanismos, como perturbações motoras ou sensoriais [14]. De fato, Collins (1996) descreveu que a inflamação da mucosa altera as funções dos nervos e músculos em modelos animais de RCU [15]. A DII tem sido associada com um aumento de tonicidade e redução da complacência colônica. Alterações na distribuição, absorção, armazenamento ou eliminação do conteúdo do cólon e nos padrões contrácteis do músculo liso podem ser manifestadas clinicamente como sinais de perturbações intestinais, dor abdominal, ou ambos [16, 17].

A diarreia na DII ocorre principalmente devido à liberação de fluidos e muco, sangramento e absorção debilitada, entretanto, motilidade e trânsito alterados também

devem ser considerados. Connel *et al.* (1962) foram os primeiros a propor que o cólon, em estado avançado de retocolite ulcerativa, pode se comportar como um tubo semirrígido, além disso, é bem reconhecido clinicamente que as contrações segmentares são ausentes na fase tardia da doença [18, 19].

Existe uma relação bastante complexa e não bem elucidada entre distúrbios funcionais da motilidade gastrointestinal e DII [20]. Entre esses distúrbios funcionais temos entre outros: refluxo gastroesofágico; gastroparesia; dispepsia funcional; síndrome do intestino irritável; doença celíaca; e doenças anorretais [21].

Vários modelos animais já foram utilizados para investigar a patogênese das DIIs, sendo um dos principais o modelo de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) [22, 23]. Normalmente, no modelo de TNBS, a lesão da mucosa e a infiltração de células inflamatórias são observados dentro de 2 horas após a exposição ao TNBS, enquanto que as características de inflamação crônica e infiltração celular linfocítica ocorrem 48 h após a exposição e persistem ao longo de várias semanas [24]. As alterações nas propriedades neurofisiológicas de neurônios mioentéricos persistem após controle da inflamação e provavelmente contribuem para a dismotilidade [25].

A atividade motora do cólon é frequentemente anormal em pacientes com DII, mesmo quando o processo inflamatório é leve ou moderado. Em geral, os dados disponíveis mostram que a doença ativa causa trânsito rápido e aumento da atividade de propulsão [26]. É crescente o número de estudos que descrevem anormalidades motoras relacionadas a DII, entretanto os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por essas anormalidades ainda permanecem obscuros devido à complexidade dos mecanismos envolvidos no controle da motilidade do intestino grosso [26].

O estudo da motilidade colônica pode ser definido como a compreensão do fluxo do conteúdo intraluminal, os movimentos da parede colônica que induzem esse fluxo, e

o sistema de controle que integra e regula esses processos. Em geral a função motora é muito menos estudada no cólon do que no trato gastrointestinal superior devido à ausência da dependência clara em relação ao alimento, aos complexos motores interdigestivos e a relativa inacessibilidade do órgão [18].

Registros de sinais mioelétricos do cólon humano mostram sinais elétricos que iniciam e controlam as contrações musculares. Os eletrodos podem ser inseridos diretamente na serosa do órgão ou de maneira intraluminal associado a tubos flexíveis [27]. Os registros mais seguros são os oriundos dos eletrodos fixos na serosa, pois sua localização é conhecida e próxima aos estímulos elétricos produzidos. Alterações na passagem, absorção, ou na eliminação do conteúdo do cólon e os padrões contráteis do músculo liso podem ser manifestadas clinicamente como alterações de hábito intestinal, dor abdominal, ou ambos [28]. De maneira geral, a eletromiografia é uma técnica eficiente para estudar, do ponto de vista elétrico, as contrações musculares que darão origem à motilidade colônica [29, 30].

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma eficiente técnica biomagnética para acessar e analisar diferentes parâmetros relacionados ao estudo do TGI e suas funções motoras. Desenvolvida na década de 1990 por Baffa, Miranda e colaboradores para avaliar a fisiologia do trato gastrointestinal de humanos, tem grande precisão ao avaliar o esvaziamento gástrico, trânsito orocecal e atividade de contração gástrica em humanos [31-33], cães [34] e animais de pequeno porte [35, 36].

Através do uso de marcadores acoplados às paredes dos órgãos, a BAC possibilita a investigação das propriedades mecânicas resultantes de atividade de contração de determinado órgão/tecido. Quando associada às técnicas usuais para o registro elétrico - como a Eletromiografia (EMG) – proporciona um modelo capaz de detalhar o perfil elétrico e mecânico dessas contrações, abrindo caminho para avaliações

de condições normais e alteradas, seja por doença, procedimento cirúrgico ou tratamentos farmacológicos [37, 38].

A associação dos registros elétricos e mecânicos, em experimentação animal, pode ajudar a elucidar a atividade característica do cólon e evidenciar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos distúrbios gastrintestinais observados na motilidade colônica durante a doença inflamatória intestinal.

Apesar de vários estudos na área, a grande maioria foi desenvolvida com cólons removidos do corpo, *in vitro*, trazendo assim informações desprovidas de situações fisiológicas reais, como controle neural, reflexos sensoriais e liberação de substâncias [39-41]. A contribuição desta pesquisa está centrada no estudo *in vivo* de alterações fisiológicas e funcionais da motilidade colônica de animais ao longo de modelo experimental de inflamação intestinal. Neste sentido, este trabalho buscou meios para fornecer maior compreensão das consequências da DII nas atividades motoras do cólon e a relação destas com os principais sintomas dessa doença.

Conclusão

Esse estudo obteve bons resultados na avaliação *in vivo* das alterações da motilidade em resposta ao modelo de DII induzido por TNBS. A investigação dessas consequências contráteis apontou para uma clara relação grau de inflamação, dano tecidual, que por sua vez teve correspondência com características da fisiopatologia da doença inflamatória intestinal.

Todos parâmetros avaliados demonstraram resultados coerentes com a literatura atual e também proporcionaram um novo ângulo para abordagens e discussões em torno de mecanismos diretamente relacionados à patogênese, sintomas e danos causados pela DII.

A principal resposta que obtivemos foram os diferentes perfis temporais da alteração contrátil das duas atividades mecânicas, RPMC (estímulo-dependente, propulsão) e RPR (*slow wave*, mistura). Respectivamente, essas alterações sugerem fortemente ligações com a diarreia (temporária no modelo) e a formação de fibrose no tecido (permanente).

O fato das medidas biomagnéticas, bioelétricas e químicas serem conduzidas em um mesmo animal, devido à eficiência da dosagem do marcador inflamatório nas fezes e às técnicas físicas não invasivas, agregou para este estudo um grande potencial metodológico.

Por fim, acreditamos que este trabalho irá contribuir para o esclarecimento de questões na área de intersecção entre motilidade e doenças inflamatórias intestinais. Ademais, este estudo permitirá o desenvolvimento de novos projetos dando continuidade ao uso dessa metodologia associada a diferentes delineamentos experimentais, como, por exemplo, outros modelos de inflamação ou a implementação de drogas.

Referências

1. de Mattos, B.R.R., et al., *Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments*. Mediators of Inflammation, 2015. **2015**: p. 493012.
2. Gearry, R.B., *IBD and Environment: Are There Differences between East and West*. Dig Dis, 2016. **34**(1-2): p. 84-9.
3. Zhai, H., et al., *Increasing rate of inflammatory bowel disease: a 12-year retrospective study in NingXia, China*. BMC Gastroenterol, 2016. **16**: p. 2.
4. Judd, T.A., et al., *Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(10): p. 1493-9.
5. Rosenstiel, P., et al., *Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease*. Semin Immunol, 2009. **21**(6): p. 334-45.
6. Singh, V.P., et al., *Effect of nimesulide on acetic acid- and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2003. **71**(3-4): p. 163-75.
7. Loftus, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
8. SOUZA, M.T., LE; RODRIGUES, CM; VIANA, CF; ONOFRE, PH; MONTEIRO, RA; PASSOS, AD; MARTINELLI, AL; MENEGHELLI, UG *Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil*. Arquivos de Gastroenterologia, 2002. **39**(2): p. 7.
9. Victoria, C.R., L.Y. Sassak, and H.R. Nunes, *Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil*. Arq Gastroenterol, 2009. **46**(1): p. 20-5.
10. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors*. Autoimmunity Reviews, 2004. **3**(5): p. 394-400.
11. Ordas, I., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2012. **380**(9853): p. 1606-19.
12. Danese, S. and C. Fiocchi, *Medical Progress Ulcerative Colitis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(18): p. 1713-1725.
13. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-1359.

14. Coulie, B., et al., *Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effects of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2001. **15**(5): p. 653-663.
15. Collins, S.M., *The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(6): p. 1683-99.
16. Hosseini, J.M., et al., *Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 1999. **11**(5): p. 347-56.
17. Wells, R.W. and M.G. Blennerhassett, *Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis*. *Pflugers Arch*, 2004. **448**(5): p. 515-24.
18. O'Brian, M.P., SF, *Colonic motility in health and disease*. *Gastrointestinal Motility in Clinical Practice*, 1996. **25**(1): p. p147-163.
19. Connell, A.M., *The motility of the pelvic colon. II. Paradoxical motility in diarrhoea and constipation*. *Gut*, 1962. **3**: p. 342-8.
20. Bassotti, G., et al., *Gastrointestinal motility disorders in inflammatory bowel diseases*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(1): p. 37-44.
21. Abdalla, S.M., G. Kalra, and B. Moshiree, *Motility Evaluation in the Patient with Inflammatory Bowel Disease*. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2016. **26**(4): p. 719-38.
22. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(4): p. 1344-67.
23. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
24. Kiyosue, M., et al., *Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis*. *Neurogastroenterol Motil*, 2006. **18**(11): p. 1019-30.
25. Lomax, A.E., et al., *Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **292**(2): p. G482-91.
26. Bassotti, G., et al., *Colonic motility in ulcerative colitis*. *United European Gastroenterol J*, 2014. **2**(6): p. 457-62.
27. Latour, A., L. Bueno, and J. Fioramonti, *Quantitative measurement of human colonic electrical activity by a micro-computerized system*. *International Journal of Bio-Medical Computing*, 1983. **14**(1): p. 7-16.
28. Bueno, L., et al., *Colonic Myoelectrical Activity in Diarrhea and Constipation*. *Hepato-Gastroenterology*, 1980. **27**(5): p. 381-389.

29. Raez, M.B.I., M.S. Hussain, and F. Mohd-Yasin, *Techniques of EMG signal analysis: detection, processing, classification and applications*. Biological Procedures Online, 2006. **8**: p. 11-35.
30. Nozu, T., et al., *Water avoidance stress induces visceral hyposensitivity through peripheral corticotropin releasing factor receptor type 2 and central dopamine D2 receptor in rats*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(4): p. 522-31.
31. Miranda, J.R., et al., *An AC biosusceptometer to study gastric emptying*. Med Phys, 1992. **19**(2): p. 445-8.
32. Baffa, O., et al., *Analysis and development of AC biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements*. Med Biol Eng Comput, 1995. **33**(3): p. 353-7.
33. Miranda, J.R., et al., *A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions*. Phys Med Biol, 1997. **42**(9): p. 1791-9.
34. Moraes, R., et al., *Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry*. Physiol Meas, 2003. **24**(2): p. 337-45.
35. Quini, C.C., et al., *Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats*. J Biol Eng, 2012. **6**(1): p. 6.
36. Americo, M.F., et al., *Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(12): p. 1340-4, e374.
37. Calabresi, M.F., et al., *Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study*. Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(11): p. 1613-20.
38. Americo, M.F., et al., *Electrical and mechanical effects of hyoscine butylbromide on the human stomach: a non-invasive approach*. Physiol Meas, 2009. **30**(4): p. 363-70.
39. Bossone, C., et al., *Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G949-57.
40. Jamontt, J.M., et al., *The effects of Delta-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(3): p. 712-23.
41. Krauter, E.M., et al., *Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(12): p. 990-1000.
42. Huizinga, J.D., et al., *Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 93.

43. Johnson, L.R., *Gastrointestinal Physiology*. 8^a ed. Mosby's Physiology Monograph, ed. Elsevier. 2014, Philadelphia.
44. Chen, J.H., et al., *Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60474.
45. Tonini, M., et al., *Dissociation of the ascending excitatory reflex from peristalsis in the guinea-pig small intestine*. Neuroscience, 1996. **73**(1): p. 287-97.
46. Roberts, R.R., et al., *Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(3): p. G930-8.
47. Dinning, P.G., et al., *Neurogenic and myogenic motor patterns of rabbit proximal, mid, and distal colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(1): p. G83-92.
48. Fida, R., et al., *Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon*. Neurogastroenterol Motil, 1997. **9**(2): p. 99-107.
49. Li, M., et al., *Cholinergic and nitrergic regulation of in vivo giant migrating contractions in rat colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G544-52.
50. Lentle, R.G., et al., *High-definition spatiotemporal mapping of contractile activity in the isolated proximal colon of the rabbit*. J Comp Physiol B, 2008. **178**(3): p. 257-68.
51. Sarna, S.K., *Physiology and pathophysiology of colonic motor activity* (2). Dig Dis Sci, 1991. **36**(7): p. 998-1018.
52. Morita, H., et al., *Effects of denervation at ileocecal junction and ileocecal resection in dogs*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(1): p. 86-93, e14.
53. Heredia, D.J., et al., *Localized release of serotonin (5-hydroxytryptamine) by a fecal pellet regulates migrating motor complexes in murine colon*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1328-38.
54. Copel, C., et al., *The Nav1.9 channel regulates colonic motility in mice*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 58.
55. Spencer, N.J., *Characteristics of colonic migrating motor complexes in neuronal NOS (nNOS) knockout mice*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 184.
56. Smith, T.K., J.B. Reed, and K.M. Sanders, *Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon*. Am J Physiol, 1987. **252**(2 Pt 1): p. C215-24.
57. Barajas-Lopez, C. and J.D. Huizinga, *Different mechanisms of contraction generation in circular muscle of canine colon*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 1): p. G570-80.

58. Chow, E. and J.D. Huizinga, *Myogenic electrical control activity in longitudinal muscle of human and dog colon*. J Physiol, 1987. **392**: p. 21-34.
59. Fioramonti, J., et al., *Colonic myoelectrical activity and propulsion in the dog*. Dig Dis Sci, 1980. **25**(9): p. 641-6.
60. Pluja, L., et al., *Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G255-66.
61. Gil, V., et al., *Effects of hydrogen sulphide on motility patterns in the rat colon*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(1): p. 34-50.
62. Karaus, M. and S.K. Sarna, *Giant migrating contractions during defecation in the dog colon*. Gastroenterology, 1987. **92**(4): p. 925-33.
63. Gonzalez, A. and S.K. Sarna, *Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G546-54.
64. Spencer, N.J. and T.K. Smith, *Simultaneous intracellular recordings from longitudinal and circular muscle during the peristaltic reflex in guinea-pig distal colon*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 3): p. 787-99.
65. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 521-33.
66. Panossian, A., G. Wikman, and H. Wagner, *Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action*. Phytomedicine, 1999. **6**(4): p. 287-300.
67. Masoodi, I., et al., *Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review*. GMS German Medical Science, 2011. **9**: p. Doc03.
68. van der Veen, B.S., M.P. de Winther, and P. Heeringa, *Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2899-937.
69. Masoodi, I., et al., *Evaluation of fecal myeloperoxidase as a biomarker of disease activity and severity in ulcerative colitis*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(5): p. 1336-40.
70. Peterson, C.G., et al., *A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(7): p. 1755-62.
71. Cora, L.A., et al., *AC biosusceptometry in the study of drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(8): p. 1223-41.
72. Belikov, V.G.K., A.G., *Generation and Medicobiological Application of Magnetic Fields and Carriers (Review)*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2001. **35**(2): p. 7.

73. Cora, L.A., et al., *Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research*. Pharm Res, 2011. **28**(3): p. 438-55.
74. Taylor, A.D., R. Bronks, and A.L. Bryant, *The relationship between electromyography and work intensity revisited: a brief review with references to lacticacidosis and hyperammonia*. Electromyogr Clin Neurophysiol, 1997. **37**(7): p. 387-98.
75. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
76. Paskaranandavadivel, N., et al., *Comparison of filtering methods for extracellular gastric slow wave recordings*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(1): p. 79-83.
77. Reddy, S.N., S.M. Collins, and E.E. Daniel, *Frequency analysis of gut EMG*. Crit Rev Biomed Eng, 1987. **15**(2): p. 95-116.
78. Randhawa, P.K., et al., *A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(4): p. 279-88.
79. Di Stasi, L.C., C.A. Costa, and A. Witaicenis, *Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013 - 2014)*. Expert Opin Ther Pat, 2015. **25**(6): p. 629-42.
80. Witaicenis, A., L.N. Seito, and L.C. Di Stasi, *Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. Chem Biol Interact, 2010. **186**(2): p. 211-8.
81. Ohama, T., M. Hori, and H. Ozaki, *Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced?* J Smooth Muscle Res, 2007. **43**(2): p. 43-54.
82. Yamada, Y., et al., *A comparative analysis of two models of colitis in rats*. Gastroenterology, 1992. **102**(5): p. 1524-34.
83. Camilleri, M., et al., *Pharmacologic, Pharmacokinetic, and Pharmacogenomic Aspects of Functional Gastrointestinal Disorders*. Gastroenterology, 2016. **150**(6): p. 1319-1331.e20.
84. Aranda-Michel, J. and R.A. Giannella, *Acute diarrhea: a practical review*. Am J Med, 1999. **106**(6): p. 670-6.
85. Witaicenis, A., et al., *Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine*. Chem Biol Interact, 2012. **195**(1): p. 76-85.
86. Poli, E., et al., *Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis*. Neurochem Res, 2001. **26**(8-9): p. 1085-93.

87. Egbuji, J.U., et al., *Origin, propagation and regional characteristics of porcine gastric slow wave activity determined by high-resolution mapping*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(10): p. e292-300.
88. Lammers, W.J. and B. Stephen, *Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine*. Exp Physiol, 2008. **93**(3): p. 334-46.
89. Kim, Y.C., S.D. Koh, and K.M. Sanders, *Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine*. J Physiol, 2002. **541**(Pt 3): p. 797-810.
90. Mane, N., et al., *Dynamics of inhibitory co-transmission, membrane potential and pacemaker activity determine neuromyogenic function in the rat colon*. Pflugers Arch, 2014. **466**(12): p. 2305-21.
91. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
92. Rieder, F., et al., *Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(7): p. G786-801.
93. Choi, Y.S., et al., *A case of Crohn's disease with improvement after azathioprine-induced pancytopenia*. Case Rep Gastroenterol, 2011. **5**(2): p. 344-9.
94. Rieder, F. and C. Fiocchi, *Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 228-35.
95. Sanders, K.M., S.M. Ward, and S.D. Koh, *Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function*. Physiological Reviews, 2014. **94**(3): p. 859-907.
96. Nolan, J.D., et al., *Diarrhea in Crohn's Disease: Investigating the Role of the Ileal Hormone Fibroblast Growth Factor 19*. Journal of Crohn's and Colitis, 2015. **9**(2): p. 125-131.
97. Fiocchi, C., *IBD: advances in pathogenesis, complications, diagnosis, and therapy*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(4): p. 297-300.
98. Bharucha, A.E., J.H. Pemberton, and G.R. Locke, 3rd, *American Gastroenterological Association technical review on constipation*. Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 218-38.