

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE POR
ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO
TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS) EM
CONCENTRAÇÃO SUBINFLAMATÓRIA**

Camila Hiromi Chiba

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

BOTUCATU – SP

2013

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE POR
ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO
TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS) EM
CONCENTRAÇÃO SUBINFLAMATÓRIA**

ALUNA: Camila Hiromi Chiba

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

CO-ORIENTADOR: Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Chiba, Camila Hiromi.

Avaliação da influência do estresse em modelo experimental de colite por administração de Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em concentração subinflamatória / Camila Hiromi Chiba. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Coorientador: Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Capes: 21003009

1. Colite – Fatores de risco. 2. Intestinos – Doenças inflamatórias.
3. Stress (Fisiologia). 4. Imobilização animal.

Palavras-chave: Contenção; Doença inflamatória intestinal; Estresse; Frio; TNBS.

Avaliadores

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e Dr. Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa

Departamento de Farmacologia

Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu

Dra. Aline Witaicenis

Departamento de Farmacologia

Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu

Agradecimentos

Ao professor Luiz Claudio Di Stasi por ter dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo o conhecimento e sabedoria transferidos.

Ao Celso, pelos ensinamentos, pelo acompanhamento em cada experimento e pela paciência no desenvolvimento da monografia.

À Ana, pelos ensinamentos e paciência no desenvolvimento de dosagens e análises bioquímicas.

Aos meus amigos de laboratório Adriano, Alexandre Chagas, Alexandre Tanimoto, Aline, Adriana, Elen, Fabiana, Juliana Rocha, Juliana Severi, Luiz, Tainan e Ubirajara pelo apoio e ensinamentos constantes.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo fundamental apoio emocional e todo o incentivo aos estudos.

À minha amiga de infância Raíra que, mesmo distante fisicamente, sempre esteve presente.

As minhas amigas de república e agregadas Thaís (Garga), Marina Naves (Babalu), Jussara (Godira), Marina Bellot (Push), Erica (Tosa), Amanda (Ahlelek), Barbara (Wendy) e Larissa (Lecê) por me escutarem, incentivarem e ajudarem na vida acadêmica e pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários da seção de graduação.

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

Sumário

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1	COLITE E ESTRESSE	1
1.2	EPIDEMIOLOGIA	3
1.3	MODELOS EXPERIMENTAIS	4
<u>2</u>	<u>OBJETIVO</u>	<u>6</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>7</u>
3.1	ANIMAIS	7
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	7
3.3	AVALIAÇÃO GERAL	10
3.4	OBTENÇÃO DO SORO	10
3.5	ANÁLISE MACROSCÓPICA	10
3.6	DOSAGEM DE GLICEMIA	11
3.7	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	11
3.7.1.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	11
3.7.2	DETERMINAÇÃO DO CONTEUDO DE GLUTATIONA TOTAL	11
3.7.3	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CORTICOSTERONA NO SORO	12
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
<u>4</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>13</u>
4.1	EXPERIMENTO 1	13
4.1.1	AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS	13
4.1.2	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	14
4.2	EXPERIMENTO 2	17
4.2.1	AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS	17
4.2.2	DOSAGEM DE GLICEMIA	20
4.2.3	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	21
4.3	EXPERIMENTO 3	24
4.3.1	AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS	24
4.3.2	DOSAGEM DE GLICEMIA	27
4.3.3	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	28
<u>5</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>32</u>
<u>6</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>33</u>

Lista de Abreviaturas

DII	Doença Inflamatória Intestinal
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
GSSG	Glutathione oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida
E.P.M.	Erro padrão da média
TNBS 40	Ácido Trinitrobenzenosulfônico na concentração de 40 mg/ml em etanol 50%
TNBS 12,5	Ácido Trinitrobenzenosulfônico na concentração de 12,5 mg/ml em etanol 50%
TNBS 6	Ácido Trinitrobenzenosulfônico na concentração de 6 mg/ml em etanol 50%
TNBS 1	Ácido Trinitrobenzenosulfônico na concentração de 1 mg/ml em etanol 50%
IFN- γ	Interferon- γ
IL-12	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 β
MPO	Mieloperoxidase
GSH	Glutathione
Th1	T helper 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

Lista de figuras

- Figura 1: Esquema ilustrando o delineamento do experimento 2. _____ 9
- Figura 2: Esquema ilustrando o delineamento do experimento 3. _____ 9
- Figura 3: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos a indução do processo inflamatório intestinal com diferentes concentrações de TNBS. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____ 15
- Figura 4: Avaliação dos níveis de glutathione total (GSH) em animais submetidos a indução do processo inflamatório intestinal com diferentes concentrações de TNBS. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____ 16
- Figura 5: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em Δ peso corporal. _____ 17
- Figura 6: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em consumo (g)/número de animais. _____ 18
- Figura 7: Relação peso da adrenal esquerda (mg)/peso do animal (g), dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____ 18
- Figura 8: Relação peso da adrenal direita (mg)/peso do animal (g), dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____ 19
- Figura 9: Dosagem do nível glicêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____ 21
- Figura 10: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associada ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____ 22
- Figura 11: Avaliação dos níveis de glutathione total (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associada ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____ 22
- Figura 12: Avaliação dos níveis de corticosterona no soro dos animais submetidos ao modelo experimental de colite associada ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$. _____ 23
- Figura 13: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Dados expressos em Δ peso corporal. _____ 24

Figura 14: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Dados expressos em consumo (g)/número de animais. _____25

Figura 15: Relação peso da adrenal esquerda/peso do rato, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Comparação feita em relação ao grupo branco. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____25

Figura 16: Relação peso da adrenal direita/peso do rato, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Comparação feita em relação ao grupo branco. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____26

Figura 17: Dosagem do nível glicêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____27

Figura 18: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associada ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____28

Figura 19: Avaliação dos níveis de glutathione total (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40. _____29

Figura 20: Avaliação dos níveis de corticosterona no soro dos animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média $\pm$ E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco. _____30

Lista de tabelas

Tabela 1: Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon. _____10

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros macroscópicos no modelo experimental da DII induzida por TNBS em ratos. _____13

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros macroscópicos no modelo experimental da DII induzida por TNBS em ratos e exposição ao estresse por contenção. _____20

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros macroscópicos da indução do processo inflamatório intestinal e exposição ao estresse por contenção e frio. _____27

Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença crônica e recidivante provocada pela resposta exacerbada do sistema imunológico. Ela representa um importante problema de saúde por limitar a qualidade de vida e por ser o principal fator de risco para o câncer colorretal. Apesar da sua importância, da alta incidência mundial e de ser objeto de pesquisas há várias décadas, a etiologia ainda permanece desconhecida. Estudos indicam que haja uma interação entre fatores genéticos e ambientais, os quais, juntamente com a microbiota intestinal, levam a uma resposta imunológica descontrolada. Um dos fatores ambientais agravantes frequentemente discutidos é o estresse, visto que a vida cotidiana da população atual em geral está cada vez mais corrida. A fim de se demonstrar a influência do estresse na DII, o presente estudo teve como objetivo a padronização de um modelo experimental que induzisse a colite pela instilação de uma concentração subinflamatória de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e que a exposição ao estresse intensificasse o quadro inflamatório. Para tanto, foi feito um experimento para determinar qual seria a concentração subinflamatória. Foram testados quatro diferentes concentrações de TNBS (1, 6, 12,5 ou 40 mg/ml) e definiu-se que 1 mg/ml foi a menor concentração de TNBS capaz de induzir uma resposta subinflamatória no intestino. Em seguida, foi realizado o segundo experimento que induziu a colite e expôs os animais ao estresse por contenção. Os resultados, porém, mostraram que este estímulo não foi suficiente para agravar os danos causados no cólon pela concentração de 1 mg/ml de TNBS. Com algumas mudanças no protocolo, o terceiro experimento associou frio e contenção, além da mudança no dia da eutanásia dos animais, ocorrendo imediatamente após a sessão de estresse. Os resultados da dosagem da atividade da mieloperoxidase foram inesperados, pois a concentração subinflamatória de TNBS causou uma inflamação intestinal semelhante a da concentração de 40 mg/ml. Apesar disso, os resultados da quantificação do conteúdo de glutathione total bem como os níveis de corticosterona mostraram-se elevados nos grupos que passaram pela sessão de estresse. A partir dos dados obtidos, não foi possível determinar a influência do estresse no agravamento da colite. Dessa forma, um novo estudo deve ser realizado a fim de se refinar as condições do protocolo experimental proposto.

Palavras chave: Contenção, Doença Inflamatória Intestinal, estresse, frio, TNBS.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic and relapsing disease caused by exaggerated response of the immune system. It represents a significant health problem by limiting the quality of life and being the main risk factor for colorectal cancer. Despite of its importance, the high worldwide incidence and being the object of research for several decades, the etiology remains unknown. Studies indicates an interaction between genetic and environmental factors which together with the intestinal microbiota, leads to an uncontrolled immune response. One of the aggravating environmental factors often discussed is stress, as the daily life of the population in general is increasingly rushed. In order to demonstrate the influence of stress on IBD, this study aimed to standardize an experimental model of colitis induced by instillation of a trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) noninflammatory concentration plus exposure to stress that intensify the inflammation. Therefore, an experiment was done to determine what would be the noninflammatory concentration. In this step, four different concentrations of TNBS (1, 6, 12.5 or 40mg/ml) were tested and the lowest concentration capable of inducing a noninflammatory response in the gut was defined as 1 mg/ml. Then, a second experiment was performed which induced colitis and exposed the animals to restraint stress. The results, however, showed that this stimulus was not enough to exacerbate the damage caused by the 1 mg/ml concentration of TNBS in the colon. With some changes in the protocol, the third experiment associated cold and restraint, as well as changes on the day of euthanasia, which occurred immediately after the stress session. The results of myeloperoxidase activity measurement were unexpected due to the noninflammatory concentration of TNBS caused an intestinal inflammation similar to the concentration of 40 mg/ml. However, the results of glutathione quantification and the corticosterone levels showed to be higher in the groups that passed through the stress session. From the data obtained, it was not possible to determine the influence of stress in the colitis exasperation. Thus, a new study should be done in order to improve the conditions of the experimental protocol proposed.

Keywords: restraint, Inflammatory Bowel Disease, stress, cold, TNBS.

1 Introdução

1.1 Doença Inflamatória Intestinal e estresse

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma desordem gastrointestinal comum definida como uma inflamação intestinal exacerbada, caracterizada por uma resposta acentuada do sistema imune (Jurjus et al., 2004). A DII é representada, principalmente, por duas doenças: a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn. Ambas são patologias crônicas e recidivantes (Gitnick, 1996), marcadas pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com diarreia e constipação (Singh et al., 2003). A DII representa um importante problema de saúde por limitar a qualidade de vida e ser o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal – sendo a incidência 19 vezes maior quando comparada com a população geral (Yang et al., 2009; Onken, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que o desenvolvimento da DII na infância pode causar problemas de crescimento e retardo da puberdade, devido à deficiência na absorção de nutrientes causada pela inflamação intestinal (Mamula et al., 2008).

Apesar da importância, da alta incidência mundial e de ser objeto de pesquisa há várias décadas, a etiologia da DII ainda permanece desconhecida. Estudos indicam que a patogênese é considerada multifatorial, de modo que a interação entre fatores genéticos e ambientais, juntamente com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células do sistema de defesa da mucosa intestinal e leva a uma resposta imune descontrolada (Fiocchi, 1998). Um dos fatores ambientais frequentemente discutidos durante as últimas décadas tem sido o estresse, em vista do notável crescimento dos transtornos psicológicos que tem afetado a vida cotidiana da população em geral (Reber, 2012).

A ideia entre a possível relação de fatores psicológicos e a DII não é recente, tendo surgido primeiramente na década de 1930 (Murray, 1930). Sabe-se que qualquer estresse físico ou psicológico que ameace a homeostase de um organismo pode iniciar uma série de comportamentos e respostas neuroendócrinas que ajudam o organismo a se adaptar à situação alterada (Gülpinar et al., 2004). Esse fenômeno adaptativo é de grande importância, pois aumenta o nível glicêmico, acelera o fluxo sanguíneo, aguça a cognição e reduz a percepção de dor, preparando o organismo para

respostas de luta ou fuga (Sapolsky et al., 2000). Por outro lado, porém, quando as situações de estresse se apresentam de forma acentuada e prolongada podem influenciar na fisiopatologia e no quadro clínico das condições gastrointestinais, como foi demonstrado em diversos estudos com humanos ou animais (Lindgren et al., 1991; Lindgren et al., 1993; Buret, 2006).

Dessa forma, modelos experimentais animais têm demonstrado que a exposição do roedor ao estresse facilita a ativação de linfócitos e a aderência bacteriana, além de reduzir a produção de mucina e aumentar a permeabilidade da mucosa, influenciando no desenvolvimento da DII (Mawdsley, Rampton, 2005). Para observar tais atividades, existem diversas técnicas de indução do estresse. Entretanto, é importante considerar que há vários fatores que influenciam nessa resposta, como a intensidade e a duração do estímulo, além do tipo de agente estressor, como contenção, frio, barulho, choque, privação de água e alojamento em ambiente agitado (Wilson, Baldwin, 1999; Soderholm et al., 2002).

O mecanismo pelo qual o estresse influencia no quadro das DII ainda é incerto. Segundo o endocrinologista Hans Selye (1937), a resposta ao estresse pode ser dividida em três fases:

1. Fase de alarme: resposta imediata do organismo ao estresse. Ocorre, principalmente, estimulação do sistema simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), com descarga de adrenalina, noradrenalina e cortisol.
2. Fase de resistência: estado em que o organismo mobiliza reservas energéticas para responder adequadamente ao agente estressor, evitando prejuízos para o seu funcionamento.
3. Fase de exaustão: estado em que a duração e/ou intensidade do estímulo estressor é muito grande, não sendo mais possível responder de modo adequado. Dessa forma, a estimulação do eixo HHA promove a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que leva à liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. Este, por sua vez, estimula a secreção de glicocorticoides (cortisol em primatas e corticosterona em roedores) pela adrenal. Em concentração elevada, devido à intensa estimulação do eixo somada à perda do mecanismo de feedback negativo que ocorre nesta fase, o excesso de glicocorticoide pode agir

estimulando a produção de diversas substâncias como, por exemplo, IL-6, IFN- γ e TNF- α , as quais estão envolvidas com uma maior incidência da DII (Mawdsley, Rampton, 2005).

Além desse mecanismo, outro estudo relata ainda que diversos eventos da vida cotidiana e o estresse desencadeado por eles podem aumentar o risco de recidiva em pacientes em remissão (Carbonnel et al., 2009). Por fim, pesquisas observaram que o CRH e o ACTH também têm participação, uma vez que o primeiro hormônio provoca o aumento da permeabilidade intestinal (Buret, 2006) e o segundo influencia na motilidade gastrointestinal (Fukudo et al., 1998). Os mecanismos, portanto, ainda não estão bem elucidados (Kuroki et al., 2011) e o melhor entendimento da influência do estresse como um fator etiológico da DII é necessária.

1.2 Epidemiologia

A DII constitui a condição inflamatória crônica mais séria e comum do intestino humano (Qiu et al., 1999). O número de casos esta aumentando com o passar do tempo em diferentes regiões, o que indica sua emergência como doença global (Molodecky et al., 2012), estimando-se que ela afete cerca de 28 milhões de pessoas no mundo (Schoultz et al., 2013). As maiores taxas de incidência são normalmente relatadas em países desenvolvidos e industrializados como os do Norte e Oeste Europeu, assim como na América do Norte, indicando a urbanização como um fator de risco (Lakatos, 2006). Atualmente, entretanto, a frequência da DII tem aumentado nos países em que raramente haviam sido relatadas anteriormente, como Índia e China (Cosnes et al., 2011). No Brasil, por exemplo, apesar da inexistência de dados epidemiológicos oficiais, a incidência tem crescido nos últimos anos e se aproxima dos níveis de países desenvolvidos (Molodecky et al., 2012; Victoria, Sassak, Nunes, 2009).

Ao mesmo tempo, a prevalência de pacientes com DII que sofrem de algum transtorno psicológico, como depressão e ansiedade, também é elevada, sendo mais do que o dobro quando comparada com a população saudável (Graff, 2010). Dessa forma, considerando que a população em geral esta cada vez mais sendo afetada por transtornos psicológicos e pelo estresse, tornam-se necessários estudos que demonstrem e comprovem a influencia desse fator etiológico no desenvolvimento da DII.

1.3 Modelos experimentais

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

O modelo já padronizado e utilizado pelo Laboratório de Fitomedicamentos (LaFIT) do Departamento de Farmacologia da UNESP – Botucatu, baseia-se na administração de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) diluído em uma solução de etanol a 50% por via intrarretal, classificado como um modelo de inflamação induzida. Este modelo é considerado o mais adequado, pois se aproxima muito ao que ocorre com seres humanos (Jurjus et al., 2004). O etanol age rompendo a barreira biológica, aumentando a permeabilidade da mucosa e facilitando a entrada do TNBS (o qual age como um hapteno - substância de baixo peso molecular que por si só não é imunogênica, mas que se torna imunogênica após a sua conjugação com uma proteína carreadora ou uma célula, sendo capaz de induzir a produção anticorpos (Benjamini et al., 2002)) do lúmen para a lâmina própria (Gonçalves et al., 2008). Em seguida, o TNBS associa-se a substâncias de alto peso molecular, como proteínas teciduais, é processado pelas células apresentadoras de antígenos e, então, apresentado para as células T. O reconhecimento promove a secreção excessiva de IL-12, além de um desbalanço da resposta das células Th1, que leva a produção, principalmente, de IFN- γ . Este, por sua vez, age nos macrófagos e provoca a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que desencadeiam uma inflamação aguda no local (Strober et al., 1998).

Já para a indução do estresse, existem diferentes agentes estressores, podendo ser de natureza biológica, química, física ou psicológica, cada qual com uma gama de respostas características (Mendes, 2011). O presente trabalho utilizou o método de estresse por contenção – que induz ao estresse psicológico (reação de escape) e físico (esforço muscular) – associado ao frio – que afeta componentes psicológicos e fisiológicos (Zaidi et al., 2005). O procedimento experimental consiste em restringir o animal a um pequeno compartimento, com movimentos limitados dentro de um ambiente com temperatura controlada a 4 °C. A contenção é um método privilegiado por ser simples, de baixo custo, indolor e sem debilitação permanente. Além disso, em

comparação com outros estímulos estressores, a contenção permite a análise das mudanças dos níveis hormonais de forma mais eficiente (Buynitsky, Mostofsky, 2007). Já o frio é uma ameaça direta para o organismo. Foi observado que alterações na temperatura do corpo de ± 4 °C pode comprometer funções físicas e mentais. Uma das alterações fisiológicas provocada por este método esta relacionada com o consumo de oxigênio, a indução de mudanças na produção de energia e posterior produção de espécies reativas de oxigênio (Fu et al., 2013), os quais têm sido implicados na intensificação do processo inflamatório (Halliwell, 1996).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo padronizar, para as condições experimentais do Laboratório de Fitomedicamentos, o modelo de indução da inflamação intestinal por meio do agente indutor TNBS associado à exposição dos animais ao estresse, tendo em vista a hipótese de que baixas concentrações de TNBS, as quais, por si só, não seriam suficientes para promover um processo inflamatório no intestino, poderiam ter seus efeitos acentuados pela adição do estresse por contenção e frio. A ideia foi baseada no estudo de Cólón e colaboradores (2004), que também padronizaram um modelo experimental semelhante, porém utilizando fêmeas de roedores. Dessa forma, o desenvolvimento do presente modelo permitirá o melhor entendimento da influência do estresse no desenvolvimento da inflamação intestinal, além da busca de novos agentes farmacológicos, que possam ser usados para o tratamento da DII.

2 Objetivo

O trabalho teve como objetivos determinar a menor concentração de TNBS que fosse capaz de induzir um estado subinflamatório no intestino; e subsequentemente padronizar o modelo de indução de colite, em ratos machos, pela instilação de TNBS, em baixas concentrações, associado ao estresse pelo método de contenção e frio.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando de 180 a 200g, provenientes da ANILAB (Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos do Departamento de Farmacologia por, pelo menos, cinco dias antes dos procedimentos experimentais, para aclimação. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de 21 ± 2 °C e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos ficaram alojados em caixas e foram alimentados com ração Presence® peletizada e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental 493, submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

3.2 Delineamento experimental

A. Experimento 1: Definiu a menor concentração que induziu ao processo subinflamatório no intestino, para tanto foram determinados os seguintes grupos experimentais:

- Grupo branco: animais sem indução do processo inflamatório intestinal
- Grupo TNBS 40: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 40 mg/ml em etanol 50%.
- Grupo TNBS 12,5: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 12,5 mg/ml em etanol 50%.
- Grupo TNBS 6: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 6 mg/ml em etanol 50%.

- Grupo TNBS 1: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 1 mg/ml em etanol 50%.

B. Experimento 2: Avaliou a influência do estresse pelo método de contenção no desenvolvimento da colite. Os grupos experimentais foram:

- Grupo branco: animais sem indução do processo inflamatório intestinal e sem exposição ao estresse pelo método de contenção.
- Grupo TNBS 40 (controle): animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 40 mg/ml em etanol 50%.
- Grupo TNBS 1: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 1 mg/ml em etanol 50%.
- Grupo TNBS+est: animais com indução do processo inflamatório intestinal pela administração de uma solução de TNBS na concentração de 1 mg/ml em etanol 50% e expostos ao estresse pelo método de contenção.
- Grupo Estresse: animais sem indução do processo inflamatório intestinal e expostos ao estresse pelo método de contenção.

C. Experimento 3: Avaliou a influência do estresse por contenção e frio no desenvolvimento da colite, por meio dos mesmos 5 grupos experimentais relatados no experimento anterior.

A indução do processo inflamatório intestinal foi realizada pelo método descrito por Morris e colaboradores (1989), com algumas modificações. Antes da indução os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e, posteriormente, anestesiados. 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 cada animal recebeu 0,25 ml, com concentrações diferentes dependendo do grupo experimental. O TNBS foi administrado por via retal (intracolônica) com a ajuda de um cateter de 2 mm de diâmetro, até uma distância de 8 cm. Os animais foram

mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) desde o momento da instilação da solução até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco e grupo estresse foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

O agente estressor primeiramente testado foi a contenção. Os animais foram introduzidos no contensor às 10 e retirados às 16 horas. Durante essas 6 horas, todos os animais ficaram privados de água e comida. Tal procedimento foi repetido do primeiro ao décimo primeiro dia, exceto no sexto dia em que foi feita a indução da colite pela administração da solução de TNBS. No décimo segundo dia, os animais foram eutanasiados por decapitação. Esquemáticamente:

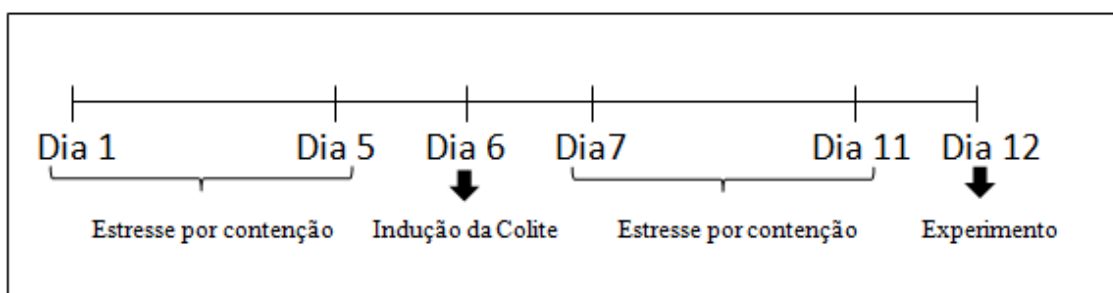


Figura 1: Esquema ilustrando o delineamento do experimento 2.

No terceiro experimento, houve a adição do frio no método de estresse. Neste protocolo os animais foram introduzidos no contensor e colocados em uma câmara fria à temperatura de 4 °C durante 2 horas. Esse procedimento foi realizado durante 11 dias, exceto no 6º em que foi feita a instilação do TNBS nos grupos colíticos. No décimo primeiro dia, logo após a sessão de estresse, os animais foram eutanasiados por decapitação. Esquemáticamente:

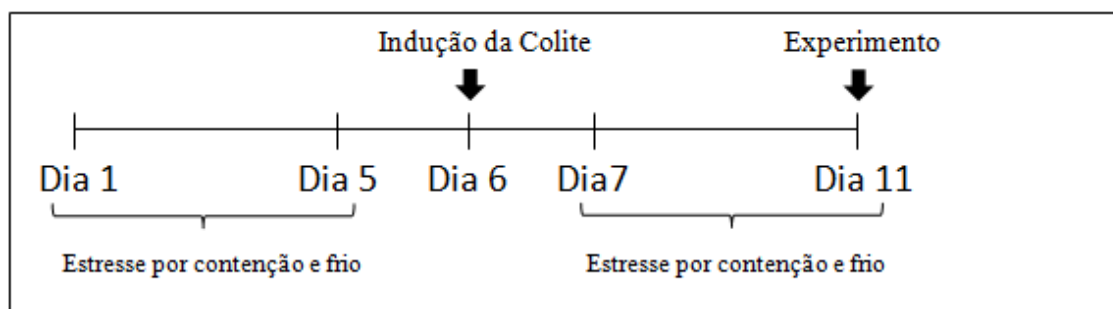


Figura 2: Esquema ilustrando o delineamento do experimento 3.

3.3 Avaliação geral

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas.

3.4 Obtenção do soro

Ao final dos protocolos experimentais descritos, o sangue obtido por decapitação foi coletado em tubos adequados do tipo Vacutainer® e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a coagulação. Após esse período o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 4000rpm. O soro separado foi armazenado à -80° C para a dosagem de corticosterona.

3.5 Análise Macroscópica

As adrenais foram retiradas, limpas e pesadas.

Nos cólons foram avaliados: Peso e comprimento, bem como a relação entre eles, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell e colaboradores, 1995 (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon.

Escala	Critério
0	Sem danos
1	Hiperemia, sem úlceras.
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
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 dano cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (a escala é aumentada em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 7 fragmentos longitudinais, os quais foram congelados a -80 °C para determinação da atividade da mieloperoxidase e da glutatona total.

3.6 *Dosagem de glicemia*

Imediatamente após a decapitação, a glicemia foi mensurada a partir de um glicosímetro portátil da marca TRUEread™ (USA).

3.7 *Determinações bioquímicas*

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas nos homogeneizados dos fragmentos do cólon.

3.7.1 *Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)*

A determinação da atividade da mieloperoxidase foi realizada pelo método de Krawisz e colaboradores (1984). Os resultados foram expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25 °C. A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

3.7.2 *Determinação do conteúdo de glutathiona total*

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à 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 glutathiona 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 consequente incremento de absorbância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

3.7.3 Determinação do nível de corticosterona

Os níveis de corticosterona foram determinados no soro por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (abcam[®]), empregando-se anticorpos monoclonais específicos.

As placas de microtitulação já vieram revestidas com anticorpos de captura. Foram adicionados as amostras em duplicatas e, em seguida, o anticorpo de detecção específico em cada poço. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada e a enzima estreptavidina foi adicionada a cada poço. Foi novamente feito um período de incubação de 30 minutos e a placa foi lavada ao final deste procedimento. Então, adicionou-se o substrato cromogênico em todos os poços até que eles adquirissem a cor azul e, por fim, foi colocado a solução de parada para que a quantidade de corticosterona fosse determinada por absorbância a 450 nm com correção a 540 nm.

3.8 Análise estatística

Dados paramétricos foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posteriori de múltiplas comparações de Dunnett ou Bonferroni. Dados não paramétricos foram expressos na forma de mediana (intervalo interquartil) e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste a posteriori de Dunn. As proporções foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Todas as análises foram feitas pelo software GraphPad InStat com nível de significância mínimo de $p \leq 0,05$.

4 Resultados e Discussão

Apesar da etiologia da DII não estar totalmente elucidada, um crescente número de evidências indica que o estresse tem função relevante na patofisiologia e/ou curso clínico das condições gastrointestinais (Collins, 2011).

Para investigar a hipótese de que o estresse é um importante fator agravante na DII, o presente estudo uniu colite e estresse em um modelo experimental. Isso permitirá, futuramente, a realização de testes de fármacos que possam auxiliar no tratamento da DII, diretamente no processo inflamatório ou sob a circuitaria neural relacionada ao estresse.

4.1 *Experimento 1*

A fim de se determinar a concentração subinflamatória que permita avaliar a influencia do estresse na DII, foram testados três diferentes concentrações de TNBS.

4.1.1 *Avaliações Macroscópicas*

Dois dias após a indução do processo inflamatório intestinal, os animais foram eutanasiados e os cólons, retirados. A partir do cólon foram feitas as avaliações macroscópicas de escore e extensão da lesão, relação peso/comprimento do órgão e análise de presença ou ausência de aderência. Os dados de diarreia foram coletados no dia da eutanásia dos animais.

Tabela 2: Avaliação dos parâmetros macroscópicos no modelo experimental da DII induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore Macroscópico (0-10 (quartil)) ¹	Extensão da Lesão (cm) ²	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ²	Diarreia (%) ³	Aderência (%) ³
Branco	0 ^a	0 ^a	99,68±4,64 ^a	0 ^a	0 ^a
TNBS 1	7 (6,25-7) ^b	2,37±0,24 ^b	149,79±4,32 ^b	66,7 ^{ab}	50 ^{ab}
TNBS 6	6 (5,25-6,75) ^b	2,18±0,35 ^b	138,91±8,56 ^b	33,3 ^{ab}	33,3 ^{ab}
TNBS 12,5	7 (7 - 8) ^b	2,62±0,56 ^b	138,78±8,85 ^b	50 ^{ab}	33,3 ^{ab}
TNBS 40	9 (7,25-10) ^b	4,1±0,39 ^b	148,25±6,35 ^b	100 ^b	83,3 ^b

¹Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo interquartil) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunn, ²extensão da lesão e relação peso/comprimento estão expressos em média±E.P.M. e foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett, ³diarreia e aderência foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$.

Como foi possível observar, o escore, a extensão da lesão e a relação peso/comprimento das quatro concentrações foram diferentes significativamente do grupo branco. Quanto aos parâmetros diarreia e aderência, as três concentrações intermediárias foram iguais ao grupo branco e ao grupo TNBS 40, mas esses dois grupos foram diferentes entre si. Chama a atenção que é possível observar uma tendência das concentrações 1, 6 e 12,5 de se diferenciarem do grupo TNBS 40 em relação ao escore e extensão da lesão. Por exemplo, a extensão da lesão do TNBS 40 é praticamente o dobro da lesão das outras concentrações e o menor escore do TNBS 40 ainda está mais elevado que o maior escore das concentrações de 1 e 6 (Tabela 2).

Macroscopicamente, portanto, as quatro concentrações foram eficazes em causar lesão intestinal, exceto pelos parâmetros diarreia e aderência.

4.1.2 Avaliações Bioquímicas

A instilação do hapteno leva a uma série de eventos, que resultam no aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade capilar. Esse fato promove o extravasamento de granulócitos, especialmente leucócitos polimorfonucleares (Jurjus, 2004). Os neutrófilos, então, estimulados pelo TNBS presente na mucosa e submucosa, liberam a enzima mieloperoxidase presente nos seus grânulos primários (azurófilos) (Nakamuta et al., 1993). Esta enzima constitui o sistema antimicrobiano, atuando como

catalisador da oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e um halogênio: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MPO}} \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ (Kato et al., 2003), que resulta na ligação H_2O_2 -halogênio-MPO, um sistema altamente tóxico para microorganismos (Oberge et al., 1983). Apesar da importante ação antimicrobiana, a ativação desregulada do sistema imune leva a um excesso de neutrófilos ativados, que, por sua vez, secreta em excesso a enzima MPO (Bos, Wever, Roos, 1978). O excesso dessa enzima causa dano tecidual pela produção dos radicais livres formados (Bos, Wever, Roos, 1978). Por este motivo, a dosagem da atividade de MPO é um interessante marcador para a DII.

Nesse experimento pôde-se observar um aumento da atividade da MPO de todos os grupos que foram induzidos pelo TNBS, com maior atividade registrada no grupo que recebeu maior concentração do hapteno, em relação ao grupo Branco. Estatisticamente, os grupos que receberam as concentrações 1, 6 e 12,5 foram estatisticamente iguais quando comparados ao grupo Branco e simultaneamente iguais quando comparados ao grupo TNBS 40, mostrando um resultado intermediário entre os dois grupos (Figura 3).

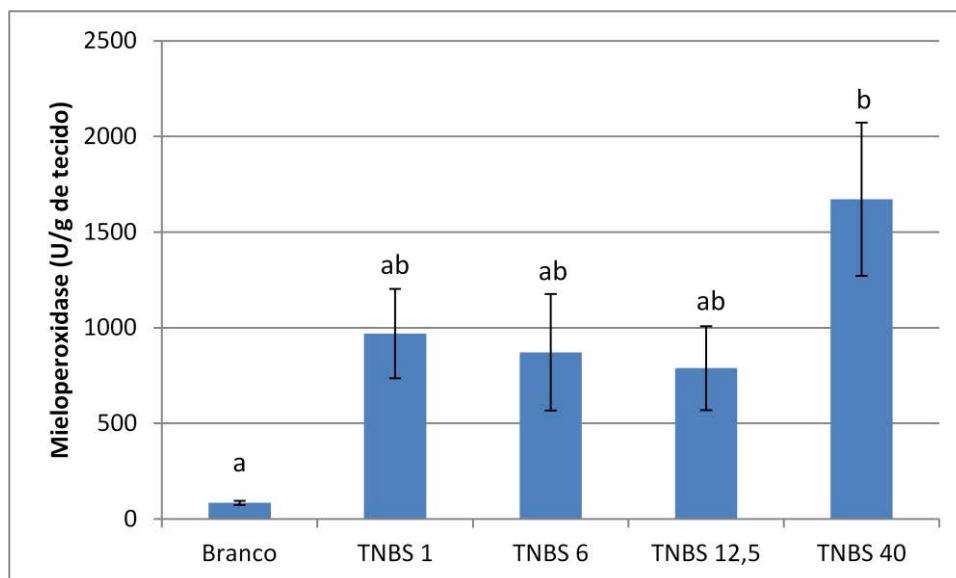


Figura 3: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos a indução do processo inflamatório intestinal com diferentes concentrações de TNBS. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40.

Com o aumento da atividade de MPO ocasionada pela excessiva resposta imunológica, ocorre um aumento da quantidade de radicais livres. Para neutralizá-los o organismo conta com um sistema antioxidante constituído por compostos enzimáticos e não enzimáticos. A glutathione é um dos compostos antioxidantes não enzimáticos (Roberts, Sindhu, 2009), sendo a primeira defesa intracelular contra os produtos tóxicos do oxigênio (Deleve, Kaplowitz, 1991). Portanto, a exposição da glutathione reduzida aos agentes oxidantes, leva à formação de glutathione oxidada e à neutralização dos radicais livres no citoplasma, por meio da glutathione peroxidase. A reação inversa é feita pela enzima glutathione redutase na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para a manutenção da integridade do sistema protetor celular (Wang, Ballatori, 1998). Em condições de excesso de agentes oxidantes, ocorre um desbalanço e maior formação da glutathione oxidada. Esta, por sua vez, sai da célula por difusão com maior facilidade, esgotando a glutathione intracelular (Karp, Koch, 2006; White, 1994). Portanto, em quadros patológicos que produzem grandes quantidades de radicais livres, como a DII, é possível monitorar a intensidade do estresse oxidativo através da glutathione total.

Ao analisarmos o nível de glutathione total nos animais que receberam as diferentes concentrações de TNBS, é possível notar que todos eles tiveram depleção dos seus níveis, significativamente diferentes quando comparados ao grupo branco (Figura 4).

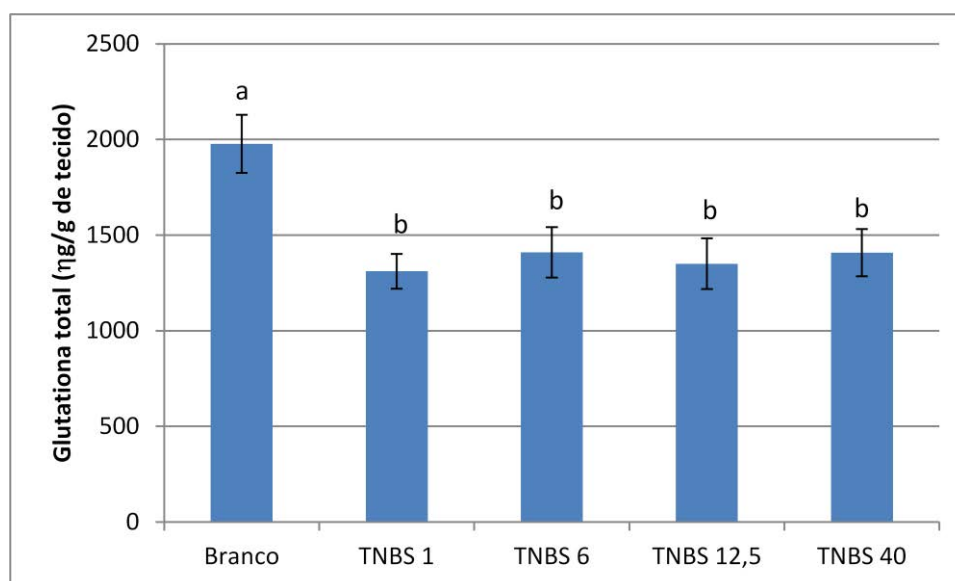


Figura 4: Avaliação dos níveis de glutathione total (GSH) em animais submetidos a indução do processo inflamatório intestinal com diferentes concentrações de TNBS. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40.

Todos os grupos colíticos, portanto, tiveram tanto aumento da atividade de MPO como depleção dos níveis de GSH. Esses resultados levaram ao segundo experimento, no qual foi selecionada a concentração de 1 mg/ml de TNBS, visto ser esta a menor das três concentrações que foi capaz de induzir o processo subinflamatório intestinal, já que foi possível notar uma tendência na redução dos parâmetros macroscópicos (escore e relação peso/comprimento), redução da diarreia e aderência, além da redução da atividade da enzima MPO quando comparado ao grupo TNBS 40.

4.2 *Experimento 2*

A partir dos resultados anteriores, este experimento visou a padronização de um modelo experimental de colite que avaliou a influência do estresse pelo método de contenção.

4.2.1 *Avaliações Macroscópicas*

Após o período de ambientação de uma semana, foi feito o controle do peso e do consumo de ração diariamente (Figuras 5 e 6, respectivamente). Foi constatado que, após a administração de TNBS, houve uma diminuição da quantidade de alimento ingerido. Os animais não colíticos restabeleceram normalmente o consumo após o jejum. Como consequência da redução do consumo de alimento, ocorreu também redução do peso corpóreo. Esses resultados já eram esperados, visto que a indução do processo inflamatório intestinal causa grande dor abdominal, a qual leva à redução do apetite do animal e, conseqüentemente, do seu peso corporal. Já os grupos branco e estresse, que não tiveram a instilação do hapteno, não tiveram nem a massa corporal nem o consumo de ração diminuídos.

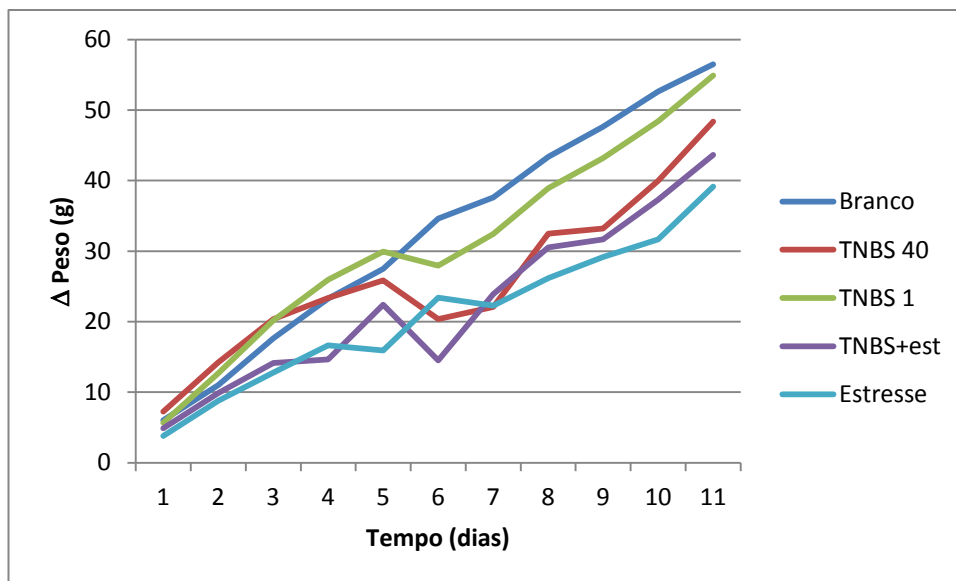


Figura 5: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em Δ peso corporal.

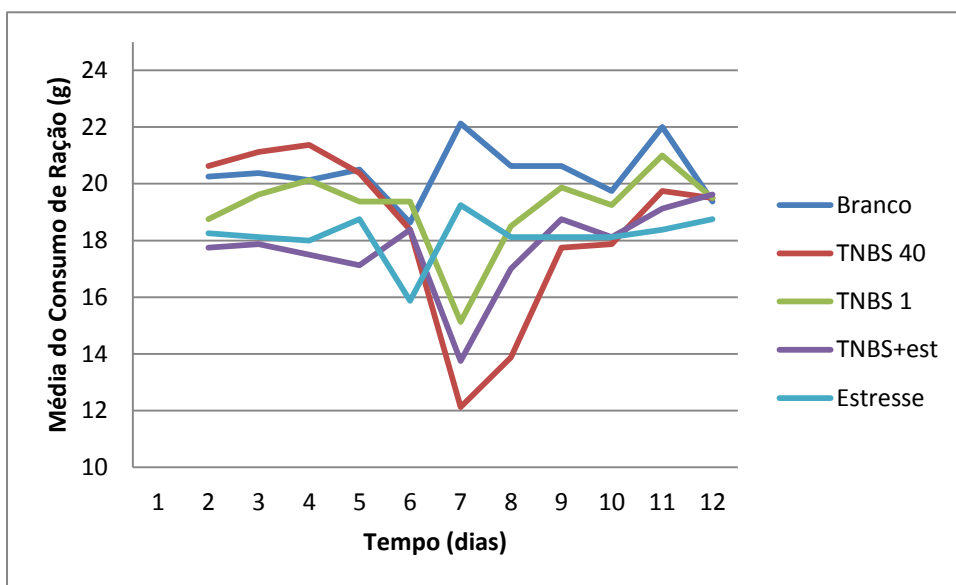


Figura 6: Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em consumo (g)/número de animais.

No décimo segundo dia, os animais foram eutanasiados por decapitação e as adrenais foram retiradas e pesadas, diferenciando-se direita e esquerda. A partir desses dados, foi feita uma relação peso da adrenal (mg)/peso do animal(g), que pode ser observada nas figuras 7 e 8.

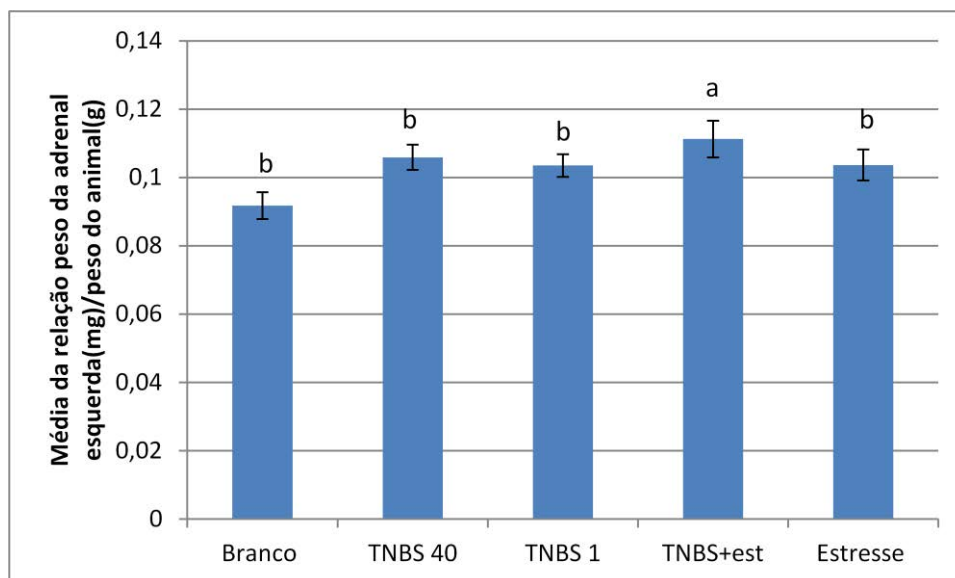


Figura 7: Relação peso da adrenal esquerda (mg)/peso do animal (g), dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

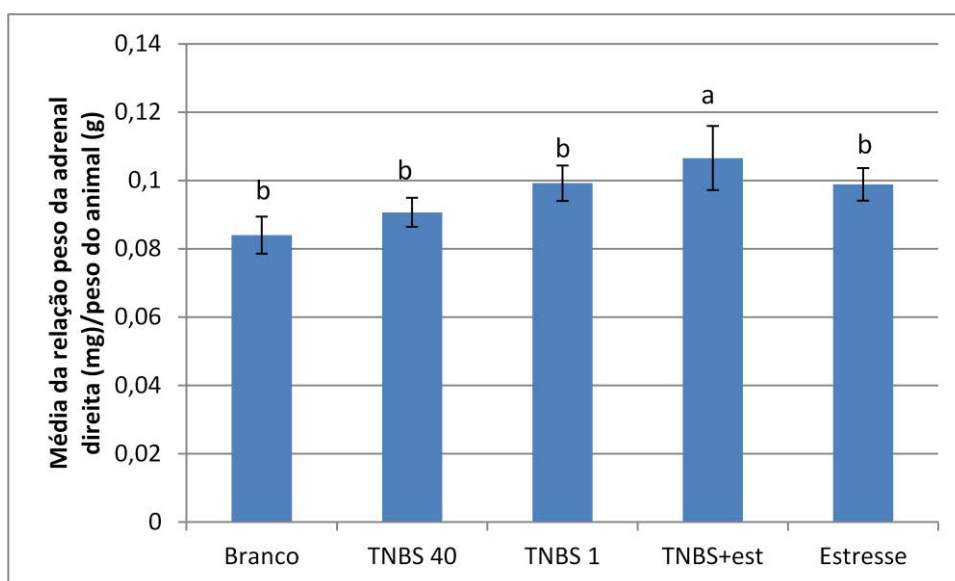


Figura 8: Relação peso da adrenal direita (mg)/peso do animal (g), dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

A relação peso da adrenal/peso do animal de ambos os lados foi significativamente maior no grupo TNBS+est. Este fenômeno deve ter ocorrido pelo fato de que o estresse gerado pela contenção e o estresse causado pela agressão do TNBS levaram à ativação do eixo HHA, que, por sua vez, provocou um aumento do metabolismo da adrenal, aumentando o peso desse órgão pela maior síntese de cortisol (Ulrich-Lai et al., 2006).

Em seguida, foi retirado o cólon e avaliado o escore, a extensão e a relação peso/comprimento da lesão. Também foram avaliados a presença ou ausência de diarreia e de aderência.

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros macroscópicos no modelo experimental da DII (induzida por TNBS em ratos) associado ao estresse por contenção.

Grupo	Escore Macroscópico (0-10 (quartil)) ¹	Extensão da Lesão (cm) ²	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ²	Diarreia (%) ³	Aderência (%) ³
Branco	0 ^a	0 ^a	93,79±3,87 ^a	0 ^a	0 ^a
TNBS 40	7 (4,75-8) ^b	1,95±0,44 ^b	137,49±10,44 ^b	87,5 ^b	75 ^b
TNBS 1	3 (0,75-5) ^b	0,93±0,30 ^a	115,58±8,04 ^b	50 ^{ab}	12,5 ^a
TNBS+est	3 (0,75-5) ^b	0,90±0,24 ^a	115,06±5,76 ^b	37,5 ^{ab}	0 ^a
Estresse	0 ^a	0 ^a	96,29±3,57 ^a	0 ^a	0 ^a

¹Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo interquartil) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunn, ²extensão da lesão e relação peso/comprimento estão expressos em média±E.P.M. e foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett, ³diarreia e aderência foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$.

Podemos notar, na tabela 3, que o escore e a relação peso/comprimento dos cólons dos três grupos que receberam a instilação do hapteno foram significativamente maiores que os grupos branco e estresse. Já a extensão da lesão, o grupo que recebeu a maior concentração do TNBS ficou diferente do grupo branco. Com relação aos parâmetros de diarreia e aderência, somente o grupo TNBS 40 ficou diferente significativamente do branco. Porém, é possível notar uma tendência dos grupos que receberam a concentração de 1 mg/ml se diferenciarem do TNBS 40, principalmente em relação ao escore e extensão da lesão em que os valores dos grupos TNBS 1 e TNBS+est foram menos que a metade do grupo TNBS 40.

4.2.2 Dosagem de glicemia

Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado e a glicemia foi mensurada. Em caso de estresse agudo, esperava-se que o nível glicêmico estivesse alterado, pois o estresse ativa o sistema nervoso autônomo simpático e eleva a glicemia

plasmática a fim de preparar o organismo para as reações de luta ou fuga (Sapolsky et al., 2000). Porém, neste caso de estresse crônico, não foi encontrado nenhuma diferença significativa entre os níveis glicêmicos de nenhum dos grupos (Figura 9).

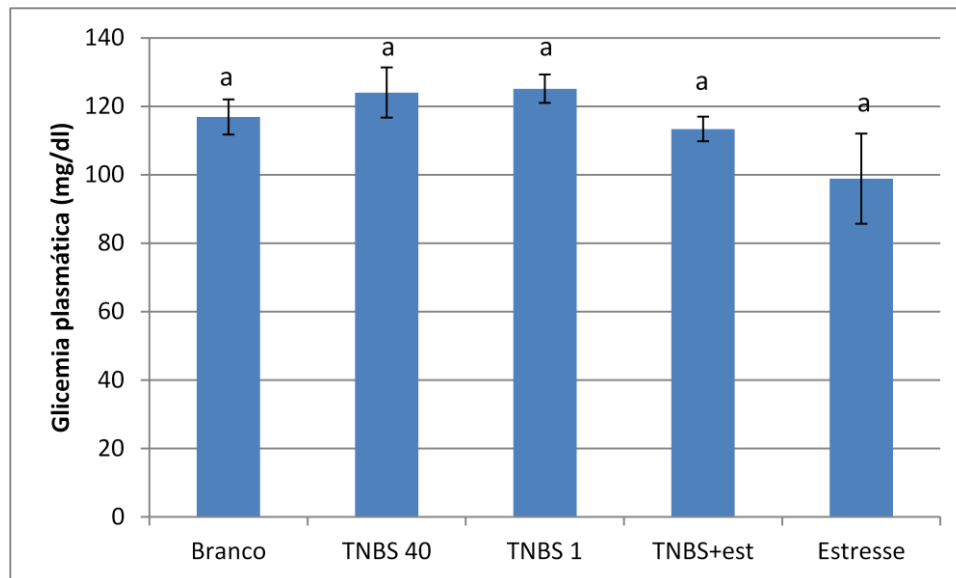


Figura 9: Dosagem do nível glicêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

4.2.3 Avaliações Bioquímicas

Quanto à atividade da MPO, esta apresentou-se elevada nos grupos TNBS 40 e TNBS+est. O grupo TNBS 1, por sua vez, apresentou igualdade estatística em relação ao grupo Branco e simultaneamente em relação aos grupos TNBS 40 e TNBS+est, mostrando ser um resultado intermediário. Logo, apesar de não existir diferença significativa entre os grupos TNBS 1 e TNBS+est, é possível perceber uma tendência para que haja diferença, visto que o grupo TNBS+est teve grande variabilidade dos dados (Figura 10).

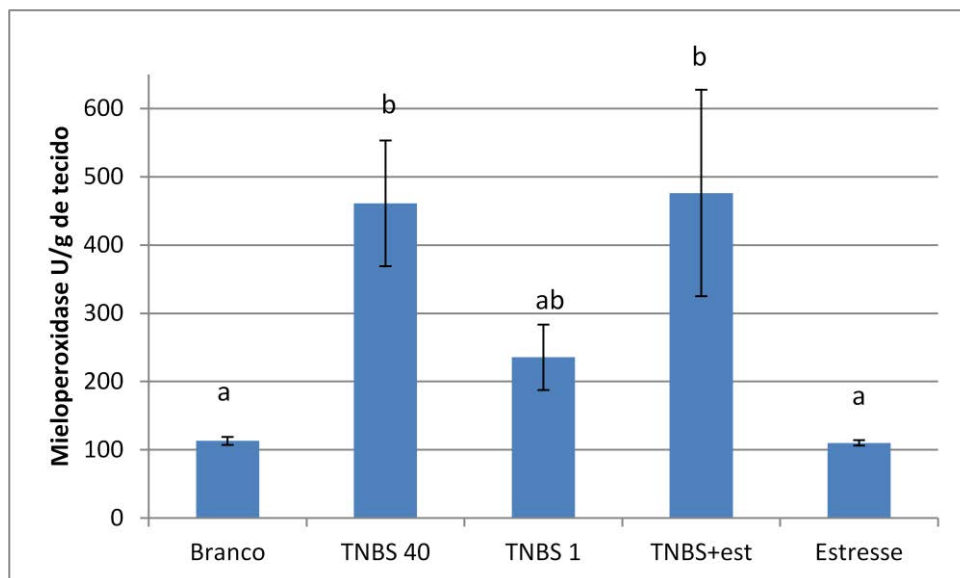


Figura 10: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associada ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$.

A dosagem de glutathiona, por sua vez, mostrou um resultado esperado, pois o grupo TNBS 40 teve seus níveis de GSH depletados e o grupo TNBS 1, não (Figura 11). A glutathiona dos grupos que passaram pela exposição ao estresse manteve-se igual ao grupo branco, pois, segundo Maher (2005), a glutathiona está relacionada a um sistema de defesa das células contra formas mais severas de estresse.

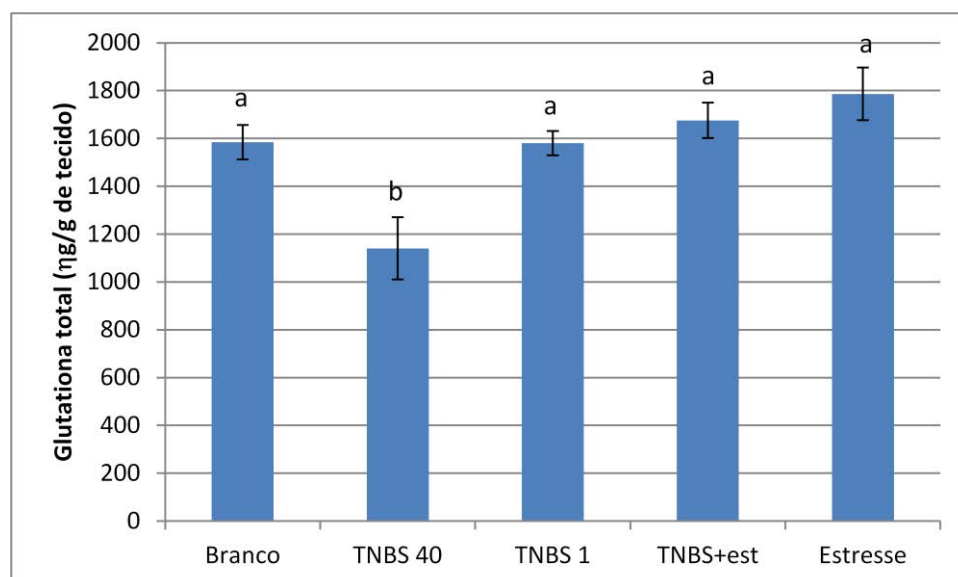


Figura 11: Avaliação dos níveis de glutathiona total (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40.

A fim de avaliar se o método de estresse por contenção foi eficiente para causar alterações fisiológicas, foi mensurado o nível de corticosterona no soro.

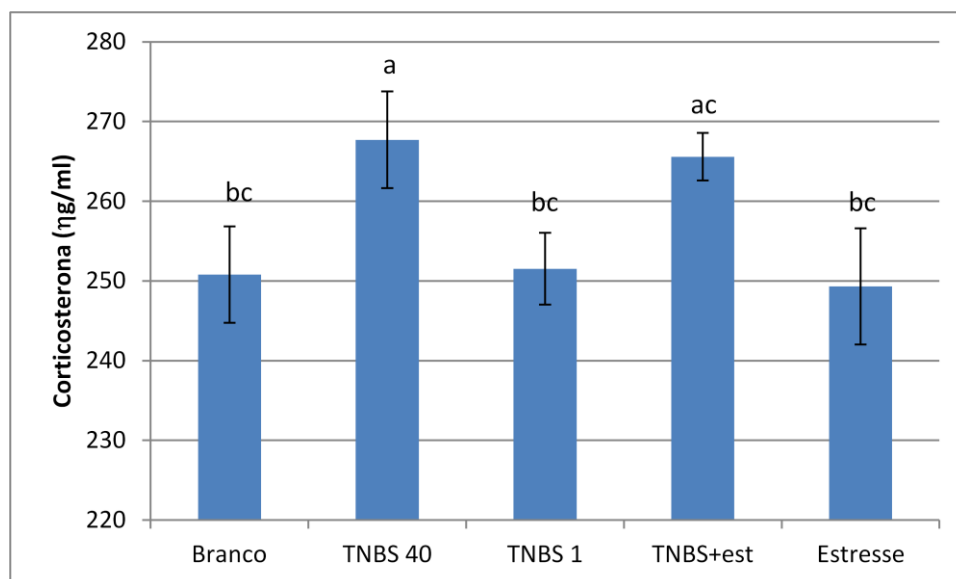


Figura 12: Avaliação dos níveis de corticosterona no soro dos animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$.

Os resultados observados nesta dosagem, figura 12, demonstraram que somente os grupos estresse e branco não obtiveram diferença significativa. Esperava-se que o nível de corticosterona dos grupos que foram expostos ao estresse estivesse mais elevado em comparação aos outros. A não observância de diferença significativa pode ser explicada pelo fato de que houve um período muito longo entre o fim da sessão de estresse e a eutanásia dos animais, tempo suficiente para que os níveis de corticosterona retornassem ao basal. Além disso, vários estudos sugerem que machos são mais resistentes ao estresse em relação às fêmeas (Kudielka et al., 2004; Young, 1998). Tendo em vista esses dados e os da MPO, o terceiro experimento foi elaborado com duas mudanças no protocolo experimental: adição de um fator estressor e mudança no dia do experimento, para que a eutanásia dos animais ocorresse imediatamente após a sessão de estresse.

4.3 Experimento 3

Foram utilizados os mesmos grupos experimentais, a mesma concentração subinflamatória de TNBS, a indução realizada no 6º dia e os 10 dias de exposição ao estresse. As mudanças no protocolo deste estudo foram: adição do frio ao método de estresse e mudança no dia da eutanásia dos animais.

Essas alterações relacionam-se ao fato do trabalho ter sido realizado com ratos machos, pois eles são mais resistentes ao estresse quando comparados às fêmeas (Kudielka et al., 2004; Young, 1998). Por isso, apesar de a contenção já ser um estímulo suficientemente grande para induzir a resposta de estresse no roedor (Mendes, 2011), foi necessária a associação com baixa temperatura para que ocorressem alterações fisiológicas.

4.3.1 Avaliações Macroscópicas

O controle de peso e consumo de ração feito durante o experimento pode ser observado nas figuras 13 e 14. Da mesma forma que o experimento anterior, os animais tiveram queda do peso corporal e do consumo alimentar no dia da indução do processo inflamatório intestinal.

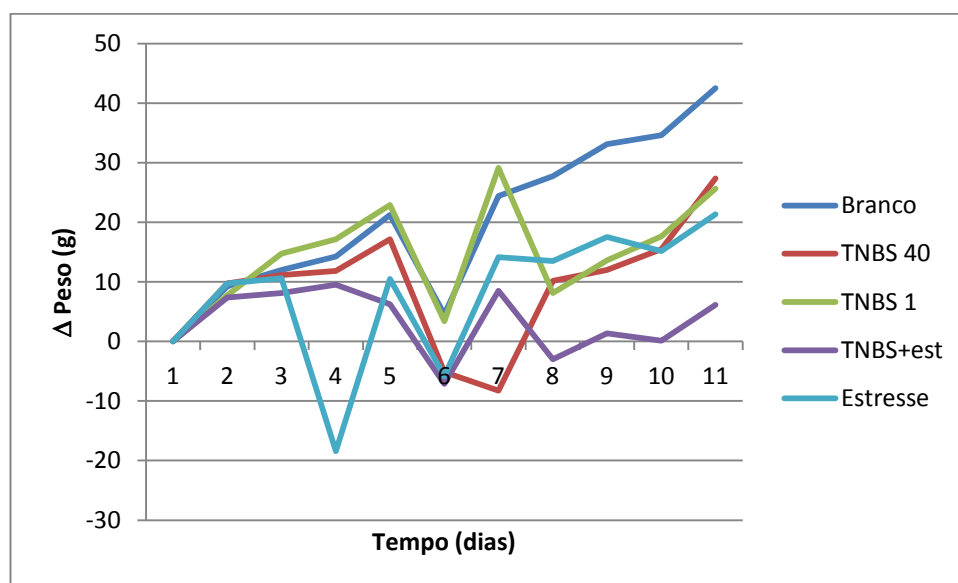


Figura 13: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Dados expressos em Δ peso corporal.

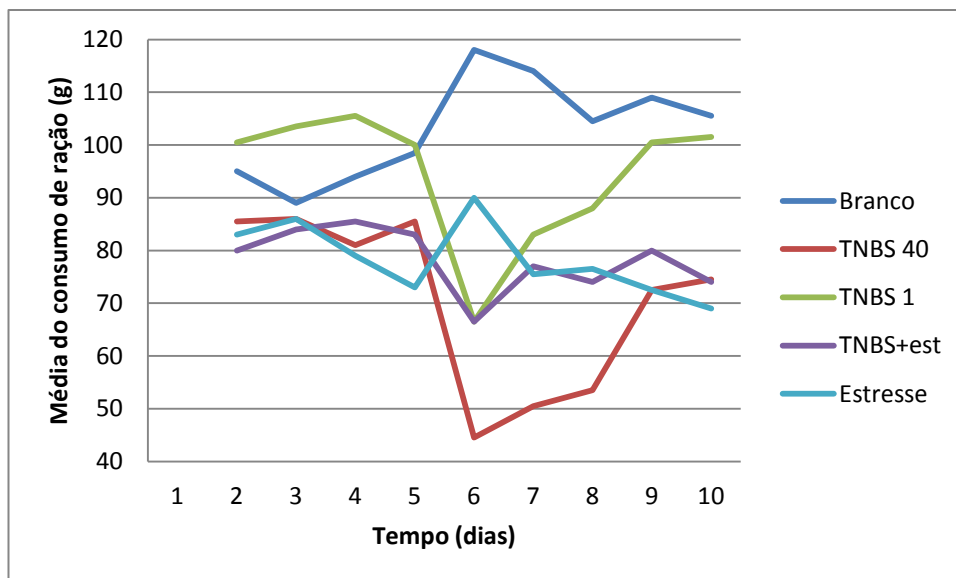


Figura 14: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Dados expressos em consumo (g)/número de animais.

No décimo primeiro dia, os animais foram expostos à última sessão de estresse e logo em seguida foram eutanasiados por decapitação. As adrenais, direita e esquerda, foram retiradas e pesadas. Foi possível fazer, então, a relação peso da adrenal (mg)/peso do animal(g), que pode ser observada nas figuras 15 e 16.

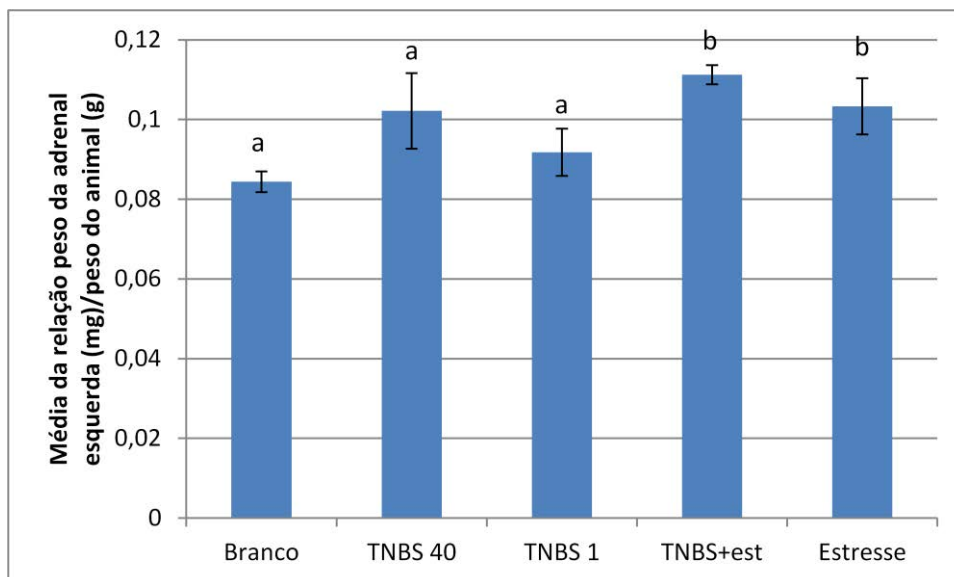


Figura 15: Relação peso da adrenal esquerda/peso do rato, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Comparação feita em relação ao grupo branco. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

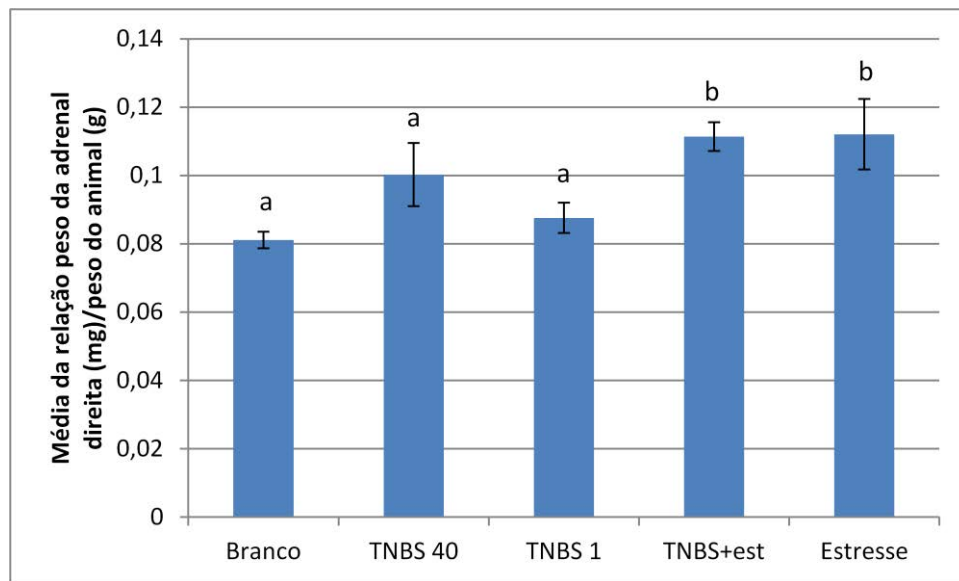


Figura 16: Relação peso da adrenal direita/peso do rato, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção e frio. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Comparação feita em relação ao grupo branco. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

Nota-se que os grupos expostos ao estresse tiveram a relação peso da adrenal/peso do animal significativamente maior do que os outros grupos, devido ao metabolismo aumentado desse órgão, como já foi discutido anteriormente.

Em seguida, o cólon foi retirado e avaliados o escore, a extensão da lesão, a aderência e a relação peso/comprimento do cólon. Também foram observadas a presença ou ausência de diarreia no dia da eutanásia dos animais.

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros macroscópicos da indução do processo inflamatório intestinal e exposição ao estresse por contenção e frio.

Grupo	Escore Macroscópico (0-10 (range)) ^a	Extensão da Lesão (cm) ^b	Relação Peso/comprimento (mg/cm) ^b	Diarreia (%) ^c	Aderência (%) ^c
Branco	0 ^a	0 ^a	103,28±3,78 ^a	0 ^a	0 ^a
TNBS 40	8,5 (8-9) ^b	3,10±0,50 ^b	240,23±41,08 ^b	33,3 ^a	83,8 ^b
TNBS 1	7 (5,75-7) ^b	2,14±0,20 ^b	181,88±20,98 ^b	25 ^a	62,5 ^b
TNBS+est	7 (5-7) ^b	1,97±0,32 ^b	143,29±10,60 ^a	0 ^a	57,14 ^b
Estresse	0 ^a	0 ^a	94,62±3,2 ^a	0 ^a	0 ^a

^aOs valores de escore estão expressos em mediana (intervalo interquartil) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunn, ^bextensão da lesão e relação peso/comprimento estão expressos em média±E.P.M. e foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett, ^cdiarreia e aderência foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$.

Semelhantemente com o observado nas avaliações macroscópicas do experimento anterior, neste os grupos TNBS 1 e TNBS+est ficaram muito semelhantes, exceto na relação peso/comprimento. Surpreendentemente, os parâmetros escore, extensão da lesão, diarreia e aderência ficaram iguais entre os três grupos que receberam o TNBS (Tabela 4).

4.3.2 Dosagem da glicemia

Novamente o perfil do nível glicêmico manteve-se semelhante ao experimento anterior, não mostrando alterações significativas entre os diferentes grupos (Figura 17).

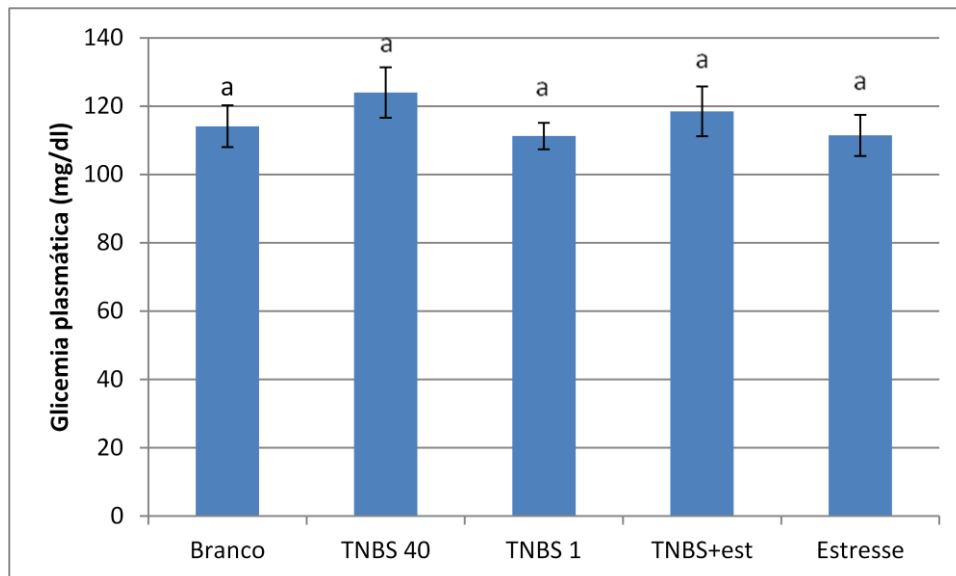


Figura 17: Dosagem do nível glicêmico dos animais submetidos ao modelo experimental de colite e estresse por contenção. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Dados expressos em média±E.P.M. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

4.3.3 Avaliações Bioquímicas

Neste experimento, a atividade da MPO esteve elevada em todos os grupos que receberam a indução do processo inflamatório intestinal. A concentração de 1 mg/ml de TNBS, ao contrário do que se esperava, provocou um processo inflamatório de intensidade semelhante à concentração de 40 mg/ml (Figura 18).

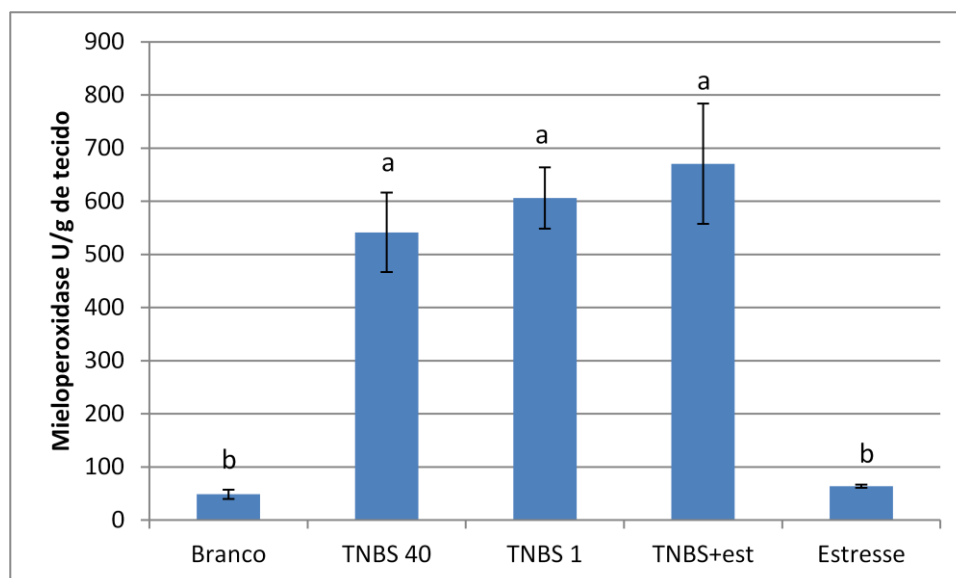


Figura 18: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelos experimental de colite associada ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40.

A dosagem de glutathiona, figura 19, demonstrou que os animais do grupo induzido com TNBS 40 apresentaram uma propensão a depleção nos níveis de glutathiona, enquanto os animais do grupo TNBS 1 ficaram iguais ao grupo Branco. Já os animais do grupo estresse tiveram os níveis de GSH elevados significativamente quando comparados aos outros grupos devido ao sistema de proteção que esse composto fornece ao organismo em situação de estresse (Maher, 2005).

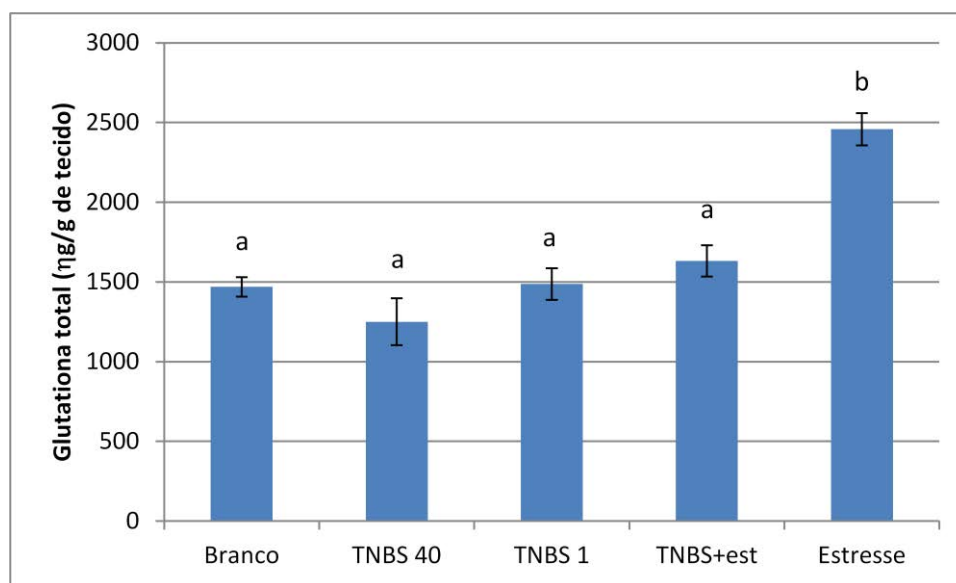


Figura 19: Avaliação dos níveis de glutathiona total (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo TNBS 40.

E, por fim, a dosagem de corticosterona neste experimento mostrou o resultado esperado. Os grupos expostos ao estresse pelo método de contenção e frio tiveram seus níveis de corticosterona circulantes elevados significativamente em relação aos grupos não expostos (Figura 20).

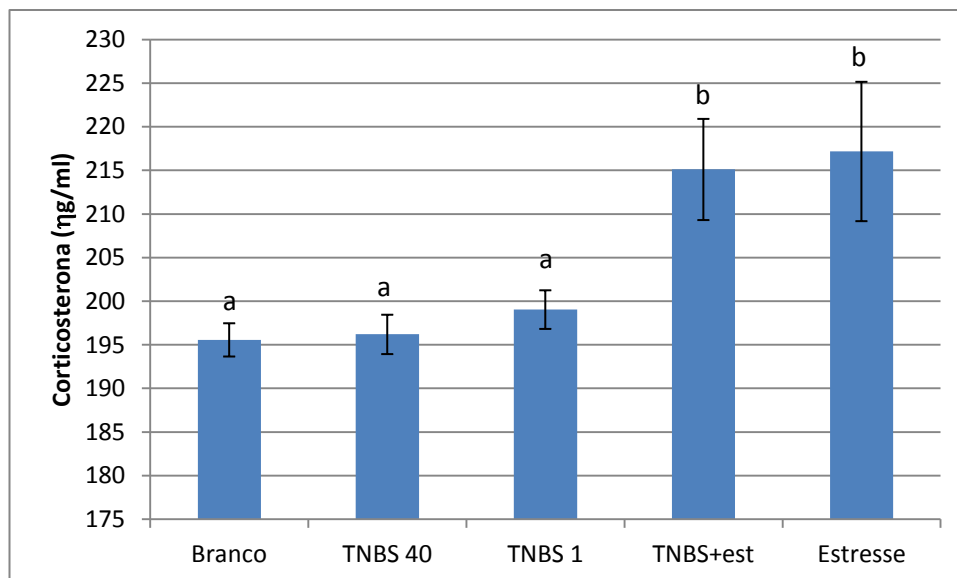


Figura 20: Avaliação dos níveis de corticosterona no soro dos animais submetidos ao modelo experimental de colite associado ao estresse por contenção e frio. Dados expressos em média±E.P.M. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores com letras distintas diferem em $p \leq 0,05$ em relação ao grupo Branco.

Apesar do estresse ter sido eficaz, a avaliação da atividade da MPO dos três grupos TNBS 40, TNBS 1 e TNBS+est mostraram-se elevadas no mesmo nível. Esperava-se que o grupo TNBS 1 tivesse menor atividade da MPO e os outros dois grupos (TNBS 40 e TNBS+est) estivessem com a atividade da enzima elevada. Isso mostraria que apenas a instilação da concentração de 1 mg/ml não seria capaz de induzir tamanha inflamação quanto a administração de 40 mg/ml. Além disso, seria possível verificar a influência do estresse no agravamento do processo inflamatório, o qual supostamente tornaria-se exacerbado a ponto de causar uma lesão semelhante ou maior àquela causada pela maior concentração do hapteno. Uma hipótese para o ocorrido pode ser o fato de que os animais do grupo TNBS 1 fossem mais suscetíveis e por isso desenvolveram tamanha inflamação quando induzidos, mesmo com a baixa concentração do ácido.

Finalmente, apesar das avaliações macroscópicas e bioquímicas de inflamação não terem demonstrado um resultado esperado, o estresse pelo método de contenção e frio foi eficiente e proporcionou o aumento do nível de corticosterona no soro dos animais expostos ao estresse. Além disso, foi possível observar que somente o estresse não foi capaz de desenvolver a DII por si só, sendo este apenas um fator agravante do quadro inflamatório.

Considerando essas possibilidades, um novo estudo deve ser realizado a fim de se refinar as condições do protocolo experimental, como, por exemplo, uma menor concentração de TNBS, bem como uma maior aleatorização dos animais entre os diferentes grupos testados.

5 Conclusão

Com base nos objetivos propostos, foi possível concluir que a menor concentração de TNBS capaz de induzir uma condição subinflamatória no intestino deva ser menor que a de 1 mg/ml de TNBS. Logo, não foi possível determinar a influência do estresse no agravamento da colite, uma vez que o grupo TNBS 1 desenvolveu um processo inflamatório de mesma intensidade que o grupo TNBS 40 e TNBS+est. No entanto, verificou-se que o protocolo de estresse foi eficaz e deve ser mantido para estudos futuros, já que o nível de corticosterona mostrou-se alterado significativamente em relação aos grupos que não passaram pela contenção e frio.

6 Referências Bibliográficas

BENJAMIM E., COICO R., SUNSHINE G. *Imunologia*. 4th ed. Editora Guanabara Koogan S.A.; 2002.

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

BOS, A; WEVER, R.; ROOS, D., 1978. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et biophysica acta*, v. 525, n. 1, p. 37-44.

BURET A.G., How stress induces intestinal hypersensitivity. *American Journal of Pathology*, v. 168, n.1, January 2006.

BUYNITSKY T, MOTOFSKY DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol.33, pp.1089-1098, 2007.

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

COLLINS, S.M., 2001. Stress and the gastrointestinal tract-IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 280, G315–G318.

CÓLON, A.L. *et al.* Stress increases susceptibility to oxidative/nitrosative mucosal damage in a experimental model of colitis in rats. *Digestive diseases and sciences*, v.19, n.10, p.1713-21, 2004.

COSNES, J. *et al.* Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, v. 140, n. 6, p. 1785-1794, maio. 2011.

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

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, v. 115, n. 1, p. 182-205, jul. 1998.

FRACKIEWICZ, E.J., SRAMEK, J.J., CUTLER, N.R., 2000. Gender differences in depression and antidepressant pharmacokinetics and adverse events. *Ann. Pharmacother.* 34, 80–88.

FU J, LIU C, ZHANG Z, XING M, XU S. Influence of inflammatory pathway markers on oxidative stress induced by cold stress in intestine of quails. *Research in Veterinary Science*, 2013.

FUKUDO S., NOMURA T., HONGO M., 1998. Impact of corticotropin-releasing hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *GUT An international Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 42, n. 6, p. 845-859.

GITNICK, G, 1996. Inflammatory bowel disease: a new assessment. *Scand. J. Gastroenterol.* v.31, p. 83-86.

GONÇALVES, C.C.M.; HERNANDES, L.; OLIVEIRA, N.L.B.; NATALI, M.R.M, 2008. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. *Cienc Cuid Saúde.*, v.7, n. 1, p.107-111.

GRAFF LA, Walker JR, Bernstein CN: It's not just about the gut: managing depression and anxiety in inflammatory bowel disease. *Practical Gastroenterology* 2010, 34:11–25.

GÜLPINAR, M.A.; ÖZBEYLI, D.; ARBAK S.; YEGEM B.Ç. Anti-inflammatory effect of acute stress on experimental colitis is mediated by cholecystokinin-B receptors. *Life Sciences*, v.75, p. 77-91, 2004.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, v. 16, p. 33-50, jan. 1996.

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

KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Disease-a-month : DM*, v. 52, n. 5, p. 199-207, maio. 2006.

KATO, Y. et al., 2003. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 67, n. 5, p. 1136-9.

KUDIELKA, B.M., BUSKE-KIRSCHBAU, A., HELLHAMMER, D.H., KIRSCHBAUM, C., 2004. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology* 29, 83–8.

KUKORI T., OHTA A., SHERRIFF-TADANO R., MATSUURA E., TAKASHIMA T., IWAKIRI R., FUJIMOTO K, 2011. Imbalance in the stress-adaptation system in patients with inflammatory bowel disease. *Biological Research for Nursing*, v. 13, n. 4, p. 391-8.

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

LINDGREN, S., LILJA, B., ROSEN, I., SUNDKVIST, G., 1991. Disturbed autonomic nerve function in patients with Crohn's Disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 26, 361– 366.

LINDGREN, S., STEWENIUS, J., SJOLUND, K., LILJA, B., SUNDVIST, G., 1993. Autonomic vagal nerve dysfunction in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 28, 638– 642.

MAHER P. The effects os stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, v. 4, p. 288-314, 2005.

MAMULA, P., MARKOWITZ, J.E., BALDASSANO, R.N., KIRSCHNER, B.S., RICH, B.H., 2008. Puberty and pediatric-onset inflammatory bowel disease. In: *Pediatric Inflammatory Bowel Disease*, Springer US, pp. 133—142.

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

MENDES, F.R. Modelos animais para avaliação de plantas adaptógenas. In: CARLINI E.A. Protocolos em psicofarmacologia comportamental. Um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011. p. 323-335.

MOLODECKY, N. A et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, v. 142, n. 1, p. 46-54, jan. 2012.

MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, v.96, p.795-803, 1989.

MURRAY CD: Psychogenic factors in the etiology of ulcerative colitis and bloody diarrhea. *Am J Med Sci* 1930, 180:239–247.

NAKAMUTA, M. et al. High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism. *Hepatology*, v. 18, n. 6, p. 1377-1383, 1993.

NOBLE, R.E., 2005. Depression in women. *Metabolism* 54, 49–52.

OBERG, G. et al. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. *British Journal of Haematology*, v. 55, n. 4, p. 701-708, 1983.

ONKEN, J. E. Is colorectal cancer surveillance cost-effective in patients with ulcerative colitis? *Inflammatory bowel diseases*, v. 14 Suppl 2, p. S196-7, out. 2008.

QIU B.S., VALLANCE B.A., BLENNERHASSETT P.A.& COLLINS S.M., The role of CD4⁺ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nature Medicine*, v. 5, n. 10, October 1999.

REBER, S.O. Stress and animal models of inflammatory bowel disease – An update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, v.37, p. 1-19, may 2011.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences*, v. 84, n. 21-22, p. 705-12, 22 maio. 2009.

SAPOLSKY RM, ROMERO M & MUNCK AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *End Rev.* 2000; 21(1), 55–89.

SCHOULTZ et al., Assessment of causal link between psychological factors and symptom exacerbation in inflammatory bowel disease: a protocol for systematic review of prospective cohort studies. *Systematic Reviews*, v. 2, n. 8, 2013.

SELYE, H. “Studies on Adaptation”. *Endocrinology*, Springfield, vol. 21, 1937, pp. 169-188.

SINGH, V. P.; PATIL, C.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. *Prostaglandins & others Lipid Mediators.*, v.71, p.163-175, 2003.

SODERHOLM JD, YATES DA, GAREAU MG, YANG PC, MACQUEEN G, PERDUE MH: Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1257–G1263, 2002.

SOLOMON, M.B., HERMAN, J.P., 2009. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. *Physiol. Behav.* 97, 250–258.

STROBER, W.; LUDVIKSSON, B.R.; FUSS, I.J. The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. *Annals of Internal Medicine.*, v.128, n.10, 1998.

ULRICH-LAI Y.M., FIGUEIREDO H.F., OSTRANDER M.M.,CHOI D.C., ENGELAND W.C., HERMAN J.P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Endocrinology and Metabolism*, 291, 965-973, 2006.

VICTORIA, C.; SASSAK, L.; NUNES, H. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 46, n. 1, p. 20-25, 2009.

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

WILSON LM, BALDWIN AL: Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation* 6:189–198, 1999

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.

YANG, G.Y., TABOADA, S., LIAO, J., 2009. Inflammatory bowel disease: a model of chronic inflammation-induced cancer. *Methods Mol. Biol.* (Clifton, NJ) 511, 193—233.

YOUNG, E.A., 1998. Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. *J. Gend. Specif. Med.* 1, 21–27.

ZAIDI SM, KASHIF R, AL-QIRIM TM, BANU N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R D.* 2005;6: 157–165.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **493-CEUA**, sobre "Avaliação da influência do estresse em modelo experimental de colite por administração de TNBS em concentração subinflamatória", sob a responsabilidade de **Luiz Cláudio Di Stasi**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 21 de junho de 2013.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA