

ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Cely Cristina Martins Gonçalves *
Luzmarina Hernandez **
Nelson Luiz Batista de Oliveira ***
Maria Raquel Marçal Natali ****

RESUMO

Modelos experimentais de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) fornecem informações consideráveis sobre a patogênese dessas doenças e representam importante ferramenta na pesquisa de novas estratégias de tratamento. A Doença de Crohn (DC) é uma condição inflamatória crônica e idiopática do trato gastrointestinal, que acarreta alterações funcionais e estruturais do Sistema Nervoso Entérico (SNE) e para a qual as opções terapêuticas são limitadas. A utilização de produtos naturais como terapia alternativa para a DC tem sido intensivamente investigada em modelos animais de DII. Esta revisão sumariza as principais anormalidades estruturais encontradas no SNE humano na DC e no modelo animal de DC quimicamente induzida, bem como os efeitos de produtos naturais sobre o processo inflamatório. A pesquisa bibliográfica de caráter descritivo abrange um período de dez anos e foi realizada por meio de consulta da fonte de dados impressos e informatizados do banco de dados da Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde e do Caribe (LILACS) e no National Library of Medicine (MEDLINE), disponibilizados em suporte eletrônico. Também foram utilizados livros técnicos.

Palavras-chave: Terapias alternativas. Sistema nervoso entérico. Inflamação.

INTRODUÇÃO

A doença de Crohn é uma forma grave de doença inflamatória intestinal (DII) idiopática, crônica, transmural, granulomatosa, que representa um problema de saúde pública mundial, e acarreta alterações funcionais e estruturais, de caráter provisório ou permanente, do trato gastrointestinal (TGI). Interfere na atividade motora e secretora deste sistema e provoca sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e cólicas. Também apresenta potencial para complicações sistêmicas e extra-intestinais⁽¹⁾.

Foi primeiramente descrita por Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), porém é assim denominada por ter sido Burrill Bernard Crohn, um gastroenterologista americano que, em 1932, descreveu 40 casos da doença caracterizando-a como “ileíte terminal”, sendo posteriormente descrita como “ileíte regional”.

A doença acomete uma crescente parcela da população jovem, entre 15 e 30 anos, causando elevada morbidade. Afeta predominantemente indivíduos da raça branca, particularmente os judeus, sendo que a proporção entre os sexos é a mesma. A prevalência mundial da DC vem aumentando desde a segunda metade do século XX. Sua incidência varia em diferentes regiões, sendo alta nos Estados Unidos, países escandinavos e norte da Europa. Na Ásia e na América do Sul, as taxas de incidência são menores⁽²⁾.

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos básicos da inflamação e da patogênese, a causa da DC permanece desconhecida. Nas últimas décadas, a pesquisa de dados de pacientes e o estudo em modelos animais de inflamação intestinal sugerem a participação de fatores imunológicos, genéticos e ambientais^(1,2).

* Enfermeira. Doutoranda em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Docente do Departamento de Enfermagem da UEM.

** Bióloga. Doutora em Biologia Celular e Tecidual. Docente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM.

*** Enfermeiro. Doutor em Enfermagem em Saúde do Adulto. Docente do Departamento de Enfermagem da UEM.

**** Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas. Docente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM.

A hipótese mais amplamente sustentada de sua etiologia é que uma complexa interrupção na homeostasia do microambiente na mucosa intestinal originária, em indivíduos geneticamente predispostos, uma resposta imune agressiva (células T) contra um subgrupo de bactérias entéricas comensais. Este desequilíbrio seria desencadeado por fatores ambientais⁽³⁾.

DESENVOLVIMENTO

Histopatologia da Doença de Crohn

A Doença de Crohn tem caráter recorrente e, embora possa atingir qualquer segmento (da boca ao ânus), o íleo terminal e o cólon são mais comumente comprometidos⁽¹⁾.

As lesões na DC são tipicamente segmentares, bem demarcadas e apresentam áreas lesadas intercaladas com segmentos normais. A inflamação pode penetrar em toda a espessura da parede intestinal com envolvimento da muscular própria e externa, resultando em fissuras profundas levando à formação de fístulas⁽⁴⁾.

A análise histológica dos tecidos, obtidos de indivíduos com DC ativa, revela um grande infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), monócitos e linfócitos no interstício colônico coincidente com extensiva lesão transmural, incluindo edema, perda das células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia das células da cripta, erosões e ulcerações⁽⁵⁾. Nas áreas de mucosa mais preservada, observa-se hiperplasia de células caliciformes, hiperprodução de muco e alteração da arquitetura vilositária. A progressão da doença pode levar ao espessamento da parede intestinal com fibrose, sendo que o segmento comprometido se torna rígido e estreitado. Os granulomas podem formar-se e surgir vasculite associada a eles⁽⁴⁾.

O SNE tem um papel efetivo na coordenação das funções gastrointestinais; não é de surpreender que alterações neste sistema possam contribuir, pelo menos em parte, para os distúrbios observados nas DII. A participação deste sistema na patogênese das DII foi postulada, pela primeira vez, por Storsen et al. em 1953⁽⁶⁾.

As principais alterações estruturais do SNE são mais comumente encontradas na DC do que em outras doenças inflamatórias

intestinais, porém são inespecíficas e incluem variações na arquitetura dos plexos, hipertrofia e hiperplasia nos corpos celulares neuronais e células gliais entéricas, além de alterações no conteúdo dos neuropeptídeos⁽⁷⁾.

As alterações axonais características na DC não são limitadas às áreas de inflamação, podendo ser observadas concomitantemente em áreas afetadas e não-afetadas, sendo difusas e extensas⁽⁷⁾. Em relação ao conteúdo de neuropeptídeos, estudos demonstram aumento relativo nos neurônios óxido nítrico sintetase positivos (NOS), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) no plexo submucoso e mioentérico e poderiam justificar o persistente relaxamento da musculatura lisa dos segmentos afetados⁽⁸⁾.

A participação efetiva do óxido nítrico nos processos de lesões neuronais, provocadas por inflamação e desencadeamento de morte celular neuronal, tem sido indicada⁽⁹⁾.

O estudo do SNE, em modelos animais de DC, demonstra perda significativa e irreversível de neurônios, correlacionada ao aparecimento de neutrófilos na região lesada, sugerindo que os eventos iniciais do processo inflamatório seriam os responsáveis pela perda de neurônios nos plexo submucoso e mioentérico⁽¹⁰⁻¹²⁾. A hiperplasia das células da musculatura lisa e conseqüente aumento na espessura da túnica muscular, com manutenção da densidade dos axônios entre estas células durante e após a inflamação, sugerem que uma rápida proliferação axonal ocorre no colo inflamado e ainda um grau desconhecido de lesão nos axônios sobreviventes⁽¹⁰⁾.

Aumento nos neurônios VIP - imunorreativos⁽¹²⁾ e prejuízo global da atividade propulsiva colônica associada com lesão e perda neuronal também foram constatados em modelos animais da DC⁽¹¹⁾.

Alternativas terapêuticas em modelo de DC experimental

O tratamento na DC não é específico e são utilizadas drogas como corticosteróides, aminossalicilatos, imunomoduladores, e antibióticos, estas, no entanto, possibilitam a remissão das crises, mas não a cura da doença. Além disso, apesar do uso intensivo dessas

drogas, 60 a 70% dos indivíduos necessitarão de intervenção cirúrgica em decorrência de complicações da doença e, destes, 50% necessitarão de cirurgia subsequente⁽¹⁾.

Os modelos murinos tradicionais desenvolvidos para o estudo da doença de Crohn usam indução química, a transferência de células imunes, ou manipulação genética. Modelos da DC, quimicamente induzidos, incluem o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), dextran sulfato de sódio (DSS) e oxalazone. Estes modelos são particularmente úteis no estudo das vias bioquímicas do processo inflamatório e na comprovação de novas estratégias terapêuticas⁽¹³⁾.

A indução química da inflamação, em modelos animais de DII, é feita por meio da administração de agente químico exógeno. Modelo amplamente utilizado para o estudo da DC é a indução com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Este modelo foi desenvolvido por Morris et al⁽¹⁴⁾, o qual se baseou na hipótese de que, na doença de Crohn, um aumento na permeabilidade da mucosa resulta na entrada de um antígeno luminal, na lâmina própria, que não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico da mucosa. Utilizaram uma solução contendo etanol (um “rompedor de barreira”) e o ácido TNBS, um hapteno, que ao se associar com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, são capazes de desencadear uma resposta imunológica.

A administração combinada do etanol e o ácido TNBS resultaram no desenvolvimento de inflamação severa transmural e granulomatosa do colo distal, com a ulceração da mucosa colônica persistindo por oito semanas.

O estabelecimento do modelo é realizado por diversos procedimentos: a observação de sinais característicos da DC experimental em ratos, (presença de diarreia sanguinolenta, queda do pêlo e da vitalidade dos animais) e a utilização de escala com escores para a avaliação macroscópica e histológica da lesão colônica e quantificação da inflamação por métodos bioquímicos.

A quantificação da inflamação é realizada por meio da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima presente principalmente nos grânulos azurófilos dos

neutrófilos e em concentrações muito inferiores nos monócitos e macrófagos. É um marcador bioquímico para a infiltração de neutrófilos e inflamação no tecido danificado. O nível da atividade da MPO é diretamente proporcional à concentração de neutrófilos no tecido inflamado⁽¹⁵⁾.

Esses modelos animais de DC apresentaram manifestações clínicas semelhantes às aquelas observadas em humanos. Nestes, alternativas terapêuticas para as DII têm sido intensamente investigadas, destacando-se a pesquisa de diversos produtos naturais.

A *Zataria multiflora* Bois, planta da família Labiatae, própria da região do Pasquitão, Iraque e Irã, é muito utilizada na medicina popular como anti-séptico, anestésico e antiespasmódico. Os benefícios da utilização do extrato total desta planta foram estudados em modelo animal de colite quimicamente induzida. A análise dos dados macroscópicos, histológicos e bioquímicos (atividade da mieloperoxidase-MPO e substâncias reativas ao ácido barbitúrico-TBARS) demonstraram que este extrato exerce efeito protetor e de resolução da colite comparável aos da prednisolona, utilizada como droga padrão⁽¹⁶⁾.

O resveratrol, composto polifenólico encontrado na casca da uva vermelha e no vinho, reduziu a lesão no tecido colônico, suprimiu o dano oxidativo e estimulou a apoptose dos macrófagos⁽¹⁷⁾; o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) mostrou efeito protetor no colo dos animais previamente tratados, reduzindo os danos teciduais⁽¹⁸⁾; o curcumim, obtido da *Curcuma longa* apresentou efeito preventivo e melhora da colite nos animais tratados, graças às suas propriedades antitumorais, antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras⁽¹⁹⁾; a aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* fr.all) exerceu efeito anti-inflamatório e antiulcerogênico no tecido colônico⁽²⁰⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu constatar que, dentre os modelos de DC quimicamente induzida, o mais utilizado para o estudo de alterações no SNE e de novas alternativas terapêuticas foi aquele induzido pelo ácido TNBS. Os animais mais utilizados foram ratos albinos (*Rattus*

norvegicus, linhagem Wistar) e ratos Sprague-Dawley.

Muito embora seja conhecido que lesões neuronais ocorram em modelos animais de DII e apesar dos diversos modelos que têm sido desenvolvidos, os efeitos da inflamação sobre as estruturas nervosas e do SNE são pouco estudados nestes modelos. A maioria dos protocolos dirige maior atenção às características inflamatórias, e o estudo próprio do SNE não é incluído na avaliação dos espécimes.

A DC induzida pelo ácido TNBS, em animais, fornece um modelo relativamente simples e reprodutível e, apesar de esse modelo não ser réplica exata da DC, apresenta um curso similar à doença humana, permitindo a compreensão de eventos associados à patogênese e, portanto, sendo útil em investigações clínicas para o desenvolvimento e o teste de novos agentes terapêuticos.

THERAPEUTICAL ALTERNATIVES IN EXPERIMENTAL MODELS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ABSTRACT

Experimental models of inflammatory bowel disease (IBD) supply considerable information on the pathogenesis of this illness and represent an important tool in testing new strategies of treatment. Crohn's disease (CD) is an idiopathic, chronic inflammatory condition of the intestinal tract that causes structural and functional changes in the enteric nervous system (ENS), and for which therapeutics options are limited. The use of natural products as alternative therapy for CD has been intensively investigated in animal models of IBD. This review summarizes the major structural abnormalities of the ENS in animal models of Crohn's disease and the effects of natural products in the inflammatory process. The bibliographical research, of descriptive character, comprises a period of 10 years and was carried through consultation of printed materials and the database of *Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde e do Caribe* (LILACS) and in the National Library of Medicine (MEDLINE), displayed in electronic support. Books have also been used.

Key words: Alternative therapies. Enteric nervous system. Inflammation.

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

RESUMEN

Los modelos experimentales de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) fornecen informaciones considerables sobre la patogénesis de esas enfermedades y representan una importante herramienta en la pesquisa de nuevas estrategias de tratamiento. La Enfermedad de Crohn (EC) es una condición inflamatoria crónica e idiopática del trato gastrointestinal, que provoca alteraciones funcionales y estructurales del Sistema Nervioso Entérico (SNE) y para la cual las opciones terapéuticas son limitadas. La utilización de productos naturales como terapia alternativa para la EC ha sido intensamente investigada en modelos animales de EII. Esta revisión presenta las principales anomalías estructurales encontradas en el SNE humano, en la EC y en modelo animal de EC químicamente inducida, así como los efectos de productos naturales sobre el proceso inflamatorio. La investigación bibliográfica de carácter descriptivo incluye un período de 10 años y fue realizada a través de consulta de la fuente de datos impresos e informatizados de la base de datos de la *Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde e do Caribe* (LILACS) y en la *National Library of Medicine* (MEDLINE), disponibles en ayuda electrónica. También fueron utilizados libros técnicos.

Palabras Clave: Terapias alternativas. Sistema nervioso entérico. Inflamación.

REFERÊNCIAS

1. Judge TA, Lichtenstein GR. **Inflammatory bowel disease**. In: _____. Scott L, Friedman, Kenneth R, McQuaid, James H, Grendell (coord.). Current Diagnosis & Treatment in Gastroenterology. 2.ed. Estados Unidos: McGraw-Hill, 2002. p. 867. cap.7: 108-130.
2. Loftus, EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
3. Balfour SR. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and colitis ulcerative. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 July;3(7):390-407.
4. Bogliolo L. *Patologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
5. Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115:182-205.
6. Shanahan F. Enteric neuropathophysiology and inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil*. 1998;10:185-7.
7. Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil*. 1998;10:189-202.
8. Geboes K. Immunopathological studies on the small intestinal intramural nervous system and of intramural vessels in Crohn's disease. *Verh Acad Geneeskd Belg*. 1993;55:267-303.
9. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the badly, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-1437.
10. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol*. 1999;155(4):1051-7.
11. Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, et al. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosci*. 2005, 117(1):41-53.
12. Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, et al. Indiscriminate loss of myenteric neurons in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2005;17:751-60.
13. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med*. 2003 May;9(5):218-22.
14. Morris GP, Bech PL, Herridge M.S, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96:795-803.
15. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*. 1984;87:1344-50.
16. Nakai LA, Mohammadirad A, Yasa N, Minae B, Nikfar S, Ghazanfari G, et al. Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(1):43-50.
17. Martín RA, Villegas I, Casa LC, Lastra CA. Resveratrol: a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*. 2004;67:1399-10.
18. Paiva LAF, Gurgel, LA, Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, et al. Protective effect of *Copaiba langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004;93:51-6.
19. Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, et al. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology*. 2002;123:1912-22.
20. Rodrigues LV, Ferreira FV, Regadas FSP, Matos D, Viana GSB. Acta morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira do Sertão). *Phytother Res*. 2002;16:267-72.

Endereço para correspondência: Cely Cristina Martins Gonçalves. Rua Quintino Bocaiúva, 1154, Apto 61. Zona 7. CEP: 87020-160. Maringá-PR. E-mail: ccmgoncalves@uem.br.

Recebido: 30/09/2007

Aprovado: 30/03/2008