

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**O EFEITO PROTETOR DA GLUTAMINA NA COLITE  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

*Henrique Sarubbi Fillmann*

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**O EFEITO PROTETOR DA GLUTAMINA NA COLITE EXPERIMENTAL  
INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

**HENRIQUE SARUBBI FILLMANN**

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Norma Possa Marroni

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. Susana Llesuy

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul. Requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Biológicas – Fisiologia.*

Porto Alegre

2007

*Para aprender é preciso passar por situações emocionantes. Para isso é preciso tirar as pessoas de suas rotinas físicas e mentais. Não aprendemos nada dentro de nossas "zonas de conforto", sentados todos os dias, no mesmo lugar, na mesma mesa, fazendo a mesma coisa, onde tudo é previsível. Na "zona de aprendizado" há uma dose de desconforto e as emoções são intensificadas."*

**Ernest Shackleton**

**À Paula**

Por estar sempre comigo.

### ***Agradecimento***

À professora **Norma**, pela confiança e incentivo ao longo deste trabalho; mas, acima de tudo, pelo valoroso exemplo de dedicação e de incansável disposição nesta orientação.

***Agradecimento***

Aos meus pais Érico e Consuelo e ao meu irmão  
Lúcio pelo permanente apoio e carinho

## Agradecimentos

- Ao meu amigo **Nélson Alexandre Kretzmann Filho**. Tornou este trabalho possível graças à sua enorme competência e permanente disponibilidade. Grande amigo esteve sempre presente auxiliando em todas as etapas desta tese.
- Aos professores **Alexandre Dias** e **Marilene Garrido** pelo exemplo, apoio e incentivo.
- Aos amigos do laboratório. Todos, sem exceção, em algum momento foram essenciais em alguma etapa da execução deste trabalho.
- **Dr. Cláudio Marroni**, pelas incansáveis revisões e exemplo.
- Ao Laboratório KCM, na pessoa da **Dra. Lúcia Maria Kliemann** pelo apoio na realização de uma etapa deste trabalho.
- À minha co-orientadora professora **Susana Llesuy** pela orientação, ajuda e incentivo.
- Aos professores e funcionários do curso de pós-graduação nas pessoas da Profa. **Ilma Simoni Brum da Silva** e das secretárias **Alice** e **Fabiana**.

**TRABALHO REALIZADO NO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE.  
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA DIGESTIVA DO DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.**



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - Colite.....	<b>2</b>
1.2 - Colite Experimental.....	<b>4</b>
1.3 - Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	<b>6</b>
1.3.1 - Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) e Radicais Livres.....	<b>6</b>
1.3.2 - Defesas Antioxidantes .....	<b>10</b>
1.3.2.1 - Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	<b>12</b>
1.3.2.2 - Defesas Antioxidantes não Enzimáticas.....	<b>13</b>
1.4 - Colite e Estresse Oxidativo.....	<b>14</b>
1.5 - Glutamina.....	<b>16</b>
1.6 - Glutamina e Estresse Oxidativo.....	<b>17</b>
1.7 - Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta (NF-KB).....	<b>18</b>
1.8 - Estresse Oxidativo e Fator de Transcrição Nuclear.....	<b>20</b>
1.9 - Estresse Oxidativo e a Óxido Nítrico Sintase Induzível.....	<b>21</b>
1.10 - Colite e Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta	<b>22</b>
1.11 - Colite e Óxido Nítrico.....	<b>23</b>
1.11.1 - Musculatura Anal Esfincteriana e o Óxido Nítrico.....	<b>24</b>
1.12 - Cicloxigenase.....	<b>27</b>
1.12.1 - Cicloxigenase e colite	<b>28</b>
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 - Geral.....	<b>30</b>
2.2 - Específicos .....	<b>30</b>
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 - Delineamento da Pesquisa.....	<b>32</b>
3.2 - Animais.....	<b>32</b>
3.3 - Delineamento Experimental.....	<b>33</b>
3.4 - Análise Histológica.....	<b>33</b>

3.5 - Medida da Pressão Esfincteriana.....	35
3.6 - Determinação do Estresse Oxidativo.....	35
3.6.1 - Preparação do Homogeneizado a Fresco.....	35
3.6.2 - Proteínas.....	36
3.6.3 - Avaliação da Lipoperoxidação.....	36
3.6.3.1 - Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico.....	36
3.6.3.2 - Quimiluminescência.....	37
3.7 - Glutathione Peroxidase.....	38
3.8 - Preparação dos Extratos Nucleares.....	39
3.9 - Preparação dos Extratos Citoplasmáticos.....	39
3.10 - Expressão Protéica.....	39
3.11 - Morte Dos Animais.....	41
3.12 - Análise estatística.....	41
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 - Estudo Histológico.....	42
4.2 - Medida da Pressão Anal Esfincteriana.....	44
4.3 - Determinação do Estresse Oxidativo.....	45
4.4 - Atividade da Enzima Antioxidante Glutathione Peroxidase.....	47
4.5 - Expressão da Subunidade p65 do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B	48
4.6 - Níveis Citoplasmáticos do IKB.....	49
4.7 - Níveis Citoplasmáticos do IKK.....	50
4.8 - Expressão da Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível.....	51
4.9 - Expressão da Cicloxigenase 2 (COX-2).....	52
<b>5 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ARTIGOS PUBLICADOS</b>	

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Patogênese da colite.....	<b>04</b>
<b>Figura 2</b>	Produção das espécies ativas de oxigênio.....	<b>06</b>
<b>Figura 3</b>	O oxigênio na lesão celular.....	<b>07</b>
<b>Figura 4</b>	Respiração mitocondrial.....	<b>08</b>
<b>Figura 5</b>	Interação entre enzimas antioxidantes.....	<b>13</b>
<b>Figura 6</b>	Ativação do NF-KB.....	<b>20</b>
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografia do intestino grosso de um animal controle.....	<b>42</b>
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia do intestino grosso de um animal colite.....	<b>43</b>
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografia (colite e glutamina).....	<b>43</b>
<b>Figura 10</b>	Medidas das pressões anais esfinterianas.....	<b>45</b>
<b>Figura 11</b>	Determinação do estresse oxidativo, TBARS.....	<b>46</b>
<b>Figura 12</b>	Determinação do estresse oxidativo, QL.....	<b>47</b>
<b>Figura 13</b>	Atividade da enzima glutathiona peroxidase.....	<b>48</b>
<b>Figura 14</b>	Expressão do NF-KB (p65).....	<b>49</b>
<b>Figura 15</b>	Expressão inibidor kappa beta (IKB).....	<b>50</b>
<b>Figura 16</b>	Expressão dos níveis de IKK.....	<b>51</b>
<b>Figura 17</b>	Expressão da óxido nítrico sintase induzível.....	<b>52</b>
<b>Figura 18</b>	Expressão da cicloxigenase-2.....	<b>53</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Modelos experimentais de colite.....	<b>05</b>
<b>Tabela 2</b>	Índices macroscópicos de colite.....	<b>34</b>
<b>Tabela 3</b>	Índices microscópicos de colite.....	<b>35</b>
<b>Tabela 4</b>	Resultados da histologia.....	<b>44</b>

## Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
Ca <sup>++</sup>	Cálcio iônico
CAT	Catalase
CPS	Contas por Segundo
CL	Colite
CO	Controle
COX	Cicloxygenase
CP	Criptas
cNOS	Óxido Nítrico Síntase Constitutiva
DII	Doença Intestinal Inflamatória
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
EG	Epitélio Glandular
EP	Erro Padrão
Fe	Ferro
NF-KB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta
GL+CL	Grupo colite que recebeu Glutamina
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona
GSSH	Glutaciona Oxidada
HE	Hematoxilina e Eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IF	Infiltrado Inflamatório
IgA	Imunoglobulina A
IKB	Inibidor kappa beta
IKK	Inibidor do IKB
IL(1,2,6,8,12)	Interleucinas
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
LP	Lâmina Própria
LPO	Lipoperoxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Muscular Circular

mg	Miligrama
M	Molaridade
Min	Minutos
mL	Mililitros
ML	Muscular Longitudinal
MEI	Músculo Esfíncter Anal Interno
MM	Muscular da Mucosa
mRNA	Ácido Ribonucléico (mensageiro)
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NANC	Não Adrenérgico e Não Colinérgico
NO	Óxido Nítrico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
OH	Radical Hidroxil
O <sub>2</sub> •	Radical Superóxido
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	Polimorfonucleares
Prot	Proteína
QL	Quimiluminescência
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
RL	Radicais Livres
<b>ROH</b>	Redução do Hidroperóxido
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
t-BOOH	Hidróxido de tert-butila
TCA	Ácido Tricloroacético
TNBS	Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VCAM	Molécula de Adesão Vascular
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
°C	Grau Celsius

## **RESUMO**

---

Foram investigados os efeitos da glutamina sobre marcadores de estresse oxidativo, ativação do fator de transcrição nuclear Kappa Beta e mediadores pró-inflamatórios em um modelo de colite experimental induzida por ácido acético em ratos Wistar. A glutamina (25 mg / Kg), foi administrada via retal 48 e 24 horas antes da instilação de ácido acético. A Glutamina reduziu significativamente os escores de dano histológico e preveniu parcialmente a diminuição das pressões anais esfinterianas nos animais que receberam ácido acético. Os valores da lipoperoxidação medidos por TBARS e quimiluminescência foram significativamente inferiores no grupo que recebeu glutamina profilática em comparação ao grupo colite. A instilação de ácido acético induziu a um aumento significativo na expressão do NF-KB no núcleo, o que resultou em alterações nas concentrações citosólicas do IKK e da forma não fosforilada do inibidor IKB. A expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e da cicloxigenase-2 (COX-2) estão significativamente aumentados. Todos estes efeitos foram parcialmente prevenidos pela administração de glutamina. Concluiu - se que a atividade antiinflamatória da glutamina no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos deve-se, pelo menos em parte, pela inibição da expressão de certos mediadores pró - inflamatórios que são regulados pela rota de transcrição do NF-KB.

## **1 - INTRODUÇÃO**

---

O intestino grosso é o segmento do trato gastrintestinal localizado entre o íleo e o canal anal. Inicia-se no ceco que contém a válvula íleo-cecal e o apêndice cecal. Progredir craniamente como cólon ascendente em direção ao fígado, onde angula medialmente formando o ângulo hepático. Desloca-se para a esquerda como cólon transversal até a localização do baço, onde angula novamente no sentido caudal para formar o cólon descendente e sigmóide. Na porção final do cólon sigmóide tem-se uma alteração da camada muscular e uma dilatação do intestino grosso para formar o reto. Este último termina no canal anal (GARDNER, 1980; BURLEIGH *et al.*, 1992).

Histologicamente, o intestino grosso não difere muito do restante do trato gastrintestinal. Apresenta uma camada mucosa com glândulas, uma submucosa com vasos e duas camadas musculares. A camada muscular interna é circular, e a externa é longitudinal. A musculatura longitudinal apresenta uma formação característica a partir do ceco, dispondo-se em três agregados musculares que percorrem todo o intestino grosso, fundindo-se no reto, para novamente formar uma única camada muscular longitudinal. A este agregado muscular dá-se o nome de ténia (HAM & CORMACK 1978; ETTARH & CARR, 1997).

Sob o ponto de vista fisiológico, o intestino grosso é responsável pela formação e transporte das fezes, absorção de água e pelo metabolismo da uréia, amônia e de determinados hormônios e algumas vitaminas. Apresenta, ainda, movimentos segmentares e de propulsão (GANONG, 1995).



Assim como o restante do trato gastrointestinal, o intestino grosso também pode ser acometido por inúmeras doenças. Entre elas, destacamos a colite, enfermidade inflamatória que compromete principalmente a mucosa e que pode ser causada por agentes infecciosos, inflamatórios, tóxicos, medicamentosos e auto-imunes (DUTHIE, 1993).

Estudos prévios, realizados no Laboratório de Fisiologia Digestiva e Estresse Oxidativo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, demonstraram significativas alterações de caráter inflamatório no intestino grosso dos animais estudados. Observou-se aumento da lipoperoxidação e dos níveis de óxido nítrico no homogeneizado da mucosa do intestino grosso distal desses animais, sugerindo a presença de processo inflamatório no local. Cortes histológicos dos segmentos demonstraram importante infiltrado inflamatório com a presença de neutrófilos na mucosa e submucosa. A análise histológica encontrou semelhança entre o canal anal desses animais e o de humanos (FILLMANN *et al*, 2002). Observou-se também um infiltrado neutrofílico demonstrando a presença de colite no intestino grosso dos animais diabéticos (FILLMANN *et al*, 2002).

### 1.1 - Colite

O ambiente da mucosa intestinal é uma mistura complexa de antígenos da dieta, flora bacteriana normal, produtos do metabolismo bacteriano e patógenos potenciais. É essencial, portanto, que o sistema imunológico seja capaz de discriminar a presença de cada um desses estímulos, prevenindo a entrada excessiva de agentes patogênicos através da mucosa; enquanto, ao mesmo tempo, mantém em estado irresponsivo para evitar uma resposta aos materiais antigênicos complexos, porém inofensivos, que atravessam a mucosa (BERN *et al.*, 1989). O sistema imunológico adquire essa função através de mecanismos altamente regulados e especializados que incluem imunoglobulinas (IgA) especializadas, tipos especiais de células T diferenciadas e um padrão de circulação que se dirige, essencialmente, para uma resposta imune da mucosa (NIVATHVONGS *et al*, 1992).

O processo inflamatório pode ser dividido nas fases de iniciação, amplificação e cicatrização, embora, na maioria das vezes, essas fases ocorram todas ao mesmo tempo e não isoladamente. Existem dois grandes caminhos pelos quais o sistema imune poderia mediar a lesão da mucosa durante a fase de iniciação da colite. Diretamente, através de uma ação auto-imune contra o epitélio intestinal e, indiretamente, por uma ação não-auto-imune de hiperativação das células T, através de uma lesão causada por um elemento local não-agressor (PÓVOA FILHO, 1995; PANÈS & GRANGER, 1996).

A doença intestinal inflamatória idiopática (DII) compreende um espectro de doenças que se caracterizam por uma inflamação crônica do trato gastrintestinal sem uma causa ou patógeno específico. Incluída nessa classificação está a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) que envolve exclusivamente o cólon e o reto, caracterizando-se por um infiltrado celular inflamatório mononuclear superficial na mucosa e pela presença de úlceras superficiais. A outra forma bem conhecida de apresentação da DII é a Doença de Crohn que pode afetar qualquer segmento do trato gastrintestinal. Essa doença se caracteriza por um processo inflamatório focal, transmural e freqüentemente granulomatoso, que pode resultar no aparecimento de fístulas, perfurações e estenoses.

A retocolite ulcerativa, que tem sua etiologia desconhecida, é caracterizada por ulcerações da mucosa, infiltrado inflamatório na submucosa e eventuais manifestações extra-intestinais (SINGLETON, 2005). A colite pode estar relacionada com fatores ambientais, dietéticos, genéticos e da resposta imune (SINGLETON, 2005) (**Figura 1**).

O estudo da retocolite ulcerativa é importante pela sua maior e crescente incidência em jovens nos últimos anos, pela sua cronificação e malignização (CHAMBERS *et al.*, 2005).



**Figura 1** – Interação entre os fatores que contribuem para a patogênese da colite. Adaptado de Shanahan & Targan (SHANAHAN . & TARGAN , 1995).

A etiologia dessas duas formas de DII, retocolite ulcerativa (RCUI) e a Doença de Crohn, permanece incerta. Entretanto, anormalidades na imunidade celular e humoral parecem estar implicadas na sua etiologia. A relação precisa entre as alterações destas cascatas inflamatórias e o desenvolvimento da DII ainda necessitam ser definidas.

## 1.2 - Colite Experimental

Vários modelos experimentais de colite foram desenvolvidos uma vez que os riscos oriundos da pesquisa em humanos são grandes. Panés & Granger (1996) descreveram vários modelos animais de doença intestinal inflamatória que podem ser classificados de acordo com as suas características de apresentação (aguda ou crônica), pela forma de desenvolvimento (induzido ou espontâneo) ou ainda pela forma de indução (tóxica, infecciosa, imunomediada). Os modelos mais conhecidos e suas características estão apresentados na **Tabela 1**.

Os modelos experimentais de colite auxiliam na investigação de diferentes aspectos relacionados ao processo inflamatório do cólon. Granger et al (2007) recentemente demonstrou os mecanismos de recrutamento de leucócitos e plaquetas em camundongos através da videomicroscopia intravital. Técnica semelhante já havia sido demonstrada por Panes. Gao et al (2007) apresentaram uma análise histológica do intestino grosso de ratos Sprague Dawley submetidos à

colite experimental com dextran e álcool. Inúmeros trabalhos foram publicados demonstrando a eficácia dos modelos experimentais de colite para o estudo dessa doença, avaliando aspectos de biologia molecular, fisiologia, uso de drogas, protetores ou indutoras de colite e também de estresse oxidativo. O uso desse modelo experimental para avaliar a eficácia do tratamento da dor com acupuntura também já foi descrito. (Miranda et al,2007; Inoue et al,2007; Kim et al,2007)

Na grande maioria dos casos a via de administração do fármaco para induzir a colite é feita via retal. Entretanto, modelos de administração via oral e intraperitoneal também podem ser utilizados. A dose e o tempo de duração da indução também são variáveis. Alguns autores utilizam uma única dose na indução, outros preferem a administração crônica de doses menores. (Fillmann et al,2007; Kaya et al,2007)

**Tabela 1** – Características dos modelos experimentais, em ratos e camundongos, de doença inflamatória intestinal.

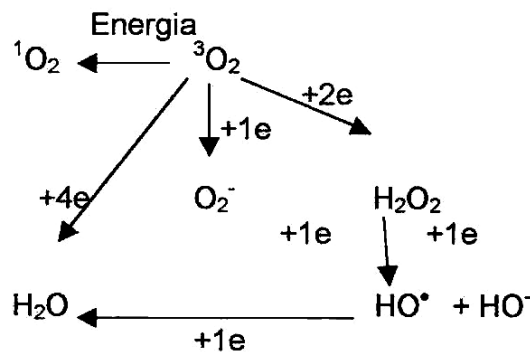
MODELO (Indutor)	APRESENTAÇÃO	MÉTODO DE INDUÇÃO
Ácido	Aguda	Tóxico
TBNS	Aguda	Possivelmente
Dextra	Aguda	Possivelmente
Poliss	Aguda	Imunomediado
Imuno	Aguda	Imunomediado
Indom	Aguda	Inibição
Tamar	Crônica	Espontâneo
HLA-	Crônica	Espontâneo

### 1.3 - Estresse Oxidativo e Antioxidantes

#### 1.3.1 - Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) e Radicais Livres

O oxigênio é um elemento vital e também potencialmente nocivo para as células. Em certas condições, é responsável por reações químicas muito tóxicas (BOVERIS & CHANCE, 1973).

Na **figura 2**, a molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons desemparelhados, sendo um bom agente oxidante, capaz de oxidar outros átomos ou moléculas, aceitando um par de elétrons (LLESUY, 2002).



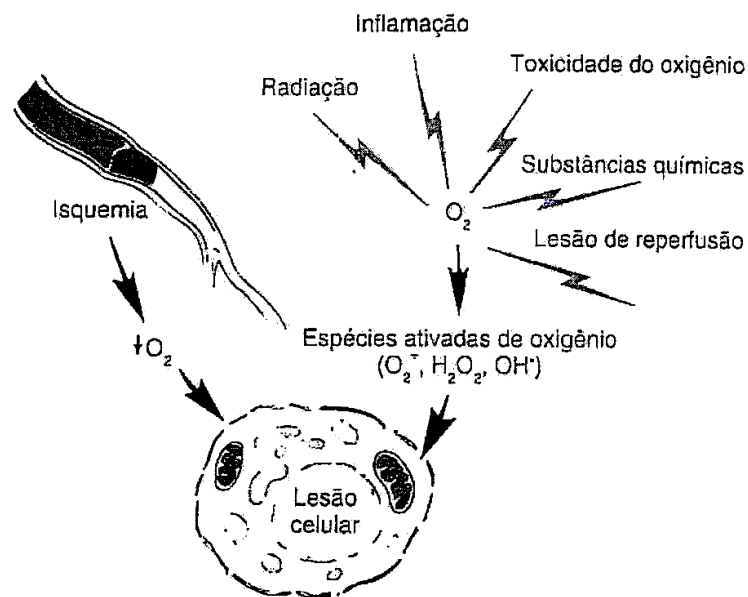
**Figura 2.** Esquema da produção das EAO (LLESUY, 2002).

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam consideravelmente devido à espécie do organismo, à idade, ao estado fisiológico e à dieta. Os diferentes tecidos de um mesmo animal também podem ser afetados de formas distintas (KYLE *et al*, 1990). Esses efeitos ocorrem devido à elevada produção de radicais livres (RL) ou de espécies ativas de oxigênio (EAO).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas e altamente reativas, capazes de atacar qualquer biomolécula (HALLIWELL, 1994). Tais radicais podem ser formados em situações

fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grandes quantidades (HALLIWELL, 1994).

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não-radical e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical. Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de radicais livres, através da fagocitose na resposta inflamatória, em situações de exposição do organismo a radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, excesso de exercício, hiperóxia e isquemia (**Figura 3**) (HALLIWELL, 1997)

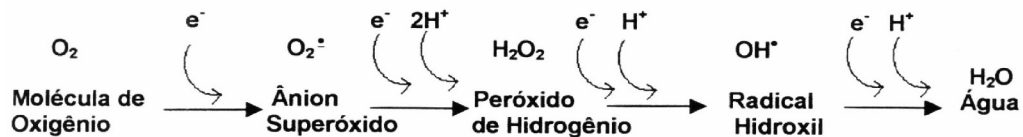


**Figura 3.** O papel do  $O_2$  na lesão celular. A isquemia causa lesão por redução dos suprimentos celulares de  $O_2$ , enquanto outros estímulos, induzem lesões através de espécies ativadas tóxicas de oxigênio (KUMAR *et al.*, 2000).

Os radicais livres podem ser pequenos, como a hidroxila, ou grandes e complexos, contendo átomos de carbono e cadeias laterais. Os dois principais radicais livres são o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (DROGE, 2002).

As espécies ativas de oxigênio (EAO), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda ou ganho de elétrons por um não-radical (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) e estão envolvidas numa série de processos degenerativos devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres (MENEHINI 1987; YU 1994).

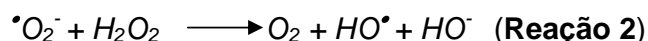
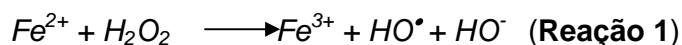
Nos organismos aeróbios, o  $O_2$  é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (**Figura 4**). A molécula de  $O_2$ , mantém-se unida ao complexo IV da cadeia respiratória até que ocorra a redução total do  $O_2$  em água. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do  $O_2$ , gerando ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Desse modo, a formação de radicais ou de espécies ativas de oxigênio deve-se ao fato do  $O_2$  se reduzir à água de forma monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução do oxigênio (THANNICKAL e FANBURG 2000).



**Figura 4.** Esquema da redução do  $O_2$  em  $H_2O$ , na respiração mitocondrial e a redução das EAO (MENEHINI, 1987).

Dessa forma, a geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para formação de ATP na mitocôndria. A princípio, o oxigênio ( $O_2$ ) é reduzido até água ( $H_2O$ ), recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos. A formação dessas moléculas ocorre em, aproximadamente, 5% de todo o processo de redução do oxigênio até água. (MENEHINI 1987; YU 1994; DROGE 2002).

O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) é constituído pela redução do  $O_2$  molecular por um elétron após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação que consiste na reação de dois ânions de superóxido catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  é geralmente produto da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD. As enzimas oxidativas são capazes de formar e degradar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo comumente encontradas nos peroxissomas. Dentre as mais comuns, encontram-se a catalase (CAT), D-amino oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e glutathione peroxidase (GPx). O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, conforme a reação de Fenton (**Reação 1**) e Haber-Weiss (**Reação 2**), formando o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). (HALLIWELL, 1994).



O radical hidroxil é uma EAO instável, sendo um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos. É formado a partir da reação do  $H_2O_2$  com um ânion superóxido ou com íons ferro (segundo a reação de Fenton - **Reação 1**) e não possui enzima que catalise sua remoção. Esse radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas como lipídios insaturados e DNA, apesar de sua baixa meia vida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais peroxil – alcoxil são mais seletivos, reagem com as proteínas da membrana e iniciam a seqüência de reações em cadeia da peroxidação de lipídios, tendo por produto final o malondialdeído.

O oxigênio *singlet* é uma EAO produzida por fosforilação oxidativa, que se caracteriza como um estado excitado do oxigênio molecular com mais energia pelo arranjo de elétrons os quais reagem mais rapidamente que o oxigênio em estado normal. Quando presente em pequenas quantidades, modula processos bioquímicos e, em grandes concentrações, provoca lesões no DNA e destruição celular. É



originado de reações entre o ânion hipoclorito ou ânion superóxido com  $H_2O_2$ . Uma pequena quantidade de  $O_2$  *singlet* é produzida como resultado da absorção da luz dentro da célula, causando formação de um gradiente de fótons através da membrana celular e da membrana mitocondrial, alterando a permeabilidade celular para vários íons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999)

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser a peroxidação lipídica (LPO), a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano ao DNA. A LPO é uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre as cadeias de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios (LLESUY, 2002).

A LPO é a auto-oxidação das cadeias laterais dos ácidos graxos polinsaturados mediante a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno (Fase de Iniciação). Após essa fase, forma-se um radical lipídio-carbono que reage com a cadeia lateral do ácido graxo polinsaturado adjacente (Fase de propagação). Dessa forma, um evento inicial pode desencadear vários ciclos de auto-oxidação, suficientes para alterar a função da membrana interrompendo a ação sobre a permeabilidade seletiva. Isso causa um descontrole na entrada e saída de ânions, comprovado pela perda de fluidez (LLESUY, 2002).

Logo, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém-se equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de EAO, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes oxidantes e, nessa situação, diz-se que a célula ou o organismo encontra-se sob estresse oxidativo com potenciais danos a eles. (LLESUY, 2002).

### 1.3.2 - Defesas Antioxidantes

Existem estratégias celulares de defesa contra os processos mediados pelas EAO que incluem os sistemas de defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações

comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (o termo oxidável inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de EAO em baixas concentrações, e para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas (REPETTO & LLESUY, 2002).

As defesas antioxidantes compreendem agentes que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies ativas, como as enzimas SOD, CAT e GPx; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como íons ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos como proteínas de choque térmico e substâncias de baixo peso molecular que combatem EAO e espécies ativas de nitrogênio como glutatona,  $\alpha$ -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros (MENDES, 2004).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular e em diferentes células do mesmo tecido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não-enzimáticos que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

Quando a substância age neutralizando as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher" (SIES & MURPHY, 1991; HALLIWEL, 1997) . A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de espécies ativas de oxigênio (EAO) e, assim, podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a processos de doença.

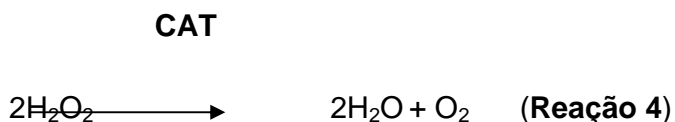
### 1.3.2.1 - Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O sistema enzimático, encarregado da detoxificação das EAO, é formado por várias enzimas das quais destacam-se: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**Reação 3**). Essa enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a SOD-Mn, presente na matriz mitocondrial e a FeSOD, existente somente nos procariontes e plantas (SIES *et al.*, 1979).

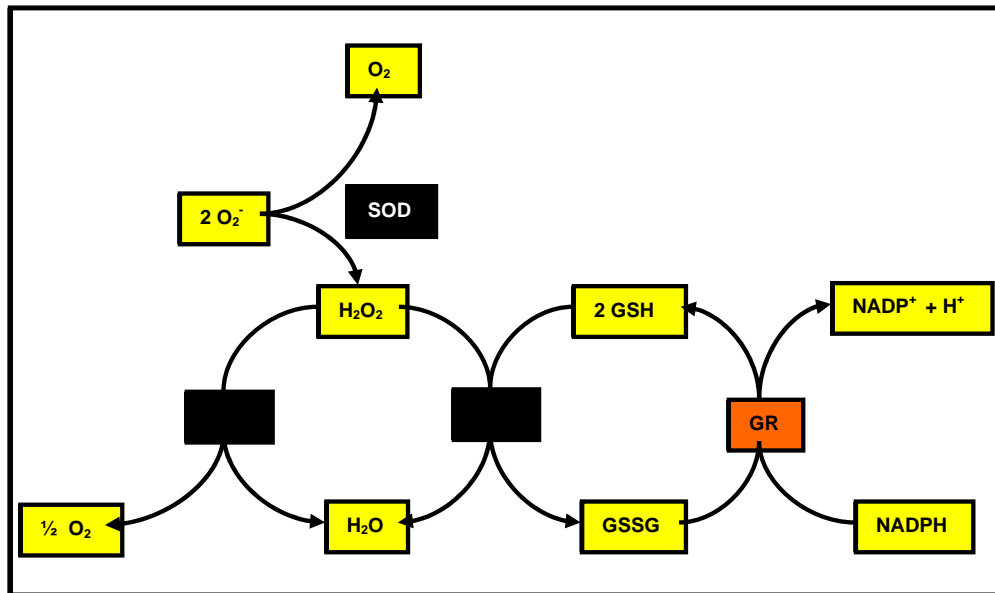


Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical, reage facilmente, originando o radical hidroxila. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (LLESUY, 2002). A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na **Reação 4**.



Entre as peroxidases que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GPx que se localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a

redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutathiona oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH, conforme demonstrado na **Figura 5** (YU, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 5.** Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes modificado de Halliwell e Gutteridge (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

### 1.3.2.2 - Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou EAO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a lipoperoxidação. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos e flavonóides (MICHAELIS et al 1996; DIAS *et al.*, 2005). Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de RL ou EAO, suprimir uma cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparar ou reconstruir a membrana.

A glutathiona é um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina que, além de ser um importante antioxidante não-enzimático, participa de reações de

enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a glutathiona transferase. Sendo assim, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de EAO, reagindo por via não-enzimática com estas espécies. A sua ação se deve à presença de um grupamento sulfidríla que atua como doador de elétrons (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como co-substrato na biossíntese do colágeno, catecolaminas e carnitina. Atua como “*scavenger*” de  $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$  com a formação de um composto intermediário que vem reduzido sucessivamente pela GSH (HALLIWELL, 1994).

A forma da vitamina E com maior atividade química é o  $\alpha$ -tocoferol, que é um composto lipossolúvel, presente em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular e está presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas. Sua ação como antioxidante está associada à inibição da peroxidação de lipídios. Após reagir com radicais peroxil, retorna à forma de  $\alpha$ -tocoferol pela ação do ascorbato. (LANDVIK, 2004).

Os  $\beta$ -carotenos são considerados antioxidantes porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais. Eles agem principalmente com o oxigênio *singlet*, sendo que sua utilização ocorre em concentrações baixas, têm afinidade à luz e absorvem a energia de excitação do radical (KRINSKY, 1989).

#### 1.4- Colite e Estresse Oxidativo

Muitos fatores vêm sendo implicados na patogênese da doença intestinal inflamatória tais como a infiltração leucocitária e a superprodução de agentes pró-inflamatórios. A lesão tecidual produzida por neutrófilos vem sendo atribuída à sua capacidade de liberar grande variedade de espécies ativas de oxigênio (EAO) e de nitrogênio. Esses agentes estão envolvidos no desenvolvimento da lesão tecidual em várias doenças inflamatórias e também na colite. Medicamentos largamente utilizados na DII, tais como a sulfassalazina e o ácido 5-amino salicílico têm o seu efeito benéfico justamente ao inibirem a formação de EAO pelos neutrófilos.

Sob condições fisiológicas normais, as defesas antioxidantes protegem os tecidos dos danos causados pelas espécies ativas de oxigênio e nitrogênio. As substâncias oxidantes podem causar lesão e destruição dos tecidos quando a sua taxa de produção superar a capacidade de defesa dos antioxidantes endógenos. Mecanismos de defesa antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutatona) são relativamente deficientes no intestino grosso, quando comparados aos do fígado. Isso sugere que a inflamação do cólon pode produzir altos índices de substâncias oxidantes que provavelmente, irão exceder a relativa baixa capacidade antioxidante do intestino grosso e provocar lesão tecidual.

Sabe-se que a capacidade antioxidante do cólon é relativamente deficiente, quando comparada com a de outros órgãos e tecidos, dessa forma, o dano oxidativo ocorre de forma intensa e marcada na mucosa colônica (THAM *et al.*, 2002).

Estudos de Harris *et al.* (1992) demonstraram que as espécies ativas de oxigênio (EAO) desempenham um papel importante na patogênese da colite através da lipoperoxidação. Biópsias realizadas no reto de pacientes com doença intestinal inflamatória apresentaram um elevado índice de lipoperoxidação, quando comparados a indivíduos normais (TUZUN *et al.*, 2002). Estudos prévios em nosso laboratório, com ratos diabéticos demonstraram a existência de um importante infiltrado inflamatório na mucosa e na submucosa do intestino grosso (colite). Nas medidas de estresse oxidativo realizadas no homogeneizado de intestino grosso distal, encontrou-se aumento da peroxidação lipídica medida por quimiluminescência assim como aumento nos níveis de nitritos e nitratos (FILLMANN & MARRONI, 2002). Os mesmos resultados repetiram-se em estudos realizados com colite induzida por ácido acético. Nesses, observou-se significativo aumento da lipoperoxidação no homogeneizado de intestino grosso distal dos ratos, quando comparados a um grupo controle (FILLMANN & MARRONI, 2002). Para esse estudo, utilizaram-se as técnicas de quimiluminescência (QL) (GONZALEZ-FLECHA *et al.*, 1991) e a das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978).

Estudos realizados por Panès & Granger (1996), com microscopia intravital em animais com colite induzida por irradiação abdominal, demonstraram significativo aumento da migração e adesão leucocitária aos vasos do segmento examinado. Foi

observado também que tal migração leucocitária é responsável pela elevação na concentração de espécies ativas de oxigênio no tecido afetado e que este aumento, associado ao aumento da produção de proteases, é responsável pelo dano tecidual. O aumento do estresse oxidativo através da avaliação da atividade das moléculas de adesão e do recrutamento de leucócitos em ratos submetidos à colite experimental vem, desde então, sendo demonstrado. A microscopia intravital mostrou nesses ratos aumento da adesão e migração leucocitária no cólon inflamado (SEGUI J et al., 2000). Murano *et al* (2000) demonstraram que citocinas tais como a interleucina-1,6 e 8 assim como os fatores de necrose tumoral alfa estão aumentados em ratos submetidos à colite experimental. Carrier *et al* (2006) demonstraram que ratos submetidos à colite por dextran apresentaram elevação do estresse oxidativo avaliado por um aumento significativo da mieloperoxidase, TNF-alfa, IL-1, lipoperoxidação e atividade do NF-KB. Ratos submetidos à colite por ácido acético também apresentaram um importante aumento do estresse oxidativo com elevação da lipoperoxidação, mieloperoxidase, malondialdeído, fator de transcrição nuclear beta (NFK-B), assim como diminuição das defesas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione.

### 1.5- Glutamina

Inúmeras substâncias vêm sendo utilizadas no tratamento e/ou na prevenção de colites experimentais. Os experimentos visam à avaliação de novas drogas sobre o processo inflamatório ou associação de drogas para obtenção de melhores resultados (MAXWELL, 1995; SALAS et al, 2002; CURI *et al.*, 2005). Para a prevenção, utilizam-se substâncias para inibir ou minimizar o processo inflamatório frente a agentes agressores. Uma das substâncias utilizadas é a glutamina. A glutamina é um aminoácido polar sem carga, é um aminoácido não essencial ou ocasionalmente essencial, hidrofílico encontrado na superfície das proteínas onde interage com a água. Esta substância foi inicialmente utilizada de forma profilática em pacientes a serem submetidos à radioterapia, quando se observou uma diminuição da incidência e da gravidade da enterite actínica. (KLIMBERG, 1990).

Observou-se também que a glutamina apresenta um papel fundamental na defesa imunológica da barreira mucosa do intestino através da sua participação na formação de imunoglobulinas, especialmente IgA (CURI *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a glutamina diminui os efeitos inflamatórios da enterocolite induzida por metotrexato e que diminui a translocação bacteriana em animais com sépsis abdominal (GIANOTTI,1995). Este aminoácido age sobre a atividade dos macrófagos, interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios (CURI *et al.*, 2005). Além de efeitos protetores diretos, como os citados acima, a glutamina tem uma importante função em processos inflamatórios intestinais, atuando sobre os radicais livres de oxigênio. Welbourne & Miers (1998) demonstraram que a glutamina, na presença de inflamação, aumenta o fluxo de glutathione no fígado e no trato gastrointestinal.

### 1.6 - Glutamina e Estresse Oxidativo

A glutamina é um aminoácido multifuncional usado para a síntese hepática de uréia, amoniogênese renal, gliconeogênese e como o principal combustível respiratório para muitas células. Concentrações baixas de glutamina são encontradas durante estresse catabólico e estão associadas à suscetibilidade a infecções. A glutamina não é somente uma importante fonte de energia para a mitocôndria, mas é também a precursora do neurotransmissor cerebral glutamato que, por sua vez, é utilizado na síntese do antioxidante glutathione. A glutamina é, portanto, vital na regulação do equilíbrio oxidativo intracelular. (MATES *et al.*, 2002).

A glutamina é mais extensamente investigada na sua relação com o estresse oxidativo no exercício físico. Rogero (2003) demonstrou que no exercício físico exaustivo ocorre uma diminuição importante da glutamina plasmática. Essa diminuição é acompanhada de aumento significativo da atividade inflamatória e dos níveis de estresse oxidativo medido através da taxa de lipoperoxidação. Observou-se uma relação linear entre a diminuição da glutamina plasmática e o aumento da leucocitose em indivíduos submetidos a exercícios intensos e exaustivos. As medidas de lipoperoxidação pela técnica de quimiluminescência no músculo de animais submetidos a exercícios físicos diários mostraram valores superiores aos de



grupos tratados previamente com glutamina. A glutamina é requerida para síntese de glutathione, visto que é metabolizada no ciclo  $\gamma$ -glutamil para produção de glutathione. A glutathione é produzida a partir de glutamato, glicina e cisteína (MATÉS *et al.*, 2002). A glutathione está presente nas células tanto na forma oxidada quanto na forma reduzida, sua a células *in vitro* pode conduzir a um aumento na concentração de glutathione total.

A glutamina tem sido utilizada como suplemento nutricional em pacientes gravemente debilitados com o intuito de diminuir o efeito deletério do estresse oxidativo no seu prognóstico (HEYLAND *et al.*, 2005). Já foi bem demonstrado que a prevenção do estresse oxidativo em pacientes graves, politraumatizados ou submetidos a grandes cirurgias é benéfico como adjuvante na terapia específica de cada paciente. A terapia antioxidante melhora o prognóstico e diminui o índice global de complicações em pacientes graves (NATHENS *et al.*, 2006).

Observações clínicas demonstram que pacientes que recebiam suplementação dietética de glutamina toleravam melhor as colites secundárias à radioterapia para neoplasias de próstata e colo do útero (KLIMBERG & McCLELLAN, 1996). A mesma substância foi, então, utilizada em pacientes portadores de Doença de Crohn (enterocolite granulomatosa) e retocolite ulcerativa inespecífica. Nesses pacientes, observou-se uma melhora do quadro clínico com diminuição da diarreia, aumento na taxa de cicatrização de fístulas e diminuição no uso de medicações.

Uma vez que ficou demonstrada a importância das espécies ativas de oxigênio na gênese da colite, passou-se a procurar a relação entre o estresse oxidativo e o suposto efeito clínico benéfico da glutamina nas colites (PRAVDA, 2005).

### 1.7 - Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa$ B)

O fator nuclear *Kappa Beta* é um fator da transcrição que desempenha um importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação

de respostas imunes e adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares (ZINGARELLI *et al.*, 2003).

Esse fator foi descrito primeiramente, em 1986, por Sen e Baltimore, sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa nas imunoglobulinas em células B (SEN & BALTIMORE, 1986). É agora bem reconhecido que NF- $\kappa$ B está expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel.

A família do NF- $\kappa$ B/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB. Essas subunidades formam homodímeros e heterodímeros em várias combinações. Geralmente, o NF- $\kappa$ B consiste em dois polipeptídeos: um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65) (**Figura 6**). Em células em homeostase, o NF- $\kappa$ B mantém-se no citoplasma em sua forma inativa associado com as proteínas inibidoras do sítio kB, chamadas de inibidores kB (I $\kappa$ B). Sete espécies de I $\kappa$ Bs são descritas: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100, e p105. O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por uma variedade de sinais relevantes à etiologia e à fisiopatologia inflamatória (ZINGARELLI *et al.*, 2003).

Para ativar o NF- $\kappa$ B, são necessários estímulos intracelulares e ou extracelulares cujos os ativadores podem ser produtos bacterianos (endotoxinas, peptideoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas, (fator de necrose tumoral - TNF- $\alpha$ , interleucinas), radicais livres e ou oxidantes (ZINGARELLI *et al.*, 2003).

A ativação do NF- $\kappa$ B requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (particularmente o I $\kappa$ B $\alpha$ ) em resíduos específicos de Serina (Ser-32 e Ser-36). Essa fosforilação é mediada por um complexo protéico. O complexo kinase kappa B (IKKs) é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , e uma unidade reguladora IKK $\gamma$  (NF- $\kappa$ B essencial modulator, NEMO). Após a fosforilação, ocorre a subsequente degradação das I $\kappa$ Bs através das ubiquitinas, formando um proteossoma 26S (YAMAOKA *et al.* 1998). A degradação proteolítica dos I $\kappa$ Bs permite a translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo, onde é regulada a expressão de centenas de genes que são importantes à resposta imune inflamatória.

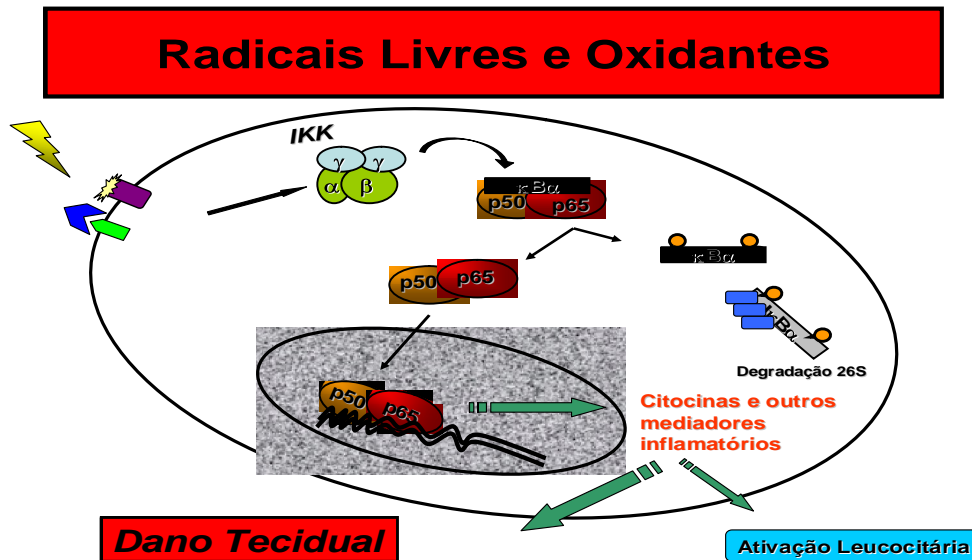


Figura 6: Rota de ativação do NF-κB.

### 1.8 - Estresse Oxidativo e Fator de Transcrição Nuclear

O mecanismo pelo qual as espécies ativas de oxigênio participam da resposta inflamatória é iniciado pelo aumento na produção de diversos marcadores inflamatórios oriundos das células de defesa. A síntese de inúmeras citocinas pró-inflamatórias depende de ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), a qual depende do potencial redox celular e conseqüentemente pode ser regulada pela relação de glutatona. As EAO estimulam a ativação dos fatores de transcrição celular, como o NF-κB, e as proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Devido ao aumento na produção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e de diversas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), ocorre a resposta inflamatória sistêmica (CLOSA e FOLCH-PUY, 2004). O NF-κB possui uma região ácida composta por 300 aminoácidos, conhecida como domínio homólogo Rel, com função de mediar a interação com os inibidores do NF-κB. Especificamente, é composto por um complexo heterodímico, denominado p50 e p65 (KARIN, 1999). Diversos estímulos ativam o NF-κB através da fosforilação e da ativação do complexo IκB kinase (IKK).

### 1.9 - Estresse Oxidativo e a Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula biologicamente importante, um radical livre inorgânico que participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, geralmente como sinalizador ou como fator de relaxamento derivado do endotélio. Moléculas com elétrons desemparelhados, gerados a partir da resposta inflamatória, como o ânion superóxido, podem reagir com o NO, e formar as espécies ativas de nitrogênio (EAN), como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (SQUADRITO e PRYOR, 1995). O ONOO<sup>-</sup> pode reagir com os aminoácidos tirosina e cisteína e produzir a nitrotirosina e a nitrocisteína, considerados os promotores das reações entre as EAO e o NO.

Mesmo sendo uma molécula simples, a síntese enzimática do NO é bastante complexa. O óxido nítrico participa diretamente nas reações que culminam com a desregulação de sua síntese (SZABO *et al.*, 2000). O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que transforma a L-arginina em L-hidroxiarginina, formando, assim, a citrulina e o NO. As óxido nítrico sintases (NOS) pertencem à família enzimática que sintetiza o NO e são enzimas que utilizam como co-fator a forma reduzida do fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e moléculas de oxigênio. São subdivididas, em função de sua atividade, em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS) (GROSS & WOLIN, 1995).

As NOS são descritas como três isoformas, baseadas em três genes diferentes, já seqüenciados: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (ambas constitutivas) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS). (GROSS & WOLIN, 1995; SZABO *et al.*, 2000). Quanto à ação de cada uma, sabe-se que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária. Já a isoforma nNOS gera o NO que regula a transmissão neuronal e apresenta a função de neurotransmissor. A iNOS produz NO nos macrófagos estimulada por certas citotoxinas. Este NO está intimamente ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, relaciona-se aos processos destrutivos teciduais, presentes na inflamação aguda ou crônica e na apoptose celular (SZABO *et al.*, 2000; PAZA e PEDROSA, 2001).

### 1.10 - Colite e Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

O fator nuclear Kappa Beta (NF-kB) é a molécula responsável pela transcrição de uma grande variedade de genes celulares implicados na regulação do processo inflamatório. Várias citocinas pró-inflamatórias são reguladas pelo NF-kB e o aumento da sua expressão está diretamente implicado com a patogênese da doença inflamatória intestinal.

O NF-kB possui um papel chave na ativação destes genes envolvidos na resposta inflamatória, tanto no desencadeamento quanto na manutenção da inflamação. Vários genes pró-inflamatórios estão implicados na patogênese da doença intestinal inflamatória, incluindo a IL-1B, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12. Todos possuem sítios de ligação para o NF-kB e têm a sua transcrição regulada por ele.

O NF-kB também é responsável pela regulação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) cuja expressão está aumentada na célula epitelial do cólon de pacientes portadores de retocolite ulcerativa e doença de Crohn.

Em todas as doenças inflamatórias crônicas, existe recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T para a região e o tecido inflamados. Esse recrutamento é feito por moléculas de adesão, cujo controle de transcrição também é executado pelo NF-kB. No estágio inicial do processo inflamatório, ocorre aumento da expressão da molécula de adesão intercelular-1 e da E-seletina que promovem o rolamento e a adesão de neutrófilos ao endotélio. Posteriormente, ocorre um estímulo para a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) responsável pelo recrutamento de monócitos e linfócitos para a área inflamada.

A expressão induzida de um gene é um mecanismo regulado por reconhecimento específico que requer uma ou mais proteínas que ativem a transcrição através da ligação ao DNA. Dos muitos fatores de transcrição que se têm descritos, o NF-kB aparece com particular relevância para regulação dos genes envolvidos na cascata da inflamação.

A ativação de NF- $\kappa$ B foi encontrada uniformemente nos modelos animais de doença intestinal inflamatória (IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*), incluindo colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), colite em ratos com desligamento (*knock-out*) de IL-10 e com peptideoglicano/polissacarídeo (NIELSEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005). A ativação do NF- $\kappa$ B também foi demonstrada na doença intestinal inflamatória em humanos (PANÉS, 1999). A ativação do NF- $\kappa$ B está restrita a locais com atividade inflamatória, tanto na Doença de Crohn quanto na colite ulcerativa. Na DII, a ativação do NF- $\kappa$ B foi demonstrada ao ocorrer tanto na lâmina própria das células mononucleares quanto nas células epiteliais (CHEN *et al.*, 2005).

A forma ativada o fator de transcrição é descrita em células mononucleares e epiteliais do cólon inflamado (ROGLER *et al.*, 1998), e sua inibição por corticoesteróides estabiliza a proteína inibitória alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) (SCHREIBER *et al.*, 1998). A utilização de oligonucleotídeos antisense para diminuir a transcrição da subunidade p65 na colite experimental mostrou benefícios no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (NEURATH *et al.*, 1996). A diminuição na ativação do NF- $\kappa$ B em manifestações de colite já foi demonstrada pelo uso de substâncias como a petrosaspongiolida M e a melatonina (BUSSEROLLES *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). Os resultados desses estudos indicam que a ativação do NF- $\kappa$ B é o evento sinalizador inicial que contribui com a disfunção e/ou destruição celular. (BROWNLEE, 2001).

### 1.11 - Colite e Óxido Nítrico

O óxido nítrico participa na regulação de muitas funções do intestino como absorção, secreção e motilidade. A expressão da isoforma induzida da NOS e a concentração do NO produzido desempenham um papel importante na patogênese da DII. Biópsias de reto em pacientes com retocolite ulcerativa apresentam elevada concentração de citrulina, um co-produto da NOS. Estudos em pacientes com retocolite ulcerativa e Doença de Crohn revelaram um aumento significativo da NOS independente de Ca<sup>++</sup> característica da isoforma induzível da NOS (KOLIOS *et al.*, 2004).

O papel exato do óxido nítrico na fisiopatologia da doença intestinal inflamatória ainda não está bem estabelecido, existindo evidências favoráveis e contrárias à sua citotoxicidade no processo patológico. Sabe-se que a produção de óxido nítrico (NO) a partir da sua forma constitutiva da óxido nítrico sintase (NOS) é vital para a manutenção da integridade tecidual e vascular do cólon. Em condições fisiológicas, o óxido nítrico age como neurotransmissor, influenciando diretamente a motilidade intestinal. Ele apresenta um efeito antiinflamatório na colite demonstrado em inúmeros trabalhos. A sua ação neste processo é realizada através da regulação das moléculas de adesão e conseqüente diminuição da migração leucocitária para os tecidos. Além disso, o óxido nítrico diminui a agregação plaquetária, estimula a síntese de cGMP e inibe a lipoperoxidação. Apresenta um efeito citoprotetor no endotélio e músculo liso, controlando a permeabilidade microvascular. O óxido nítrico é capaz de inibir determinadas citocinas envolvidas na colite, tais como a interleucina-2 (IL-2) e P-selectina (RACHMILEWITZ *et al* 1995).

A atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) está aumentada em pacientes portadores de retocolite ulcerativa e Doença de Crohn. A expressão desta enzima é maior nas áreas de inflamação e está associada a parâmetros inflamatórios histológicos tais como depleção de células caliciformes e ulcerações (KIMURA *et al.*, 1997). A administração de inibidores da iNOS em animais submetidos à colite têm apresentado resultados variáveis. Resultados favoráveis, indiferentes e de piora da inflamação foram encontrados por diferentes autores quando avaliaram parâmetros histológicos e bioquímicos de inflamação. Entretanto, o uso de doadores de óxido nítrico em estudos de animais submetidos à colite parece apresentar resultados favoráveis. A suplementação exógena de óxido nítrico diminui a adesão e a migração leucocitária, modula a expressão das moléculas de adesão, diminui a síntese de citocinas e inibe outros agentes pró-inflamatórios como o fator de transcrição nuclear *Kappa Beta* (HOGABOAM *et al* 1995).

### 1.11.1 - Musculatura Anal Esfincteriana e o Óxido Nítrico

Segundo SPEAKMAN (1997), os neurotransmissores inibitórios executam uma importante função na propulsão do conteúdo do trato gastrointestinal através do

relaxamento da musculatura intestinal em determinados pontos, favorecendo a força de propulsão da musculatura imediatamente acima deste ponto de relaxamento. A musculatura lisa dos esfíncteres intestinais é favorável ao estudo de neurotransmissores inibidores devido ao seu constante estado de contração tônica. A origem exata de todos os neurotransmissores inibitórios do intestino ainda não é conhecida; entretanto, duas substâncias são bem conhecidas e têm sua atividade comprovada: polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico.

Estudos recentes da musculatura lisa dos esfíncteres do trato gastrointestinal de ratos sugerem que o óxido nítrico é um dos mediadores ou neurotransmissores inibitórios. Essa sugestão baseia-se nos seguintes pontos: 1) ação direta inibitória do óxido nítrico sobre a musculatura 2) bloqueio da ação inibitória dos neurônios não-adrenérgicos e não-colinérgicos através do uso de inibidores da NOS (BURLEIGT, 1993).

O esfíncter anal interno é um músculo liso que reconhecidamente se apresenta sob controle inibitório do óxido nítrico. Inúmeros estudos demonstram a liberação de óxido nítrico em resposta à estimulação de neurônios não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC) do esfíncter anal interno. Experimentos realizados em ratos, com estimulação dos neurônios NANC e bloqueio adrenérgico e colinérgico, demonstraram um relaxamento da musculatura esfíncteriana associado à uma maior liberação de óxido nítrico. O uso de inibidores da síntese da NOS bloqueou esse efeito relaxante, e o uso de precursores do óxido nítrico como a L-arginina aumentou o relaxamento (HERBERT, 1996).

As altas pressões do canal anal são primariamente devidas às propriedades miogênicas do músculo esfíncter interno (MEI), o qual representa um papel importante na continência fecal, assim como no reflexo evacuatório reto-anal. O relaxamento do MEI pode ser mimetizado "*in vitro*", em fibras musculares isoladas através da estimulação elétrica de neurônios NANC (ADEBANJO, 1976).

Atualmente o conceito de que o óxido nítrico é formado e liberado por células endoteliais e de que apresenta um importante efeito relaxante sobre a musculatura lisa dos vasos. Recentemente, porém, um espectro mais amplo de ação do óxido nítrico vem sendo evidenciado no que se refere a musculatura lisa. Observa-se um



efeito de segundo mensageiro, mediador e também de neurotransmissor inibitório responsável pelo relaxamento da musculatura lisa intestinal. Tais evidências são suportadas pelo efeito relaxante obtido com a L-arginina, bloqueio do relaxamento pelo uso de inibidores da L-arginina (L-NNA) e pelo efeito direto do óxido nítrico sobre a musculatura lisa vascular e intestinal (BARLOW, 1996).

A origem do óxido nítrico que atua sobre a musculatura anal esfínteriana ainda não é bem clara. A origem neuronal (neurônios mioentéricos inibitórios) do óxido nítrico vem sendo sugerida em alguns estudos, demonstrando a presença de NOS imunorreativa em neurônios do plexo mioentérico do intestino de mamíferos. Parecem existir, entretanto algumas evidências de que as células musculares lisas do intestino podem ser as responsáveis pela síntese e liberação de óxido nítrico em resposta à neurotransmissão inibitória. De acordo com o que foi investigado, parte do processo de relaxamento da musculatura lisa intestinal, em resposta ao neurotransmissor VIP, é mediada pela liberação de óxido nítrico pelas próprias células da musculatura lisa. A sugestão é fortalecida pelo fato do VIP ocasionar relaxamento do músculo esfíncter interno ao mesmo tempo em que ocorre um aumento de liberação de óxido nítrico. Além disso, esse relaxamento do músculo esfíncter interno induzido pelo VIP é bloqueado pela presença de inibidores da NOS (HECHTMAN, 1996).

Apesar da sugestão de que a síntese e a liberação de óxido nítrico possam ser feitas pelas células da musculatura lisa intestinal, a natureza exata do local ainda não está totalmente caracterizada. Estudos recentes demonstraram a presença da NOS constitutiva em células musculares lisas do intestino. A presença da NOS constitutiva nestas células sugere um importante papel do óxido nítrico na neurotransmissão inibitória e moduladora da motilidade intestinal.

Assim, fica evidente o importante papel do óxido nítrico no controle do músculo esfíncter anal interno em resposta à estimulação dos neurônios NANC. A possibilidade de outros efeitos, além do de neurotransmissor sobre o músculo esfíncter anal interno, deve ser considerada, sendo os mais significativos: 1) mediador inibidor final em resposta a diferentes estímulos neuro-humorais 2) envolvimento do óxido nítrico na transdução do sinal ou como segundo mensageiro em nível de células-alvo que seria, então, responsável pelo relaxamento da

musculatura do esfíncter anal interno em resposta à estimulação inibitória dos neurônios NANC.

### 1.12 - Cicloxigenase

Os eucosanóides que incluem as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, estão entre os mais potentes reguladores das funções celulares e são produzidos por quase todas as células do organismo. Participam em inúmeros processos químicos, particularmente na resposta inflamatória que ocorre após injúria e infecção, na regulação da contração muscular do músculo liso, especialmente no intestino e no útero, e aumentam a excreção de água e sódio pelo rim, estando envolvidos no controle da pressão arterial.

Freqüentemente, os eucosanóides participam como moduladores e agem como estimuladores ou inibidores no mesmo processo. Por exemplo, alguns agem como vasodilatadores e outros, como vasoconstritores, no mesmo processo. O mesmo pode ocorrer em relação ao controle da dilatação brônquica.

O mais importante precursor dos eucosanóides é o ácido araquidônico, um ácido graxo polinsaturado presente na membrana fosfolipídica. Ele é liberado da membrana por ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> ou C. Esta ativação ocorre por estímulo de substâncias como a histamina e citoquinas.

Após ser liberado no citoplasma, o ácido araquidônico é convertido em eucosanóides por uma grande variedade de enzimas que variam de acordo com o tecido afetado. Esta variação explica por que algumas células, como as do endotélio vascular sintetizam prostaglandinas, enquanto outras, como as plaquetas, sintetizam tromboxano.

Três rotas metabólicas do ácido araquidônico levam à formação de eucosanóides. A primeira é a da cicloxigenase que forma prostaglandinas e tromboxano. A segunda é a da lipoxigenase que forma os leucotrienos. A terceira, catalisada pelo citocromo P450, participa da síntese de epóxidos cuja função biológica ainda não está bem definida.

A cicloxigenase (COX) é a enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A COX converte o ácido araquidônico em prostaglandina  $H_2$ , o precursor dos demais prostanóides.

Existem três isoformas da cicloxigenase: COX<sub>1</sub>, COX<sub>2</sub> e COX<sub>3</sub>. A COX<sub>3</sub> é uma pequena variação da COX<sub>1</sub> sendo normalmente avaliada em conjunto com ela. Diferentes tecidos expressam níveis variáveis de COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub>. A COX<sub>1</sub> é considerada uma enzima constitutiva encontrada na maior parte das células do organismo. A COX<sub>2</sub>, por sua vez, é indetectável na maior parte dos tecidos em situações fisiológicas. É considerada uma enzima induzível, sendo encontrada em grande quantidade em macrófagos ativados e em outras células em sítios de inflamação (MARKS *et al*,1996).

### 1.12.1- Cicloxigenase e Colite

Já foi descrita a localização e a expressão das enzimas COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub> no intestino grosso normal e durante o processo inflamatório. Essas enzimas possuem um papel importante não só no processo inflamatório, mas também na regulação da motilidade intestinal e da tumorigênese. (Singer,1998)

A enzima COX-1 é expressa da mesma maneira e com níveis equivalentes no cólon normal e na colite. Ela se localiza preferentemente na base das criptas do epitélio do íleo e do cólon.

A enzima COX-2 não é detectada no epitélio normal, sendo apenas induzida nas células apicais do epitélio inflamado do íleo terminal e cólon. Existe um importante aumento na expressão da enzima COX-2 na doença intestinal inflamatória. Esse aumento ocorre tanto na forma aguda como na crônica e relaciona-se diretamente com o grau de inflamação da área afetada. (JIANG, 2006)

Dessa forma, a medida da expressão da COX-2 serve como um parâmetro de gravidade ou melhora do processo inflamatório no intestino grosso e sua medida vem sendo feita com o intuito de demonstrar o grau de inflamação, bem como

caracterizar a melhora do processo inflamatório com o uso de substâncias que inibam a sua função. (TSUBOUCHI, 2006; MARTIN, 2005)

A colite acarreta inúmeras alterações de caráter estrutural, fisiológico e molecular no intestino grosso. Este trabalho se propõe a demonstrar o efeito protetor da glutamina sobre a colite experimental induzida em ratos Wistar avaliando esse efeito através da análise de parâmetros histológicos, fisiológicos, inflamatórios, bioquímicos e moleculares.

## **2 - OBJETIVOS DO ESTUDO**

---

### **2.1 - Geral**

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar os processos inflamatórios intestinais de animais com colite induzida por ácido acético e a ação protetora da glutamina.

### **2.2 - Específicos**

- 1) Avaliar as alterações histológicas no intestino grosso de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.
- 2) Demonstrar as alterações na pressão anal esfinteriana nos diferentes grupos de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.
- 3) Avaliar, nos diferentes grupos, a lipoperoxidação no intestino grosso, através da determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e mediante a determinação da quimiluminescência (QL) no intestino grosso de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.
- 4) Avaliar o potencial antioxidante através da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), no intestino grosso de animais submetidos a colite experimental e à ação da glutamina.
- 5) Determinar a expressão da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B em núcleos, da proteína inibitória do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) e da enzima inibidora da I $\kappa$ B (Ikk) em extratos

citoplasmáticos através do Western blot no intestino grosso de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.

6) Determinar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) através do Western blot no intestino grosso de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.

7) Determinar a expressão da enzima cicloxigenase (Cox2) em extratos citoplasmáticos através do Western blot no intestino grosso de animais submetidos à colite experimental e à ação da glutamina.

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.1 - Delineamento da Pesquisa**

Este estudo tem caráter experimental quantitativo. Para isso, foi realizada a indução de colite em ratos, cujos resultados foram comparados aos dos animais controle e tratados com glutamina.

#### **3.2 - Animais**

Os procedimentos com os animais estão de acordo com aqueles preconizados pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela resolução normativa 04/97(GOLDIN & RAYMUNDO, 1997).

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal do HCPA durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. A água e a ração foram administradas *ad libitum*.

### 3.3 - Delineamento Experimental

Foi utilizado um modelo experimental de colite, através da administração intracolônica, por enema, de ácido acético.

Foram utilizados 32 animais divididos em quatro grupos experimentais:

- Grupo controle (CO): submetido ao enema com solução fisiológica.
- Grupo controle + glutamina (G): submetido ao enema com glutamina.
- Grupo colite (CL): submetido à indução da colite, por enema de ácido acético.
- Grupo glutamina + colite (G+CL): submetido ao enema com glutamina 24 e 48 horas antes da indução da colite por enema de ácido acético.

O processo iniciou com uma leve anestesia do animal mediante inalação com isoflurano® em um carro de anestesia. A técnica escolhida para a indução da colite foi uma adaptação daquelas descritas por Yamada *et al.* (1992) e Tannahill *et al.* (1995). Os animais sem qualquer tratamento prévio, foram submetidos à administração intracolônica, por enema, de uma solução de ácido acético diluído a 7% e com volume de 3 ml. Para a administração do enema, foi utilizado um cateter plástico de 0,8mm de diâmetro com três orifícios distais para melhor dispersão da substância. O cateter foi introduzido, aproximadamente, 8 cm da margem anal, sendo retirado gradualmente com a instilação do ácido acético.

Os grupos G e G+CL receberam o enema com glutamina (L-glutamina, Support-Aminofarma, 1 envelope, 10g) na dose de 25mg/kg diluídos em 3 mL de solução fisiológica.

### 3.4 - Análise Histológica

Após a morte dos animais, foi realizada a retirada completa do intestino grosso. O material retirado foi fixado em formalina a 10% por um período mínimo de



24 horas. Posteriormente, foi submetido ao processamento histológico com desidratação em cinco álcoois absolutos por uma hora, clarificação em dois xilóis por uma hora e impregnação em parafina a 65 graus Celsius. A seguir, os blocos de parafina foram submetidos a cortes em micrótomo manual com espessura de cinco micrômetros. As lâminas contendo os cortes foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e montadas com lamínula para avaliação histológica.

A avaliação histológica foi realizada em duas etapas: macroscópica e microscópica.

**MACROSCÓPICA:** Foi realizada análise macroscópica do intestino grosso logo após a morte do animal e abertura do mesmo. Os danos à mucosa foram avaliados através de um escore que varia de 0 a 5 adaptado de Morris *et al.* (1989), conforme a **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Índices macroscópicos de colite segundo Morris *et al.* (1989).

<b>Escore</b>	<b>Achados macroscópicos</b>
<b>0</b>	Sem dano
<b>1</b>	Hiperemia sem ulcerações
<b>2</b>	Ulcerações lineares sem inflamação significativa
<b>3</b>	Ulcerações lineares com inflamação em um local
<b>4</b>	Dois ou mais locais: inflamação e ulceração
<b>5</b>	Dois ou mais locais de inflamação e ulceração com um local de inflamação/ulceração >1,0 cm.

**MICROSCÓPICA:** O protocolo para avaliação histológica da mucosa baseou-se no Índice Histológico de Atividade Inflamatória descrito por Sandborn (1995), conforme a **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Índices microscópicos de colite segundo Sandborn (1995).

<b>Grau</b>	<b>Achados microscópicos</b>
<b>0 Normal</b>	
<b>1 Leve</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Polimorfos nucleares (PMN) difusos na lâmina própria</li><li>-Criptite ocasional</li><li>-Mínima destruição glandular e ulceração</li></ul>
<b>2 Moderada</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Moderado número de PMN na lâmina própria com criptite e abscessos</li><li>-Alguma destruição glandular</li></ul>
<b>3 Grave</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Numerosos PMN com abundante criptite</li><li>-Abscessos críticos</li><li>-Destruição celular extensa</li><li>-Ulceração pode ser proeminente</li></ul>

### 3.5 - Medida da Pressão Esfincteriana

Vinte e quatro horas após a indução da colite, foram realizadas as medidas de pressão anal esfincteriana. Utilizamos um aparelho de manometria anorretal (Proctosystem -Viotti – SP) com cateter de balão e medida em cm de H<sub>2</sub>O. Foram realizadas três medidas subseqüentes, sendo realizada a média entre os três valores. (READ *et al*, 1992).

### 3.6 - Determinação do Estresse Oxidativo

#### 3.6.1 - Preparação do Homogeneizado Fresco

Utilizaram-se 9 mL de solução tampão fosfato (KCl 140mM) por grama de tecido. O órgão foi homogeneizado em Ultra-Turrax durante um minuto à

temperatura de 2 graus Celsius. Foi, então, centrifugado por 10 minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada. O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado no freezer a  $-70^{\circ}$  C para posterior utilização nas dosagens.

### 3.6.2 - Proteínas

A concentração de proteínas no homogeneizado do intestino grosso distal foi determinada, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina 1mg/mL. Para a curva de concentração utilizada no cálculo, foram utilizados volumes de 50, 100 e 150  $\mu$ L. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 $\mu$ L) em 780 $\mu$ L de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> (reativo A), adicionado com 0,5 mL do reativo B1 (CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30 minutos apareceu a coloração azulada que foi, então, medida no espectrofotômetro a 625nm (LOWRY *et al.*, 1951).

### 3.6.3 - Avaliação da Lipoperoxidação

#### 3.6.3.1 - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento da coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram colocadas em tubos de ensaio, nesta ordem de adição, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,25mL do homogeneizado, 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 0,25mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de *Schiff*, o TCA foi utilizado para desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Agitou-se cada tubo e eles foram aquecidos à uma temperatura de 100

graus Celsius. Após, os tubos foram resfriados e acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles, então, foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado, presente na fração superior, foi lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína (BUEGE & AUST, 1978).

### 3.6.3.2 - Quimiluminescência

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de *tert*-butila) ao homogeneizado de tecido em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência (QL) produzida pela amostra.

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (Liquid Scintillation Corenter, 1209 RACKBETA, LKB Wallar) operando como um luminômetro. Adicionaram-se 3,5 mL de tampão fosfato em viais de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos viais ativada pela luz fluorescente, eles foram protegidos da luz até o momento do uso e as determinações feitas em sala escura. Primeiramente se realizou apenas a leitura dos viais com tampão (QL Basal). Após, adicionar 0,5 mL de homogeneizado de tecido e fez-se a leitura, que correspondeu à QL espontânea. Em seguida, foi adicionado o hidroperóxido de *tert-butila* que aumenta a QL (QL Máxima). A reação total consistiu em uma solução reguladora de tampão fosfato e de t-BOOH 3 mM.

Para cálculo de QL, iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima (QL Máxima), descontada a emissão da QL espontânea (a QL do vial contendo o tampão e a amostra). Os resultados foram expressos em contagem por segundo (cps) por mg de proteína (GONZALEZ-FLECHA *et al.*, 1991).

### 3.7 - Glutathione Peroxidase

A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos (ROOH) com glutathione reduzida (GSH) para formar a glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido (ROH). A regeneração da GSH, a partir da GSSG, ocorre pela glutathione redutase em presença de NADPH.

A determinação da glutathione peroxidase selênio dependente, obtida pelo método de FLOHÉ & GUNTZLER(1985), consistiu na medida de oxidação de NADPH por glutathione redutase, sendo que a oxidação se registrou espectrofotometricamente a 340 nm (equação 1 e 2).

#### GPx



#### GR



Os reativos para incubação tiveram um volume final de 800  $\mu\text{L}$ : 500  $\mu\text{L}$  tampão fosfato potássio (0,1 M; pH 7,0), 100  $\mu\text{L}$  EDTA (2mM), 50  $\mu\text{L}$   $\text{NaN}_3$  (20 mM), 50  $\mu\text{L}$  GSH (40 mM), 50  $\mu\text{L}$  glutathione redutase (2 U), 50  $\mu\text{L}$  NADPH (2,4 mM). As amostras foram incubadas a 25°C durante três minutos, determinou-se a redução da absorbância a 340 nm, o qual foi provocado pelo consumo de NADPH não-dependente do hidroperóxido. Posteriormente adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do homogeneizado total e 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (2 mM), registrando-se a leitura a cada minuto durante cinco minutos.

Para determinar a atividade da glutathione peroxidase, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 6,2  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A atividade da glutathione peroxidase selênio dependente foi expressa em nmol de  $\text{NADP}^+$  formados/mg de proteína/min.

### 3.8 - Preparação dos Extratos Nucleares

Os extratos nucleares, para determinar a expressão da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B por *Western blot*, foram preparados de secções teciduais congeladas (Gutiérrez et al., 2006). As amostras foram homogeneizadas em 800  $\mu$ L de tampão hipotônico A (10 mM HEPES pH 7.9; 10 mM KCl; 0.1 mM EDTA-Na; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.5 mM phenilmetilsulfonil fluoride, PMSF) sendo adicionado a esta solução Nonidet P-40 a 10%. O homogeneizado foi incubado em gelo por 15 minutos, transferido e centrifugado a 14.000 rpm por três minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, o *pellet* nuclear ressuspendido com 60  $\mu$ L de tampão hipertônico B (20 mM HEPES pH 7.9; 0.4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) em vórtex e incubado em gelo por 15 minutos. O extrato foi então centrifugado a 14.000 rpm por três minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80°C.

### 3.9 - Preparação dos Extratos Citoplasmáticos

Os extratos citoplasmáticos utilizados para detecção da expressão das proteínas I $\kappa$ B- $\alpha$ , COX<sub>2</sub>, IKK e iNOS foram preparados a partir de um homogeneizado do intestino em um tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0), ao qual se adicionaram inibidores de proteases. O homogeneizado foi incubado durante 30 minutos a 4 °C, sendo centrifugado durante 30 minutos a 13.000 xg a 4 °C, o sobrenadante retirado em alíquotas e armazenado a -80°C.

### 3.10 - Expressão Protéica

A técnica utilizada para detecção da expressão da p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e iNOS foi a de *Western blot*, sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970) para a eletroforese e, para o *blotting*, a técnica descrita por Towbin e colaboradores (Towbin *et al*, 1979).

Foi selecionada uma quantidade de amostra equivalente a 75  $\mu$ g de proteína à qual adicionou-se a solução (H<sub>2</sub>O, tris/HCl 0,5 M, DTT 1% e azul de bromofenol),

incubando-a durante cinco minutos a 100 °C. Após realizou-se a eletroforese em gel de poli(acrilamida a 9-12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Para realizar a transferência, uma vez extraído o gel, este era equilibrado em um tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol 20). A transferência realizou-se a 13 volts durante 25 minutos. Para comprovar que a transferência estava correta, introduziu-se a membrana de nitrocelulose em uma solução de vermelho Ponceau para visualizar as proteínas totais. A membrana foi lavada com agitação durante cinco minutos com PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl). Depois foi colocada durante 30 minutos em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween 20 frio) a 37°C.

A membrana de nitrocelulose foi, então, incubada em overnight a 4° C com os anticorpos primários policlonais específicos para; p65 (65 kDa), (Santa Cruz Biotechnology®), IκBα (36 kDa) (Cell Signaling®), iNOS (130 kDa) (BioMol®). Após essa etapa a mesma foi lavada cinco vezes com PBS-Tween 20%. Posteriormente foi incubada durante uma hora e meia com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho. (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido este tempo, novamente foi lavada cinco vezes em PBS-Tween 20.

A detecção das proteínas foi realizada por quimiluminescência, utilizando um kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha), expondo a membrana durante dois minutos a esta mistura comercial. Posteriormente introduziu-se um filme em cassete para revelação (Amersham Hyperfilm ECL, UK) durante aproximadamente dois minutos.

Depois de revelado, o filme foi secado e quantificadas as bandas por densitometria, utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. As diluições utilizadas para cada anticorpo foram: p65 1/200 em leite a 3%; IκB e IKK: 1/1000 em leite a 3%; e iNOS e COX-2: 1/1000 em leite a 1%.

### 3.11 - Morte dos Animais

A morte dos animais controles e experimentais foi realizada da seguinte maneira: o processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento do mesmo para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. Inicialmente foi realizada uma tricotomia manual da região abdominal, seguida de intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia mediana ventral e a exposição das alças intestinais, para retirada do intestino grosso distal (2,5cm). Após esse procedimento foi realizado o pneumotórax para a morte do animal.

### 3.12 - Análise Estatística

Após a determinação de todos os parâmetros experimentais, realizou-se a análise estatística através de métodos adequados ao tamanho e tipo da amostra. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e para as expressões como média e desvio padrão para cada um dos grupos do experimento.

O teste utilizado para análise de variância dos dados paramétricos foi o ANOVA para medidas entre grupos diferentes; a fim de podermos comparar as diferenças observadas em cada parâmetro estudado seguido do teste Student-Newman-Keuls. Para análise dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann Whitney.

Consideramos diferença estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas quando obtivemos um nível de significância de pelo menos, 5% ( $p < 0,05$ ) para as análises histológicas e bioquímicas, e 1% para as análises das expressões.



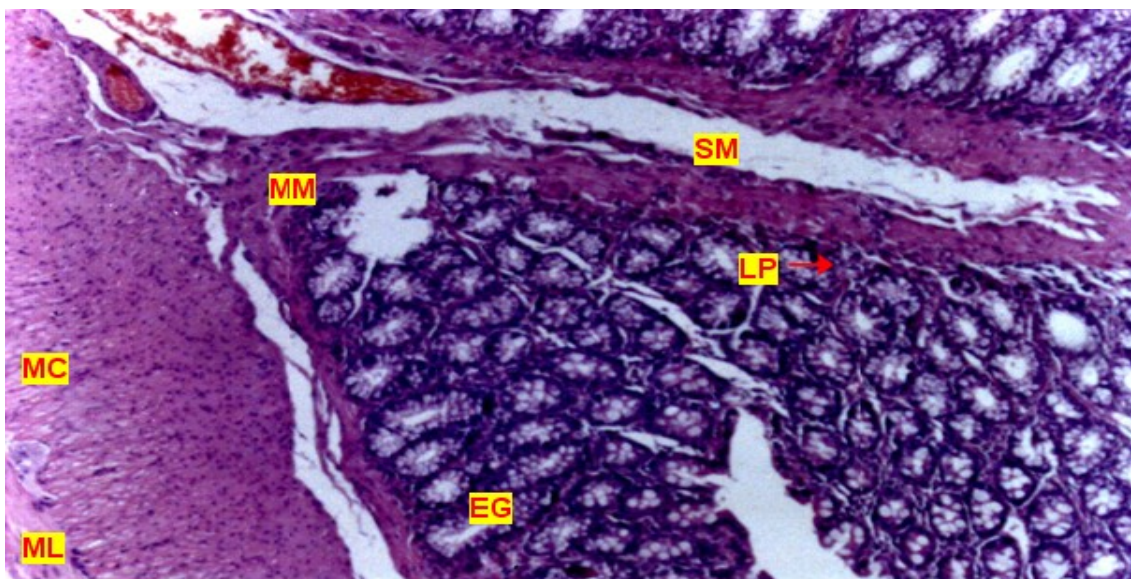
## 4 - RESULTADOS

---

### 4.1 - Estudo Histológico

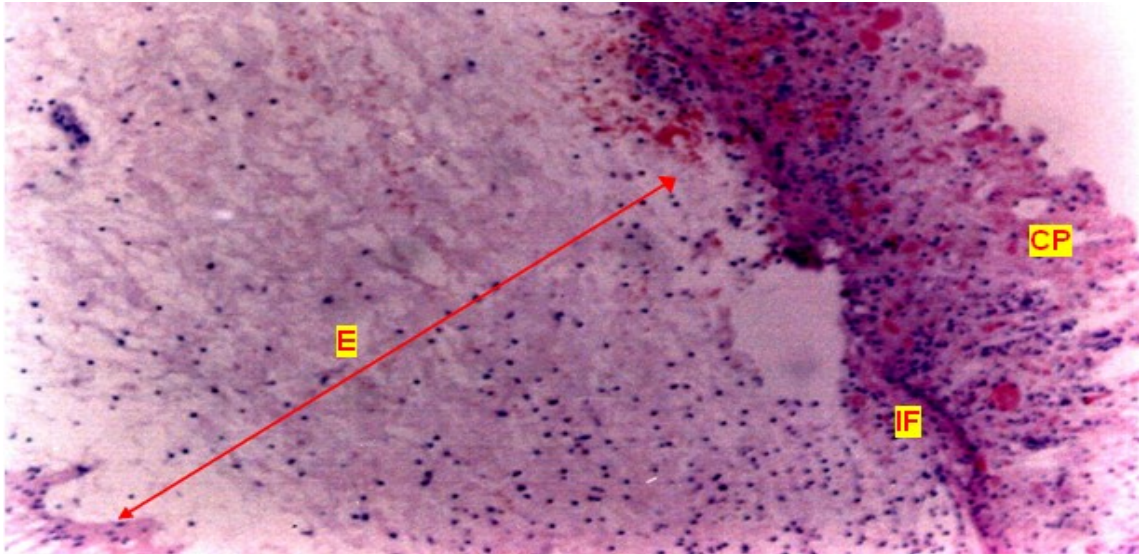
O estudo histológico foi realizado através da coloração com hematoxilina-eosina no intestino dos animais avaliados. O tecido foi retirado no momento do sacrifício e analisado em aumento de 100X e 200x.

Na **Figura 7** temos fotomicrografia de um animal CO. Nele, observa-se a arquitetura do cólon, onde identificamos a luz intestinal, o epitélio simples glandular (EG), a lâmina própria (LP), a muscular da mucosa (MM), submucosa (SM) com vasos e as camadas musculares circulares (MC) e longitudinais (ML).



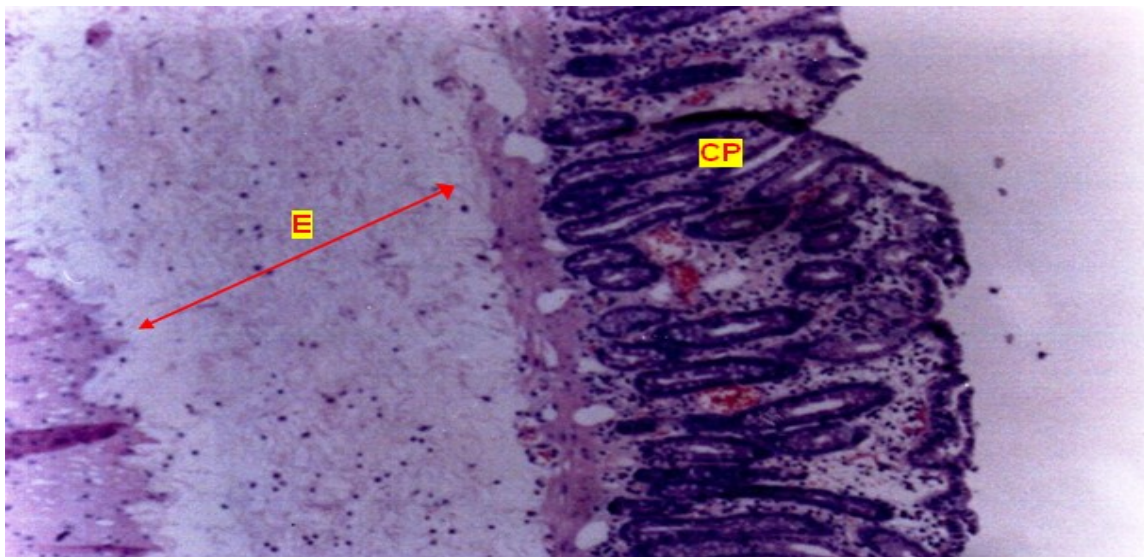
**Figura 7:** Fotomicrografia do intestino grosso de animais do grupo controle. Epitélio simples glandular (EG), a lâmina própria (LP), a muscular da mucosa (MM), submucosa (SM) com vasos e as camadas musculares circulares (MC) e longitudinais (ML), 100X.

Na **Figura 8**, fotomicrografia de um animal CL, verifica-se uma alteração da arquitetura colônica na qual ocorre uma destruição das criptas da mucosa intestinal (CP) e um considerável edema de submucosa (E), caracterizado por um grande infiltrado inflamatório (IF).



**Figura 8:** Fotomicrografia do intestino grosso de animais do grupo colite. Destruição das criptas (CP) com extenso edema de submucosa (E) caracterizado pelo infiltrado inflamatório (IF), 200X.

Na fotomicrografia de um animal do grupo G+CL (**Figura 9**) observa-se uma preservação das criptas da mucosa (CP) e um menor edema de submucosa (E), assemelhando-se, portanto, ao grupo CO.



**Figura 9:** Fotomicrografia do intestino grosso de animais do grupo glutamina+colite. Preservação das criptas (CP), Menor edema (E) 200X.

Cabe ressaltar que não foram observadas alterações histológicas no grupo de animais controles que receberam o enema com glutamina (**Tabela 4**).

Na **Tabela 4**, apresentam-se os índices macroscópicos e microscópicos na avaliação do intestino nos diferentes grupos estudados. Observa-se um aumento significativo no índice, tanto macroscópico quanto microscópico, do grupo CL, e uma diminuição desses índices no grupo G+CL.

**Tabela 4:** Média dos índices de danos macro e microscópicos na colite experimental.

Índices de Dano	Grupos Experimentais			
	CO	CO+G	CL	G+CL
<b>Macroscopia</b> (0-5)	0±0	0±0	4.7±0.2*	2,7±0.3 <sup>#</sup>
<b>Microscopia</b> (0-3)	0±0	0±0	2,7±0.1*	1.8±0.3 <sup>#</sup>

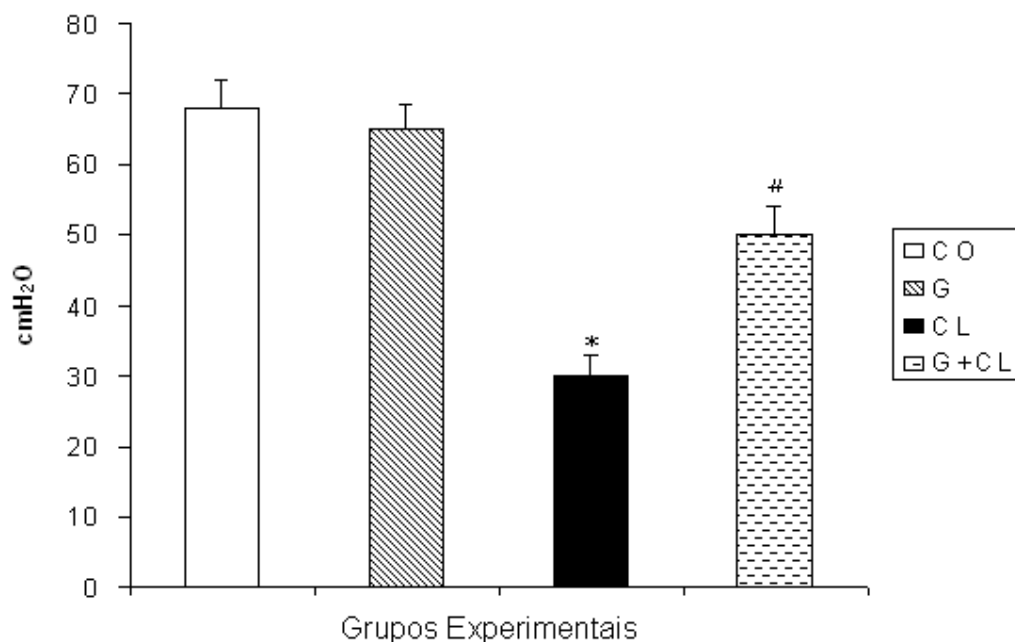
Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) 8 animais cada grupo.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 - Medida da Pressão Anal Esfincteriana

A pressão anal esfincteriana, avaliada por manometria ano-retal, demonstrou haver uma diminuição significativa das pressões em animais com colite, quando comparados ao grupo controle. Os grupos CO e G+CL demonstraram um aumento significativo das pressões, quando comparados ao grupo CL.



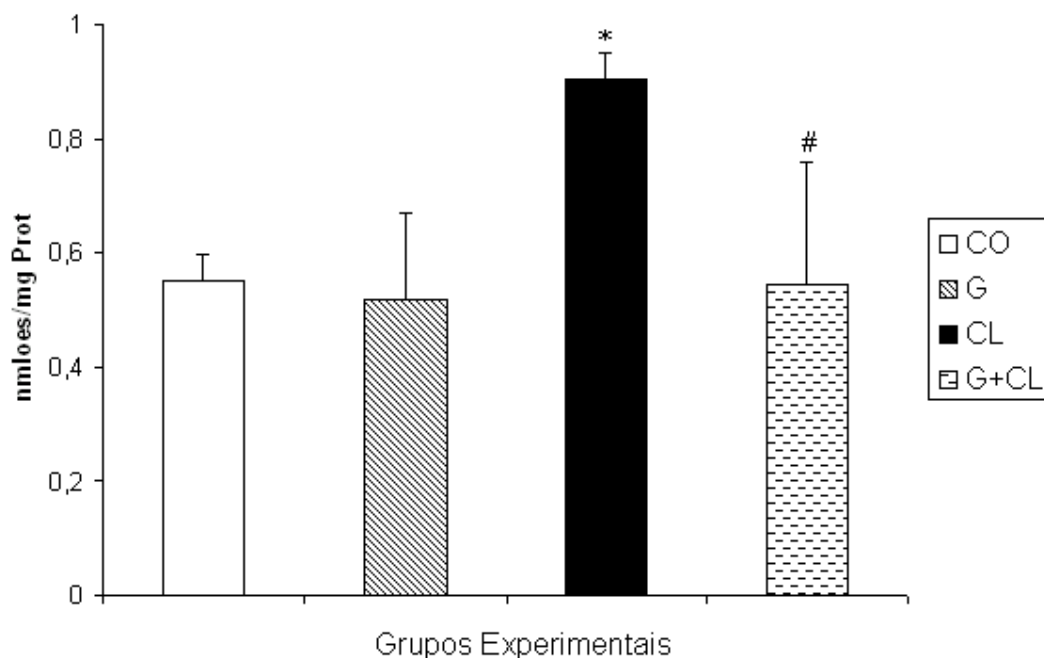
**Figura 10:** Valores médios das pressões anais esfinterianas. Os resultados estão expressos como média + erro padrão (EP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e (G+CL) ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 - Determinação do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado pelas técnicas de TBARS e QL. Observaram-se alterações significativas principalmente entre o grupo CL e o CO, e entre o grupo CL e o G+CL. O TBARS (Figura 11) dos animais do grupo CL aumentou em relação ao CO ( $p < 0,05$ ). Não foi apresentada diferença significativa entre os animais do grupo CO e G. Com a administração prévia da glutamina, grupo G+CL, houve uma diminuição na lipoperoxidação desses em relação ao grupo CL ( $p < 0,05$ ).

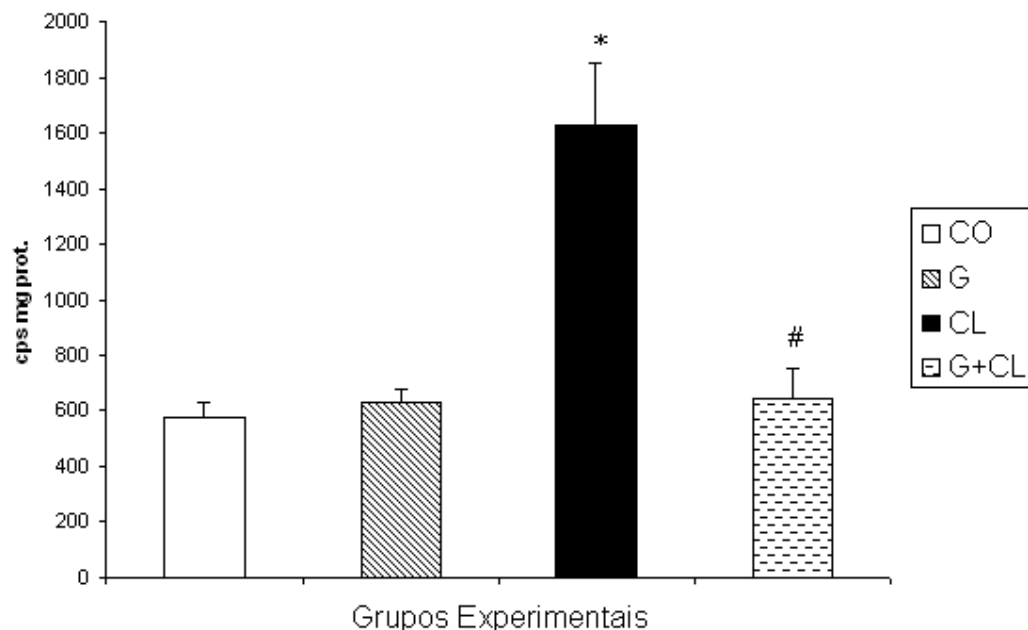


**Figura 11:** Valores médios das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e (G+CL) ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar a quimiluminescência (**Figura 12**) dos animais do grupo CL, verificou-se que houve aumento em relação aos do grupo CO ( $p < 0,05$ ). Os animais do grupo G+CL apresentaram uma redução comparados aos do grupo CL ( $p < 0,05$ ). Ressalta-se que nos animais do grupo CO e do grupo G a QL foi semelhante e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 12:** Valores médios da quimiluminescência (QL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

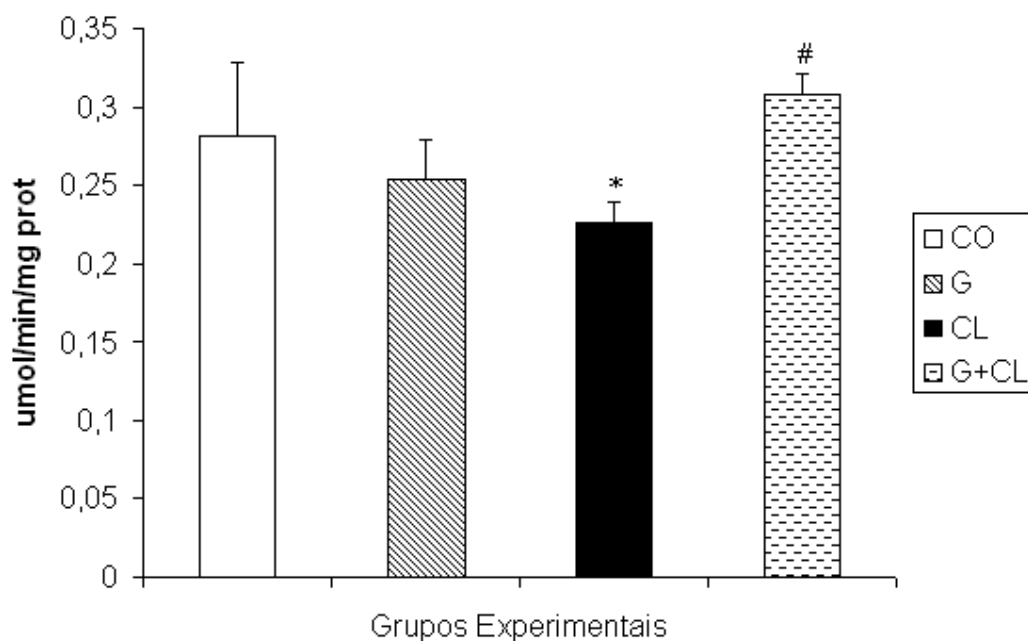
\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e (G+CL) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 - Atividade da Enzima Antioxidante Glutathione Peroxidase

Na **Figura 13**, podemos observar os valores referidos à atividade da enzima antioxidante GPx no homogeneizado dos tecidos dos diferentes grupos avaliados. Houve diminuição nos animais do grupo CL, quando comparados aos do grupo CO ( $p < 0,05$ ), e aumento nos animais do grupo G+CL, quando comparados aos do grupo CL ( $p < 0,05$ ). A comparação da atividade da GPx entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.





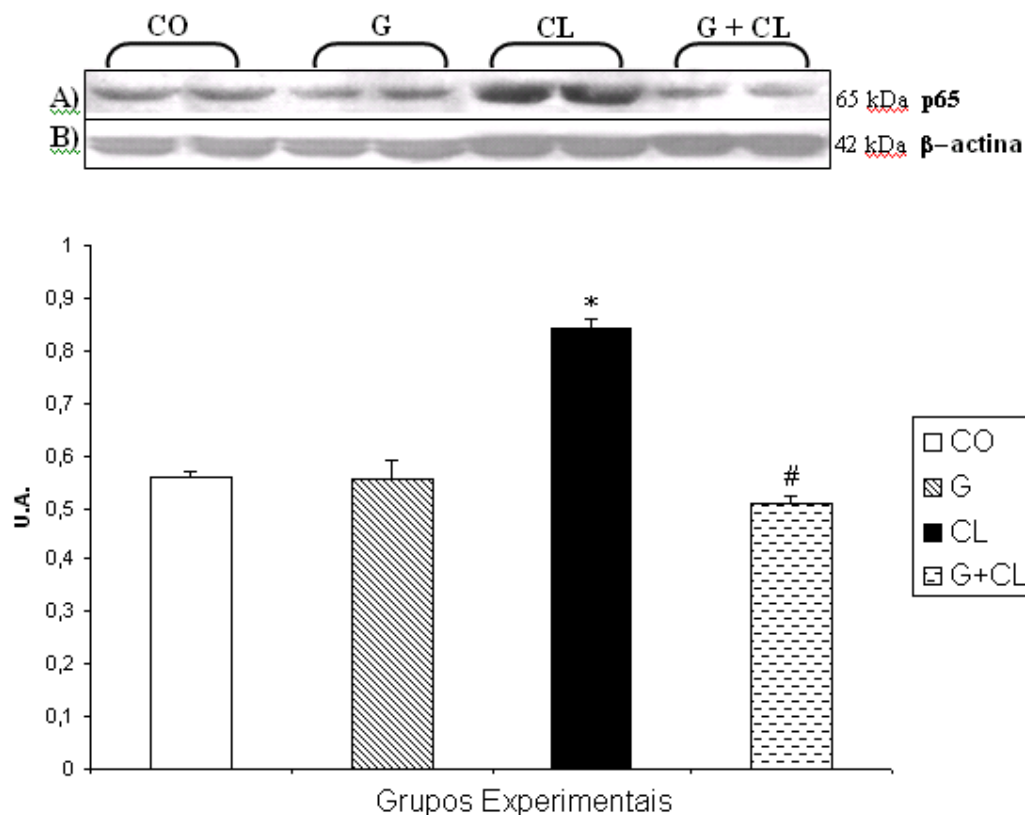
**Figura 13:** Atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx). Os resultados estão expressos como média + erro padrão (EP), para oito animais em cada grupo.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 - Expressão da Subunidade p65 do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B em Extratos Nucleares

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) foi avaliada pela expressão da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, em extratos nucleares dos tecidos, através de técnica de *Western Blot* (**Figura 14**). Observou-se que os animais do grupo CL apresentaram aumento estatisticamente significativo ao serem comparados com o grupo CO. Nos animais do grupo G+CL, houve diminuição, quando comparados aos do grupo CL ( $p < 0,01$ ). A comparação da expressão do p65 entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.



**Figura 14.** Expressão do p65 em extrato nuclear. (A) Representação da análise por *western blot*. B) Valores foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três diferentes observações.

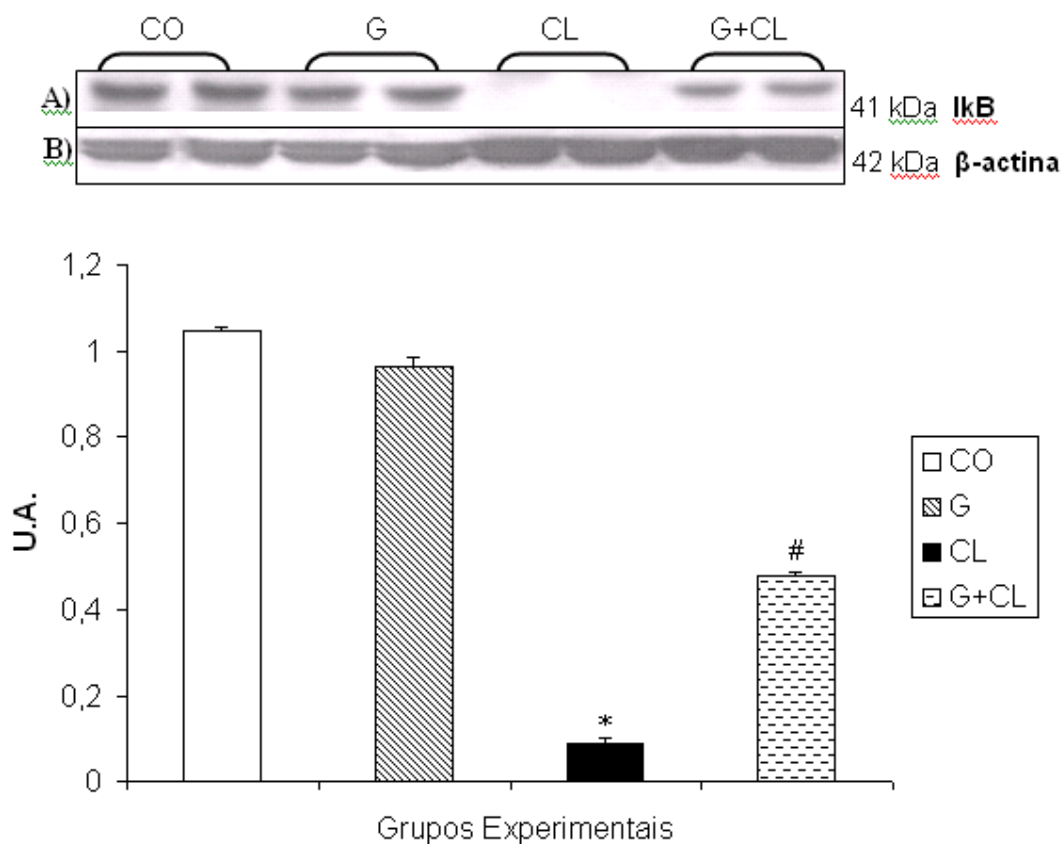
\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,01$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,01$ ).

#### 4.6 - Níveis Citoplasmáticos do I $\kappa$ B.

A **Figura 15** mostra os efeitos da colite e da administração da glutamina sobre o I $\kappa$ B. Observou-se que os animais do grupo CL apresentaram diminuição na expressão em relação aos do grupo CO. Nos animais do grupo G+CL ocorreu um aumento, quando comparados aos do grupo CL ( $p < 0,01$ ). A comparação da expressão do I $\kappa$ B entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.





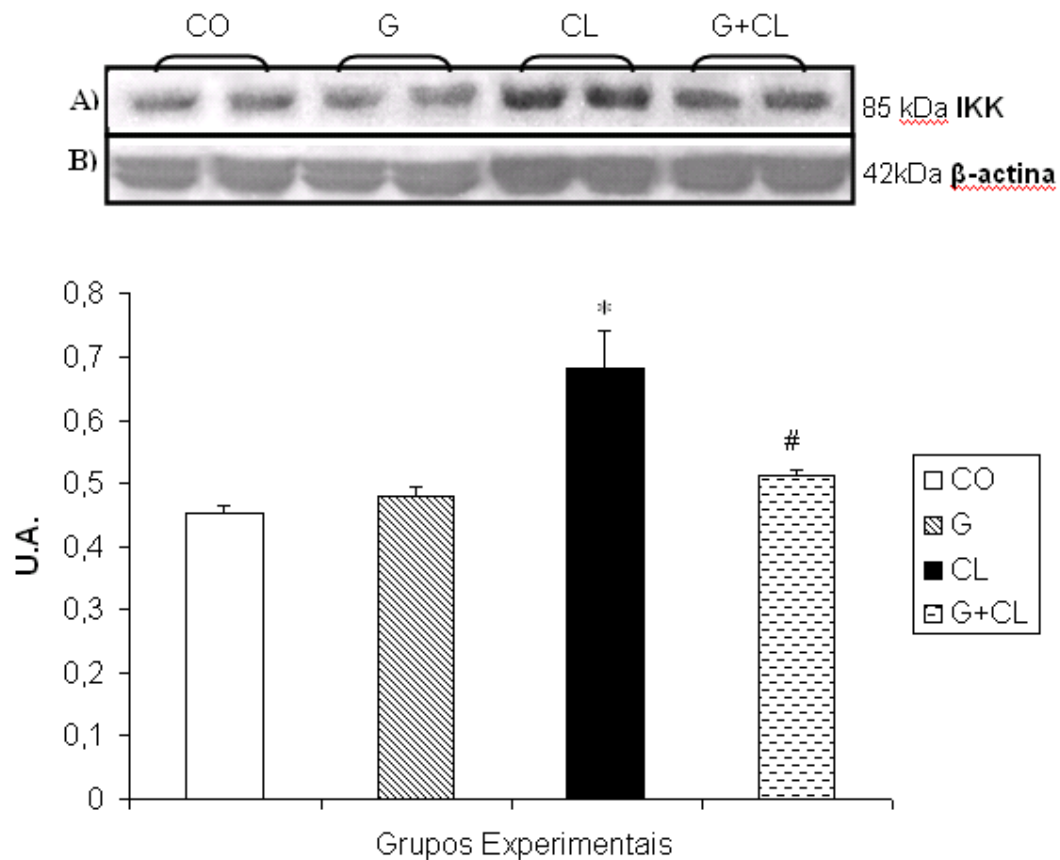
**Figura 15.** Expressão do inibidor kappa beta (IkB). (A) Representação do *Western blot*. (B) Valores expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três diferentes observações.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,01$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,01$ ).

#### 4.7 - Níveis Citoplasmáticos do IKK

A **Figura 16** mostra os efeitos da colite e da administração da glutamina sobre o ikk. Observa-se que os animais do grupo CL apresentaram aumento na expressão em relação aos do grupo CO. Nos animais do grupo G+CL, ocorreu diminuição, quando comparados aos do grupo CL ( $p < 0,01$ ). A comparação da expressão do IKK entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.



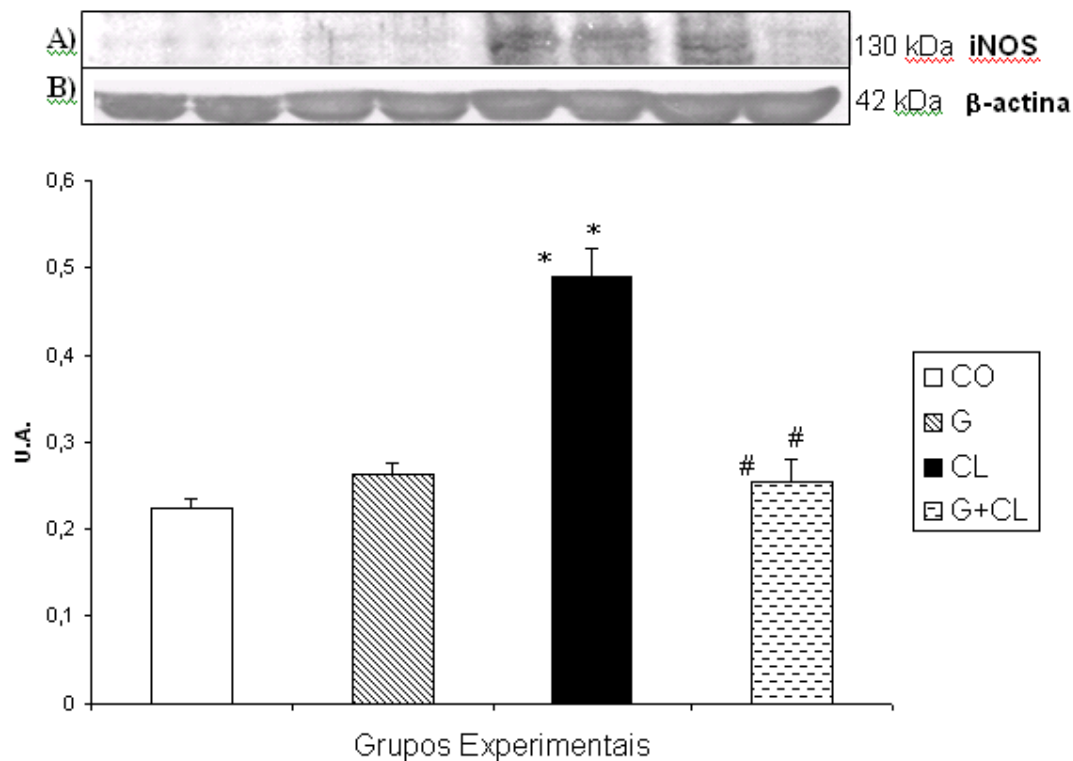
**Figura 16.** Expressão da IKK. (A) Representação da análise por *Western blot*. B) Valores foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três diferentes observações.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,01$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,01$ ).

#### 4.8 - Expressão da Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS)

Na **Figura 17**, são observados os resultados da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos homogeneizados de tecidos. Observou-se que os animais do grupo CL apresentaram aumento estatisticamente significativo ao serem comparados com o grupo CO ( $p < 0,01$ ). Nos animais do grupo G+CL, houve diminuição quando comparados aos do grupo CL. A comparação da expressão da iNOS entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.



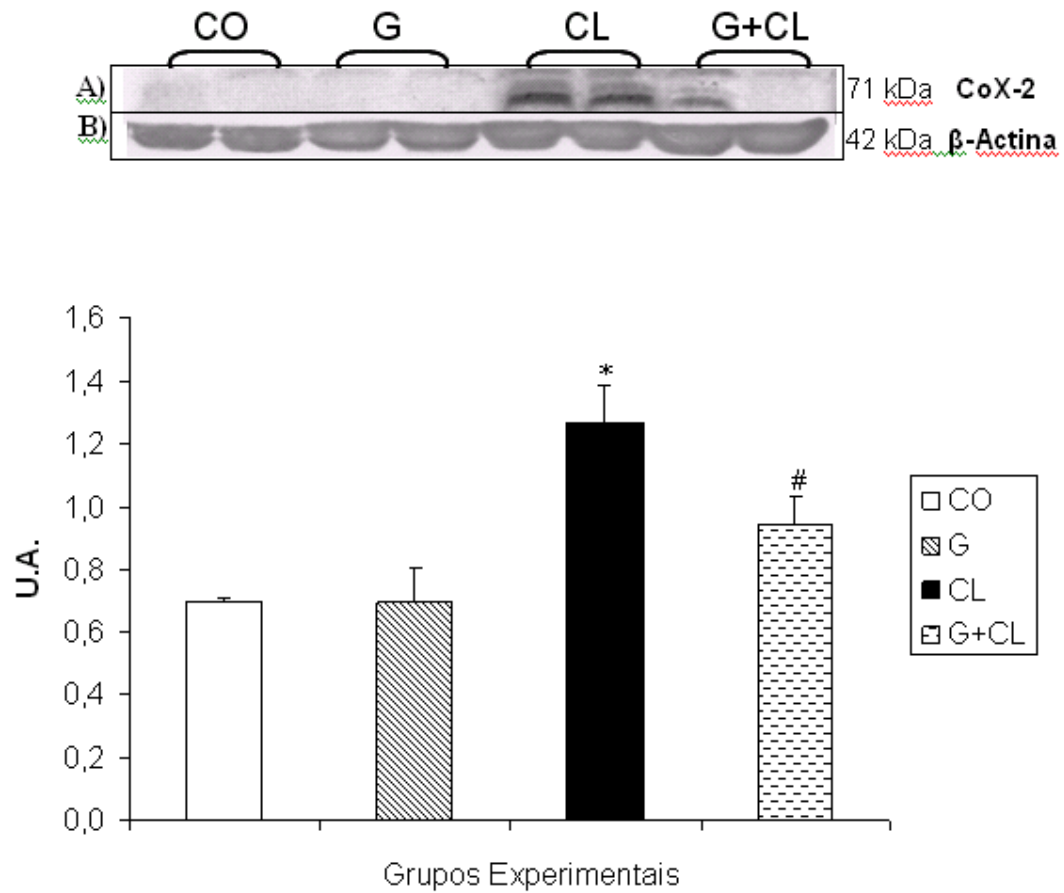
**Figura 17.** Expressão da NO sintase induzível (iNOS). (A) Representação da análise por *Western blot*. B) Valores foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três diferentes observações.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,01$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,01$ ).

#### 4.9 - Expressão da Cicloxigenase 2 (COX-2)

Na **figura 18** são demonstrados os resultados da expressão da cicloxigenase 2 no homogeneizado de tecidos. Observou-se que os animais do grupo CL apresentaram aumento estatisticamente significativo ao serem comparados com o grupo CO ( $p < 0,01$ ). Nos animais do grupo G+CL houve diminuição da expressão, quando comparados aos do grupo CL. A comparação da expressão da COX2 entre os animais do grupo CO e do grupo G não mostrou diferenças significativas.



**Figura 18.** Expressão da COX2. (A) Representação da análise por *Western blot*. (B) Valores foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de três diferentes observações.

\* - diferença significativa entre o grupo CO e CL ( $p < 0,01$ ).

# - diferença significativa entre o grupo CL e G+CL ( $p < 0,01$ ).

## 5 - DISCUSSÃO

---

A doença intestinal inflamatória (DII) é uma condição clínica cuja etiologia ainda é desconhecida. Muitos fatores, entretanto, vêm sendo implicados na sua patogênese tais como a infiltração leucocitária e a superprodução de agentes pró-inflamatórios. A lesão tecidual produzida por neutrófilos vem sendo atribuída à sua capacidade de liberar uma grande variedade de espécies ativas de oxigênio (EAO) e de nitrogênio. Esses agentes estão envolvidos no desenvolvimento da lesão tecidual em várias doenças inflamatórias e também na colite. Inúmeras substâncias vêm sendo pesquisadas no sentido de melhorar a DII através de uma ação direta sobre o processo inflamatório e também sobre o estresse oxidativo.

Neste trabalho utilizamos a glutamina tópica via anal para demonstrar o efeito benéfico dessa substância no processo inflamatório do cólon. A glutamina foi inicialmente utilizada de forma profilática em pacientes a serem submetidos à radioterapia pélvica, quando se observou uma diminuição da incidência e da gravidade de enterite actínica, além de apresentar um papel fundamental na defesa imunológica da barreira mucosa do intestino através da sua participação na formação de imunoglobulinas, especialmente a IgA (CURI *et al.*, 2005). Foi demonstrado também que a glutamina diminui os efeitos inflamatórios da enterocolite induzida por metotrexato e que diminui a translocação bacteriana em animais com sépsis abdominal (MACHLIN & BENDICH, 1985). Este aminoácido é também capaz de agir sobre a atividade dos macrófagos, interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios (CURI *et al.*, 2005). Além de efeitos protetores diretos como os citados acima, a glutamina tem uma importante função em processos inflamatórios intestinais, atuando sobre os radicais livres de oxigênio. Welbourne &

Miers (1998) demonstraram que a glutamina, na presença de inflamação, aumenta o fluxo de glutathione no fígado e no trato gastrointestinal.

Para reproduzir a DII em ratos, utilizamos o modelo de ácido acético via anal. Trata-se de um modelo de indução aguda, tóxica e já extensamente utilizado em pesquisas com animais. Reproduz o processo inflamatório do cólon com formação de abscessos crípticos, infiltrado leucocitário, edema de submucosa e ulcerações de mucosa. (AKGUN *et al.*, 2005; MAHGOUB *et al.*, 2005). Akgun *et al* (2005) verificaram a presença de um importante infiltrado inflamatório intersticial na mucosa e submucosa de ratos submetidos à colite experimental. El-Medany (2006), além de descrever a lesão tecidual provocada pelo ácido acético no cólon de ratos, também estabeleceu uma relação entre esta lesão e um escore histológico. O ácido acético permite, rapidamente, o estudo do processo inflamatório, pois apenas 12 horas após a indução já é possível que sejam observadas as alterações inflamatórias. A utilização de escores histológicos permite a quantificação mais objetiva da lesão no cólon, bem como os seus parâmetros de melhora.

Na avaliação dos índices macroscópicos e microscópicos do intestino em nosso modelo (Tabela 4), confirmam-se os achados da colite nos grupos induzidos pelo ácido acético (Figura 8) pelos escores apresentados ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle (Figura 7). Pode-se observar importante infiltrado leucocitário, edema de submucosa, focos hemorrágicos, abscessos crípticos e destruição de criptas com formação de úlceras. Os animais do grupo G+CL (Figura 9), por sua vez, apresentaram diminuição significativa na extensão e no grau dessas alterações, com diminuição do infiltrado inflamatório e, conseqüentemente, uma redução significativa nos escores macro e microscópicos da colite. Este mesmo efeito foi encontrado por outros autores que utilizaram a glutamina sob a forma de enema dois dias antes da indução da colite (ISRAELI *et al.*, 2004). Em estudos de Ameho (1997) e colaboradores, com suplementação de glutamina em modelo com ratos Wistar, foram constatadas: redução das áreas de necrose, um menor acúmulo de células inflamatórias e conseqüente redução nos índices macro e microscópicos de inflamação. Resultados semelhantes foram encontrados com a ação da glutamina ou de outras substâncias antioxidantes, como a N-acetilcisteína e a superóxido dismutase com melhora nos índices histológicos tanto macro quanto microscópicos de lesão colônica (ISRAELI *et al.*, 2004; SEGUÍ *et al.*, 2004; AKGUN *et al.*, 2005).

A infiltração leucocitária é a característica mais importante e patognomônica de um processo inflamatório. Como já foi demonstrado, na colite existe um importante acúmulo de células inflamatórias no intestino inflamado. Inúmeros trabalhos já constataram o aumento da expressão de moléculas de adesão nos vasos do cólon submetido à colite. Tais moléculas são as responsáveis pela migração leucocitária para a área inflamada. Dessa maneira, o aumento da expressão das moléculas de adesão confirma também o aumento de infiltrado de células inflamatórias no tecido inflamado.

Os leucócitos, especialmente os neutrófilos, são algumas das células inflamatórias responsáveis pela produção das espécies ativas de oxigênio (EAO), e; portanto, do surgimento de estresse oxidativo no tecido inflamado. Estudos realizados por Panès & Granger (1996) observaram também que esta migração leucocitária é responsável pela elevação de espécies ativas de oxigênio no tecido afetado e que esse aumento, associado ao aumento da produção de proteases, é responsável pelo dano tecidual. A produção de espécies ativas de oxigênio aumenta com a progressão e a gravidade da doença.

Os neutrófilos ativados podem, por exemplo, produzir o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) através da reação da NADPH oxidase, a qual reduz o oxigênio molecular em ânion radical superóxido (BABIOR *et al.*, 1973), radical livre, este, capaz de provocar dano tecidual.

Os danos celulares causados pelos radicais livres possibilitam a peroxidação lipídica (LPO), a inativação enzimática, a alteração do estado redox intracelular e o dano ao DNA. A LPO é uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre as cadeias de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios (LLESUY, 2002).

Estudos de Harris *et al.* (1992) demonstraram que as espécies ativas de oxigênio (EAO) desempenham um papel importante na patogênese da colite através da lipoperoxidação.

A injúria tóxica, causada ao intestino pelo ácido acético, é reconhecida por aumentar os níveis de lipoperoxidação em ratos e, em contraponto, vários agentes

terapêuticos usados na colite experimental diminuíram estes níveis peroxidativos tais como a superóxido dismutase, sulfasalazina, N-acetilcisteína e glutamina (CETINKAYA *et al.*, 2005; MAHGOUB *et al.*, 2005; TRIANTAFILLIDIS *et al.*, 2005).

A diminuição da lipoperoxidação em manifestações de colite em humanos já foi demonstrada pelo uso de outras substâncias com ação antioxidante como a N-acetilcisteína (ISRAELI *et al.*, 2004; AKGUN *et al.*, 2005) e superóxido dismutase (SEGUÍ *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, avaliamos o estresse oxidativo através de dois métodos: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL).

Em relação ao TBARS (**Figura 11**), observamos um significativo aumento nos níveis de lipoperoxidação no grupo colite, quando comparado ao grupo controle (CL 0,78nmol/mg prot. X CO 0,52nmol/mg prot.  $P < 0,05$ ). No grupo pré-tratado com glutamina, observa-se uma diminuição significativa dos níveis de lipoperoxidação em relação ao grupo colite (CL 0,78nmol/mg prot. X G+CL 0,49nmol/mg prot.  $P < 0,05$ ). Portanto, quando avaliamos o estresse oxidativo através da técnica de TBARS, observamos uma significativa melhora no grupo que foi previamente tratado com glutamina, quando comparado ao grupo colite.

Em relação à técnica de quimiluminescência (QL) (Figura 12), obtivemos resultados semelhantes. O grupo colite apresentou valores significativamente superiores aos do grupo controle (CL 1450 cps/mg prot. X CO 610 cps/mg prot.  $P < 0,05$ ). No grupo colite pré-tratado com glutamina observamos valores significativamente inferiores aos do grupo colite (CL 1450 cps/mg prot. X G+CL 650 cps/mg prot.  $P < 0,05$ ). Ficou demonstrado, portanto, que pela técnica de QL também houve uma diminuição significativa do estresse oxidativo no grupo pré-tratado com glutamina.

A melhora nos achados histológicos da mucosa intestinal é acompanhada pela modificação observada nos parâmetros enzimáticos, assim como a restauração na integridade da membrana plasmática é traduzida pela redução na lipoperoxidação (CETINKAYA *et al.*, 2005).



Elevados níveis intracelulares das EAO podem ser o resultado de um aumento na produção das próprias EAO ou à diminuição da proteção dos antioxidantes. Na colite ocorre um desbalanço entre as substâncias oxidativas e antioxidantes, como o observado em nosso trabalho, levando ao processo de estresse oxidativo. A glutamina, por sua possível ação antioxidante, parece proteger o intestino grosso, melhorar a resposta ao dano inflamatório e diminuir o dano oxidativo do trato gastrointestinal, fato observado neste trabalho e também em trabalhos anteriores (MATÉS *et al.*, 2002; ISRAELI *et al.*, 2004).

As células possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático que converte espécies oxidantes reativas em moléculas menos reativas e protege o organismo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (FORMICA & REGELSON, 1995). A glutathione peroxidase (GPx) é responsável pela neutralização de 91% do peróxido de hidrogênio, em conjunto com um tripeptídeo antioxidante glutathione (GSH). Estudos demonstram o envolvimento direto da GPx com a colite na qual ratos com *Knockout* da GPx desenvolveram colite espontaneamente (Pravda, 2005). Foi demonstrado por Ardite *et al.* (2000) a relação da colite com a glutathione. Em ratos submetidos à colite experimental por TNBS, observou-se uma diminuição significativa dos níveis de glutathione quando comparado ao grupo controle.

Em nosso estudo, observamos uma diminuição significativa da atividade da GPx no grupo colite, quando comparado ao grupo controle (CL 0,23umol/mg prot. X CO 0,28umol/mg prot.). Durante a colite ocorre grande formação de radicais superóxido e conseqüente formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Devido a isso, ocorre um estímulo ao consumo dessa enzima no sentido de neutralizar a formação de radicais livres. No grupo de animais pré-tratados com glutamina, observamos um aumento na atividade da GPx, quando comparada ao grupo colite (G+CL 0,31umol/mg prot. X CL 0,23 umol/mg prot.). Tal fato confirma a atuação da glutamina junto à atividade antioxidante enzimática. **(Figura 13)**

Em diversos tecidos, a resposta inflamatória causa geração elevada das EAO, o que contribui para o aumento no estresse oxidativo. Os mecanismos moleculares do estresse oxidativo podem contribuir para o desenvolvimento de alterações fisiopatológicas (JOBIN & SARTOR, 2000; DIAS *et al.*, 2005). Na ausência de respostas compensatórias apropriadas do sistema antioxidante há ativação das vias

de sinalização sensíveis ao estresse oxidativo, como o complexo composto pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), entre outros (JOBIN & SARTOR, 2000).

Recentes estudos demonstram que o NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que desempenha uma função reguladora no sistema imune e nos processos inflamatórios. Sendo regulador de vários genes, como citocinas, moléculas de adesão e proteínas de fase aguda. É, portanto, muito importante nos processos inflamatórios (PANÈS, 1999; DIAS *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005, a).

O NF- $\kappa$ B possui um papel chave na ativação destes genes envolvidos na resposta inflamatória tanto no desencadeamento quanto na manutenção da inflamação. Vários genes pró-inflamatórios estão implicados na patogênese da doença intestinal inflamatória, incluindo a interleucina-1B (IL-1B), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12. Todos possuem sítios de ligação para o NF- $\kappa$ B e têm a sua transcrição regulada por ele.

A colite é uma doença intestinal inflamatória diretamente relacionada com a ativação do NF- $\kappa$ B, e a ativação está intimamente envolvida na manifestação clínica da doença. A inibição de sua ativação corresponde a uma excelente ferramenta no tratamento da colite.

O heterodímero do NF- $\kappa$ B ativado transloca ao núcleo, após a fosforilação de um de seus inibidores, o I $\kappa$ B- $\alpha$ , pelo IKK. A ativação desse fator de transcrição pode ser avaliada a partir da expressão da subunidade p65 contida em extratos nucleares através da técnica de *Western blot*.

Kellym e colaboradores (2005) demonstraram que o cultivo de células endoteliais na presença de lipopolissacarídeos (LPS) com privação de glutamina apresentou diminuição na expressão I $\kappa$ B-a, o que permite, por sua vez, uma translocação nuclear do NF- $\kappa$ B, regulando a resposta inflamatória e imune, incluindo diversas citocinas (KELLYM *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, ao avaliarmos extratos nucleares das células intestinais dos animais do grupo CL em relação à ativação do NF- $\kappa$ B, encontramos um aumento significativo da expressão do p65, quando comparado ao grupo controle

(CL 0,85 U.A. X CO 0,55 U.A.  $p < 0,05$ ). Entretanto, no grupo pré-tratado com glutamina, a ativação do NF- $\kappa$ B avaliada pela determinação da expressão do p65 apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo colite ( G+CL 0,53 U.A. X CL 0,85 U.A.). (**Figura 14**)

Quando comparamos os dados do NF- $\kappa$ B em ambos os grupos com os dados já referidos de estresse oxidativo, percebemos haver uma estreita relação entre o aumento dos níveis de NF- $\kappa$ B e o aumento dos níveis de estresse oxidativo nos grupos submetidos à colite. O oposto ocorre no grupo pré-tratado com glutamina.

Esses resultados suportam a hipótese de que o estresse oxidativo presente na colite estimule a expressão do NF- $\kappa$ B e que a administração da glutamina em animais submetidos à colite experimental reduza os seus valores até próximo aos dos animais do grupo controle.

A identificação do p65 (NF- $\kappa$ B) é predominante nos dois principais modelos de inflamação intestinal crônica a Colite Ulcerativa e a Doença de Crohn, predizendo um aumento da expressão do NF- $\kappa$ B na doença inflamatória intestinal humana. Assim como no nosso estudo, outros trabalhos encontraram uma ativação de NF- $\kappa$ B nos pacientes com colite. Neurath e colaboradores (NEURATH *et al.*, 1996; NEURATH & PETTERSSON, 1997) demonstraram um aumento significativo de níveis da proteína p65 em macrófagos da lâmina própria em células endoteliais de pacientes com a Doença de Crohn, o que foi acompanhado pela produção aumentada das citocinas pró-inflamatórias como a IL-1b, IL-6, e o TNF- $\alpha$ .

A diminuição na ativação do NF- $\kappa$ B em manifestações de colite já foi demonstrada pelo uso de outras substâncias, como a petrosaspongiolida M e a melatonina (BUSSEROLLES *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005,a). Os resultados desses estudos indicam que a ativação do NF- $\kappa$ B é o evento sinalizador inicial que contribui com a disfunção e/ou destruição celular. (BROWNLEE, 2001). Nossos dados estão de acordo com os encontrados por Li e colaboradores (2005), pois a melatonina reduz o dano inflamatório e inibe a expressão de moléculas pró-inflamatórias e a ativação do NF- $\kappa$ B. Isso ocorreu, possivelmente, devido ao bloqueio da degradação da I $\kappa$ B- $\alpha$  que impede a transcrição do NF- $\kappa$ B no núcleo da célula. (Li *et al.*, 2005 ).

Em nosso estudo, observamos uma diminuição significativa do I $\kappa$ B no grupo colite quando comparado ao grupo controle (CL 0,09 U.A. X CO 1,03 U.A.  $p < 0,05$ ). A diminuição do I $\kappa$ B no grupo colite permitiu o aumento da expressão do NF- $\kappa$ B e sua entrada no núcleo para a transcrição junto ao DNA. No grupo pré-tratado com glutamina observa-se um aumento significativo da expressão do I $\kappa$ B em relação ao grupo colite (G+CL 0,44 U.A. X CL 0,09 U.A.  $p < 0,05$ ). (**Figura 15**).

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com ratos submetidos à colite experimental em que a expressão de moléculas pró-inflamatórias, juntamente com a expressão do p65, mostraram-se aumentadas. Esse aumento foi acompanhado de uma diminuição nos níveis do I $\kappa$ B (JOBIN & SARTOR 2000; LI *et al.*, 2005).

Como já foi visto, para que o NF- $\kappa$ B penetre no núcleo a fim de promover a transcrição junto ao DNA, é necessário a fosforilação do seu inibidor I $\kappa$ B. Isto é feito através da ativação da molécula inibidora do I $\kappa$ B, chamada IKK. Sendo assim, nas situações em que ocorre um aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e diminuição da expressão de I $\kappa$ B, é esperado que haja um aumento da expressão de IKK.

Em nosso estudo isso se confirmou. No grupo colite, observamos um aumento significativo da expressão de IKK, quando comparado ao grupo controle (CL 0,69 U.A. X CO 0,45 U.A.  $p < 0,05$ ). O aumento da expressão de IKK ocasionou a diminuição da expressão do I $\kappa$ B e conseqüente aumento da expressão do NF- $\kappa$ B. No grupo pré-tratado com glutamina observamos uma diminuição significativa da expressão do IKK, comparado-o ao grupo colite (G+CL 0,51 U.A. X CL 0,69 U.A.  $p < 0,05$ ). Em conseqüência disso, como já foi demonstrado, obtivemos no grupo pré-tratado com glutamina, um aumento da expressão de I $\kappa$ B e uma diminuição da expressão de NF- $\kappa$ B. (**Figura 16**).

Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos em que foram avaliadas expressões de moléculas pró-inflamatórias como o NF- $\kappa$ B junto a diferentes tipos de substâncias antioxidantes tais como a quercitina (DIAS *et al.*, 2005). Nesses estudos, também ficaram constatadas as alterações de expressão com inibição e ativação do NF- $\kappa$ B pelas moléculas I $\kappa$ B- $\alpha$  e IKK na presença ou não de substâncias antioxidantes.

A principal consequência da ativação das vias de sinalização intracelular pelo NF- $\kappa$ B são os produtos decorrentes dos genes estimulados. Um desses produtos é o óxido nítrico (NO). Sabe-se que o óxido nítrico é capaz de provocar diversos danos celulares e é responsável pelo aparecimento de algumas complicações encontradas na colite (FILLMANN *et al.*, 2002; KOLIOS *et al.*, 2004).

O NO funciona como um sinalizador celular, mediando a vasodilatação, quando produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) em células vasculares endoteliais, mas também como uma fonte altamente tóxica e oxidante, quando produzido em altas concentrações pela NOS de macrófagos no processo patológico (FILLMANN e al, 2002). Nessa situação, o NO pode reagir com as espécies ativas de oxigênio, formando o peroxinitrito que é uma espécie oxidante altamente reativa, contribuindo para o estresse oxidativo ou nitrosativo (LLORENS & NAVA, 2003).

O papel do óxido nítrico na fisiopatologia da colite não está completamente estabelecido, mas existem evidências de que favorecem o envolvimento do NO nestes processos patológicos (FILLMANN *et al.*, 2002).

Sabe-se que pacientes com retocolite ulcerativa e Doença de Crohn, comparados a controles, revelaram um significativo aumento da isoforma induzível da NO sintase (BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993).

Após serem expostas a citocinas pró-inflamatórias, as células endoteliais intestinais apresentam níveis aumentados de mRNA da iNOS. A colite induzida por ácido acético estabelece um aumento na expressão, tanto da proteína quanto do mRNA, da enzima iNOS, que é acompanhada pelo aumento na geração de NO (KANKURI *et al.*, 2001).

Já foi demonstrado também que a atividade enzimática da NOS está aumentada em modelos experimentais de colite e na doença intestinal inflamatória humana. A intensidade da manifestação clínica da doença está diretamente relacionada ao valor da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)(CROSS & WILSON, 2003).

A quantidade elevada de iNOS, gerada durante a inflamação, favorece o desenvolvimento da colite experimental (IWASHITA *et al.*, 1998). Williams e

colaboradores verificaram que na retocolite ulcerativa há uma elevação nos níveis da expressão iNOS que foram correlacionadas com a severidade da doença (WILLIAMS *et al.*, 2002).

Na **figura 17**, observamos um aumento significativo da expressão de iNOS nos animais do grupo colite quando comparado ao grupo controle (CL 0,5 U.A. X CO 0,22 U.A.  $p < 0,05$ ). O aumento na expressão da iNOS relaciona-se diretamente com o aumento também encontrado na expressão do NF- $\kappa$ B no grupo colite. Nos animais que receberam o pré-tratamento com glutamina, observa-se uma diminuição significativa da expressão da iNOS (G+CL 0,25 U.A. XCL 0,5 U.A.  $p < 0,05$ ) tal qual ocorreu com a expressão do NF- $\kappa$ B. O efeito protetor da glutamina, portanto, também foi demonstrado na avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível.

Nossos resultados estão de acordo com os achados encontrados por Dong e colaboradores na colite por ácido acético (DONG *et al.*, 2003) e em outros modelos experimentais, tais como cultivos de macrófagos estimulados por LPS (MU, *et al.*, 2001) e colite experimental induzida pelo ácido trinitro-benzenossulfônico (TNBS) (LI *et al.*, 2005) ou dextran sulfato de sódio (DSS) (REED *et al.*, 2005). Um aumento na expressão da iNOS foi também demonstrado na colite em células endoteliais, indicando uma relação entre a ativação vascular e a patogênese da doença intestinal inflamatória (PRICE & LOSCALZO, 1999).

Sabe-se, atualmente, que o aumento da expressão da iNOS é um dos responsáveis pelos efeitos deletérios à função e à integridade intestinal na doença intestinal inflamatória, contribuindo significativamente para alterações imunopatológicas gastrointestinais durante os eventos inflamatórios crônicos. (HOGABOAM *et al.*, 1995; RACHMILEWITZ *et al.*, 1995; KIMURA *et al.*, 1997; SALAS *et al.*, 2002 ;GRISHAM *et al.*, 2002).

Em estudo recentemente publicado por Fillmann e colaboradores (2007), ficou demonstrado que o uso de substâncias que bloqueiam a atividade da NOS, tais como o L-NAME, produz uma melhora significativa em vários parâmetros inflamatórios em animais submetidos à colite experimental com ácido acético. Nesse trabalho, ratos submetidos à colite com ácido acético e posteriormente tratados com

L-NAME apresentaram uma significativa redução nos valores da expressão da iNOS, quando comparados ao grupo colite. Neste mesmo grupo, observou-se também a reversão de uma hipotonia da musculatura anal esfinteriana após a utilização de L-NAME por via retal sob a forma de enema. Tais resultados confirmam os achados em nosso estudo onde encontra-se uma estreita relação entre a expressão da iNOS e a intensidade das alterações em parâmetros bioquímicos, histológicos e fisiológicos em nossos animais. (Fillmann *et al*, 2007).

No presente estudo, avaliamos a pressão anal esfinteriana dos ratos Wistar como um parâmetro fisiológico de atuação do óxido nítrico. A exemplo de estudos anteriores, também aqui encontramos uma importante alteração da função muscular diretamente relacionada à inflamação e à expressão de iNOS. O grupo colite encontra-se marcadamente hipotônico, quando comparado ao grupo controle (CL 29cm H<sub>2</sub>O X CO 68 cm H<sub>2</sub>O , p<0,05). Os baixos valores da pressão anal esfinteriana no grupo colite foram parcialmente revertidos no grupo pré-tratado com glutamina (GL+CL 55cm H<sub>2</sub>O X CL 29cm H<sub>2</sub>O, p<0,05). (**Figura 10**).

Como já foi visto, o estresse oxidativo está definitivamente implicado como um fator etiológico da doença intestinal inflamatória. A produção de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio oriundas de diversas fontes diferentes inicia uma cascata de eventos que culmina com a lesão celular. Além das já demonstradas neste trabalho, a oxidação do ácido araquidônico constitui outra fonte geradora de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) a mais frequentemente envolvida no processo da colite.

Inúmeros trabalhos já demonstraram haver um importante aumento da expressão da COX-2 na colite experimental. Martin *et al* (2005) avaliaram a atividade da COX-2 na colite experimental em ratos Wistar e compararam-na com diferentes parâmetros inflamatórios tais como a infiltração leucocitária e a atividade da mieloperoxidase. Os resultados mostraram um importante aumento da atividade da COX-2 que se relacionou diretamente com um aumento dos demais parâmetros de inflamação. Fornai *et al* (2006) avaliaram a expressão da COX-2 na camada neuromuscular do intestino de ratos submetidos à colite através das técnicas de PCR e imunistoquímica. Também aqui foi encontrado um aumento significativo da expressão da COX-2 quando comparado ao grupo controle. JIANG *et al* (2006)

avaliaram não apenas a expressão da COX-2 em animais submetidos à colite experimental, mas também à atividade das prostaglandinas diretamente relacionadas a esta enzima. Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo da expressão da COX-2 e também das prostaglandinas produzidas por ela, quando comparados ao grupo controle.

No presente trabalho, observamos, na figura 18 um aumento significativo na expressão da COX-2 no grupo de animais submetidos à colite quando comparados ao grupo controle (CL 1,2 X CO 0,65 U.A.). Os resultados assemelham-se aos encontrados nos trabalhos acima citados. No grupo pré-tratado com glutamina, observamos uma redução significativa da expressão da COX-2 em relação ao grupo colite (G+CL 0,85 X CL 1,2 U.A.), mostrando um efeito protetor da glutamina também na cadeia do ácido araquidônico. Não existe comprovação sobre uma relação direta da glutamina com a atividade da COX-2; entretanto, sabemos que a glutamina age de forma inibitória sobre o estresse oxidativo a julgar por nossos resultados. Assim sendo, o processo inflamatório e conseqüentemente a ativação da cascata do ácido araquidônico também ficam inibidos. Como conseqüência, tem-se uma diminuição na expressão da COX-2 em animais pré-tratados com glutamina.

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, sugerimos que a glutamina, através de seu potencial antioxidante, exerça uma ação protetora sobre o intestino grosso nesse modelo experimental de colite.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AMEHO C.K., ADJEI A.A., HARRISON E.K., TAKESHITA K., MORIOKA T., ARAKAKI Y., ITO E., SUZUKI I., KULKARNI A.D., KAWAJIRI A., YAMAMOTO S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor a production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*; v. 41, p.487-493, 1997.
- AKGUN E., ÇALISKAN C., CELIK H. A., OZUTEMIZ A.O., TUNCYUREK M., AYDIN H.H. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid induced experimental colitis in rats. *The journal of international medical research*, v. 33, p. 196-206, 2005.
- BABIOR B.M., KIPNES R.S., CURNETT J. T. Biological defense mechanism the production by leukocytes of superoxide, a potential bavteril agent. *Journal of Clinical Investigation*, v. 52 p. 741-744, 1973.
- BERN M. J., STURBAUM C. W., KARAYALSIN S. S., BERSCHNEIDER H. M., WACSMAN J. T., POWELL D. W. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. *Journal Clinical Investigation*, v. 83, p.1810-1820, 1989.
- BOUGHTON-SMITH N.K., EVANS S.M., HAWKEY C.J., COLE A.T., BALSITIS M., WHITTLE B.J., MONCADA S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and crohn's disease. *Lancet*, v. 342, p. 338-340, 1993.
- BOVERIS A. & B. CHANCE. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Journal of Biochemistry*, v. 134, n. 3 p. 707, 1973.
- BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 813-20, 2001.
- BUEGE J. A., AUST S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. v. 52, p. 302-309, 1978.
- BURLEIGH D. E., HENRY M. M., SWASH M. Pharmacology of the internal anal sphincter. In: *Coloproctology and the Pelvic Floor*, p. 37-53, 1992.

- BUSSEROLLES J., PAYÁ M., D'AURIA M. V., GOMEZ-PALOMA L., ALCARAZ M. J. Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M. *Biochemical Pharmacology*, v. 69, p. 1433-1440, 2005.
- CARRIER JC, AGHDASSI E, JEEJEEBHOY K, ALLARD JP. Exacerbation of dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: role of NF-kappaB. *Int J Colorectal Dis*. 2006 May;21(4):381-7. Epub 2005 Aug 23.
- CETINKAYA A., BULBULOGLU E., KURUTAS E.B., CIRALIK H., KANTARCEKEN B., BUYUKBESE A. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, p. 131-139, 2005.
- CHAMBERS W. M., WARREN D. B. F., JEWELL D. P., McC MORTENSEN N. J. Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery*, v. 92, p. 928, 2005.
- CHEN K., LONG Y. M., WANG H., LANL., LIN Z. H. Activation of nuclear factor-kappa B and effects of pyrrolidine dithiocarbamate on TNBS-induced rat colitis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, n. 10, p.1508-1514, 2005.
- CLOSA D., FOLCH-PUY E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *Life*, v. 56, p. 185-191, 2004.
- CROSS, R. K. & WILSON K. T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 9 p.179, 2003.
- CURI R., LAGRANHA C.J., DOI S.Q., SELLITTI D.F., PROCOPIO J., PITHON-CURI T.C., CORLESS M., NEWSHOLME P. Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, v. 204 p. 392-401, 2005.
- DIAS A.S., PORAWSKI M., ALONSO M., MARRONI N., COLLADO P.S., GONZALEZ-GALLEGO J. et al. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF-{kappa}B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Nutrition*, v. 135, n. 10, p. 2299-304, 2005.
- DONG W.G., LIU S.P., YU B.P., WU D.F., LUO H.S., YU J.P. Ameliorative effects of sodium fertulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World Journal of Gastroenterology*, v. 9, p. 2533-2538, 2003.
- DROGE W. Review: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological*, v. 82, p. 47, 2002.
- DUTHIE G. S. Fecal continence and defecation. In: *Coloproctology*, HENRY M. M. 1993.
- EL-MEDANY A., MAHGOUB A., MUSTAFA A., ARAFA M., MORSI M. The effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib, on experimental colitis induced by acetic acid in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 507, p. 291-299, 2005.

- ETTARH R. R. & CARR K, E. A morphological study of the enteric mucosal epithelium in the streptozotocin-diabetic mouse. *Life Sciences*, v. 61, n. 18, p. 1851-1858, 1997.
- FILLMANN, H, MARRONI NA. Papel do óxido nítrico na pressão anal esfinteriana de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, RS. Porto Alegre, 2002. 96p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FILLMANN H, KRETZMANN NA, SAN-MIGUEL B, LLESUY S, MARRONI N, GONZÁLEZ-GALLEGO J, TUÑÓN MJ. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007 Jul 17;236(3):217-26.
- FLOHÉ L. & GUNZLER W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymology*. v. 105 p. 114-121, 1984.
- FORMICA J. V. & W. REGELSON. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids." *Food Chemical Toxicology*, v. 33, p.1061-80, 1995.
- GANONG, W. F. Review of Medical Physiology. 17 ed. USA. Appleton & Lange, 1995.
- GARDNER, E. Anatomia do Intestino Grosso; p 378-383 In: GARDNER,E.; GRAY, D.J.; RAHILLY, R. Anatomia. Ed Guanabara Koogan, 1980.
- GAO M, CHEN Y, SI JM, LIU WL, CAI JT, DU Q, WANG LJ. Induction of experimental acute ulcerative colitis in rats by administration of dextran sulfate sodium at low concentration followed by intracolonic administration of 30% ethanol. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Sep;8(9):632-7.
- GIANOTTI L, ALEXANDER JW, GENNARI P, BABCOCK GF. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 19, 69-74,1995.
- GOLDIM, J. R., RAYMUNDO, M. M. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. 2<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre. HCPA, 1997.
- GONZALEZ-FLECHA B., LLESUY S., BOVERIS A. Hydroperoxide – initiated chemiluminescence: An assay for oxydative stress in biopses of liver, heart, and muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 10, p. 41-47, 1991.
- GUTIERREZ M.B., MIGUEL B.S., VILLARES C., GONZÁLEZ-GALLEGO J.G., TUÑÓN, M.J. Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF-kappaB activation or iNOS expression. *Toxicology* (in press, doi:10.1016/j.tox.2006.02.002) 2006.
- GRANGER DN, VOWINKEL T, WOOD KC, STOKES KY, RUSSEL J. Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Sep 20.

- GRISHAM M.B., PAVLICK K.P., LAROUX F.S., HOFFMAN J., BHARWANI S. & WOLF R.E. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *Journal of Investigation in Medicine*, v.50, p.272–283, 2002.
- GROSS S. S., WOLIN M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology*, v.57, p.737-69, 1995.
- HALLIWELL B. "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *Lancet* 344(8924): p 721, 1994.
- HALLIWELL B. Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them. In: Sies, H. Antioxidants in diseases: Mecanisms and Therapy. *Advances in Pharmacology*. vol. 38. California: Academic Press, 1997.
- HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J. C. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. 1999.
- HAM A. W. & CORMACK D. H. *Histologia*. Cap.21; p, 647-650. Ed Guanabara-Koogan, 1978.
- HARRIS M. L., SCHILLER H.J., REILLY P.M., DONOWITZ M., GRISHAM M.B., BULKLEY G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 53, n. 3, p. 375-408, 1992.
- HEYLAND DK, DHALIWAL R, DAY AG, COOK D. Reducing deaths due to oxidative stress (The REDOXS Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. *Proc Nutr Soc*. 2006 Aug;65(3):250-63. Review.
- HOGABOAM C.M., JACOBSON K., COLLINS S.M. BLENNERHASSETT M.G. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *American Journal of Physiology*, v.268, p.G673–G684, 1995.
- INOUE T, MURANO M, ABE Y, MORITA E, MURANO N, YASUMOTO S, TOSHINA K, KATSU K. Therapeutic effect of nimesulide on colorectal carcinogenesis in experimental murine ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Sep;22(9):1474-81
- ISRAELI E., BERENSHTEIN E., WENGROWER D., APTEKAR L., KOHEN R., ZAJICEK G., GOLDIN E. Prophylactic administration of topical glutamine enhances the capability of the rat colon to resist inflammatory damage. *Digestive Diseases and Science*, v. 49, p.1705-1712, 2004.
- IWASHITA E, IWAI A, SAWAZAKI Y, MATSUDA K, MIYAHARA T, ITOH K. Activation of microvascular endothelial cells in active ulcerative colitis and detection of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 27, p. 74-79, 1998.

- JOBIN C., SARTOR R. B. NF-kappaB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*, v.6, n.3, p. 206-13, 2000.
- KANKURI E., VAALI K., KNOWLES R. G., LAHDE M., KORPELA R., VAPAATALO H., MOILANEN E. Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3 (Aminomethyl)benzyl]acetamide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 298, p.1128-1132, 2001.
- KARARLI T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 16, n. 5, p. 351-380, 1995.
- KARIN M. The beginning of the end: Ikappa  $\beta$  kinase (IKK) and NF-kappa B activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 27339-27342, 1999.
- KAYA E, CEYLAN A, KARA N, GÜVEN H, YILDIZ L. The effect of L-glutamine on mucosal healing in experimental colitis is superior to short-chain fatty acids. *Turk J Gastroenterol*. 2007 Jun;18(2):89-94.
- KELLYM C., LIBONI K.C., LI N., SCUMPIA P.O., NEU J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *Journal of Nutrition*, v.135, p.245-51, 2005.
- KIM HY, HAHM DH, CHAE Y, PYUN KH, LEE H, SHIM I. Acupuncture at GV01 Relieves Somatic Pain Referred by Colitis in Rats. *J Physiol Sci*. 2007 Aug 2.
- KIMURA H., MIURA S., SHIGEMATSU T., OHKUBO N., TSUZUKI Y., KUROSE I., HIGUCHI H., AKIBA Y., HOKARI R., HIROKAWA M., SERIZAWA H. & ISHII H. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestive Disease and Science*, v.42, p.1047-1054, 1997.
- KLIMBERG V. S., McCLELLAN J. L. Glutamine, cancer, and its therapy. *The American Journal of Surgery*, v. 172, p. 418-424, 1996.
- KLIMBERG V.S. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*, v. 66, p. 62-68, 1990.
- KOLIOS G., VALATAS V., WARD S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, v.113, p. 427-437, 2004.
- KRINSKY N. I. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biological Medicine*, 7(6): p 617-35, 1989.
- KUMAR K.V., RAO S.M., GAYANI R., MOHAN I.K., NAIDU M.U. Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clinica Chimica Acta*. v.298, p.111-120, 2000.
- KYLE F. Award restructuring. *Australian Nurses Journal*, v. 19, p.11-12, 1990.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDVIK S. Vitamin E from supplements has good bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 80, n. 3, p. 784, 2004.
- LI J. H., YU J. P., YU H. G., XU X. M., YU L. L., LIU S. Q. Expression and significance of nuclear factor  $\kappa$ B p65 in colon tissues of rats with TNBS-induced colitis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, n. 12, p. 1759-1763, 2005,a.
- LI J.H., YU J.P., YU H.G., XU X.M., YU L.L., LIU J., LUO H.S. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators of Inflammation*, v. 31, p. 185-193, 2005,b.
- LLESUY, S.F. "Especies Activas de Oxígeno". In: Marroni, N.A.P. et al. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas: Ulbra. 2002.
- LLORENS S., NAVA E. Review. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway. *Current Vascular Pharmacology*, v. 1, n. 3, p. 335-346, 2003.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A. L. Protein measurement with the foline reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- MAHGOUB A., EL-MEDANY A., MUSTAFA A., ARAFA M., MORSI M. Azithromycin and erythromycin ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005 p 43-52, 2005
- MARTIN AR, VILLEGAS I. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflamm Res*. 2005 Apr;54(4):145-51.
- MARKS DB, MARKS AD, AMITH CM. In: *Basic Medical Biochemistry*. Ed Lippincott. 1996, 551-556.
- MATÉS J. M., PÉREZ-GÓMEZ C., NÚÑEZ DE CASTRO I., ASENJO M., MÁRQUEZ J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, p. 439-458, 2002.
- MAXWELL S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, p. 345-361, 1995.
- MENDES R.H. Marcadores de estresse oxidativo e resposta isquêmica cardíaca em ratos diabéticos tratados com proteína de soja. *Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 2004.
- MENEGHINI R.A. Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*, v. 5, n. 28, 1987.
- MICHAELIS L. Fundamentals of oxid-reduction. In: GREEN, D. E. *Currents in Biochemical Research*. New York: Interscience, 1996.

- MIRANDA A, NORDSTROM E, MANNEM A, SMITH C, BANERJEE B, SENGUPTA JN. The role of transient receptor potential vanilloid 1 in mechanical and chemical visceral hyperalgesia following experimental colitis. *Neuroscience*. 2007 Sep 21;148(4):1021-32. Epub 2007 Aug 23.
- MOREIRA A.J, FRAGA C., ALONSO M., COLLADO P.S., ZETLLER C., MARRONI C., MARRONI N., GONZALEZ-GALLEGO J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 68, n. 10, p. 1939-46, 2004.
- MORRIS G. P., BECK P. L., HERRIDGE M. S., DEPEW W. T., SZEWCZUK M. R., WALLACE J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, v.96, p. 795-803, 1989.
- MORRYS G. P, BECK P. L. Model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, v.96, p. 795-803, 1989.
- MU M. M., CHAKRAVORTTY D., et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Endotoxin Research*, v. 7, n. 6, p. 431-438, 2001.
- MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, KATSU K. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol*. 2000 Apr;120(1):51-8.
- NATHENS AB, NEFF MJ, JURKOVICH GJ, KLOTZ P, FARVER K, GARCIA I, MAIER RV. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 2002 Dec;236(6):814-22.
- NEURATH M.F., PETTERSSON S., MEYER Z.U.M., BUSCHENFELDE K.H., STROBER W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine* v.2, p.998-1004, 1996.
- NEURATH MF, PETTERSSON S. Predominant role of NF-kappa B p65 in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. *Immunobiology* v.198, p.91-98, 1997.
- NIELSEN S. E., VAINER B., NIELSEN O. H., Comparative Studies of Superoxide Production by Microbial Wall Product-Primed Neutrophils in Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 49, p. 878-882, 2004.
- NIVATHVONGS S. *Colorectal Surgery*. Ed Bayners, 1992.
- PANÉS J. & GRANGER D.N. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, v.114, p.1066-1090, 1998.
- PANÉS J. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Pathophysiology* v.5, p. 271-282, 1999.

- PAZA T.B.C., PEDROSA R.C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápicos, In: YUNES, R.A. e CALIXTRO, J.B. Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna, p. 195-227, Chapecó, UNOESC, 2001.
- PERES W. Radicais livres em níveis biológicos. Pelotas: Educat. 1994.
- PÓVOA FILHO H. Radicais livres em patologia humana. Ed. Imago, Rio de Janeiro, Brasil, p. 416, 1995.
- PRAVDA J. Radical induction theory of ulcerative colitis. World Journal of Gastroenterology, v. 11, n. 16, p. 2371-2384, 2005.
- PRICE D.T. & LOSCALZO J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. American journal of Medicine, v. 107, 85-89, 1999.
- RACHMILEWITZ D., KARMELI F., OKON E. & BURSZTYN M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. Gut, .v.37, p.247–255, 1995.
- READ N. W. & SUN W. M. Anorectal Manometry. In Coloproctology, SWASH, M. p 119-145. 1992.
- REED K.L., FRUIN A.B., GOWER A.C., GONZALES K.D., STUCCHI A.F., ANDRY C.D., O'BRIEN M., BECKER J.M. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. Digestive Disease and Sciences, v. 50, n. 12, p. 2366-78, 2005.
- REPETTO M. G. & S. F. LLESUY. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Brazilian Journal Medicine Biological Research, v. 35, n. 5, p. 523-34, 2002.
- ROGERO M. Aspectos atuais sobre glutamina e exercício. Nutrição, Jan/Fev 2003.
- ROGLER, G., BRAND, K., VOGL, D., PAGE, S., HOFMEISTER, R., ANDUS, T., KNUECHEL, R., BAEUERLE, P.A., SCHÖLMERICH, J. & GROSS, V. Nuclear factor  $\kappa$ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. Gastroenterology, v. 115, p. 357, 1998.
- RUTGEERTS P., VAN DEVENTER S., SCREHBER S. The expanding role of biological agents in the treatment of inflammatory bowel disease-focus on the selective adhesion molecule inhibition. Aliment Pharmacologic Therapy, v. 17, p. 1435-1450, 2003.
- SALAS A.M., GIRONELLA M.M., SORIANO A., SANS M., IOVANNA J., PIQUE J.M. & PANES J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Laboratory Investigation, v.82, p.597–607, 2002.
- SANDBORN W. J. Inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v. 1093, p. 1001-1003, 1995.



- SANDERS K. M., S. M WARD. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Review American Physiology*, p 379-392, 1992.
- SANS M., PANÉS J., et al. VCAM-1 and ICAM-1 Mediate leukocyte endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. v. 116, p. 874-883, 1999.
- SANTORO M. G. Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, p. 55-63, 2000.
- SCHREIBER S, NIKOLAUS S, HAMPE J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*, v.42, p.477-484, 1998.
- SEGUÍ J., GIRONELLA M., et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS- induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 76, p. 537-544, 2004.
- SEN R., BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. *Cell*, v. 47, p. 921-928, 1986.
- SHANAHAN F., & TARGAN S. Medical Treatment of Inflammatory Bowel Disease *Annual Review of Medicine*, v. 43, p. 125-133, 1995.
- SIES H. & MURPHY M. E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 8, n. 2, p. 211-8, 1991.
- SIES H., KOCH O.R., MARTINO E., BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, v. 103, p. 287-290, 1979.
- SINGLETON J. W. Progress in inflammatory bowel disease. *Chinese Journal of Digestive Diseases*, v. 6, p. 59, 2005. *Gastroenterology*. 1998 Aug;115(2):297-306.
- SINGER II, KAWKA DW, SCHLOEMANN S, TESSNER T, RIEHL T, STENSON WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease.
- SQUADRITO G. L., PRYOR W. A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chemico-Biological Interactions*, v. 96, p. 203-206, 1995.
- SKRZYDLEWSKA E., SULKOSKI S., KODA M., ZALEWSKI B., KODA L.K., SULKOSKA M., Lipid peroxidation and antioxidant status colorectal cancer. *World journal of Gastroenterology*, v. 11, p. 403-406, 2005.
- SZABO C., LIAUDET L., SORIANO F.G. Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*, v. 28, n. 4, p. 37-52, 2000.
- TANNAHILL CL, STEVENOT SA, CAMPBELL-THOMPSON M, NICK HS, VALENTINE JF. Induction and immunolocalization of manganese superoxide

- dismutase in acute acetic acid-induced colitis in the rat. *Gastroenterology*, v. 109, p. 800-811, 1995.
- THAM D. M., WHITIN J. C., COHEN H. J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research*, v. 51, p. 641-646, 2002.
- THANNICKAL V.J., FANBURG B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. v. 279, p. 1005-28, 2000.
- TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
- TUZUN A., ERDIL A., INAL V., AYDIN A., BAGCI S., YESILOVA Z., SAYAL A., KARAEREN N., DAGALP K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Biochemistry*, v.35, p.569-572, 2002.
- WELBOURNE J., MIERS, H. Free Radicals in gastroenterology. *Gastroenterology Review*, 1998.
- WILLIAMS IL, WHEATCROFT SB, SHAH AM, KERNEY MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *International Journal of Obesity* v. 26 p.754-764, 2002.
- ZINGARELLI B. Nuclear factor- $\kappa$ B. *Critical Care Medicine*, v. 33, p. 414-416 (Suppl.) 2005.
- ZINGARELLI B., SHEEHAN M., WONG H.R. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine*, v. 31, p. S105–S111, 2003.
- YAMADA Y., MARSHALL S., SPECIAN R. D., GRISHAM M. B. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*, v. 102, p.1524-1534, 1992.
- YAMAOKA S., COURTOIS G., BESSIA C., WHITESIDE S.T., WEIL R., AGOU F., KIRK H.E., KAY R.J., ISRAEL A. COMPLEMENTATION cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, v. 93, n. 7, p. 1231-1240, 1998.
- YU P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review*, v. 74, n. 1, p.139-62, 1994.

