



## PAPEL DA MESALAZINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Daiana Silva<sup>1</sup>  
Rosa M B L Moura<sup>2</sup>  
Renata Minuzzo Hartmann<sup>2</sup>  
Norma Possa Marroni<sup>3</sup>

### Resumo

A retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) é uma doença inflamatória intestinal que envolve o cólon e o reto. Foi avaliada a ação da mesalazina sobre marcadores de estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes. Foram utilizados 20 ratos wistar divididos em 4 grupos: controle; controle+mesalazina, colite e colite+mesalazina. Os animais foram submetidos à administração de ácido acético a 4% e o tratamento com mesalazina na dose oral de 20 mg/kg 48h após a indução da colite. A mesalazina reduziu as lesões teciduais, aumentou a pressão esfíncteriana e normalizou a atividade das enzimas avaliadas. Sugere-se que a mesalazina tenha papel antioxidante na colite induzida por ácido acético. Palavras chave: antioxidante, estresse oxidativo, óxido nítrico.

### INTRODUÇÃO

A retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) é uma doença crônica que acomete principalmente o cólon, caracterizando-se por inflamação e ulceração das camadas mais superficiais, afetando apenas a mucosa e submucosa, exceto nos casos mais graves (GUYTON; HALL, 2011; WALTER, 2015).

O metabolismo oxidativo anormal gera o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) que estão diretamente envolvidos na atividade da doença (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Por outro lado, o estresse oxidativo tem seus danos minimizados por sistemas de defesa antioxidantes endógenas e/ou exógenas (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A mesalazina tem ação analgésica e anti-inflamatória e seus efeitos podem estar relacionados com a inibição da cascata do ácido araquidônico e produção de radicais livres (HIROTANI et al., 2008; HAM; MOSS, 2012). Sendo assim, o objetivo foi avaliar os efeitos da mesalazina nos animais com colite induzida por ácido acético.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Modelo Experimental

Os procedimentos com os animais estão de acordo com os Princípios Éticos padronizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais - ULBRA, Canoas, RS, sob a aprovação do mesmo (projeto 184 / CEUA 43 E).

1 Aluna de graduação do curso de Odontologia – Bolsista PIBIC/CNPq

2 Aluna de doutorado do PPG em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS

3 Professora do curso de graduação de Odontologia e PPG Bio Saúde – nmarroni@terra.com.br

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (CO), controle+mesalazina (CO+M), colite (CL), colite+mesalazina (CL+M). O modelo escolhido para a indução da colite foi uma adaptação do trabalho descrito por Yamada et al. (1992) e Tannahill et al. (1995). Os animais foram anestesiados e submetidos à administração intracolônica, por enema a partir de um cateter de 0,08 mm de diâmetro com solução de ácido acético diluído a 4% e com volume de 4 mL.

### **Administração da mesalazina**

Foram administradas nos animais doses de mesalazina por via oral a partir de uma sonda de gavagem, na dose de 20 mg/Kg diluídos em 1 mL de NaCl, uma vez ao dia, durante 48 horas após a indução da colite (adaptado de HIROTANI et al., 2008).

### **Análise Bioquímicas**

#### **Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na consequente formação de um produto corado. 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 com uma mistura de ácido tricloroacético (TCA) 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Posteriormente foram aquecidas em banho durante 15 minutos e resfriadas em gelo por aproximadamente 5 minutos. Após o resfriamento das amostras foi acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Foram colocados em agitador por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por miligrama de proteína com um comprimento de onda de 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

#### **Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) é definida por sua capacidade de inibir um sistema de detecção que reage com o  $O_2^{\cdot-}$ . A técnica de medida da SOD é baseada na inibição dessa reação (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, foi realizada a medida do meio de reação (glicina - NaOH 50 mM, pH 10) e da adrenalina (1 mM, pH 1,0), esta corresponde a 100% da reação. Na cubeta, será colocado tampão glicina 50 mM com pH 11, uma alíquota de homogeneizado e a adrenalina. Após foi realizada agitação e a leitura a 480 nm. Os dados foram expressos em Unidades de SOD por miligrama de proteína (USOD/ mg prot.).

#### **Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)**

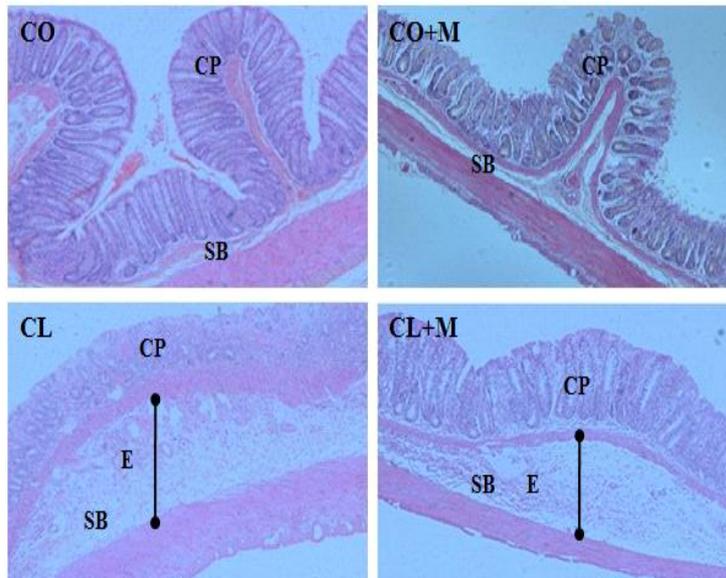
A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação de NADPH em uma mistura de reação. Em uma cubeta, foram colocados solução reguladora de fosfatos de potássio (100 mM, pH 7,0),  $H_2O$  bidestilada, azida sódica 20 mM, com GSH 40 mM, GR e NADPH. Essa mistura foi encubada durante 3 minutos e, logo após, foi adicionada a amostra diluída e  $H_2O_2$ . Por fim, a atividade da GPx foi medida em espectrofotômetro a 340 nm e sua atividade expressa em nmoles por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg prot) (FLOHÉ; GUNZLER, 1984).

### Análise Estatística

O teste utilizado para a análise de variância dos resultados foi o ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para os dados paramétricos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando obtivemos um nível de significância de pelo menos 5% ( $p < 0,05$ ).

### RESULTADOS

Figura 1: Fotomicrografia do intestino dos animais nos diferentes grupos.



Na figura 1 a fotomicrografia dos grupos CO e CO+M observou-se a arquitetura normal do cólon, onde identifica-se a luz intestinal, criptas (CP) e a submucosa (SB). No grupo CL verificou-se alteração mais severa na arquitetura colônica com destruição das CP e um edema de SB caracterizado por infiltrado inflamatório. No grupo CL+M observou-se a preservação das criptas da mucosa e um menor edema de submucosa. Criptas (CP), edema (E), submucosa (SB).

Figura 2: Valores médios dos níveis da pressão anal esfinteriana e lipoperoxidação dos animais nos diferentes grupos.

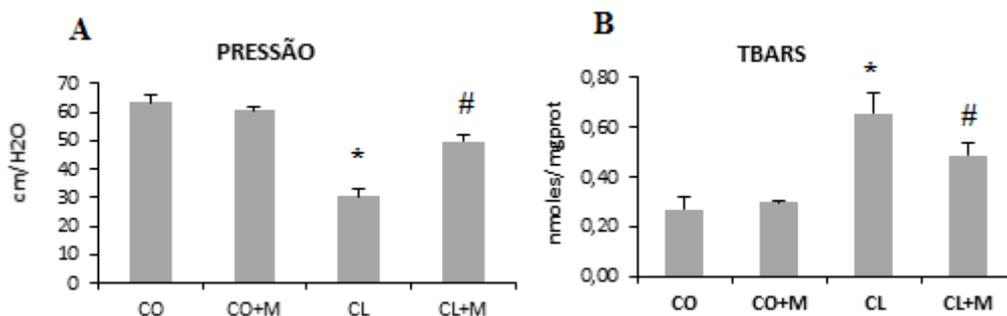


Figura 2A: A pressão anal esfinteriana demonstrou uma diminuição significativa em animais com colite, quando comparados aos grupos controles. O grupo tratado com mesalazina demonstrou um aumento significativo quando comparados ao grupo colite sendo  $p < 0,05$ . Figura 2B: Observamos um aumento significativo da LPO no grupo CL em relação aos

controles. A administração da mesalazina no grupo tratado, diminuiu a LPO em relação ao grupo colite sendo  $p < 0,05$ .

\* diferença significativa entre o grupo CL e CO / CO+M; # diferença significativa entre o grupo CL+M e CL.

Figura 3: Valores da atividade da enzima superóxido dismutase e glutathiona peroxidase dos animais nos diferentes grupos.

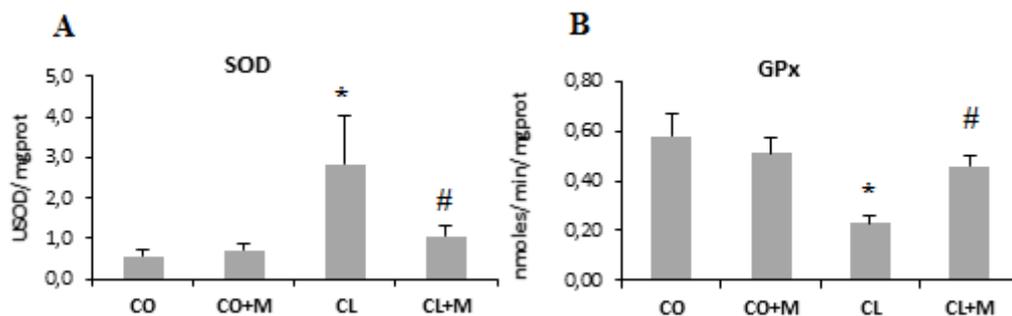


Figura 3A: Observamos um aumento na atividade da SOD nos animais do grupo CL quando comparados aos grupos CO e CO+M e diminuição nos animais do grupo CL+M em relação ao grupo CL sendo  $p < 0,001$ .

Figura 3B: Observamos uma redução significativa na atividade da GPx nos animais do grupo CL, quando comparados aos do grupo CO e CO+M e aumento no grupo CL+M, quando comparados aos do grupo CL.

\* diferença significativa entre o grupo CL e CO / CO+M; # diferença significativa entre o grupo CL+M e CL.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito da mesalazina sobre marcadores de estresse oxidativo e danos teciduais. Na análise histopatológica observamos a melhora na estrutura colônica, diminuindo o tamanho e a intensidade da lesão no intestino após o tratamento com mesalazina. Neste estudo, observamos uma diminuição dos níveis de pressão anal esfínteriana no grupo de animais com indução da colite e nos animais tratados com mesalazina foi observado um aumento significativo da pressão anal esfínteriana. Kretzmann et al. (2008) e Hartmann et al. (2014) demonstraram um aumento nos níveis de pressão anal esfínteriana quando administrado doses de dois antioxidantes: glutamina e *Boswellia serrata* (KRETZMANN et al., 2008; HARTMANN et al., 2014).

Nos níveis de lipoperoxidação observamos um aumento significativo nos níveis de LPO no grupo colite e após o tratamento com mesalazina observou-se uma redução significativa desses níveis, sugerindo o seu efeito antioxidante. Avaliamos a atividade da enzima SOD e a atividade da enzima GPx onde observamos que a mesalazina aumentou a atividade enzimática nos grupos tratados confirmando a sua ação sobre o estresse oxidativo.

Fillmann et al. (2007) utilizou a glutamina como pré-tratamento na colite induzida por TNBS e também observaram uma redução dos níveis de LPO nos animais tratados (FILLMANN et al., 2007). Hartmann et al. (2012) administrou doses do extrato de *Boswellia serrata* nos animais com colite induzida por ácido acético, observando o mesmo parâmetro das enzimas estudadas neste estudo com valores próximos ao do grupo controle após o tratamento (HARTMANN et al., 2012).

Sendo assim, sugere-se que a mesalazina apresenta uma ação antioxidante na colite devido a redução da lipoperoxidação, a restauração da atividade das enzimas antioxidantes e melhora das lesões teciduais

## REFERÊNCIAS

- BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods. Enzymol.**, v.52, p.302-9, 1978.
- CAROCHO, M., FERREIRA, F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food. Chem. Toxicol.**, v.51, p.15-23, 2013.
- FILLMANN, H. et al. 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.**, v. 236, n. 3, p. 217-26, 2007.
- FLOHÉ, L., GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods. Enzymol.**, v.105, p, 114-21,1984.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, 2011.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. **Free. Radic. Biol. Med.** 4<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc, 2007.
- HAM, M., MOSS, A.C. Mesalamine in the treatment and maintenance of remission of ulcerative colitis. **Expert. Rev. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n.2, p.113-23,2012
- HARTMANN, R.M. et al. Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Rats Induced by Acetic Acid. **Dig .Dis .Sci.**, v.57 n.8, p. 2038-44,2012.
- HARTMANN, R.M. et al. *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. **Phytother. Res.**, v.28: 1392-98, 2014.
- HIROTANI Y, et al. Changes of the peptide levels in the intestinal tissue of rats with experimental colitis following oral administration of mesalazine and prednisolone. **Yakugaku. Zasshi.**, v.128, n.9, p.1347-53, 2008.
- KRETZMANN NA, et al. Effects of Glutamine on Proinflammatory Gene Expression and Activation of Nuclear Factor Kappa B and Signal Transducers and Activators of Transcription in TNBS-induced Colitis. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v.14, n.11, p. 1504-13, 2008
- MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol.Chem.**, v.247,n 10, p. 3170-5, 1972.