



RENORBIO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

TARCISIO VIEIRA DE BRITO

**GABAPENTINA AGE COMO ANTI-INFLAMATÓRIO NO MODELO DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL, ATRAVÉS DO RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR- γ)**

PARNAÍBA, 2019

TARCISIO VIEIRA DE BRITO

**GABAPENTINA AGE COMO ANTI-INFLAMATÓRIO NO MODELO DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL, ATRAVÉS DO RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR- γ)**

Tese apresentada ao programa de doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em saúde

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

B862g Brito, Tarcisio Vieira de.
Gabapentina AGE como anti-inflamatório no modelo de
doença inflamatória intestinal, através do receptor ativado por
proliferador de peroxissoma GAMA (PPAR- γ) / Tarcisio Vieira
de Brito. – 2019.
102 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2019.
“Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa”.

1. Gabapentina. 2. Inflamação. 3. Colite. 4. Peroxissoma- γ .
I. Título.

CDD 615.1





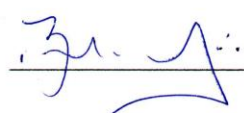
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: TARCISIO VIEIRA DE BRITO

TÍTULO DO PROJETO: “GABAPENTINA ATUA NO MODELO DE DOENÇA DE CROHN COMO ANTIINFLAMATÓRIO INTESTINAL ATRAVÉS DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR- γ).”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa - UFPI (Presidente)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	
Profª. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus – UFPI (Examinador)	<u>Aprovado</u>	
Prof. Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva - UFPI (Examinador)	<u>APROVADO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 17 de maio de 2019.

HORÁRIO: 08h30

LOCAL: Sala de Reuniões da Universidade Federal do Piauí -UFPI/PARNAÍBA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro e incontestavelmente ao magnífico DEUS de Israel, pela manutenção da minha integridade, saúde e força durante as batalhas conquistadas;

Aos meus pais Francinete e Francisco, pelo amor e ensinamento durante minha criação e pelo apoio nas lutas em busca dos meus objetivos;

À minha esposa Letícia Araujo, pelos inefáveis apoios, carinhos e conselhos iluminados que indubitavelmente servem de muralhas firmes nas batalhas diárias;

Aos meus irmãos Aurilene, Aurineide, Francisco, Maria e Fábio, pela estrutura familiar que formam, isto traz conforto e alegria nos momentos de aflição;

Aos alunos de iniciação científica José Simião e Genilson Júnior, pela enorme força e parceria nas bancadas laboratoriais durante as pesquisas deste trabalho;

Ao aluno de doutorado Renan Oliveira, pelo apoio e dedicação nos ensaios realizados em fortaleza;

Ao meu orientador PhD André Luiz, pela sabedoria e tranquilidade nas tomadas de decisões no que se refere ao andamento da pesquisa;

Aos professores chefes de laboratório Dr. Marcellus e Dr. Ronaldo, pelo carinho do acolhimento e conselhos durante a pesquisa;

A todo o grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFEX) e ao programa de pós-graduação em biotecnologia, pela contribuição na minha formação.

RESUMO

A gabapentina (GBP), análoga do ácido gama-aminobutírico (GABA), é um fármaco anticonvulsivante, com indicações também para neuralgia pós-herpética e dor neuropática. E recentemente foi comprovada a ação da GBP revertendo o processo inflamatório geral. Sendo este efeito baseado na antagonização de eventos e vias pró-inflamatórias específica como, a migração de células do sistema imunológico para o sítio da lesão, a redução da atividade da enzima Ciclooxigenase-2 e de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e IL-1 β . Com isto a gabapentina tem um forte indício de estar atuando na inibição do Fator Nuclear κ B (NF κ B), um ativador do cluster de genes do processo inflamatório, que incluem os genes para TNF- α e IL-1 β . E sabendo que o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ) é um importante receptor envolvido na ativação do NF κ B, o presente trabalho teve como objetivo estudar a participação da via do PPAR- γ durante o possível efeito anti-inflamatório promovido pela GBP na colite induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Os resultados aqui apresentados sustentam de forma muito sólida a tese de que a GBP atua diminuindo os parâmetros do processo inflamatório na colite induzida por TNBS, principalmente através da sinalização em mastócitos, e além disto, este efeito atribuído à GBP certamente está relacionado à inter-relação com o receptor PPAR- γ que por sua vez inibe a ativação do NF κ B e tendo como consequência a diminuição da ativação da cadeia gênica relacionada ao processo inflamatório intestinal que por sua vez promove uma melhora significativa do quadro inflamatório apresentado pela colite induzida por TNBS.

Palavras-chave: Gabapentina. Inflamação. Colite. Peroxissoma- γ .

ABSTRACT

Gabapentin (GBP), analogous to gamma-aminobutyric acid (GABA), is an anticonvulsant drug, with indications also for post-herpetic neuralgia and neuropathic pain. And recently GBP has been proven to reverse the general inflammatory process. This effect is based on the antagonism of specific proinflammatory events and pathways such as the migration of cells from the immune system to the lesion site, reduction of the activity of the enzyme Cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β . gabapentin has a strong indication that it is acting in inhibition of the Nuclear Factor κ B (NF κ B), an activator of the cluster of inflammatory process genes, which includes the genes for TNF- α and IL-1 β . The aim of the present study was to study the role of PPAR- γ pathway during the possible anti-inflammatory effect, and knowing that the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) is an important receptor involved in the activation of NF- promoted by GBP in trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) -induced colitis in rats. The results presented here strongly support the thesis that GBP acts by reducing the parameters of the inflammatory process in TNBS-induced colitis, mainly through signaling in mast cells, and in addition, this effect attributed to the GBP is certainly related to the inter-relationship with the PPAR- γ receptor which in turn inhibits the activation of NF κ B and consequently decreases the activation of the gene chain related to the inflammatory bowel process, which in turn promotes a significant improvement of the inflammatory picture presented by the colitis induced by TNBS.

Keywords: Gabapentin. Inflammation. Colitis. Peroxisome- γ .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	14
2.2 FISIOPATOLOGIA DAS DIIs	16
2.3 DOR VISCERAL	18
2.4 VIA DO RECEPTOR ATIVADO PELO PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR- γ).....	19
2.5 TERAPÊUTICA DAS DIIs	21
2.6 GABAPENTINA: FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA	22
2.7 AÇÃO ANTI-INFMATÓRIA E ANALGÉSICA DA GABAPENTINA.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS PARA OS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS SUGERIDOS .	27
4.2 MODELO DE DOENÇA CROHN EXPERIMENTAL	27
4.2.1 Avaliação da ação da gabapentina na colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e participação do receptor PPAR- γ nesta ação.....	27
4.2.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão.....	28
4.2.3 Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite	29

4.2.4 Contagem de mastócitos totais e ativados no tecido do cólons de ratos	30
4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	30
4.3.1 Análise dos níveis de glutaciona (GSH) na mucosa intestinal	30
4.3.2 Determinação de ácido malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal	30
4.3.3 Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	31
4.3.4 Dosagem de IL-1 β e TNF- α	31
4.3.5 Determinação de NO ₃ (nitrato) e NO ₂ (nitrito) na mucosa intestinal.....	32
4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1 β , COX-2 E iNOS	33
4.5 WESTERN BLOT PARA NFKB E COX-2.....	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 GABAPENTINA REDUZ PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DA COLITE INDUZIDA POR TNBS.....	35
5.1.1 Gabapentina reduz escores macroscópicos de lesões	35
5.1.2 Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos	36
5.1.3 Gabapentina reduz escores histológicos de dano intestinal.....	37
5.1.4 Gabapentina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de ratos	39
5.1.5 Gabapentina reduz a concentração de ácido malondialdeído (MDA) do cólon de ratos.....	39
5.1.6 Gabapentina reduz níveis de glutaciona (GSH) do cólon de ratos.....	40
5.1.7 Gabapentina reduz a concentração de metabólitos do óxido nítrico do cólon de ratos	41

5.1.8 Gabapentina reduz os níveis IL-1 β e TNF- α do cólon de ratos	42
5.1.9 Gabapentina reduz ativação mastocitária do intestino de ratos.....	43
5.1.10 Gabapentina reduz a imunomarcção para IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do cólon de ratos.....	46
5.1.11 Gabapentina reduz a expressão de COX-2 e NF κ B do cólon de ratos	48
5.2 GABAPENTINA REDUZ PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DA COLITE ATRAVÉS DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PPAR- γ	50
5.2.1 Gabapentina reduz os escores macroscópicos de lesões através do receptor PPAR- γ	50
5.2.2 Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	51
5.2.3 Gabapentina (GBP) reduz o dano histológico do cólon através do receptor PPAR- γ	52
5.2.4 Gabapentina reduz a atividade da MPO do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	54
5.2.5 Gabapentina reduz a concentração de MDA do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	55
5.2.6 Gabapentina reduz a concentração GSH do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	55
5.2.7 Gabapentina reduz NO ₃ /NO ₂ do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	56
5.2.8 Gabapentina reduz os níveis IL-1 β e TNF- α do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	57
5.2.9 Gabapentina diminui a ativação de mastócitos no cólon através do receptor PPAR- γ	59
5.2.10 Gabapentina reduz a imunomarcção para IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ	62

5.2.11 Gabapentina reduz a imunexpressão para COX-2 e NFκB em tecido do cólon de ratos através do receptor PPAR-γ.....	64
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO I.....	99
ANEXO II.....	100
ANEXO III.....	101
ANEXO IV.....	102

1 INTRODUÇÃO

A gabapentina, 1-(aminometil) ciclo-hexano ácido acético, é um análogo estrutural do ácido γ -aminobutírico (GABA), que foi inicialmente introduzida no mercado em 1994 como uma droga antiepiléptica utilizada principalmente para o tratamento de convulsões parciais (ABDEL-SALAM; SLEEM, 2009).

Este fármaco é solúvel em água, não se liga às proteínas plasmáticas e não é metabolizado em humanos, sendo excretada de forma inalterada na urina. Ele é rapidamente absorvido e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (TAYLOR, 1994) e se ligar à subunidade $\alpha 2\delta$ do receptor glutamatérgico, impedindo a ação do glutamato e causando a inibição do influxo de cálcio, aliviando assim a hiperexcitabilidade nervosa, por esta razão a gabapentina é considerada um fármaco antiepiléptico com eficácia terapêutica pré-clínica e clínica (OMORI et al., 2009; BIALER et al., 2010).

Além disto, GBP possui atividade analgésica em vários modelos experimentais de dor inflamatória (BOROUJERDI et al., 2011; THOMAS; FARQUHAR-SMITH, 2011; YEH et al., 2011) e em modelos clínicos de dor neuropática crônica, como a neuralgia pós-herpética (ROWBOTHAM et al., 1998; RICE; MATON, 2001); neuropatia diabética (BACKONJA et al., 1998); neuropatia sensorial associada ao Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV (HAHN et al., 2004) e dor fantasma (pós amputação de membro), (BONE; CRITCHLEY; BUGGY, 2002). A gabapentina também demonstrou ter um efeito analgésico útil sendo coadministrada com drogas opióides para dor neuropática do câncer (CARACENI et al., 1999; CHANDLER; WILLIAMS, 2000).

Gabapentina possui ação que regula alguns processos patológicos importantes. Dentro desta perspectiva, tona-se um importante alvo biotecnológico, que por vez, pode ser usada como mecanismo de inovação cinética para resolução de problemas de saúde relacionados à inflamação. Recentemente foi mostrado que, a gabapentina possui um potente efeito anti-inflamatório em modelos de inflamação geral atuando de forma a inibir a condição edematogênica induzida por carragenina bem com reduzir a migração de células para o peritônio, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo (DIAS et al., 2014). Estes parâmetros sobre os quais a GBP possui efetiva ação, são também classicamente encontrados em modelos de doenças inflamatórias intestinais (DIIs).

As duas principais formas clinicamente definidas como doenças inflamatórias do intestino são a colite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DC). Estas doenças são remittentes, crônicas ou condições inflamatórias progressivas que podem afetar o cólon ou todo o trato gastrointestinal (HOLLANDER, 1988). São caracterizadas pela deficiência no sistema gastrointestinal acompanhada por resposta imune defeituosa da mucosa do intestino (BRITO et al., 2014; CREER et al., 1984), tendo portanto um mecanismo fisiopatológico determinado por uma resposta imuno-inflamatória do intestino.

A fisiopatologia das DIIs está associada principalmente à ativação inadequada do sistema imunitário intestinal e sistêmico, com ênfase na ativação de células imunológicas que provocam uma reação de desequilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (AZIZA et al., 2008; WEBER; TURNER, 2007). Além disto, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio por estas células parecem desempenhar um papel crucial na fisiopatologia da colite (SANDS, 2007; SUZUKI et al., 1994).

Portadores de DIIs estão fadados a uma baixa qualidade de vida, baixo desempenho no trabalho bem como em todas as suas atividades diárias. Isto se dá devido às consequências fisiopatológicas e sintomáticas da doença. Os principais sintomas das DIIs são movimentos intestinais alterados, dor abdominal e inflamação crônica da parede do intestino (BRANDHORST et al., 2013). DIIs também estão associadas com a perda de peso, desnutrição, febre, e falta de apetite (CASTANEDA et al., 2013).

As DIIs ocorrem em todo o mundo e representam um problema de saúde, atingem preferencialmente pessoas jovens, possuem períodos de recidivas frequentes e exibem formas clínicas de alta gravidade (SOUZA et al., 2002).

Atualmente, a maior incidência anual de DIIs na Europa é de 24,3 por 100.000 pessoas/ano para CU e 12,7 por 100.000 pessoas/ano para DC, na América do Norte é de 19,2 por 100.000 pessoas/anos para CU e 20,2 por 100.000 pessoas/anos para DC e na Ásia e Oriente Médio é de 6,3 por 100.000 pessoas-ano para CU e 5,0 por 100.000 pessoas-ano para DC. A maior prevalência para UC foi de 505 por 100.000 pessoas na Europa e 249 por 100.000 pessoas na América do Norte. A prevalência anual de DC foi de 322 por 100.000 pessoas na Europa e 319 por 100.000 pessoas na América do Norte (YE et al., 2015).

Os fármacos usados para o tratamento das DIIs são: corticóides, imunossupressores, antibióticos e AINES. Destes os mais prescritos são os aminossalicilatos, anti-inflamatórios que possuem uma boa eficácia no tratamento das DIIs. Porém 90% das pessoas possuem algum tipo de intolerância a este fármaco, o que impossibilita o seu uso para o tratamento da maioria dos pacientes com DIIs (BIONDO-SIMÕES; SLEEM, 2003). Diante disto, procura-se alternativas farmacológicas que, ao passo que demonstrem uma boa eficácia terapêutica, possam trazer o mínimo de efeito adversos possíveis. Desta forma, acredita-se que tal feito necessite de aprofundamento do conhecimento sobre as mais variadas vias endógenas de proteção contra o processo inflamatório do intestino, para que se possa entender os mecanismos moleculares da composição testada.

Uma via farmacológica com importância relevante para o processo inflamatório intestinal e que tem sido nos recentes anos, alvo de pesquisas de vanguarda, é a via do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ). PPAR- γ é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, a maioria dos quais são ativadores transcricionais dependentes de ligantes. PPAR- γ é abundantemente expresso em tecido adiposo e células epiteliais do cólon. Sua expressão também tem sido observada em músculos, macrófagos e em células T e B de humanos e roedores (A BIONDO-SIMÕES DACHI et al., 2006). Tem sido demonstrado que a ativação deste receptor promove uma redução da resposta inflamatória em pacientes com DII, esta ativação mostra uma repressão da inflamação mediada pelo bloqueio do fator nuclear- κ B (NF- κ B) promovendo uma ação reguladora do processo Inflamatório intestinal (GURI et al., 2010).

O conhecimento acerca de descobertas de efeitos pleiotrópicos de fármacos que já são utilizados para o tratamento de alguma doença, promove um impacto bastante positivo nos âmbitos econômicos, sociais e biotecnológicos, uma vez que, a informação científica pode direcionar para uma farmacoterapia imediata, sem a necessidade de testes de comprovação de toxicidade ou monitoramento clínico, pois estes já existem.

Com a intenção de melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DIIs, este trabalho teve como foco, avaliar o papel do receptor PPAR- γ durante sua ação pleiotrópica, anti-inflamatória intestinal da gabapentina no modelo de colite induzida por TNBS em ratos, para propor este fármaco como alternativa terapêutica para DIIs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) são condições crônicas que compreendem principalmente dois subgrupos: colite ulcerativa (CU) e doença de Crohn (DC), que se distinguem por aspectos clínicos, endoscópicos e características patológicas que são pouco distinguíveis (WENDT; KESHAV, 2015). A CU é uma condição inflamatória crônica do trato gastrointestinal humano, afetando principalmente o cólon e o reto. É uma doença intermitente, com períodos de sintomas exacerbados e aqueles que são relativamente sem sintomas. Problemas associados à UC incluem diarreia sanguinolenta, úlceras de cólon, perda de peso, e a longo prazo, aumento do risco de câncer de cólon e patologias desconhecidas. CU afeta principalmente a mucosa de revestimento do cólon e do reto (XAVIER; PODOLSKY, 2007). A infiltração de polimorfonucleados é considerada como a lesão primária e central da colite, a qual é geralmente seguida pela perda do epitélio, perda de células caliciformes e dano da cripta (PILE et al., 2012).

Já a doença de Crohn é uma condição recorrente, inflamatória transmural que acomete a mucosa ou todas as camadas do intestino, podendo afetar todo o trato gastrointestinal da boca ao ânus. As suas manifestações clínicas resultam de uma infiltração substancial de leucócitos ativados para a mucosa intestinal tendo como consequência um processo inflamatório crônico (MARKS, 2010).

Os principais sintomas das DIIs incluem inflamação do cólon e dor abdominal, bem como outros sintomas como, sensação visceral alterada, dor, diarreia, sangramento retal, fraqueza e perda de peso (BEAUGERIE; SOKOL, 2012). Estes sintomas resultam da disfunção de células não imunes na parede do intestino, tais como células do músculo liso, neurônios entéricos e células epiteliais que regulam as funções de motilidade e de transporte (SHI et al., 2011).

Atualmente, o diagnóstico da colite ulcerativa e da doença de Crohn e a diferenciação entre ambas são baseados em padrões clínicos e histológicos inespecíficos que são muitas vezes alterados por intercorrência infecciosa, eventos iatrogênicos ou alterados por medicamentos ou cirurgia (EVGENIKOS; STEPHEN, 1996). No entanto, marcadores sorológicos que incluem anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos estarão presentes em aproximadamente 70% dos portadores de colite

ulcerativa e anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* em 50% dos portadores de doença de Crohn (RIGAUD et al., 1991; SAXON et al., 1990).

Dados relatam que a incidência da doença de Crohn é de 7 para 100.000 pessoas/ano (EUA) e 15 para 100.000 pessoas/ano (Canadá) (SONNENBERG, 1991). A Incidência da CU aumentou em geral na Europa de 6 por 100.000 pessoas/ano e a DC de 1 por 100.000 pessoas/ano no ano de 1962 para 9,8 por 100.000 pessoas/ano CU e 6,3 por 100.000 pessoas/ano DC em 2010 (BURISCH; MUNKHOLM, 2015).

No Brasil, não há dados oficiais, visto que não é caracterizada como uma doença compulsória. Mas parece estar sendo mais frequentemente diagnosticada em serviços de gastropediatria. E estudos mostram o aumento do número de casos no sudeste do Brasil, mais especificamente no interior do Estado das Minas Gerais (GABURRI et al., 1998) e no hospital universitário localizado em Ribeirão Preto no Estado de São Paulo (SOUZA et al., 2002). É mais comum na raça branca, não difere em relação ao sexo e é mais frequente em adultos jovens de 20 a 40 anos. Considerando-se a população geral, 20% tem idade entre 10 e 20 anos e 3% abaixo de 10 anos (RODRIGUES, et al., 1996).

Estudos como os de Camelo et al (2012), Puthoor e De Zoeten (2013), sugerem que as DIIs são resultado de uma resposta inflamatória inadequada a micróbios intestinais, geralmente inofensivos provenientes de microbiota em um hospedeiro geneticamente susceptível. Estímulos ambientais parecem ser capazes de desencadear uma reação imune anormal em pacientes geneticamente suscetíveis (MAYER, 2010). Alguns fatores podem estar implicados, como: aumento no consumo de açúcar, dieta pobre em fibras, conservantes alimentares e agentes infecciosos (SONNENBERG, 1986).

Especialistas afirmam que as DIIs surgem da interação de quatro fatores fundamentais: ambiental (tabagismo, dieta, hábitos higiênicos), genético (existe uma ocorrência familiar e alguns genes como CARD15 já estão identificados como estando implicados nas DIIs), microbiano (uma resposta anormal do sistema imunológico contra a microbiota intestinal); e, por fim, o imunológico (a resposta imunológica é a principal responsável pelo desenvolvimento da inflamação). Sendo embasado através de tais propostas, as causas das DIIs se encontram em uma tétrede composta por fatores genéticos, ambientais, microbianos e imunológicos. Segundo Ferrari et al

(2012) nenhum destes fatores de forma isolada pode provocar a gênese da DIIs, no entanto a interação entre eles pode desencadear a doença bem como de acordo como a natureza de cada fator pode determinar a gravidade da condição inflamatória.

2.2 FISIOPATOLOGIA DAS DIIs

A indicação da doença inflamatória intestinal se dá através da infiltração acentuada de células imunitárias inatas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células *Natural Killer*) e células imunes adaptativas (células B e células T). O aumento do número e ativação das mesmas na mucosa intestinal eleva os níveis locais de fator necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β , interferon- γ , e citocinas da via Th17 (interleucina 23), tornando uma inflamação mais acentuada (XU et al., 2014).

No cólon saudável, macrófagos intestinais podem ser encontrados na mucosa, próximo à membrana basal da camada epitelial. Na DI, o número dos mesmos estão aumentados, indicando recrutamento para o intestino inflamado. Levando a uma contribuição para os danos intestinais, ao liberar citocinas, radicais livres, e outros mediadores inflamatórios, tanto por fagocitar antígenos ou agindo como células apresentadoras de antígenos (STEVCEVA, 2001).

Os mastócitos estão distribuídos no tecido conjuntivo, em sua grande maioria na submucosa (PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013). Eles agem pela degranulação e liberação de mediadores, como: serotonina, histamina, substância P, heparina e leucotrieno (SHI et al., 2011).

A DC é caracterizada por uma inflamação transmural e descontínua ocasionada pela ação de linfócitos *T-helper* (Th1/Th17). Enquanto na CU, ocorre um acometimento das camadas mucosa e submucosa do cólon, mediado por linfócitos da subpopulação Th2 (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012; PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013). Segundo Stevceva (2001), o número de linfócitos T está aumentado nas amostras de tecidos cólicos acometido por DI. Tendo uma predominância de linfócitos T CD8 na DC. Estes liberam grandes quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13, capazes de induzir macrófagos, monócitos, neutrófilos, células T e células *natural Killer* (NK) a liberar TNF- α , IL-1 e IL-6. (MAYER, 2010; CAMELO et al., 2012; PUTHOOR; DE ZOETEN, 2013).

Devido à constante exposição da mucosa intestinal a microrganismos e xenobióticos, no intestino normal, a IL-10 é a citocina anti-inflamatória responsável por

manter o ambiente em equilíbrio por sua atividade supressora sobre as citocinas pró-inflamatórias (GLOCKER et al., 2009). Além de inibir citocinas do tipo Th1, como IL-2 e interferon- γ (PAUL et al., 2012). Quando esse equilíbrio é quebrado, os linfócitos e macrófagos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e quimiocina ligante 1 (CXCL1). CXCL1 é um quimiotático de neutrófilos e indutor de inflamação, e sua expressão gênica está aumentada em pacientes com DII (SZALAI et al., 2014).

As citocinas pró-inflamatórias uma resposta imunoinflamatória contra vários agentes nocivos, incluindo agentes microbianos (SZKARADKIEWICZ et al., 2009). Os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), são fatores preponderantes na colite ulcerativa, por promover a degradação da matriz de colágeno pelos fibroblastos intestinais, com consequente perda da integridade da mucosa e ulceração. A concentração dessas citocinas e a expressão dos RNAm correspondentes estão aumentados na mucosa colônica, fluidos intestinais, baço, soro de pacientes com CU por exemplo. Há uma correlação significativa entre a atividade destas citocinas e a intensidade da colite (MACDONALD et al., 2000). O TNF- α ativa leucócitos, inibe a apoptose de células inflamatórias e inibe a proliferação de células T ativas, aumenta a permeabilidade vascular. Pode causar inflamação diretamente e indiretamente ao promover a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, pois regulam genes que controlam a expressão de citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas imunorreguladoras e mediadores pró-inflamatórios. O TNF- α e a IL-1 β tem efeitos sinérgicos e parecem induzir um ao outro (BINGHAM, 2002). O TNF- α também participa da produção de óxido nítrico (NO) e óxido-nítrico sintase induzida (iNOS), que por sua vez promovem mais inflamação que a IL-1 β (TIAN et al., 2003). Esse conhecimento permitiu o uso de medicações anti-TNF- α para controle e remissão de formas moderadas e graves de DII (ENGEL; NEURATH, 2010).

As óxido-nítrico sintases neuronal e endotelial (nNOS e eNOS) são enzimas, presentes na mucosa gastrointestinal, que regulam a microvasculatura, a permeabilidade e manutenção da perfusão tecidual. Citocinas podem inibir a expressão de nNOS, aumentar a de iNOS, que, exerce atividade inflamatória pelo aumento da liberação de NO. O NO pode ser benéfico ou deletério a depender da sua concentração, duração e sítio de síntese. Na mucosa intestinal, em concentração

aumentada, promove maior lesão tecidual, hipomotilidade e a proliferação bacteriana (PORRAS et al., 2006; SZALAI et al., 2014).

Como visto acima a gravidade da inflamação intestinal, é orquestrada por diversos mecanismos intracelulares e vias de sinalização, ou seja, quanto mais intenso for o envolvimento de fatores e vias importantes para a fisiologia celular, maior será a gravidade do processo inflamatório. O fator de transcrição nuclear kappa B é um importante mediador inflamatório que tem sido observado em alto nível em macrófagos e células epiteliais isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) (WANG et al., 2016).

O NFκB é um fator de transcrição universal que é ubiquamente expresso e responde a diversos estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento e bactérias ou vírus pela expressão de genes de resposta ao estresse em muitas células (HAYDEN; GHOSH, 2012). Este fator de transcrição é constitutivamente expresso no citoplasma, onde se liga ao inibidor da alfa kappa B (IκBα), uma proteína que mascara o sinal de localização nuclear de NFκB, retendo-o assim no citoplasma (GHOSH et al., 1998). Os indutores de NFκB atuam por cascatas de sinalização intracelular que ativam as quinases IKK que fosforilam duas serinas N-terminais específicas de IκBα resultando em poliubiquitinação e degradação do IκBα no proteossoma 26S (GHOSH; KARIN, 2002). Quando IκBα é degradado, NFκB migra para o núcleo e modula a transcrição de genes alvo tais como os que codificam a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-1β, TNF-α e IκBα (DE SÁ LIMA et al., 2013).

Os distúrbios inflamatórios intestinais crônicos, como as doenças Inflamatórias do Intestino (DIIs), são caracterizados por liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, disfunção da barreira intestinal e ativação excessiva da cascata que culmina na ativação do NFκB (FERRARI et al., 2016).

2.3 DOR VISCERAL

Dor é uma experiência complexa que envolve não só a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). É um componente essencial do sistema de defesa do corpo. Ela fornece um rápido aviso ao sistema nervoso para iniciar uma resposta motora para minimizar danos físicos (AXELROD; HILZ, 2003).

A dor é uma queixa comum entre os pacientes com doença inflamatória intestinal, assim torna-se um componente de vários índices de atividade da doença, e é uma das principais preocupações dos pacientes, sendo um motivo comum para a baixa qualidade de vida em pacientes com doença inflamatória intestinal (DOCHERTY et al., 2011).

Dois tipos de dor nociceptiva são geralmente distinguidos: dor que emana da pele e tecidos mais profundos (por exemplo, articulações e músculos) é referida como dor somática; dor que emana dos órgãos internos é referida como dor visceral. Dor somática é normalmente bem localizada enquanto que a dor visceral é mais difícil de identificar (FEIN, 2012). A dor visceral é causada pelo alongamento das vísceras por obstrução ou inflamação ampla do trato gastrointestinal (HIMUKASHI et al., 2006).

Na DIIs a dor começa quando os estímulos nociceptivos são detectados pelos neurônios nociceptores aferentes primários especializados. Estes nociceptores são capazes de responder a uma grande variedade de modalidades de estímulos, incluindo estímulos mecânicos, químicos e/ou térmicos (GOLD; GEBHART, 2010; BASBAUM et al., 2009). A ativação destes nociceptores, então, estimula neurônios de segunda ordem na medula espinhal via sinapses excitatórias glutamatérgicas. O sinal é então transmitido via medula espinhal e do tronco cerebral para o tálamo, o qual por sua vez comunica com diversas áreas do córtex cerebral, incluindo o córtex somatossensorial, ínsula, e córtex cingulado anterior (SANDKÜHLER, 2009).

Quando este sinal neural atinge os centros superiores do tronco cerebral e do cérebro, que dá origem a uma sensação de dor consciente (DOCHERTY et al., 2011). Embora o desenvolvimento de dor visceral seja considerado um mecanismo de defesa importante, o desenvolvimento de hipersensibilidade representa um problema clínico importante e é provável que seja um dos principais fatores envolvidos na patogênese da dor abdominal em distúrbios intestinais (AKBAR et al., 2009).

A investigação ao longo dos anos mostrou que a fisiopatologia da dor visceral é extremamente complexa (KANNAMPALLI; SENGUPTA, 2015).

2.4 VIA DO RECEPTOR ATIVADO PELO PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR- γ)

O epitélio intestinal desempenha um papel importante na proteção do organismo contra patógenos e moléculas antigênicas. As patologias inflamatórias

crônicas do trato gastrointestinal, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (DII), estas ocorrem devido a uma ativação inadequada e sustentada do sistema imune mucoso contra a microbiota do intestino (CAO et al., 2013). A patogênese das DIIs não está totalmente elucidada e envolve um grande número de fatores, incluindo fatores genéticos, ambientais, microbianos e imunológicos (VAN DE WALLE et al., 2010). As teorias atuais sobre o início e a progressão do foco de DII concentram-se na desregulação da resposta inflamatória, incluindo a possibilidade de uma liberação maciça e descontrolada de mediadores pró-inflamatórios e a iniciação de uma cadeia de eventos que levam a lesões extensas nos tecidos (NASER et al., 2011). O TNF- α foi proposto como uma importante citocina proinflamatória que contribui para a inflamação intestinal na DII (YE et al., 2006). Esta citocina é liberada por diferentes tipos de células e sua atividade biológica é mediada principalmente pelo fator de transcrição NF κ B (PASPARAKIS, 2009). NF κ B estimula também, uma vasta gama de tipos de células e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem atuar como moduladores de fatores de transcrição sensíveis ao redox (SAKON et al., 2003).

Drogas que atuam de forma direta ou indiretamente inibindo a ação do NF κ B são consideradas promissoras para o tratamento de DIIs, uma vez que este fator de transcrição determina a síntese de mediadores inflamatórios estritamente envolvidos no processo inflamatório intestinal. Por exemplo, a mesalazina é um anti-inflamatório não esteroide da família do aminossalicilatos, muito promissor usado para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais devido à sua ação em inibir NF κ B pelo mecanismo de ativação da via do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ) (ZENG et al., 2011), este um receptor nuclear altamente expresso no cólon e desempenha um papel chave na inflamação induzida por bactérias. A regulação da inflamação do cólon por este receptor tem sido bem demonstrada em muitos modelos experimentais de colite que é caracterizada pela diminuição da expressão de PPAR- γ confinado às células epiteliais do cólon (HE et al., 2012).

PPAR- γ é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, a maioria dos quais são ativadores transcricionais dependentes de ligantes. PPAR- γ é abundantemente expresso em tecido adiposo e células epiteliais do cólon. Sua expressão também tem sido observada em músculos, macrófagos e em células T e B de humanos e roedores (ADACHI et al., 2006). Tem sido demonstrado

que a ativação deste receptor promove uma redução da resposta inflamatória em pacientes com DII, esta ativação mostra uma repressão da inflamação mediada pelo bloqueio do fator nuclear- κ B (NF- κ B) promovendo uma ação reguladora do processo Inflamatório intestinal (GURI et al., 2010).

A ativação do NF- κ B leva à indução de cascatas de sinais pró-inflamatórios e à intensificação do processo inflamatório. Estudos em modelos animais de colite e pacientes com DIIs sugerem que o comprometimento da função NF- κ B leva à gênese da inflamação intestinal. Por outro lado, a ativação do PPAR- γ leva à regulação da transcrição de genes alvo pró-inflamatórios e inibição da atividade do NF κ B, o que resulta em uma diminuição da inflamação (ANDERSEN et al., 2011).

2.5 TERAPÊUTICA DAS DIIs

Muitas drogas principalmente as anti-inflamatórias têm sido usadas para combater os sintomas das DIIs. Dentre a terapia de escolha para o tratamento podem-se incluir os corticóides. Estes agem na condição clínica como anti-inflamatório, contudo seu efeito imunossupressor é usado como ação terapêutica nas DIIs, eles diminuem a ação imunológica do organismo amenizando a resposta a agentes bacterianos, o que no caso das DIIs são da própria microbiota. Por se tratar de imunossupressores não se recomenda o uso contínuo de corticóide, pois eles podem provocar efeitos adversos muito significativos e a remissão da doença. Uma estratégia para reduzir o uso de corticóides é a Sulfassalazina e outro método é o uso de anticorpos específicos com anti-TNF- α e anti-NF-KB (BIONDO-SIMÕES, et al., 2003). O uso de talidomida reduz significativamente os níveis de TNF- α e IL-12. IL-12 é uma citocina imunorreguladora com envolvimento central na indução da resposta imune celular (CAMPELO et al., 2011). A combinação da inibição da TNF- α e IL-12 pode explicar por que a talidomida é mais efetiva que outros inibidores seletivo de um único mecanismo inflamatório (BAUDITZ et al., 2002). Uma outra estratégia terapêutica é o uso do ácido 5-aminosalicílico, sua ação consiste no bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos (PODOLSKY, 2002).

Até o momento os fármacos utilizados no tratamento das DIIs possuem muitos efeitos adversos e na maioria das vezes não aliviam a queixa principal, que é o desconforto abdominal acompanhado de muitas dores intestinais, então estratégias terapêuticas que possam melhorar este quadro clínico, por consequência tende a

trazer melhor qualidade de vida para pessoas que sofrem de algum tipo de doença inflamatória intestinal.

2.6 GABAPENTINA: FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA

A gabapentina, ácido 1-(aminometil) ciclohexano acético ($C_9H_{17}NO_2$). É um fármaco anticonvulsivante, liberado em diversos países, sendo ainda recomendada para neuralgia pós-herpética nos Estados Unidos e Europa (FUKADA et al., 2012).

Este fármaco foi originalmente desenvolvido como um análogo do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA). Embora estruturalmente relacionada com o neurotransmissor GABA, seu mecanismo exato de ação é desconhecido, pois os seus metabolitos não se ligam a receptores de GABA-A ou GABA-B e nem influenciar a absorção ou degradação de GABA (ABDEL-SALAM; SLEEM, 2009). Este fármaco é um íon dipolar em pH fisiológico sendo capaz de atravessar facilmente tanto a parede intestinal através de um transportador de aminoácidos (LARSEN et al., 2015), quanto a barreira hematoencefálica (BRYANS; WUSTROW, 1999). A gabapentina é aprovada para o tratamento de convulsões e dor neuropática, mas também é aplicada para transtornos de ansiedade (FARACH et al., 2012; KUKKAR et al., 2013).

Segundo Vollmer et al (1986), a gabapentina (GBP) é bem absorvida e seu pico sérico é atingido em 1 a 3 horas após administração oral. Considera-se que sua biodisponibilidade oral seja dose-dependente devido ao seu transporte ativo via sistema de transporte L-aminoácido, aparentemente ocorre um decréscimo de cerca de 25% com uma dose única de 400 mg quando comparada à dose única de 100 mg (LETTERMAN; MARKOWITZ, 1999). Quase não foram observadas ligações a proteínas plasmáticas humanas ou albumina humana sérica. A estimativa do volume excluído de albumina humana sérica é de aproximadamente 5% do seu volume total. Assim sendo, a interação com proteínas séricas parece não ser significativa (VOLLMER et al., 1986). Alta biodisponibilidade com um fenômeno de primeira passagem sem significância, estando em uma faixa de 80% da dose administrada oralmente, (SHORVON; STEFAN, 1997). E um tempo de meia vida de cerca de 5 a 8 horas. E no que diz respeito à segurança, GBP tem um perfil de efeitos adversos leves na dosagem terapêutica com os efeitos mais comuns relatados sendo tonturas, fadiga, sonolência, ganho de peso e edema periférico (LARSEN et al., 2015).

Devido ao fato de que a ação deste fármaco ainda não é bem compreendida, sugere-se então, que ele atue alterando a transmissão GABAérgica no sistema nervoso central (SNC) e bloqueando os canais de cálcio voltagem dependentes em neurônios centrais e periféricos, com afinidade pela subunidade $\alpha 2\delta$ destes canais (ROWBOTHAM et al., 1998; REMY; BECK, 2006), causando a inibição da liberação de glutamato, aliviando hiperexcitabilidade neuronal. Por isso torna-se uma droga antiepiléptica bem conhecida com eficácia comprovada pré-clínica e clínica em epilepsia e dor (BIALER et al., 2010).

Outros estudos sugerem que em neurônios de camundongos, a GBP inibe os canais de potássio por meio do aumento da produção de óxido nítrico (NO), bloqueando os canais de cálcio L, P e Q. Entretanto, a gabapentina também auxilia na neuroproteção pela inibição da síntese de óxido nítrico (NO) em córtex de ratos com hipóxia induzida, pelo bloqueio dos canais de cálcio dos tipos N, P e Q (CHENGAND; CHIOU, 2006).

2.7 AÇÃO ANTI-INFMATÓRIA E ANALGÉSICA DA GABAPENTINA

Abdel-Salam e Sleem (2009), analisaram um possível envolvimento da gabapentina nos mecanismos analgésico, proteção gástrica e efeito anti-inflamatório. Os achados permitem concluir que a GBP apresentou um efeito analgésico e gastroprotetor. Além disso, a GBP reduziu a resposta inflamatória edematogênica no edema de pata induzido por carragenina.

Em outro estudo publicado por Dias et al., em 2014, demonstrou-se o efeito da gabapentina na redução da inflamação em um modelo de edema de pata induzido por inúmeros mediadores como composto 48/80, histamina, serotonina, bradicinina e PGE2, mostrando que este fármaco na dose de 1 mg/kg atuou diminuindo o efeito inflamatório na fase vascular da inflamação aguda. Além disso, por diminuir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante a peritonite induzida por carragenina, este fármaco também atuou na fase celular migratória da inflamação. Neste mesmo estudo a gabapentina foi capaz de reverter o estresse oxidativo decorrente da instalação da inflamação aguda (DIAS et al., 2014).

O perfil de segurança farmacológica da gabapentina tem atraído cada vez mais atenção por parte das pesquisas básicas e clínicas. Estes fatos são sustentados por evidências obtidas em vários modelos experimentais de dor neuropática e inflamatória

(SHIMOYAMA et al., 1997). Estudos realizados por Abdel-Salam e Sleem em 2009 avaliando a ação da gabapentina, provaram que esta droga reverte a resposta nociceptiva induzida por capsaicina na pata de camundongos. Além disto a gabapentina possui um efeito antinociceptivo visceral quando testada em modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos (GUSTAFSSON et al., 2003). Um estudo proposto por Ortiz et al (2006), demonstrou que a administração periférica local, de gabapentina produziu uma redução dependente da dose do comportamento nociceptivo induzida por formalina. Este efeito antinociceptivo parece ser devido a uma ação local deste fármaco.

Recentemente foi demonstrado que, a gabapentina possui um potente efeito anti-inflamatório em modelos de inflamação geral atuando de forma a inibir a condição edematogênica induzida por carragenina, bem como reduzir a migração de células para o peritônio, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β e o estresse oxidativo (DIAS et al., 2014).

Existem muitos estudos e depósitos de patentes com o uso da GBP em diversas aplicações. Uma pesquisa (dados não publicados) sobre propriedades intelectuais com aplicação da gabapentina realizada na Organização Mundial da Propriedade Intelectual, mostrou que em meio a uma diversidade de patente com a gabapentina, apenas uma encontrada, relaciona-se com a inflamação, intitulada: Composições farmacêuticas tópicas estáveis contendo Gabapentina. É constituída por uma formulação farmacêutica que utiliza Gabapentina, parafina e um ou mais outros ingredientes ativos selecionados a partir de pelo menos um fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE) e fito-constituintes, úteis no alívio da dor neuropática ou distúrbios relacionados com neuropatia tais como neuropatia periférica diabética, espondilose, neuropatia de outra origem, dor lombar, espondilite anquilosante, cialgia, dor relacionada com doenças articulares e ósseas como artrite, osteoartrite, artrite reumatóide e dor lombar de etiologia variada. Com isso podemos estimar que em todo o mundo, existem muito pouca pesquisas com o objetivo de desenvolver propriedades intelectuais baseadas na capacidade anti-inflamatória da Gabapentina.

Pelo o fato desta droga possuir ação anti-inflamatória comprovada e de este efeito estar de alguma forma relacionado com a diminuição das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL- β), não se descarta a possibilidade deste composto está agindo inibindo o principal ativador gênico que determina a síntese destas citocinas

em questão, o NFκB. Sendo assim há fortes indícios desta droga também está agindo ativando a via do PPAR-γ, desta forma atuando de maneira a reduzir o processo inflamatório intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Estudar a possível ação anti-inflamatória da gabapentina na colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos e avaliar a participação do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ) durante esta ação da GBP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade da GBP sobre os critérios macroscópicos, histopatológicos, infiltrado celular e ativação mastocitária na colite de induzida por TNBS em ratos;
- ✓ Avaliar a ação da GBP através de marcadores de estresse oxidativo no cólon de ratos com colite induzida por TNBS;
- ✓ Verificar o papel da GBP sobre a produção e liberação de citocinas (IL-1 β e TNF- α) na mucosa do cólon durante a colite por TNBS;
- ✓ Verificar a ação anti-inflamatória da GBP via imunomarcagem de iNOS, COX-2 e IL-1 β no cólon de ratos durante a colite induzida por TNBS;
- ✓ Avaliar a ação da GBP sobre a expressão proteica via Western Blot para NF κ B e COX-2 durante a colite induzida por TNBS;
- ✓ Avaliar a participação do receptor PPAR- γ durante a ação anti-inflamatória da gabapentina na colite, usando o bisfenol A diglicidil éter (BADGE), um inibidor específico do receptor PPAR- γ ;
- ✓ Avaliar a participação do receptor PPAR- γ na ação da GBP através de todos os marcadores acima citados no cólon de ratos durante a colite induzida por TNBS.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS PARA OS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS SUGERIDOS

Foram utilizados 132 ratos wistar fêmeas, pesando 150 - 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Piauí. Doze a quatorze horas antes, em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos realizados estavam de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, sob o número: 308/17 em 2017.

4.2 MODELO DE DOENÇA CROHN EXPERIMENTAL

4.2.1 Avaliação da ação da gabapentina na colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e participação do receptor PPAR- γ nesta ação.

Inicialmente, os ratos passaram por um processo de preparação do cólon. Os animais permaneceram 12 a 14 h recebendo somente água *ad libitum*. Uma hora antes da indução da colite os animais foram divididos em seis grupos (de 6 animais por grupo) e tratados da seguinte forma:

Grupo salina;

Grupo TNBS;

Grupo TNBS + Dexametasona (2 mg/kg);

Grupo TNBS + GBP 0,6 mg/kg;

Grupo TNBS + GBP 3 mg/kg;

Grupo TNBS + GBP 15 mg/kg.

A colite foi induzida pela administração por via retal (v.r) TNBS (SIGMA) (20mg) diluído em etanol a 50%, sendo a solução administrada num volume de 0,8 ml por animal. O grupo controle recebeu apenas salina (0,9%, num volume de 0,8 ml). Para a indução da colite os animais foram previamente anestesiados com quetamina (75

mg/kg) + Xilasina (10 mg/kg) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 medindo 8 cm de comprimento para a administração das soluções de TNBS ou salina. Após a administração, cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções. Os tratamentos com gabapentina (0,6, 5 e 15 mg/kg) ou dexametasona (2mg/kg) foram feitos 1 hora antes da indução da colite por TNBS e uma vez ao dia durante 3 dias. No terceiro dia, uma hora após o último tratamento, os animais foram eutanasiados, abertas suas cavidades abdominais e foi retirada uma porção de 5cm do cólon de cada animal, então foram avaliados os parâmetros macroscópicos, peso úmido e em seguida o tecido foi dividido e estocado em amostras que posteriormente foram usadas nos seguintes ensaios: avaliação histopatológica, dosagens de mieloperoxidase, glutationa, ácido malonildialdeído IL-1 β , TNF- α e NO₃/NO₂ e experimentos de imunohistoquímica para iNOS, COX-2 e IL-1 β , e western blot para NF κ B e COX-2.

Foi realizado um segundo experimento igual ao anterior para avaliar a participação do receptor PPAR- γ na ação anti-inflamatória da melhor dose da GBP encontrada no experimento acima, o qual constou dos seguintes grupos:

Grupo Salina;

Grupo TNBS;

Grupo TNBS + GBP 15 mg/kg;

Grupo TNBS + GBP 15 + BADGE (inibidor específico do receptor PPAR- γ) na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal (HE X. et al., 2012);

Grupo TNBS + Dexamatasona.

A partir dos cólons foram realizados as análises macroscópicas e todos os ensaios realizados no primeiro experimento foram repetidos neste.

4.2.2 Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão

Após a eutanásia, a partir do cólon dos animais, foi isolada uma extensão de 5 cm. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita por Morris et al (1989), conforme mostrado na tabela 1. Depois disso, fragmentos da mesma peça foram processados, preparados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina ou azul de toluidina para a avaliação de escores

microscópicos seguindo a técnica descrita por Appleyard e Wallace (1995) conforme mostrado na tabela 2 e contagem mastocitária.

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentada em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Fonte: Morris, 1989.

Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por TNBS.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da camada muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células caliciformes	0 – 1

Fonte: Appleyard e Wallace em 1995.

4.2.3 Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite

Após a análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite e tratados com gabapentina, e dexametasona e BADGE, foram retirados fragmentos de cólon medindo 5 cm de comprimento cada. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos em balança analítica e os resultados foram expressos pela unidade de peso úmido / 5 cm cólon (VITOR et al., 2009).

4.2.4 Contagem de mastócitos totais e ativados no tecido do cólon de ratos

Para evidenciar a presença e realizar a contagem de mastócitos, os blocos de parafina com amostras de colón foram selecionados para a coloração com azul de toluidina, segundo Michalany (2008). A coloração de azul de toluidina foi realizada após a desparafinização da lâmina com xilol, hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool a 90%, álcool a 80%, álcool a 70% em seguidas as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa a 60° C por uma hora para secar. Após secagem as lâminas, estas foram clareadas com uma série de xilol, e em seguida, montadas. A contagem de mastócitos (total e degranulados) foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA). Os resultados representam a média de 10 campos por grupo de ratos.

4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.3.1 Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal

Para dosagem de GSH foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa intestinal dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 µL do homogenato foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por três minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.3.2 Determinação de ácido malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal

Os níveis de malondialdeído na mucosa intestinal foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). As amostras de tecido foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) na proporção de 100mg de tecido para 1 ml de KCl a

0,15 M, em seguida foram retirados 250 μ L do homogenato e acrescentado 1,5 ml de H_3PO_4 (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em banho-maria e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 min. com um misturador "vortex" e depois centrifugados a 1200 rpm por 15 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mol de MDA/g de tecido (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

4.3.3 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Para a avaliação da atividade da MPO nos cólons de animais, frações do cólon foram retiradas e processadas, a análise dessa enzima seguiu o protocolo estabelecido por Bradley et al (1982).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração dessa enzima, 50 a 100 mg de cólon de animais com ou sem colite e tratados com gabapentina, foram colocados em um tampão (HTAB 0,05% em $NaPO_4$ 0,05M, pH 6,0) e homogeneizados num Polytron (13000 rpm) e centrifugado a 15 minutos (3000 rpm) em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi pipetado numa placa (5-10 μ l) de 96 poços e foi acrescentados na placa a solução de leitura, depois, a placa foi lida em um leitor de ELISA a 450nm. O resultado foi expresso como sendo UMPO/mg de tecido (BRADLEY et al., 1982).

4.3.4 Dosagem de IL-1 β e TNF- α

Os de fator de necrose tumora α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) do tecido do cólon foram mensurado através da técnica de ELISA. Os fragmentos do cólon de animais foram retirados e adicionados em um tampão inibidor de protease (Thermo scintific) (pH 6,8) (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em ubm homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4^o C por 10 minutos. Anticorpo policlonal anti-rato para TNF- α e IL-1 β a uma concentração de 2 μ g/mL, foi diluído em 50 μ L de tampão fosfato salina (PBS, a um pH 7,2) e usado para revestir poços da microplaca. O bloqueio de sítios de ligação não específicos foi

realizado por incubação da placa com PBS contendo 2% de Albumina sérica bovina (BSA) durante 90 min a 37 ° C. Após incubação e lavagem das placas em tampão de ensaio (fosfato 0,01M, NaCl 0,05M, 0,1% Tween 20, pH 7,2), foram adicionados 50 µL de um padrão (TNF- α ou IL-1 β) ou uma amostra em cada poço e incubou-se durante a noite a 4 °C. Após a lavagem das placas, adicionou-se 50 µL de anticorpo policlonal biotilado anti-TNF- α (diluição 1: 1000) ou o anticorpo anti-IL-1 β (1: 1000) nos poços da placa e incubou-se durante 1 h a 25 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente com PBS e 50 µL de um conjugado de avidina-peroxidase (diluição 1: 5000) foram adicionados em todos os poços. Em seguida, os poços foram incubados por 30 min com 50 µL de substrato (40 µg / poço, dicloridrato de ortofenilenodiamina) para revelação da reação. Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (1M). A absorvância foi medida a 490 nm. Esses métodos de ELISA detecta consistentemente níveis de TNF- α e IL-1 β acima de 4000 pg/mL e não apresentaram reação cruzada com outras citocinas. Os resultados são expressos em picogramas (pg) de cada citocina por mililitro (TAVARES-MURTA et al., 2008).

4.3.5 Determinação de NO₃ (nitrato) e NO₂ (nitrito) na mucosa intestinal

Para a determinação das concentrações colônicas de nitrato e nitrito foi usado o método de Griess (GREEN et al.,1982). Inicialmente foi preparada uma solução de 0,5 U/ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão KH₂PO₄ contendo NADPH (pH 7,4). Para o preparo da reação de Griess foi armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo Sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e outra solução de NEED (Need- α -naphthyl-ethyl modiamida) a 0,1% em H₃PO₄ a 2,5%. As amostras dos cólons forma homogeneizadas em macerador na proporção de 100 mg de tecido para 500 µL de uma solução de KCl a 1,15 % em água destilada. As amostras processadas de tecido colônico de animais com ou sem colite e tratados com gabapentina (15 mg/kg) foram incubadas numa microplaca com nitrato redutase (16 µL por poço) durante 12 h para a conversão de NO₃ (nitrato) em NO₂ (nitrito). A produção de óxido nítrico foi determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm (GREEN et al.,1982). Os resultados foram expressos como micromoles (µM) de nitrito.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1 β , COX-2 E iNOS

As amostra de intestinos de animais com ou sem colite e submetidos ao tratamento com gabapentina (15 mg/kg) foram fixadas em formaldeído a 10%, em seguida foram parafinizadas e cortadas em um micrótomo em cortes histológicos de 4 a 5 micrômetros de espessura e colocadas em lâminas, logo depois as lâminas foram colocadas na estufa a 65° C por 15 minutos. Após desparafinização com o uso de xilol o tecido foi hidratado e levado novamente até a estufa (98 °C durante 15 minutos) para recuperação antigênica, na sequência o bloqueio da peroxidase endógena foi feito usando 1% de H₂O₂ diluído em 99% de metanol. Para evitar ligações inespecíficas, os tecidos foram incubados com soro de coelho diluídos em PBS (pH 7,2) contendo 0,3% de Triton –X 100 por 1h em temperatura ambiente antes da adição do anticorpo primário. As lâminas foram, então, incubadas “overnight” com o anticorpo primário anti-NOSi de rato, com diluição de 1:200 em PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) a 5%. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas (30 min) com o anticorpo secundário biotilado (Anti-rabbit IgG) diluído em PBS-BSA 5% na proporção de 1:200. Após a remoção do anticorpo biotilado, com lavagem em PBS as lâminas foram incubadas por 30 min com o complexo ABC (Horseradish Peroxidase Standard). Depois disso foram então lavadas em PBS e incubadas com DAB/peróxido (2 min) para dar a cor marrom à reação. O DAB/peróxido foi removido com H₂O destilada e então as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em Entellan. A intensidade da reação observada foi quantificada como ausente, moderada ou intensa, identificar pela área imunocorada (DE CARVALHO et al., 2018).

4.5 WESTERN BLOT PARA NFkB E COX-2

A expressão protéica de NFkB e COX-2 no cólon foi avaliada a partir do preparado do homogenato de segmentos intestinais com tampão RIPA (pH 8,0) da Sigma-Aldrich, Brasil, ele este permite a lise celular, a solubilização de proteínas, a este tampão foi adicionado um inibidor de protease na seguinte proporção: 1 μ l de inibidor de protease para 100 μ L de RIPA. As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinchonínico ou reação de biureto, conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). A dosagem de proteínas foi determinada

por leitor de ELISA a 562 nm. Amostras (20 µg) foram preparadas em Tris-HCl (BioRad, EUA) e β-mcaptoetanol (BioRad, EUA), agitadas, aquecidas em banho-maria (95 °C, 5 min) e centrifugadas (10000 rpm, 4 ° C, 30 seg.). Subsequentemente foi realizada a eletroforese vertical de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% para (NFκB e β-actina) e a 8% para (COX-2 e β-actina) a 60 volts durante os primeiros 15 minutos para deposição da amostra no fundo do poço e 120 v para o resto da corrida. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno, BioRad, EUA) e incubadas com anti-NFκB, anti-COX-2 ou anti-β-actina (Millipore, EP1123Y, 1: 500), e depois incubadas com anticorpo secundário HRP-cabra, anti-coelho (Invitrogen, 656120, 1: 1000) ou HRP-coelho anti-caprino (Invitrogen, A16142, 1: 1000) e, finalmente, reagente quimioluminescente (BioRad, EUA, substrato Western Blot ECL de Clarity). As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA). A densidade das bandas foi medida através do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) (DE CARVALHO et al., 2018).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dos dados quantitativos foram calculadas as médias ± erro de certo número de eventos (n = 6) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Newman-Keuls. Dos dados qualitativos foram calculadas as médias ± erro do número de eventos (n = 6) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Uma diferença de p<0,05 foi considerada estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

5.1 GABAPENTINA REDUZ PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DA COLITE INDUZIDA POR TNBS

5.1.1 Gabapentina reduz escores macroscópicos de lesões

Conforme mostrado nas Figuras 1 e 2, os animais do grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon apresentaram lesões colônicas com média de escores de $(22,20 \pm 0,583)$, enquanto o grupo que recebeu apenas salina no cólon, como era esperado, apresentou média baixa de escores $(0,600 \pm 0,400)$. Os tratamentos dos animais com GBP apresentaram os seguintes resultados em média de escores: dose de 0,6 mg/kg $(20,40 \pm 2,600)$; dose de 3 mg/kg $(18,60 \pm 1,470)$; dose de 15 mg/kg $(12,75 \pm 2,250)$, esta última dose reduziu de forma significativa a média de escores de lesão comparada ao grupo controle (TNBS), com $(p < 0,05)$, sendo considerada a dose de 15 mg/kg a que apresentou um melhor resultado quando comparada aos outros grupos que receberam o GBP. Como esperado, o tratamento com dexametasona também reduziu a média de escores macroscópico $(14,40 \pm 5,367)$ de forma estatisticamente significativa com $(p < 0,05)$, provando desta forma a reversibilidade da lesão.

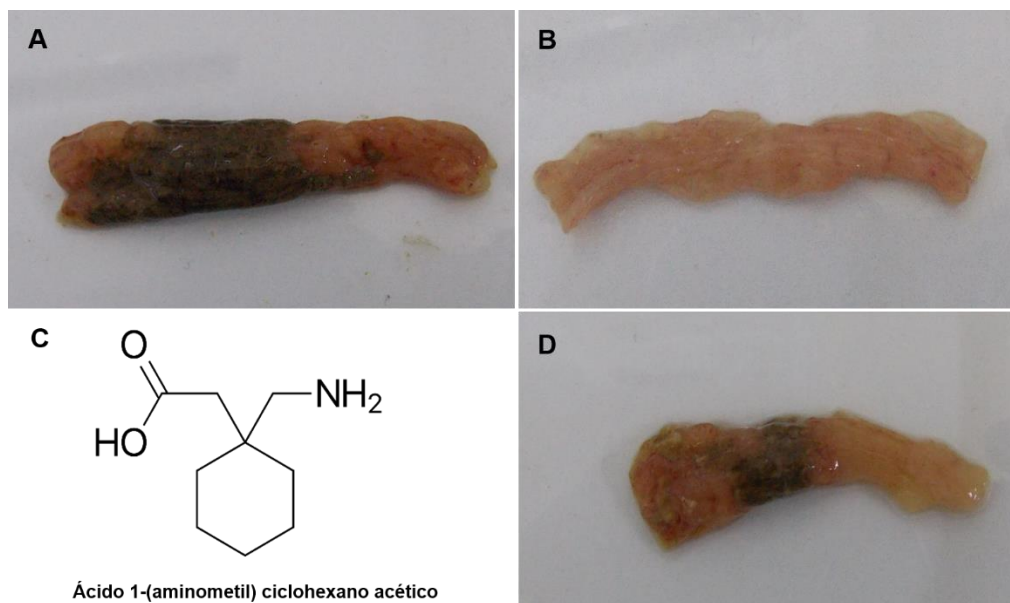


Figura 1. Gabapentina reduz escores macroscópicos de lesões. Grupo TNBS (A); grupo salina (B); estrutura molecular da gabapentina (GBP) (C); Grupo TNBS + GBP 15 mg/kg (D)

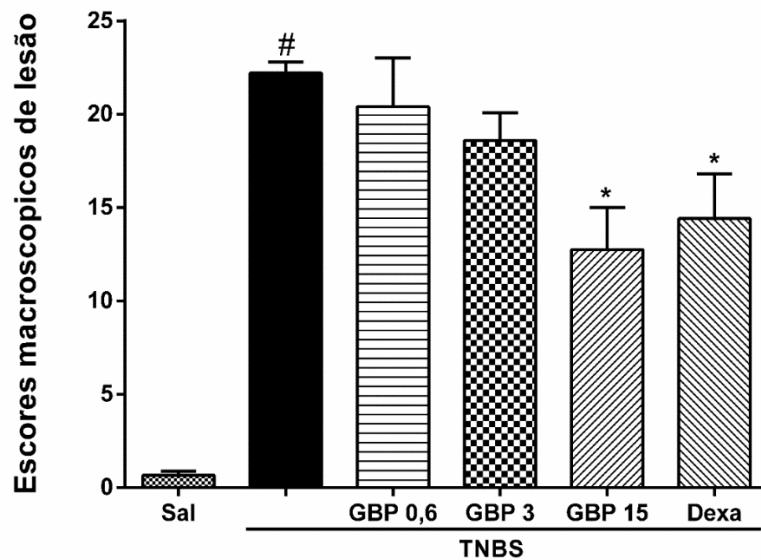


Figura 2. Gabapentina reduz escores macroscópicos de lesões. Ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, 0,8 ml, por via retal – v.r) ou salina (Sal. a 0,9%, 0,8 ml, v.r). Gabapentina (GBP nas doses de 0,6; 3; e 15 mg/kg, v.o), dexametasona (Dexa, s.c) (2 mg/kg) administrada uma vez por dia, durante três dias após a indução da colite. Amostras (5 cm) de tecido do intestino, a partir das quais foram avaliados os escores macroscópicos de lesão. Os resultados estatísticos são expressos como média ± erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.2 Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos

Após as pesagens de 5 cm de cada cólon dos animais com ou sem colite, observou-se o aumento significativo do peso úmido dos cólons dos animais do grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon ($1,139 \pm 0,040$ g/5cm) em comparação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($0,429 \pm 0,025$ g/5cm). Os grupos tratados com gabapentina apresentaram os seguintes resultados em peso úmido de 5 cm do cólon: dose de 0,6 mg/kg ($1,205 \pm 0,050$ g/5cm); dose de 3 mg/kg ($1,046 \pm 0,094$ g/5cm); dose de 15 mg/kg ($0,9010 \pm 0,094$ g/5cm), sendo esta última dose a que apresentou uma maior redução do peso úmido dos cólons quando comparada ao grupo controle (TNBS), algo similar ocorreu com os animais tratados com dexametasona na dose de 2 mg/kg ($0,908 \pm 0,0579$ g/cm) conforme mostrado na (Figura 3) com ($p < 0,05$).

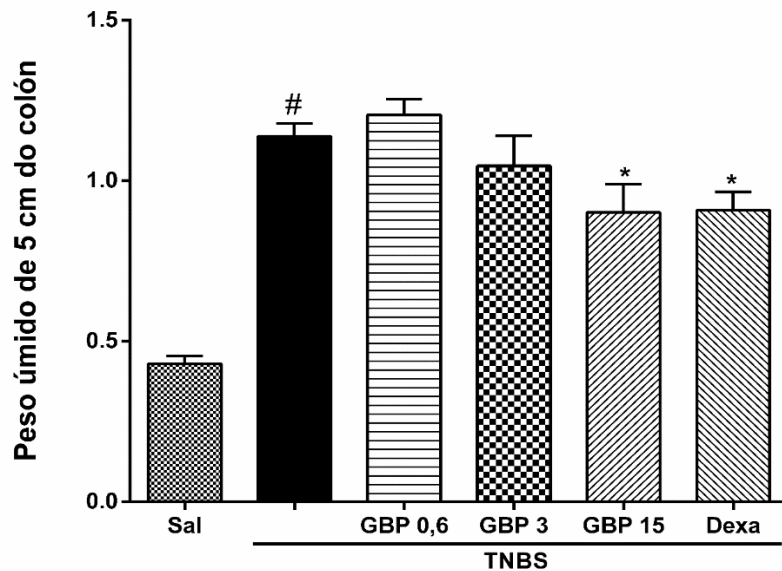


Figura 3. Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos. Amostras (5 cm) de tecido do intestino, pesados em balança analítica. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.3 Gabapentina reduz escores histológicos de dano intestinal

A análise histológica mostra que os animais do grupo salina, apresentaram as pontuações mínimas de escores microscópicos para todos os parâmetros avaliados conforme mostrado na (Tabela 3) e representado na microfotografia pela (Figura 4). Já os animais do grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon apresentaram significativa perda da arquitetura da mucosa 3 (3-3), intensa infiltração de células 3 (3-3), espessamento da camada muscular 2,5 (1-3), formação de abscessos em cripta 1 (1-1), e depleção de células caliciformes 1 (1-1), atingindo uma pontuação total de danos de 10,5 (9-11) visto na (Tabela 3) e representado pela (Figura 4). No grupo tratado com o GBP (15 mg/kg, v.o) observou-se uma significativa ($p < 0,05$) diminuição de importantes parâmetros avaliados, tais como, perda da arquitetura da mucosa 0 (0-0), espessamento da camada muscular 0 (0-0), formação de abscessos em cripta 0 (0-0), e depleção de células caliciformes 0 (0-0), atingindo uma pontuação total de danos de apenas 1,5 (1-2), como visto na (Tabela 3) e representado pela microfotografia da (Figura 4). Esta diminuição das pontuações analisados equivale a uma redução significativa ($p < 0,05$) de danos no tecido do cólon. Da mesma forma, a dexametasona (2 mg/kg, s.c) também reduziu os escores microscópicos avaliados quando comparados com o grupo de TNBS (Tabela 3) e representado pela (Figura 4).

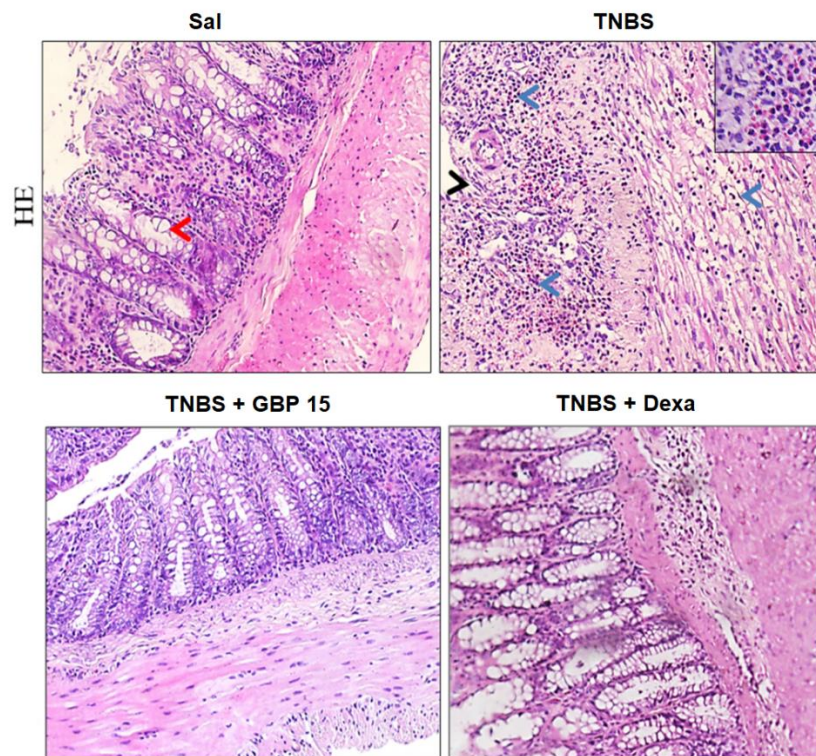


Figura 4. Gabapentina (GBP) reduz dano microscópico do intestino de ratos. Cortes histológicos dos cólons de ratos corados com hematoxilina e eosina (HE). Intestino de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite e tratado gabapentina (GBP); A seta vermelha apresenta células caliciformes, a seta preta apresenta perda da arquitetura da membrana mucosa e as setas azuis apresentam infiltrado de células inflamatórias.

Tabela 3. Gabapentina reduz escores histológicos de dano intestinal.

Grupos Experimentais	Parâmetros histológicos					Escores totais
	Arquitetura da mucosa	Infiltrado de células inflamatórias	Espessamento da camada muscular	Formação de abscesso em cripta	Depleção de células caliciformes	
Salina	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1(1-2)
TNBS	3 (3-3)#	3 (3-3)#	2.5 (1-3)	1 (1-1)#	1 (1-1)#	10.5 (9-11)#
TNBS + GBP 15	0 (0-0)*	1.5 (1-2)	0 (0-0)*	0 (0-0)*	0 (0-0)*	1.5(1-2)*
Dexa	2 (1-3)*	2 (1-3)*	1 (1-3)*	1 (0-1)	1 (0-1)	7 (3-11)*

Escores histológicos de lesão expressos como média \pm erro ($n = 6$). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

* $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (TNBS).

$P < 0,05$ quando comparado ao salina.

5.1.4 Gabapentina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de ratos

Como visto na (Figura 5), o grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon demonstrou intensa atividade da MPO no tecido do cólon ($152,7 \pm 4,655$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($0,8657 \pm 0,367$ UMPO/mg de tecido). O tratamento dos ratos com o GBP (15 mg/kg, v.o) reduziu os níveis de MPO para ($65,70 \pm 17,70$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo TNBS com ($p < 0,05$).

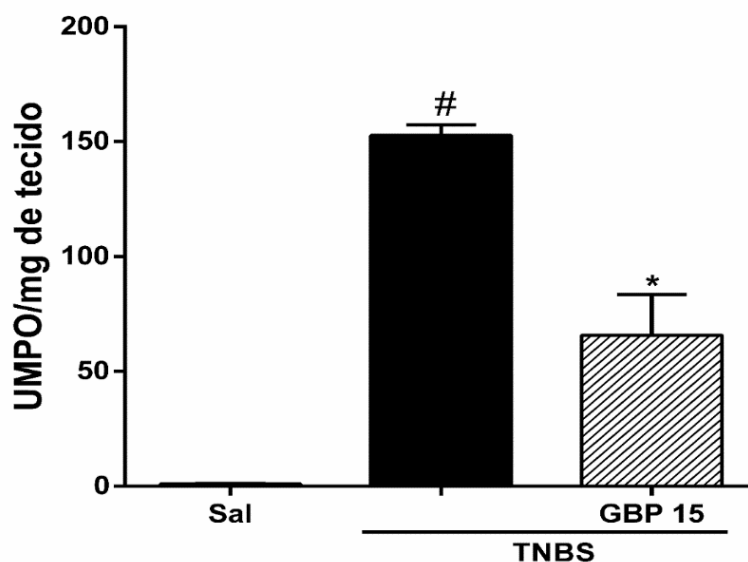


Figura 5. Gabapentina reduz atividade da mieloperoxidase (MPO) do cólon de ratos A partir das amostras de tecido do intestino, a atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.5 Gabapentina reduz a concentração de ácido malondialdeído (MDA) do cólon de ratos

Como mostrado na (Figura 6), o grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon expressou níveis altos de MDA ($179,5 \pm 27,39$ nmol/g de tecido) em relação ao grupo salina ($58,51 \pm 5,493$ nmol/g de tecido). O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) demonstrou uma significativa redução dos níveis de MDA ($84,13 \pm 14,93$ nmol/g de tecido) em relação ao grupo TNBS com ($p < 0,05$).

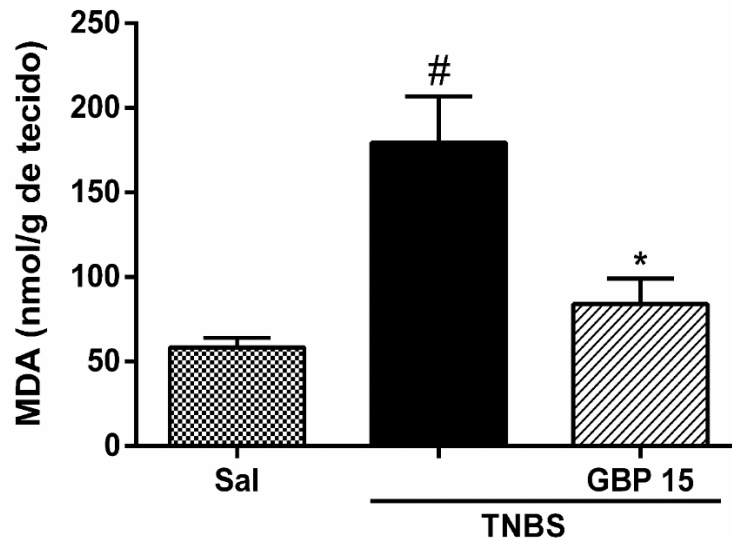


Figura 6. Gabapentina reduz a concentração de ácido malondialdeído (MDA) do cólon de ratos.

A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de ácido malondialdeído (MDA) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.6 Gabapentina reduz níveis de glutathiona (GSH) do cólon de ratos

De acordo com a (Figura 7), o grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon apresentou significativo consumo dos níveis de GSH ($91,56 \pm 14,96 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo salina ($131,6 \pm 9,504 \mu\text{g/g}$ de tecido). Por outro lado o grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) preveniu de forma significativa o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pelo TNBS ($87,34 \pm 21,22 \mu\text{g/g}$ de tecido), demonstrando uma diferença estatística ($p < 0,05$).

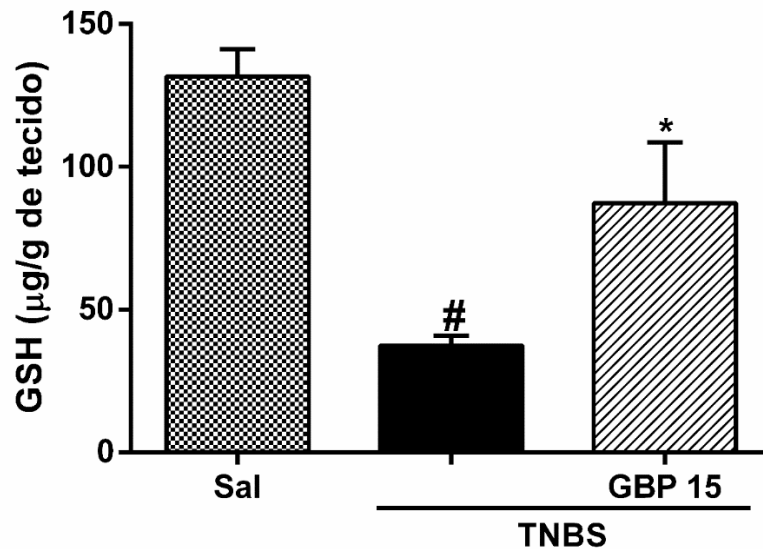


Figura 7. Gabapentina reduz níveis de glutatona (GSH) do cólon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de glutatona (GSH) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.7 Gabapentina reduz a concentração de metabólitos do óxido nítrico do cólon de ratos

Os animais submetidos à colite, grupo TNBS, apresentaram elevadas concentrações de NO_3/NO_2 ($0,222 \pm 0,031 \mu\text{M}$) quando comparados aos animais que receberam apenas salina intracolônica, grupo salina ($0,457 \pm 0,126 \mu\text{M}$) conforme mostrado na Figura 8. Por outro lado os animais tratados com o GBP (15 mg/kg, v.o) demonstraram significativa redução da concentração de NO_3/NO_2 ($0,288 \pm 0,435 \mu\text{M}$) com $p < 0,05$, em consonância com a diminuição do dano macroscópico intestinal causado pela administração de TNBS.

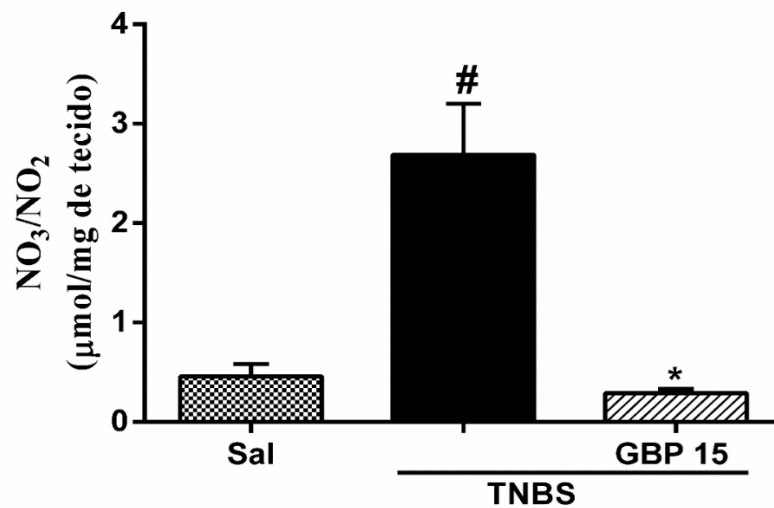


Figura 8. Gabapentina reduz a concentração de metabólitos do óxido nítrico do cólon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.8 Gabapentina reduz os níveis IL-1 β e TNF- α do cólon de ratos

Os animais submetidos à colite induzida por TNBS apresentaram um significativo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias dosadas, IL-1 β ($2,690 \pm 0,512$ pg/ml) (Figura 9A); TNF- α ($100,4 \pm 157,5$ pg/ml) (Figura 9B), comparado ao grupo salina, IL-1 β ($0,456 \pm 0,126$ pg/ml) (Figura 9A) e TNF- α ($328,2 \pm 30,16$ pg/ml) (Figura 9B). O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma redução significativa de ambas as citocinas dosadas: IL-1 β ($0,288 \pm 0,435$ pg/ml) (Figura 9A); TNF- α ($363,6 \pm 29,90$ pg/ml) (Figura 9B) com $p < 0,05$.

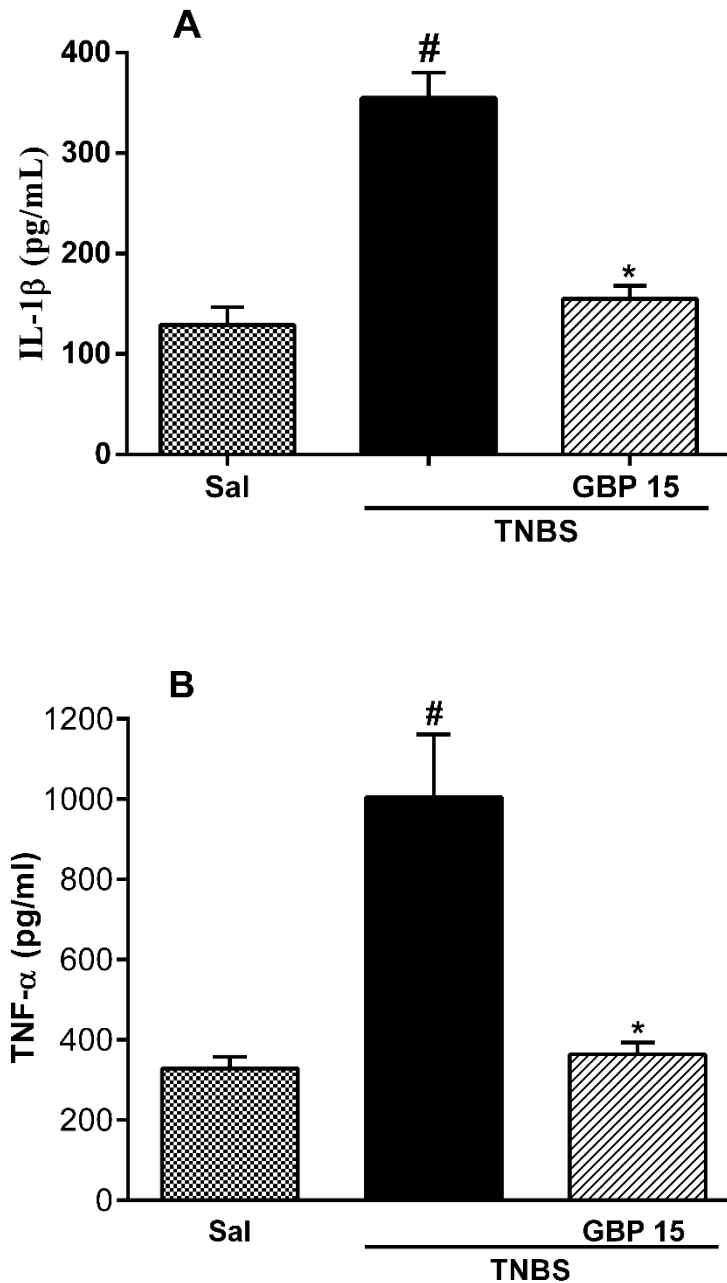


Figura 9. Gabapentina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) do cólon de ratos. IL-1 β (A); TNF- α (B). A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de IL-1 β foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.9 Gabapentina reduz ativação mastocitária do intestino de ratos

Conforme mostrado na Figura 10, há uma visível marcação mastocitária para a prancha representativa do grupo TNBS, ao comparar com a prancha que representa o grupo salina. O tratamento com GBP (15 mg/kg, v.o) também não evidencia

nenhuma marcação mastocitária na prancha representativa. Ao analisar de forma quantitativa, os animais com colite induzida por TNBS apresentaram um aumento da contagem total de mastócitos ($36,42 \pm 1,626$ mastócitos/mm²) Figura 11A; e mastócitos degranulados ($17,50 \pm 1,327$ mastócitos/mm²) Figura 11B, comparados ao grupo salina para contagem total de mastócitos ($8,917 \pm 0,916$ mastócitos/mm²) Figura 11A; e mastócitos degranulados ($3,833 \pm 0,575$ mastócitos/mm²) Figura 11B com $p < 0,05$. O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma diminuição significativa da contagem total de mastócitos ($21,11 \pm 2,037$ mastócitos/mm²) Figura 11A; e mastócitos degranulados ($10,78 \pm 1,402$ mastócitos/mm²) Figura 11B com $p < 0,05$, quando comparado ao grupo TNBS.

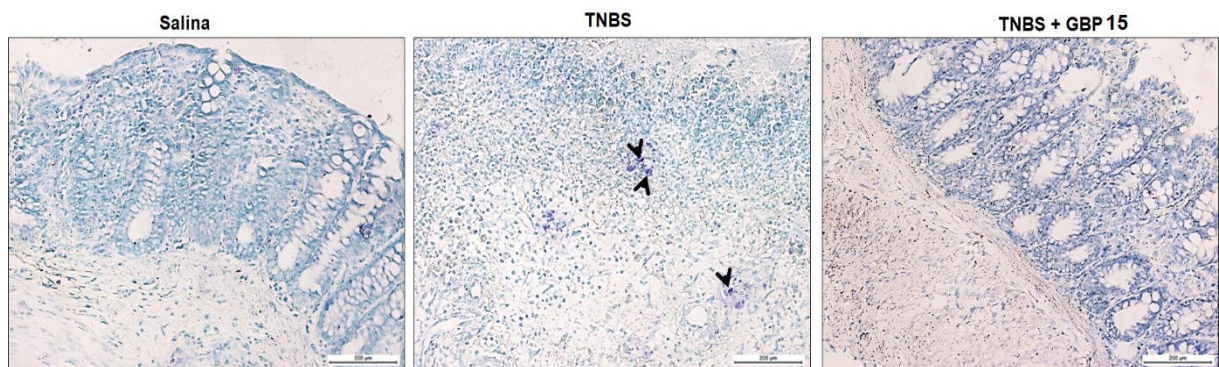


Figura 10. Gabapentina (GBP) reduz ativação mastocitária do intestino de ratos. Cortes histológicos dos cólons de ratos aumentados em 100 vezes (100µm) e corados com azul de toluidina. Intestino de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite por TNBS e tratado gabapentina (TNBS + GBP); As setas pretas apresentam mastócitos.

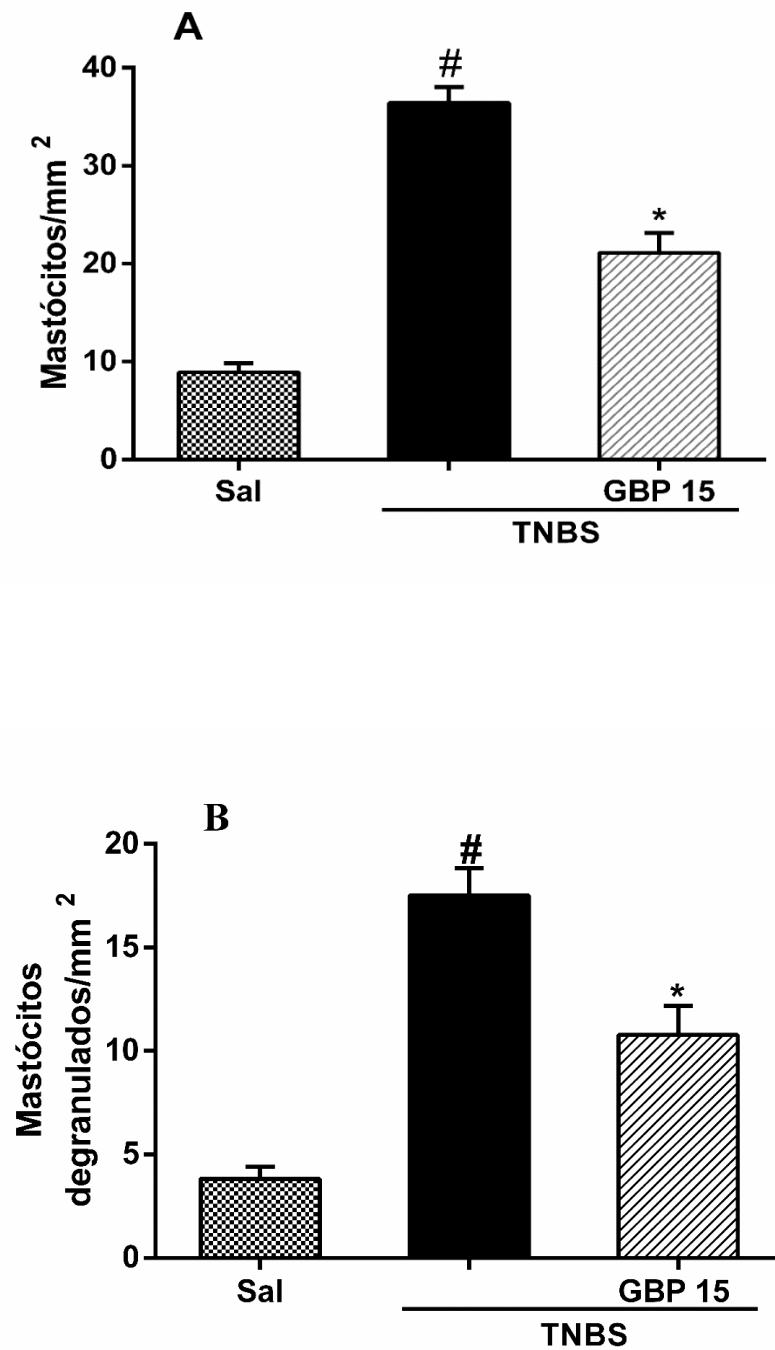


Figura 11. Gabapentina reduz ativação mastocitária do cólon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, foram realizados os cortes histológicos e corados com azul de taluidina. Contagem de mastócitos granulado por campo de 1 mm² (A); Contagem total de mastócitos por campo de 1 mm² (B). Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.10 Gabapentina reduz a imunomarcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do cólon de ratos

Conforme mostrado na Figura 12, há uma visível elevação do número de células marcadas para IL-1 β , COX-2 e iNOS no grupo TNBS, ao comparar com o grupo salina. O tratamento com GBP (15 mg/kg, v.o). Por outro lado, há uma significativa diminuição da imunomarcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS respectivamente nas pranchas do grupo com colite e tratados com GBP (15 mg/kg, v.o). Ao analisar de forma quantitativa, os animais com colite induzida por TNBS apresentaram um aumento do número de células marcadas para IL-1 β ($35,90 \pm 2,255$ células/campo), Figura 13A; COX-2 ($35,11 \pm 4,896$ células/campo), Figura 13B e iNOS ($46,45 \pm 5,370$ células/campo), Figura 13C, quando comparados ao grupo salina IL-1 β ($14,81 \pm 1,842$ células/campo), Figura 13A; COX-2 ($6,409 \pm 0,663$ células/campo), Figura 13B e iNOS ($6,250 \pm 0,619$ células/campo), Figura 13C, $p < 0,05$. Já o grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma diminuição significativa do número de células marcadas para IL-1 β ($10,78 \pm 1,136$ células/campo), Figura 13A; COX-2 ($13,19 \pm 1,576$ células/campo), Figura 13B e iNOS ($17,67 \pm 0,903$ células/campo), Figura 13C, com $p < 0,05$.

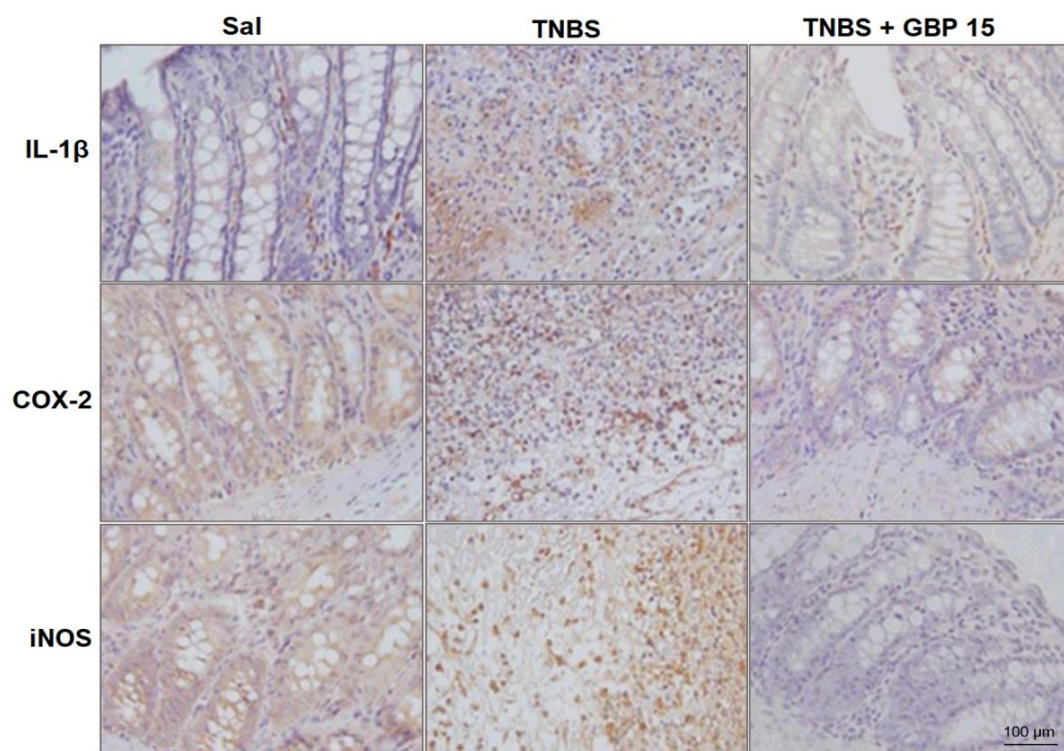
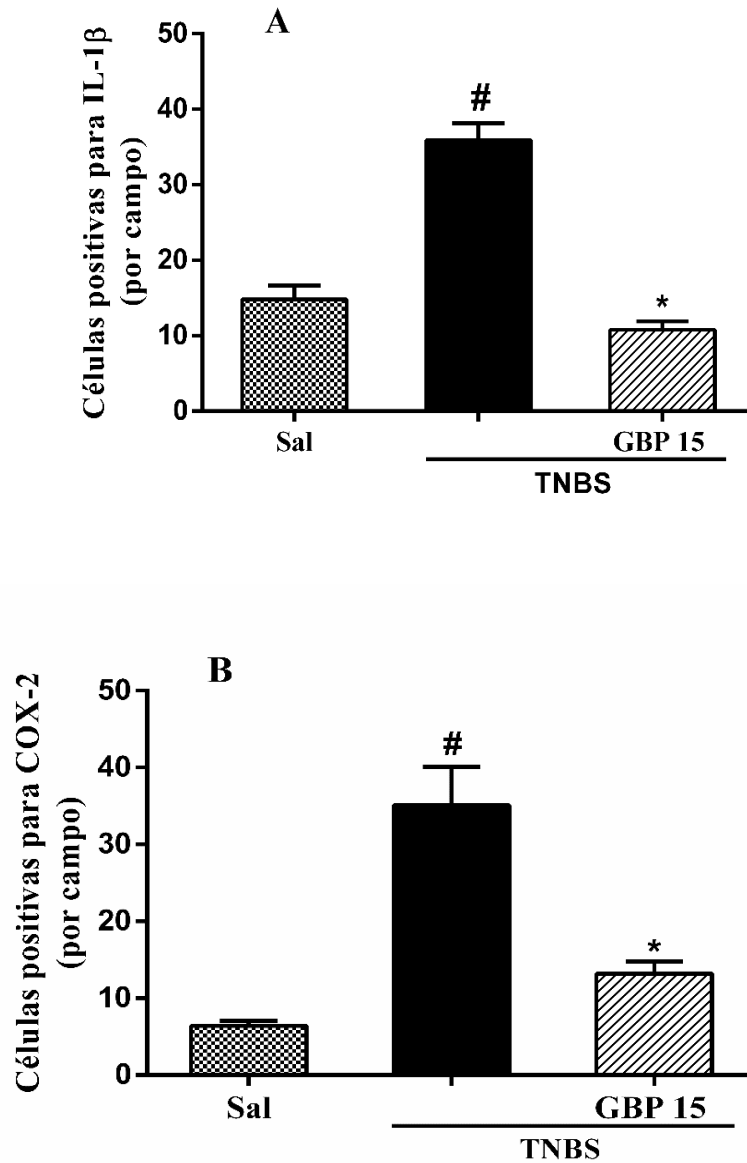


Figura 12. Gabapentina (GBP) reduz a imunomarcção para interleucina 1 beta (IL- β), ciclooxigenase – 2 (COX-2) e oxido nítrico sintase induzida (iNOS) em tecido do c3lon de ratos. Cortes histol3gicos dos c3lons de ratos imunomarcados para IL-1 β , COX-2 e iNOS. Intestino de um animal que recebeu apenas solu3o3o salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite por TNBS e tratado gabapentina (TNBS + GBP).



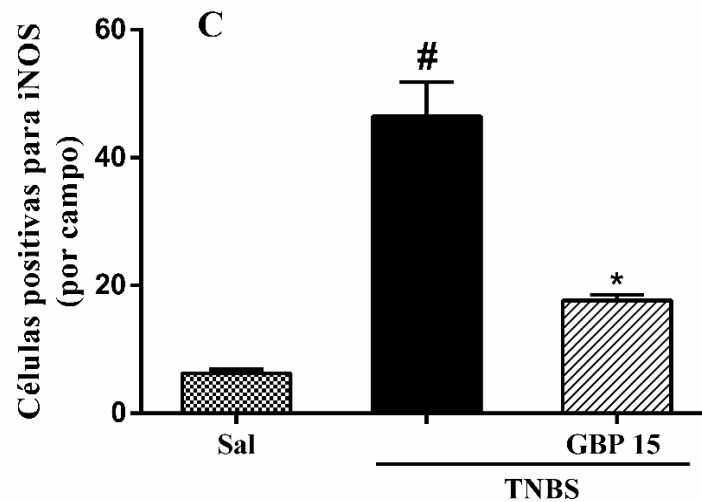


Figura 13. Gabapentina reduz a imunomarcção para IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do c3lon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, foram realizados os cortes histol3gicos e imunomarcados com anticorpos para IL-1 β , figura A; COX-2, figura B; iNOS, figura C. Os resultados estatísticos s3o expressos como m3dia \pm erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.11 Gabapentina reduz a express3o de COX-2 e NF κ B do c3lon de ratos

A imunoexpress3o de COX-2 e NF κ B em tecido do c3lon de animais com ou sem colite induzida por TNBS foi realizada atrav3s da t3cnica de Western blott. Ap3s a quantifica3o podemos observar que nos grupos TNBS houve um aumento da imunomarcção para COX-2 ($1,281 \pm 0,089$ COX-2/ α -tubulina), Figura 14 e NF κ B ($1,128 \pm 0,056$ NF κ B / α -tubulina), Figura 15, quando comparado ao grupo COX-2 ($0,686 \pm 0,114$ COX-2/ α -tubulina), Figura 14 e NF κ B ($0,579 \pm 0,111$ NF κ B / α -tubulina), Figura 15 com p<0,05. Enquanto a imunoexpress3o para os grupos com colite e tratados com GBP (15 mg/kg, v.o) foi observada uma redu3o de COX-2 ($0,801 \pm 0,128$ COX-2/ α -tubulina), Figura 14 e NF κ B ($0,742 \pm 0,046$ NF κ B / α -tubulina), Figura 15 com p<0,05.

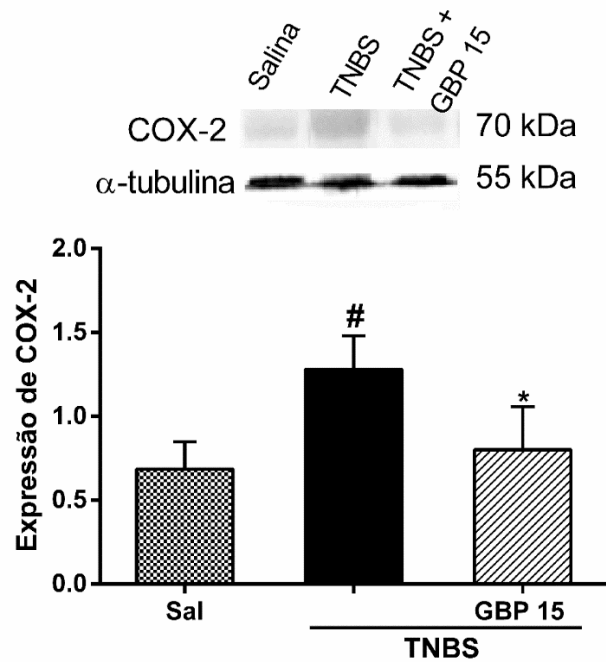


Figura 14. Gabapentina reduz a expressão de ciclooxygenase - 2 (COX-2) do cólon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, foi realizado o blotting para COX-2. Acima, observa-se a fotografia da marcação da enzima em nitrocelulose. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

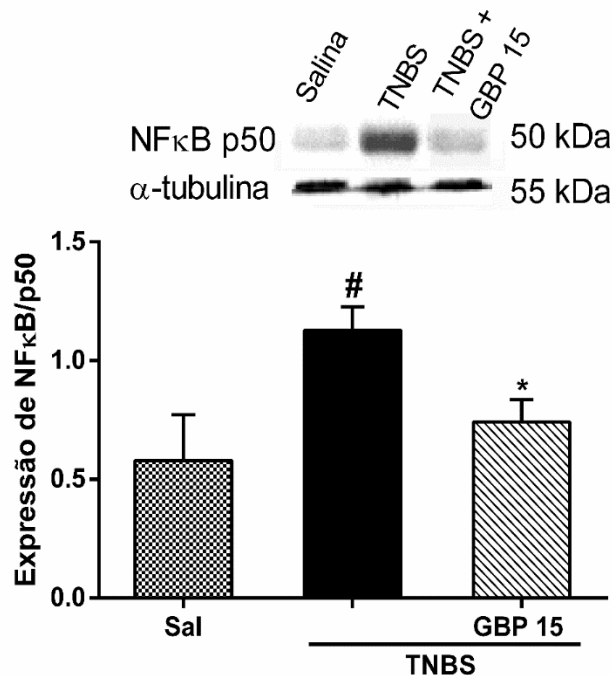


Figura 15. Gabapentina reduz a expressão do fator nuclear kappa B (NF κ B) do cólon de ratos. A partir das amostras de tecido do intestino, foi realizado o blotting para NF κ B. Acima, observa-se a fotografia da marcação da proteína em nitrocelulose. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2 GABAPENTINA REDUZ PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DA COLITE ATRAVÉS DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PPAR- γ

5.2.1 Gabapentina reduz os escores macroscópicos de lesões através do receptor PPAR- γ

De acordo com a Figura 16, o grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon apresentou um aumento médio dos escores de lesões colônicas ($21,40 \pm 0,244$), comparado ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($0,400 \pm 0,224$). Como era esperado, o tratamento dos animais com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou os seguintes resultados ($5,600 \pm 1,288$) com ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo TNBS. Nesta situação, quando um grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) foi também tratado com Bisfenol A diglicidil éter, um inibidor seletivo do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama – PPAR- γ , (BADGE na dose de 30 mg/kg, por via intraperitoneal - i.p) apresentou uma média de escores elevada ($19,20 \pm 1,744$), com diferença estatística para o grupo com colite e tratado apenas com GBP (15 mg/kg, v.o) com $P > 0,05$ e sem diferença estatística para o grupo que recebeu apenas TNBS no cólon.

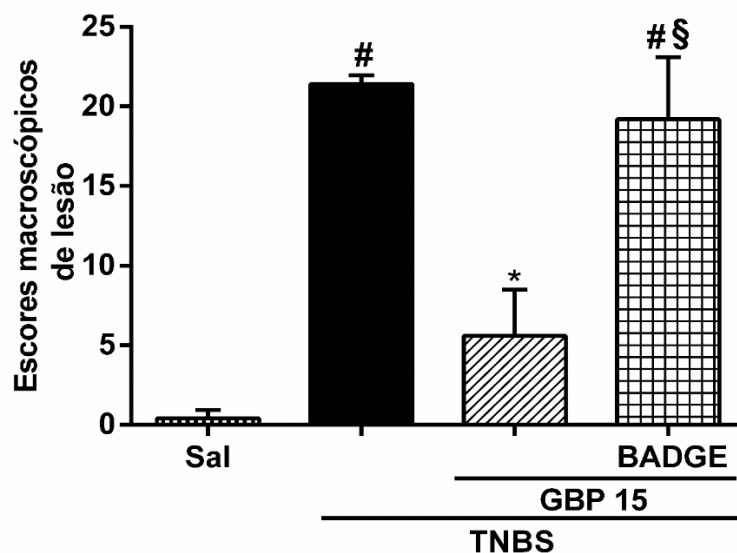


Figura 16. Gabapentina reduz os escores macroscópicos de lesões através do receptor PPAR- γ . Ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, 0,8 ml, por via retal – v.r) ou salina (Sal. a 0,9%, 0,8 ml, v.r). Gabapentina (GBP na dose de 15 mg/kg, v.o), Bisfenol A diglicidil éter (BADGE na dose de 30 mg/kg, por via intraperitoneal - i.p.) administrados uma vez por dia, durante três dias após a indução da colite. Amostras (5 cm) de tecido do intestino, a partir das quais foram avaliados os escores macroscópicos de lesão. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.2 Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

Após as pesagens de 5 cm de cada cólon dos animais com ou sem colite, conforme mostrado na Figura 17, observou-se um aumento significativo do peso úmido dos cólons dos animais do grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon ($1,092 \pm 0,072$ g/5cm) em comparação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($0,416 \pm 0,016$ g/5cm). E como era esperado, o tratamento dos animais com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou o seguinte resultado em peso úmido de 5 cm do cólon ($0,688 \pm 0,052$ g/5cm) com $p < 0,05$ quando comparado ao grupo TNBS. Por outro lado, quando um grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) foi também tratado com BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) apresentou o seguinte peso médio de 5 cm do cólons ($1,042 \pm 0,086$ g/5cm), com diferença estatística para o grupo com colite e tratado apenas com GBP (15 mg/kg, v.o) com $P > 0,05$ e sem diferença estatística para o grupo que recebeu apenas TNBS no cólon.

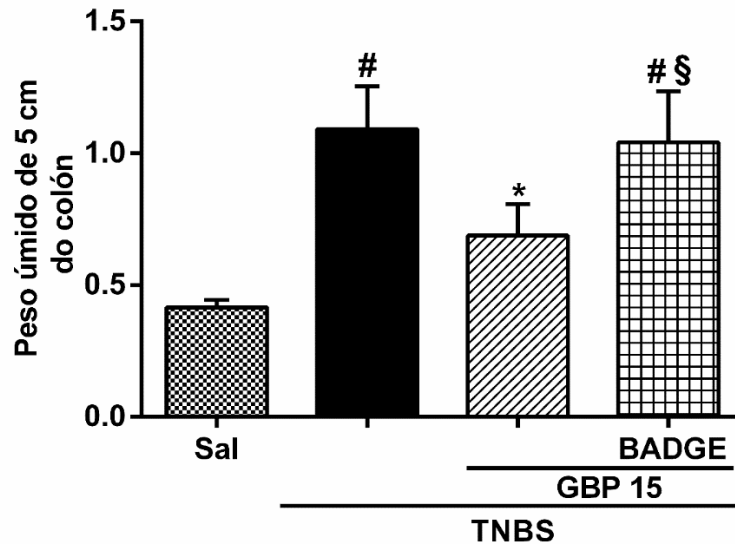


Figura 17. Gabapentina reduz o peso úmido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . Amostras (5 cm) de tecido do intestino, a partir das quais foram avaliados os escores macroscópicos de lesão. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.3 Gabapentina (GBP) reduz o dano histológico do cólon através do receptor PPAR- γ

Conforme evidenciado na Figura 18 e Tabela 4, a análise histológica de tecido do cólon de animais com e sem colite mostra que os animais do grupo salina, conforme esperado, apresentaram as pontuações mínimas de escores histológicos para todos os parâmetros avaliados. Já os animais do grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon apresentaram significativa perda da arquitetura da mucosa 3 (3-3), intensa infiltração de células 3 (3-3), espessamento da camada muscular 3 (1-3), formação de abscessos em cripta 1 (0-1), e depleção de células caliciformes 1 (0-1), atingindo uma pontuação total de danos de 11 (7-11) visto na (Tabela 4) e representado pela (Figura 18). No grupo tratado com o GBP (15 mg/kg, v.o) observou-se uma significativa ($p < 0,05$) diminuição de importantes parâmetros avaliados, tais como, perda da arquitetura da mucosa 1 (0-2), infiltrado de células inflamatórias 1 (1-2), espessamento da camada muscular 1 (1-1) e formação de abscessos em cripta 0,5 (0-1), atingindo uma pontuação total de danos de apenas 4,5 (2-7) como visto na (Tabela 4) e representado pela microfotografia da (Figura 19). Esta diminuição das pontuações analisados equivale a uma redução significativa ($p < 0,05$) de danos no tecido do cólon. Quando, a um grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) foi administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) observou-se um significativo aumento de todos os parâmetros histológicos avaliados: perda da arquitetura da mucosa 3 (2-3), infiltrado de células inflamatórias 3 (1-3), espessamento da camada muscular 3 (3-3), formação de abscessos em cripta 1 (1-1) e depleção de células caliciformes 1 (0-1) atingindo uma pontuação total de danos de apenas 11 (8-11) com diferença estatística significativa para o grupo com colite e tratado apenas com GBP ($P > 0,05$).

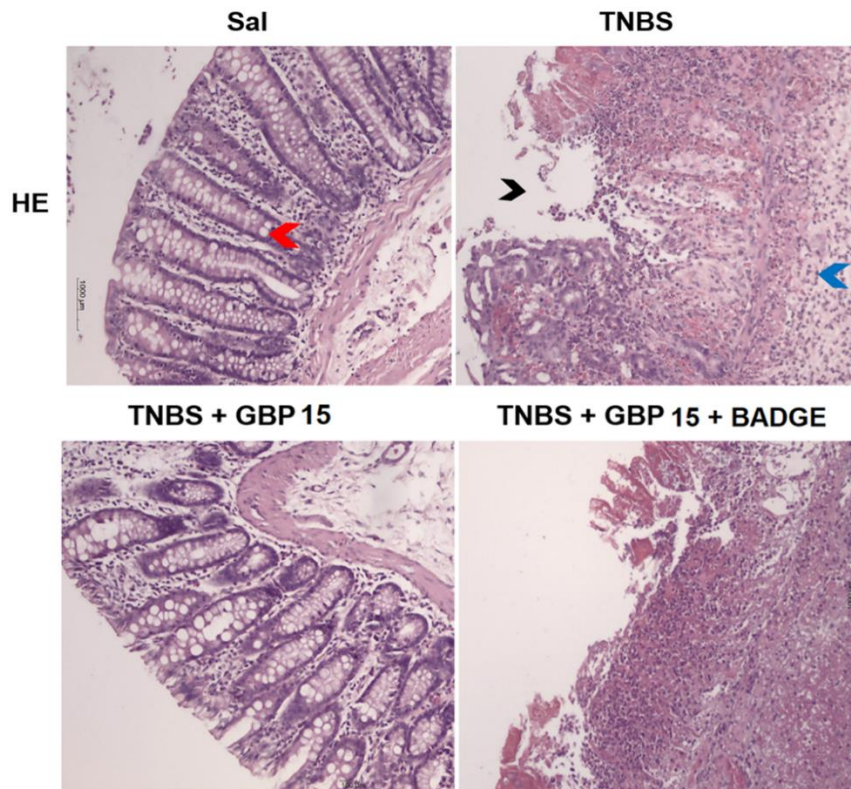


Figura 18. Gabapentina (GBP) reduz o dano histológico do cólon através do receptor PPAR- γ . Cortes histológicos dos cólons de ratos corados com hematoxilina e eosina (HE). Intestino de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite e tratado gabapentina (GBP); A seta vermelha apresentam células caliciformes, a seta preta apresenta perda da arquitetura da membrana mucosa e as setas azuis apresentam infiltrado de células inflamatórias.

Tabela 4. Gabapentina reduz danos histológicos do cólon através do receptor PPAR- γ .

Grupos experimentais	Parâmetros histológicos					Escores Totais
	Arquitetura da mucosa	Infiltrado de células inflamatórias	Espessamento da camada muscular	Formação de abscesso em cripta	Depleção de células caliciformes	
Salina	0.5 (0-1)	1 (1-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1.2 (1-3)
TNBS	3 (3-3)#	3 (3-3)#	3 (1-3)	1 (0-1)#	1 (0-1)#	11 (7-11)#
TNBS + GBP 15	1 (0-2)*	1 (1-2)*	1 (1-1)*	0,5 (0-1)*	1 (0-1)	4,5(2-7)*
TNBS + GBP 15 + BADGE	3 (2-3)#§	3 (2-3) #§	3 (3-3) #§	1 (1-1)	1 (0-1)	11 (8-11) #§

Escores histológicos de lesão expressos como média \pm erro (n = 6). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

* P <0,05 quando comparado ao grupo controle (TNBS).

P <0,05 quando comparado ao salina.

§ P <0,05 quando comparado ao grupo GBP 15

5.2.4 Gabapentina reduz a atividade da MPO do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

A partir de amostras do cólon dos animais com ou sem lesão foi mensurada a atividade da mieloperoxidase (MPO). De acordo com a Figura 19, o grupo que recebeu 20 mg de TNBS por via intracolônica demonstrou uma significativa atividade da MPO no tecido do cólon ($16,31 \pm 0,979$ UMPO/mg de tecido) quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($5,579 \pm 0,175$ UMPO/mg de tecido). O tratamento dos ratos com o GBP (15 mg/kg, v.o) reduziu os níveis de MPO para ($7,849 \pm 0,854$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo TNBS com ($p < 0,05$). Por outro lado, um grupo de animais com colite e tratado com GBP, quando recebera BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) apresentou um significativo aumento da atividade da MPO ($13,43 \pm 0,634$ UMPO/mg de tecido) quando comparado ao grupo com colite o qual foi tratado apenas com GBP, com valor de $p < 0,05$.

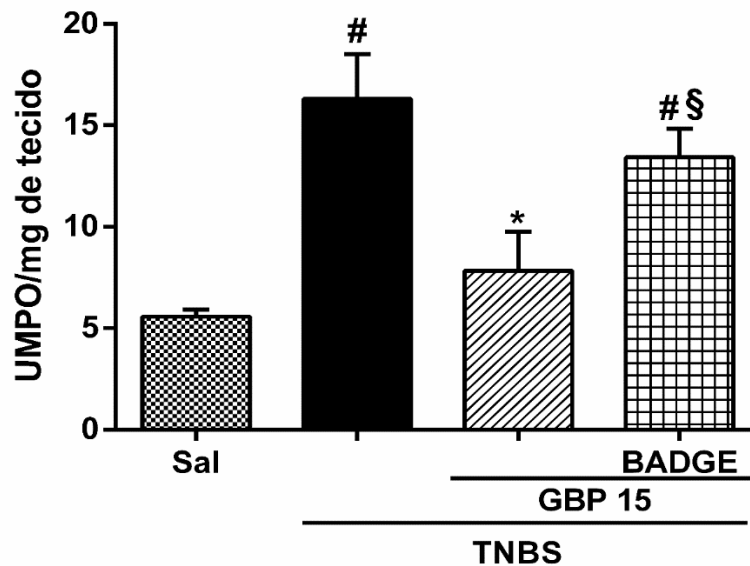


Figura 19. Gabapentina reduz a atividade da MPO do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; \$ $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.5 Gabapentina reduz a concentração de MDA do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

A concentração de ácido malonildialdeído (MDA) das amostras do cólon dos animais com ou sem lesão foi dosada, e como mostrado na (Figura 20), o grupo que recebeu 20 mg de TNBS no cólon expressou níveis altos de MDA ($92,48 \pm 6,698$ nmol/g de tecido) em relação ao grupo que recebeu apenas salina no cólon ($57,92 \pm 2,064$ nmol/g de tecido). O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) demonstrou uma significativa redução dos níveis de MDA ($53,45 \pm 4,701$ nmol/g de tecido) em relação ao grupo TNBS com ($p < 0,05$). Quando, a um grupo tratado com GBP, foi administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) apresentou um significativo aumento dos níveis deste marcador ($87,23 \pm 5,105$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo tratado somente com GBP.

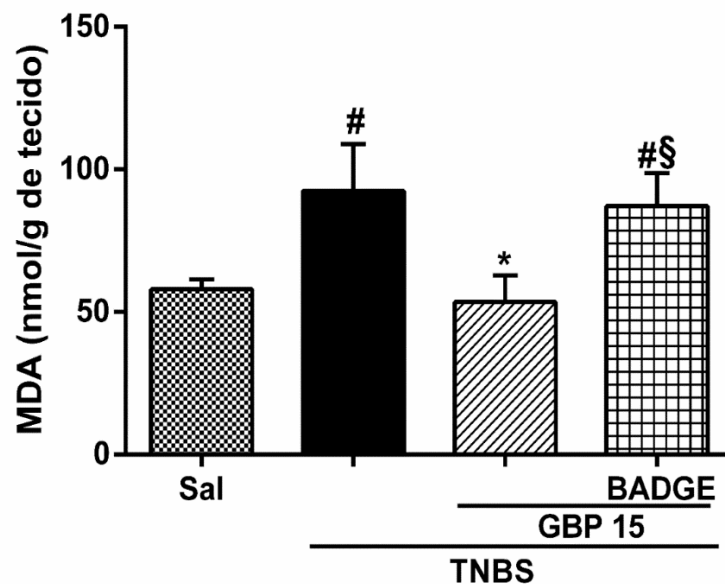


Figura 20. Gabapentina reduz a concentração de MDA do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de MDA foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.6 Gabapentina reduz a concentração GSH do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

A dosagem de GSH das amostras de tecido dos cólons de ratos com ou sem colites foi realizada, e de acordo com a (Figura 21), o grupo que recebeu 20 mg de

TNBS no cólon apresentou significativo consumo dos níveis de GSH ($10,56 \pm 5,055 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo salina ($69,32 \pm 5,843 \mu\text{g/g}$ de tecido). Por outro lado o grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) preveniu de forma significativa o consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão provocada pelo TNBS ($52,25 \pm 4,214 \mu\text{g/g}$ de tecido) ($p < 0,05$). Quando, a um grupo tratado com GBP foi administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p), os níveis de GSH retornaram a valores baixos ($12,03 \pm 5,428 \mu\text{g/g}$ de tecido) ao serem comparados com o grupo tratado apenas com GBP, sendo suas diferenças estatisticamente significativas com $P > 0,05$.

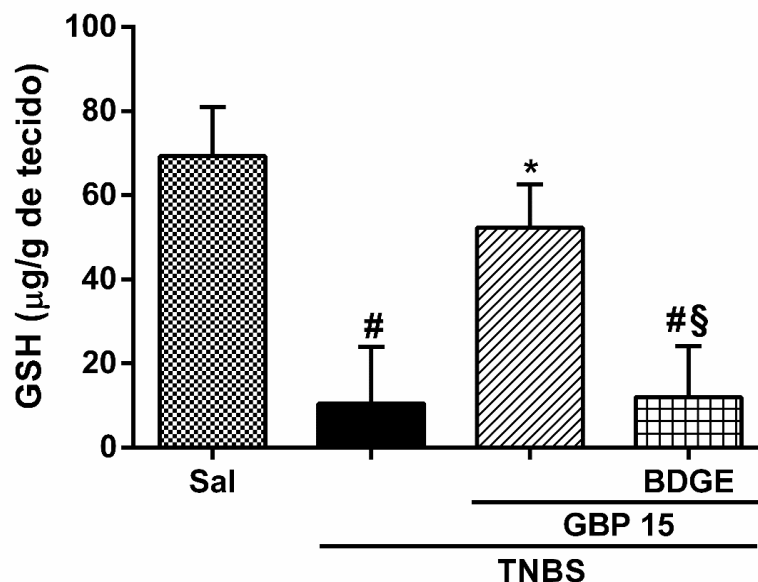


Figura 21. Gabapentina reduz a concentração GSH do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de GSH foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.7 Gabapentina reduz NO_3/NO_2 do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

Os animais submetidos à colite, grupo TNBS, apresentaram elevadas concentrações de NO_3/NO_2 ($0,639 \pm 0,102 \mu\text{M}$) quando comparados aos animais que receberam apenas salina intracolônica, grupo salina ($0,315 \pm 0,024 \mu\text{M}$) conforme mostrado na Figura 22. Por outro lado os animais tratados com o GBP (15 mg/kg, v.o) demonstraram significativa redução da concentração de NO_3/NO_2 ($0,376 \pm 0,050 \mu\text{M}$) com $p < 0,05$. Ainda na Figura 22, pode-se observar que a administração de BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) em um grupo com colite e tratado com GBP causou um

aumento significativo da concentração de NO_3/NO_2 ($0,604 \pm 0,075 \mu\text{M}$) com $P > 0,05$ quando comparado ao grupo que foi tratado apenas com GBP.

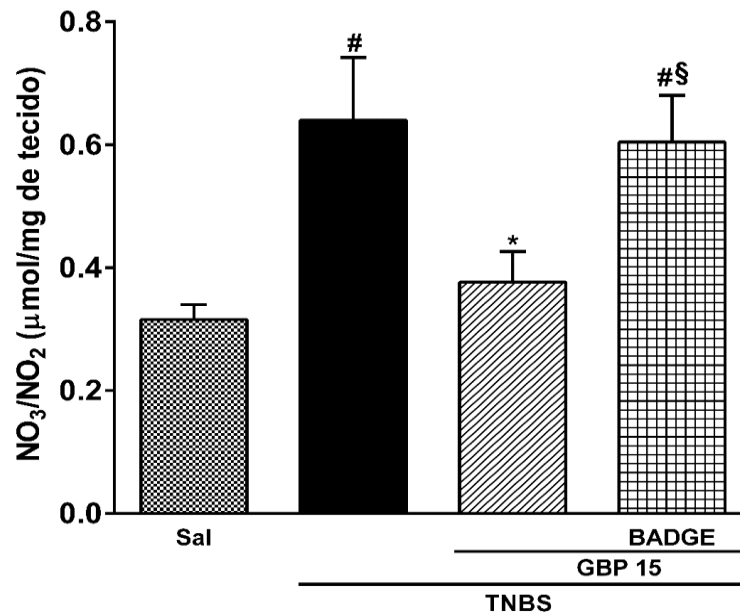


Figura 22. Gabapentina reduz NO_3/NO_2 do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.8 Gabapentina reduz os níveis IL-1 β e TNF- α do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

As citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 beta (IL-1 β) fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram dosadas a partir de amostras dos intestinos de ratos com ou sem colite. Os animais submetidos à colite induzida por TNBS apresentaram um significativo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias dosadas, IL-1 β ($1290 \pm 194,1 \text{ pg/ml}$) (Figura 23); TNF- α ($1004 \pm 157,5 \text{ pg/ml}$) (Figura 24), comparado ao grupo salina, IL-1 β ($364,3 \pm 47,75 \text{ pg/ml}$) (Figura 23) e TNF- α ($328,2 \pm 30,16 \text{ pg/ml}$) (Figura 24). O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma redução significativa de ambas as citocinas dosadas: IL-1 β ($572,3 \pm 100,8 \text{ pg/ml}$) (Figura 23); TNF- α ($363,6 \pm 29,90 \text{ pg/ml}$) (Figura 24) com $p < 0,05$. Quando, a um grupo com colite e tratado com GBP foi administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) observou-se que os níveis das citocinas dosadas, voltaram a números elevados, IL-1 β ($890,2 \pm 241,4$

pg/ml) (Figura 23); TNF- α ($908,9 \pm 91,81$ pg/ml) (Figura 245) quando comparado ao grupo que foi tratado somente com GBP, com $P > 0,05$.

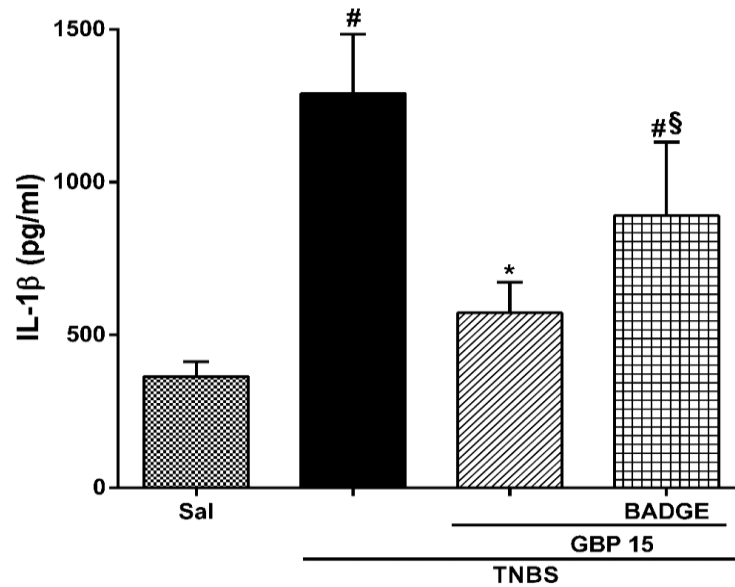


Figura 23. Gabapentina reduz os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de IL-1 β foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo TNBS; # $P < 0,05$ vs grupo salina; § $P < 0,05$ vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

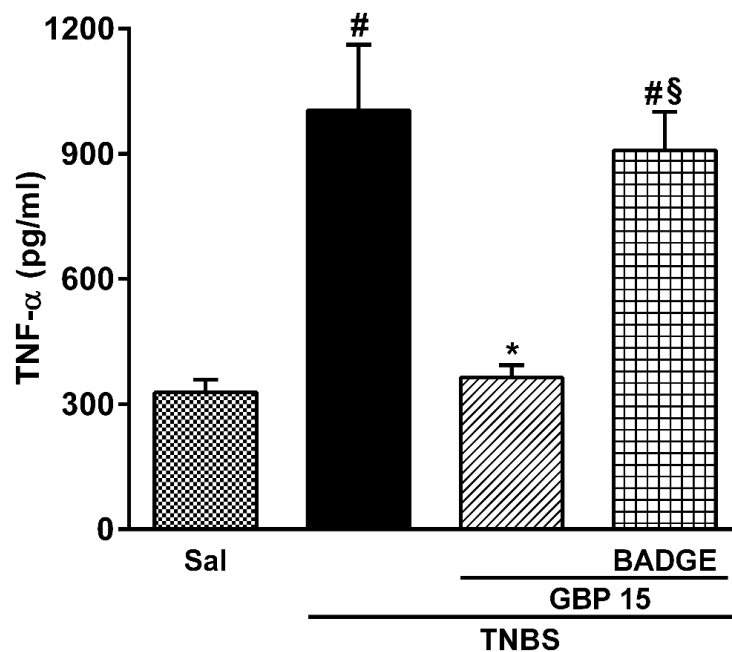


Figura 24. Gabapentina reduz os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, a concentração de TNF- α foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina; §P < 0,05 vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.9 Gabapentina diminui a ativação de mastócitos no cólon através do receptor PPAR- γ

A análise mastocitária dos tecidos dos cólons de ratos com ou sem colite induzida por TNBS, foi realizada através da coloração em lâmina histológica com azul de toluidina, e a partir de então a marcação e contagem de mastócitos totais e ativados foram feitas. Conforme mostrado na Figura 25, há uma visível aumento da marcação mastocitária para do grupo TNBS, ao comparar o grupo salina. O tratamento com GBP (15 mg/kg, v.o) também não evidencia nenhuma marcação mastocitária, por outro lado, quando um grupo tratado com GBP recebeu BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) evidenciou-se, um aumento da marcação do número de mastócitos. Ao analisar de forma quantitativa, os animais com colite induzida por TNBS apresentaram um aumento da contagem total de mastócitos ($51,40 \pm 2,358$ mastócitos/mm²) Figura 26A; e mastócitos degranulados ($20,75 \pm 1,601$ mastócitos/mm²) Figura 26B, comparados ao grupo salina para contagem total de mastócitos ($13,00 \pm 2,570$ mastócitos/mm²) Figura 26A; e mastócitos degranulados ($3,333 \pm 0,614$ mastócitos/mm²) Figura 26B com $p < 0,05$. O grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma diminuição significativa da contagem total de mastócitos ($7,800 \pm 2,518$ mastócitos/mm²) Figura 26A; e mastócitos degranulados ($9,800 \pm 1,562$ mastócitos/mm²) Figura 26B com $p < 0,05$. Quando um grupo tratado com GBP recebeu BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) observou-se a ocorrência de um aumento significativo ($P > 0,05$) da contagem mastocitária total ($50,67 \pm 2,716$ mastócitos/mm²) Figura 26A; e mastócitos degranulados ($22,00 \pm 1,703$ mastócitos/mm²) Figura 26B em comparação ao grupo que recebeu somente o tratamento com GBP.

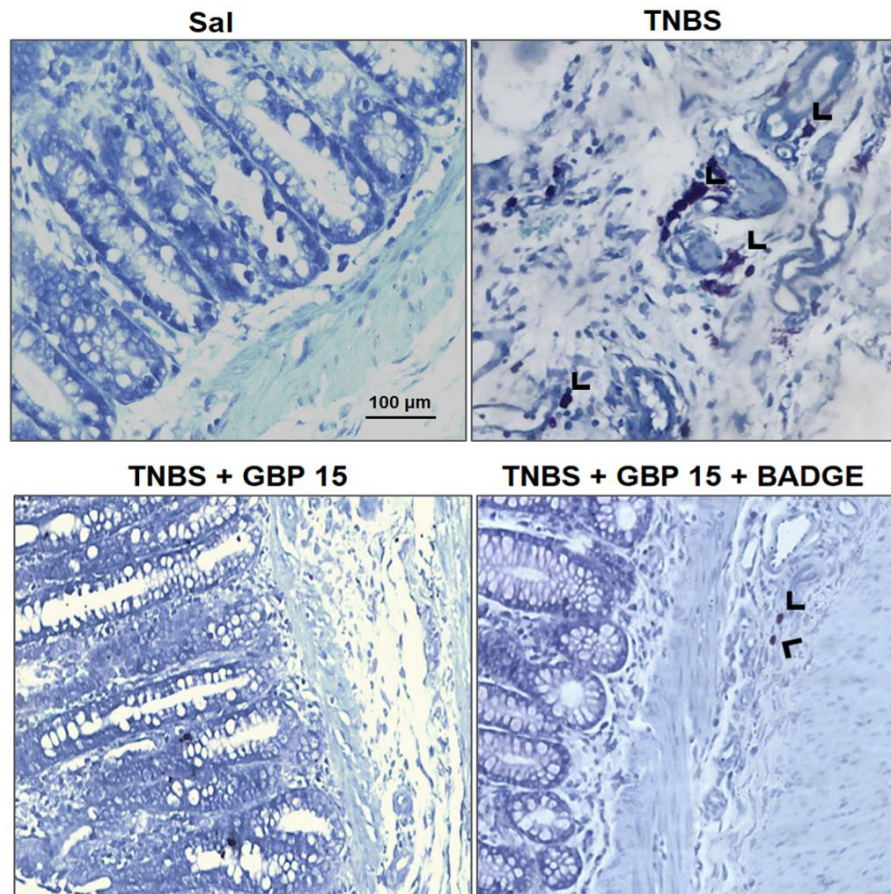


Figura 25. Gabapentina diminui a ativação de mastócitos no cólon através do receptor PPAR- γ . Cortes histológicas dos cólons de ratos corados com azul de toluidina. Intestino de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite por TNBS e tratado gabapentina (TNBS + GBP); intestino de um animal com colite por TNBS e tratado com gabapentina e Bisfenol A diglicidil éter (TNBS + GBP + BADGE). As setas pretas apresentam mastócitos ativos e corados em azul.

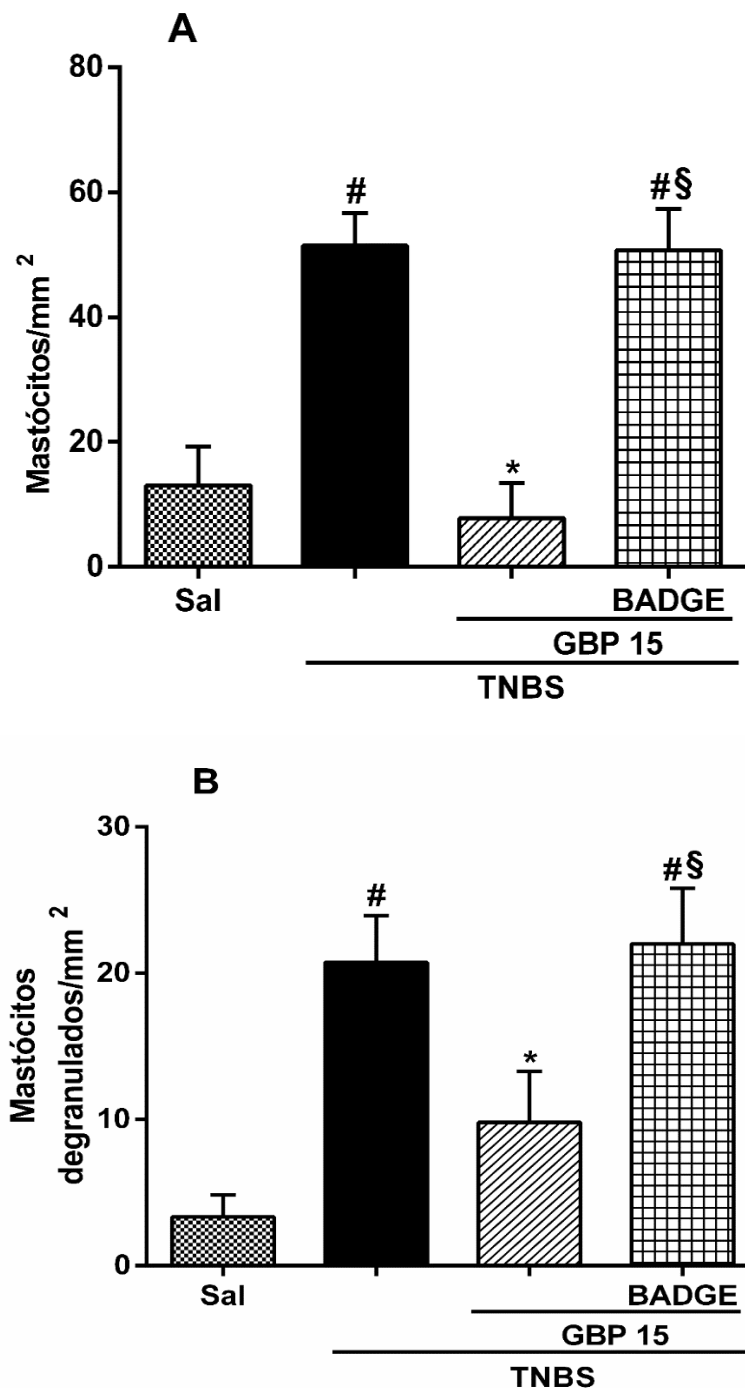


Figura 26. Gabapentina reduz a ativação de mastócitos do cólon através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, foram realizados os cortes histológicos e corados com azul de taluidina. Contagem total de mastócitos por campo de 1 mm² (A); Contagem de mastócitos degranulados por campo de 1 mm² (B); Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P < 0,05 vs grupo TNBS; [#]P < 0,05 vs grupo salina; [§]P < 0,05 vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.10 Gabapentina reduz a imunomarcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

A marcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS dos tecidos dos cólons de ratos com ou sem colite induzida por TNBS, foi realizada através da coloração em lâmina histológica através da imunohistoquímica, e a partir de então a qualificação e a contagem de células marcadas foram feitas. Conforme mostrado na Figura 27, há uma visível marcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS na pranchas representativas do grupo TNBS, ao comparar com a prancha que representa o grupo salina. Por outro lado, há uma significativa diminuição da imunomarcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS respectivamente nas pranchas representativas dos grupos com colite e tratados com GBP (15 mg/kg, v.o). A um grupo com colite e tratado com GBP, quando foi administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p) pode-se observar que ocorreu um aumento da imunomarcação para IL-1 β , COX-2 e iNOS segundo a Figura 27. Ao analisar de forma quantitativa, os animais com colite induzida por TNBS apresentaram um aumento do número de células marcadas para IL-1 β ($29,12 \pm 1,655$ células/campo), Figura 28A; COX-2 ($72,80 \pm 5,929$ células/campo), Figura 28B e iNOS ($22,42 \pm 1,098$ células/campo), Figura 28C, quando comparados ao grupo salina IL-1 β ($18,06 \pm 1,360$ células/campo), Figura 28A; COX-2 ($35,57 \pm 1,265$ células/campo), Figura 28B e iNOS ($11,14 \pm 0,780$ células/campo), Figura 28C, $P < 0,05$. Já o grupo tratado com GBP (15 mg/kg, v.o) apresentou uma diminuição significativa do número de células marcadas para IL-1 β ($15,83 \pm 1,138$ células/campo), Figura 28A; COX-2 ($30,20 \pm 2,537$ células/campo), Figura 28B e iNOS ($12,92 \pm 1,053$ células/campo), Figura 28C, com $p < 0,05$. A um grupo com colite e tratado com GBP, quando administrado BADGE (dose de 30 mg/kg, i.p), observou-se um aumento significativo da contagem de células marcadas para IL-1 β ($28,13 \pm 1,892$ células/campo), Figura 28A; COX-2 ($80,92 \pm 3,622$ células/campo), Figura 28B e iNOS ($24,35 \pm 1,336$ células/campo), Figura 28C, quando comparado ao grupo tratado apenas com GBP, com $P > 0,05$.

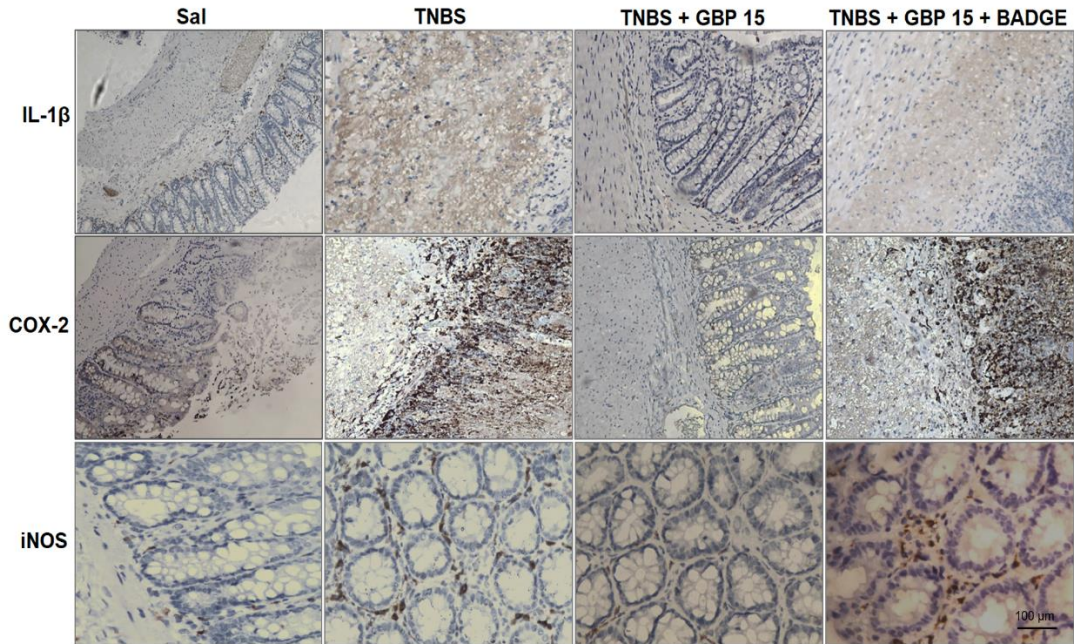
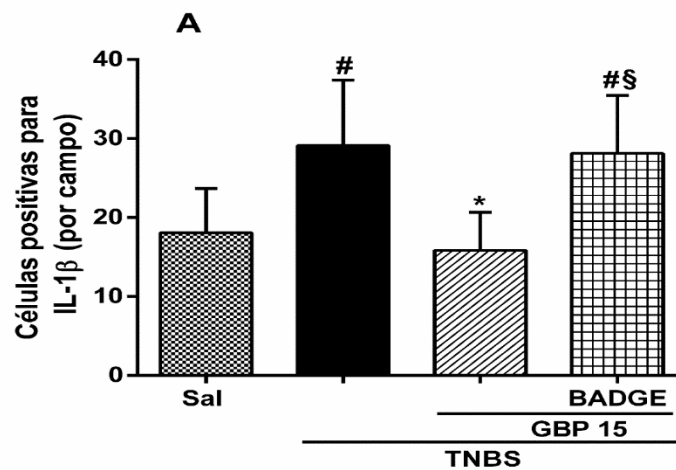


Figura 27. Gabapentina (GBP) diminui a imunomarcção para IL- β , COX-2 e iNOS através do receptor PPAR- γ . Cortes histológicos dos cólons de ratos imunomarcados para IL- β , COX-2 e iNOS. Intestino de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via retal (Salina); intestino de um animal que recebeu apenas TNBS por via retal (TNBS); intestino de um animal com colite por TNBS e tratado gabapentina (TNBS + GBP), um intestino de um animal com colite por TNBS e tratado com gabapentina e Bisfenol A diglicidil éter (TNBS + GBP + BADGE).



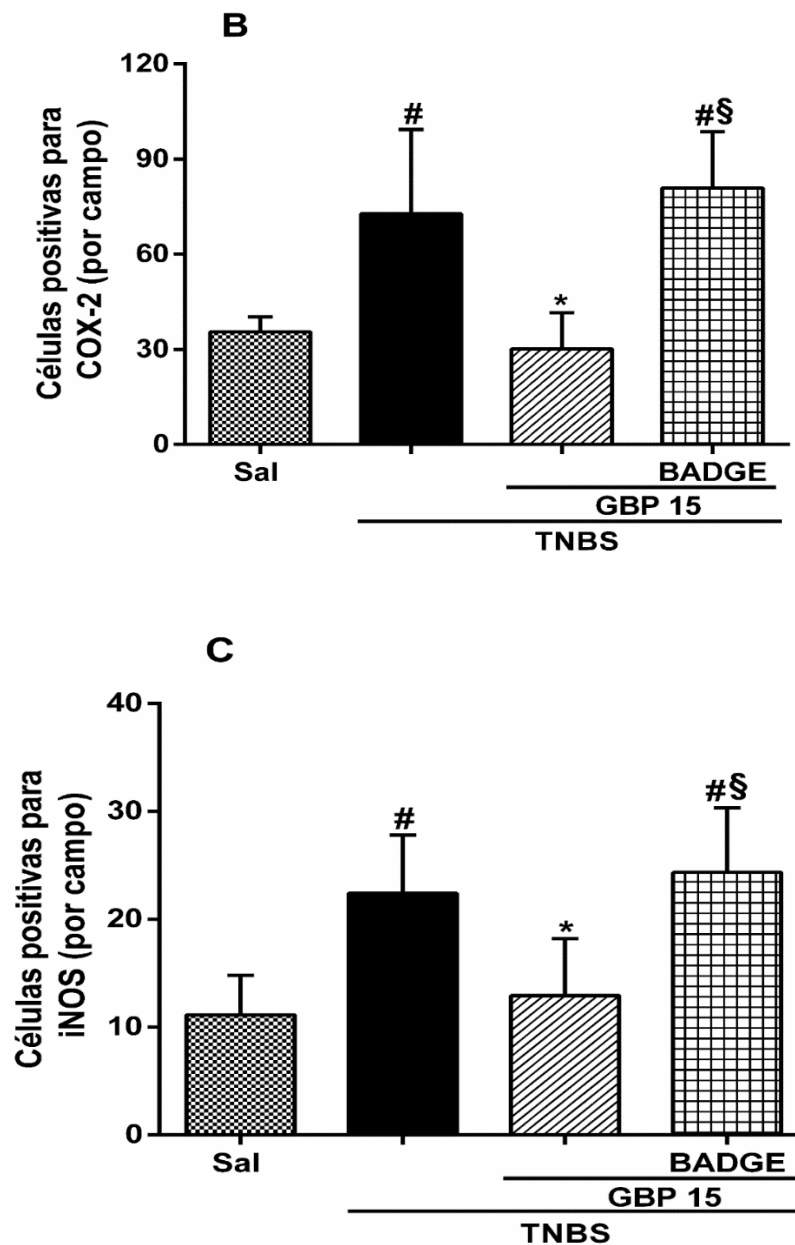
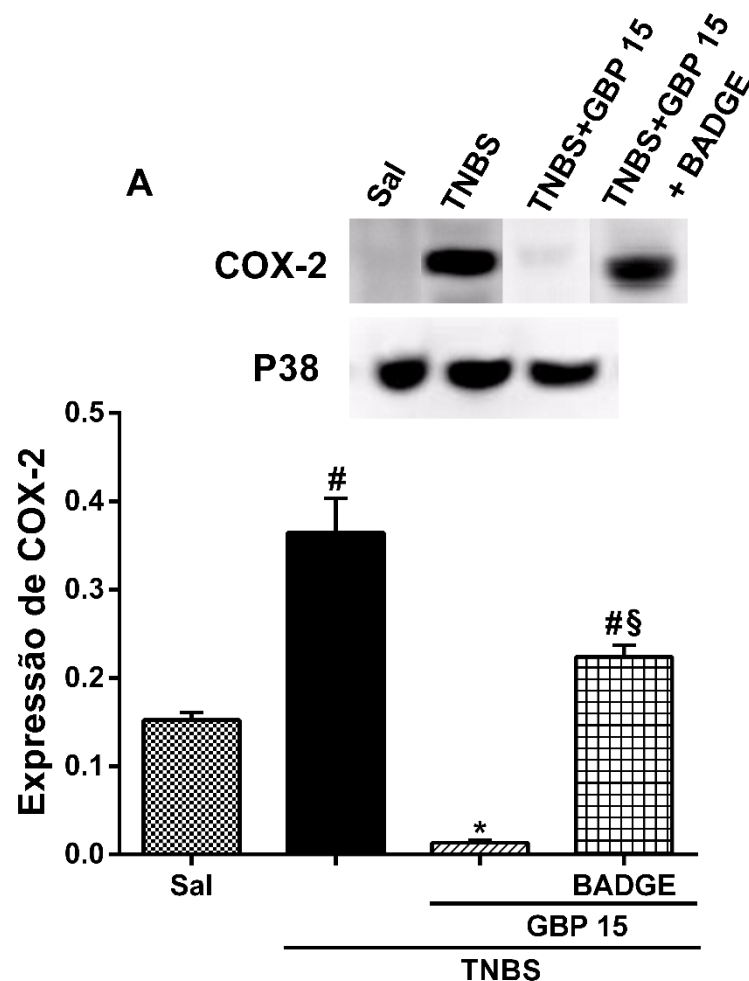


Figura 28. Gabapentina reduz a imunoquantificação de IL-1 β , COX-2 e iNOS em tecido do cólon através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino, foram realizados os cortes histológicos e imunomarcados com anticorpos para IL-1 β , figura A; COX-2, figura B; iNOS, figura C. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P <0,05 vs grupo TNBS; #P <0,05 vs grupo salina; §P < 0,05 vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.11 Gabapentina reduz a imunoexpressão para COX-2 e NF κ B em tecido do cólon de ratos através do receptor PPAR- γ

A imunoexpressão para COX-2 e NF κ B dos tecidos dos cólons de ratos com ou sem colite induzida por TNBS, foi realizada através da técnica de westrn blot. Como mostrado na Figura 29, o grupo TNBS apresentou um aumento de imunoexpressão

de COX-2 ($0,364 \pm 0,039$ COX-2/ α -tubulina), Figura 29A e NF κ B ($0,0032 \pm 0,0002$ NF κ B/ α -tubulina), Figura 29B, quando comparadas ao grupo salina COX-2 ($0,152 \pm 0,008$ COX-2/ α -tubulina), Figura 29A e NF κ B ($0,0021 \pm 0,0006$ NF κ B/ α -tubulina), Figura 29B. O tratamento com GBP diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a imunexpressão para COX-2 ($0,013 \pm 0,002$ COX-2/ α -tubulina), Figura 29A e NF κ B ($0,0006 \pm 0,0001$ NF κ B/ α -tubulina), Figura 29B. Quando o grupo GBP foi tratado com BADGE (30 mg/kg, i.p.) observou-se um significativo ($p < 0,05$) aumento na imunexpressão destes marcadores: COX-2 ($0,224 \pm 0,013$ COX-2/ α -tubulina), Figura 29A, e NF κ B ($0,0027 \pm 0,0006$ NF κ B/ α -tubulina).



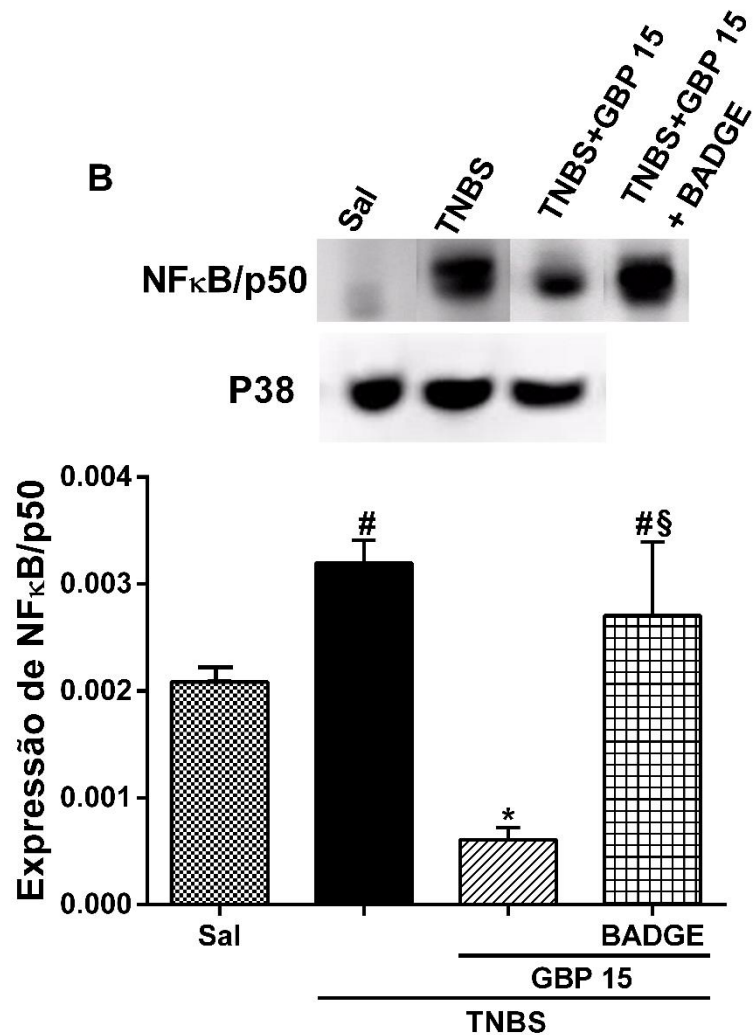


Figura 29. Gabapentina reduz a imunoexpressão de COX-2 e NF κ B em tecido do cólon através do receptor PPAR- γ . A partir das amostras de tecido do intestino foi realizado western blot para COX-2, figura A; NF κ B, figura B. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. * P < 0,05 vs grupo TNBS; #P < 0,05 vs grupo salina; §P < 0,05 vs grupo GBP. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais, são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, pois tendem a serem progressivas, causando repercussões impactantes na qualidade de vida de seus portadores, o que acarreta alterações nos âmbitos social, psicológico e profissional (OLIVEIRA et al, 2010). A inespecificidade de estudos e pesquisas direcionados para este grupo de patologias é um fator que contribui de forma negativa para os avanços no sentido de melhora do panorama atual dos pacientes com DIIs no Brasil, onde um dos principais problemas enfrentados é a dificuldade em farmacoterapia para este grupo de pacientes. Neste sentido, são necessários, estudos que possam contribuir de forma positiva para alavancar os conhecimentos e descobertas neste campo, e assim poder servir para o surgimento de descobertas biotecnológicas que possam trazer melhorias para socioeconômicas.

Uma abordagem conveniente para estudar as respostas patológicas, frente a intervenções farmacológicas de DIIs, é o uso de modelos de colite intestinal induzido em ratos. Os modelos animais desempenham um papel crucial no desenvolvimento de novos fármacos terapêuticos para o tratamento de DIi e investigação precisa do possível mecanismo de ação de um determinado fármaco. Um modelo bastante eficiente e amplamente utilizado é a colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) em ratos (LOEUILLARD et al., 2014), o qual foi utilizado nesta tese como base fundamental para a construção do conhecimento acerca das hipóteses aqui testadas e comprovadas.

Neste contexto, a presente pesquisa de tese apresenta uma ação terapêutica pleiotrópica da gabapentina, a qual age como efector anti-inflamatório intestinal por reduzir importantes marcadores e mediadores do processo inflamatório intestinal, como ativação mastocitária, atividade da mieloperoxidase, interleucinas IL-1 β e TNF- α , COX-2, além de inibir o processo de ativação gênica por diminuir a ação do principal regulador gênico do processo inflamatório intestinal, o fator nuclear kappa B (NF κ B). Além disto, e o que torna esta descoberta mais impactante é que, a ação anti-inflamatória intestinal da gabapentina é dependente da participação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ), que modula negativamente componentes da resposta imunoinflamatória.

A administração intra-colônica de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) é um dos métodos bem estabelecidos para produzir um modelo experimental de DII, que mimetiza as características clínicas e morfofuncionais da doença inflamatória intestinal em humanos, em particular a doença de Crohn (GONZÁLEZ-MAURAZA et al. 2014).

A lesão promovida por instilação de TNBS, promove um aumento do escore macroscópico de dano e do peso úmido de 5 cm do cólon analisado, o que torna estes parâmetros importantes indicadores, confiáveis e sensíveis para estimar a gravidade da colite (YANG et al., 2012), uma vez que o aumento significativo destes parâmetros é consequência do processo inflamatório estabelecido (MURAD-REGADAS et al., 2006) o qual se inicia quando o etanol da solução de TNBS rompe a camada mucosa do intestino, o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), em contato com a membrana submucosa, age como hapteno, quando acoplado a proteínas de alto peso molecular no lúmen intestinal, induz uma respostas imunológica significativa tornando-se imunogênico (ANTONIOU et al., 2016), as quais, uma vez em contato com células apresentadoras de antígenos são processadas e apresentadas ativando células com mastócitos residentes que por sua vez liberam uma cascata de mediadores inflamatórios orquestrados pela transcrição e liberação da IL-1 β e TNF- α provenientes da ativação gênica promovida pelo NF κ B um importante regulador da transcrição gênica no processo inflamatório.

Os resultados apresentados acima mostram que, os ratos com colite induzida por TNBS, quando tratados com gabapentina na dose de 15 mg/kg por via oral, tiveram uma significativa redução dos escores macroscópicos de lesão, bem como do peso úmido dos cólons analisados, mostrando assim uma evidente ação anti-edematogênica da gabapentina, o que apontando este fármaco como um efetor anti-inflamatório intestinal.

A inflamação gerada pelo TNBS é caracterizada por uma infiltração de linfócitos e granulócitos e depleção de células caliciformes no cólon; estas características são semelhantes aos efeitos da doença de Crohn de moderada a grave em humanos [18]. A GBP agiu preservando a arquitetura da estrutura epitelial, mantendo a perfeição das criptas intestinais e reduzindo infiltrados celulares para mucosa do intestino, corroborando consistentemente com os dados macroscópicos, mostrando uma

melhora significativa do quadro inflamatório observado no grupo TNBS e tratado com GBP (DE CARVALHO et al., 2018).

O processo inflamatório intestinal causado por TNBS é marcado em grande parte pela ativação celular e migração destas células para os sítios de inflamação e é predominante a presença de infiltrados neutrofílicos, mostrando que estas células são evidentemente as principais células responsáveis pelo processo inflamatórios do local.

A infiltração de neutrófilos é uma das características histológicas mais evidentes quando se faz uma análise histopatológica da mucosa colônica inflamada em pacientes com DIIs. A MPO é uma enzima abundantemente expressa em neutrófilos, macrófagos e monócitos. O aumento da atividade da MPO é um marcador proporcional do influxo de neutrófilos para o tecido e, portanto, é considerado um fenômeno específico de processo inflamatório (KIM et al., 2012). Este estudo mostrou que a colite induzida por TNBS revelou níveis comparativamente altos de MPO, indicando infiltração de neutrófilos, que é um fenômeno que contribui significativamente para danos nos tecidos e disfunção da mucosa no cólon (YANG et al., 2016). Os resultados mostram que o tratamento da colite com GBP representa uma intervenção muito eficaz, haja vista que ocorreu uma reversão significativa dos parâmetros inflamatórios acima citados. Desta forma os resultados mostram, previamente, que a GBP reduziu o influxo de neutrófilos ativados, diminuindo a atividade de MPO no tecido do cólon (DE CARVALHO et al., 2018).

Durante a migração dos neutrófilos para o local da inflamação ocorre uma grande liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela atividade da MPO, o que causa uma disfunção endotelial e lesão tecidual, o que contribui sobremaneira para a progressão do distúrbio inflamatório intestinal (MITTAL et al., 2014). Assim, o estresse oxidativo é um importante mecanismo subjacente à fisiopatologia da doença inflamatória intestinal (BAROLLO et al., 2005). Durante a fase ativa desta doença, as células inflamatórias intestinais ativadas produzem citocinas e metabolizam excessivas espécies reativas de oxigênio (ROS) (ALMENIER et al., 2012). O excesso de ROS destrói de forma reversível ou irreversível as biomoléculas oxidáveis, incluindo fosfolipídios de membrana, formando produtos de peroxidação lipídica que danificam a função e estrutura da membrana celular; o malondialdeído (MDA) é um importante indicador de peroxidação lipídica e dano induzido por ROS (LV et al., 2018). Os níveis de espécies reativas de oxigênio liberados em consequência à

instilação de TNBS no cólon apresentaram-se reduzidos pelo tratamento com a GBP, apontando assim uma potencialidade antioxidante *in vivo* atribuída a este fármaco.

Para dar mais consistência a estes dados fez-se necessário a apresentação análise dos resultado da dosagem de glutathiona (GSH).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo-tiol ubíquo presente em altas concentrações em células de mamíferos, e é um componente significativo das defesas antioxidantes da maioria dos tecidos. A GSH é um importante agente antioxidante intracelular produzido no intestino dos mamíferos e está envolvida no mecanismo de reparo do dano da mucosa pelos radicais livres. Ela desempenha um papel importante na proteção das células intestinais e atua como um mecanismo de defesa contra a inflamação (OLAMILOSOYE et al., 2018). GSH existe como glutathiona reduzida ou oxidado glutathiona (GSSG), e o estado redox celular é mantido pela distribuição de GSH e GSSG predominantemente como GSH. Este equilíbrio redox é conseguido pela ação das enzimas do ciclo redox. A exposição de células ao estresse oxidativo resulta em desequilíbrio GSH / GSSG e no acúmulo de GSSG (TSUNADA et al., 2003).

Durante a inflamação intestinal, os níveis de GSH diminuem, resultando em lesões graves na mucosa do cólon (OLAMILOSOYE et al., 2018). Por isso, níveis baixos de GSH tem sido usado como indicador alternativo de doenças inflamatórias intestinais e nos modelos animais de colite, os níveis de GSH são normalmente reduzidos (MOURA et al., 2015).

A diminuição dos níveis de GSH do grupo TNBS foi contornada pelo tratamento dos ratos com GBP, ocorrendo a manutenção ou restauração significativa dos níveis de GSH da mucosa do cólon, corroborando com a ideia de que a GBP protegendo a mucosa intestinal contra o estresse oxidativo promovido pelo TNBS.

Os danos causados por ROS estão diretamente ligados à gravidade da lesão intestinal causada por TNBS, haja vista que um dos principais radicais livres atuantes neste contexto é o radical superóxido, este por se tratar de um íon altamente reativo, participa promiscuamente da produção de espécies reativas de nitrogênio. Grandes quantidades de NO na presença de ânions superóxidos, produzem o agente oxidante tóxico peroxinitrito. O peroxinitrito pode contribuir para a inflamação através da nitração de resíduos de tirosina (nitrotirosina), levando a alterações na estrutura e função das proteínas, dano oxidativo e aumento da produção de citocinas pró-

inflamatórias (RAHIMI, 2010). Assim, a doença inflamatória intestinal está associada a uma superprodução de NO com um acúmulo tecidual de produtos da oxidação do peroxinitrito, o nitrito/nitrato (ABIODUN et al., 2016). Portanto, o nitrito / nitrato também é considerado como um índice de dano oxidativo (DODDA et al., 2014)

O aumento da produção de NO parece ser responsável pela lesão do tecido colônico em vários modelos experimentais de colite (ZINGARELLI et al., 1999). Neste estudo, os danos na mucosa intestinal induzidos pelo TNBS foram acompanhados por altos níveis de radicais livres derivados da degradação do NO (radicais NO_3 / NO_2). (BRITO et al., 2014), que por sua vez, responderam positivamente ao tratamento com GBP, retornando aos níveis basais conforme representado pela Figura 8, solidificando o conceito de ação inibidora de estresse oxidativo aplicado à gabapentina.

Em quantidades excessivas na mucosa do cólon, o NO e seus derivados são pró-inflamatórios, pois causam citotoxicidade. Além disto, o NO e seus subprodutos também sinalizam para a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (HUANG et al., 2018). Estas citocinas atuam como mediadores chaves do processo inflamatório, por isso são consideradas importantes biomarcadores inflamatórios (HU et al., 2018).

A Interleucina 1 beta (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados e monócitos, é um mediador essencial na fase inicial da cascata inflamatória que leva à colite (SPALINGER et al., 2018). A IL-1 β é um importante mediador inflamatório envolvido em diversas atividades celulares, como proliferação celular, diferenciação e apoptose (HOGQUIST et al., 1991; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). O papel fundamental da IL-1 β depende da ativação de respostas pró-inflamatórias locais ou sistêmicas (DINARELLO, 2009). Atua direta e indiretamente através da estimulação da liberação de outros fatores pró-inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF α) (KONARSKA et al., 2018). Altos nível de IL-1 β é encontrado na colite ativa e está bem correlacionado com o grau de severidade da inflamação (LV et al., 2018). E o estudo aqui apresentado, mostrou que a colite induzida por TNBS levou a um aumento dos níveis de IL-1 β no tecido do cólon. A administração de GBP teve um efeito significativo, pois reduziu os níveis de IL-1 β da mucosa do cólon de ratos com colite.

Assim como a IL-1 β , o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) tem um papel crítico na patogênese da DII, uma vez que perpetua processos inflamatórios na mucosa

intestinal rompida, causando secreção de outras citocinas. O TNF- α é produzido principalmente em células imunocompetentes, incluindo macrófagos e linfócitos (CAROZZI et al., 1990). O TNF- α apresenta sua ação na mucosa do cólon, pois modula as decisões de destino celular, fluxo paracelular, cicatrização da úlcera, iniciação e propagação da inflamação (LEPPKES et al., 2014). Além disto, o TNF- α modula a perda de células caliciformes produtoras de muco, diminuindo a espessura da camada mucosa do cólon e expondo a mucosa a antígenos luminiais, promovendo e intensificando ainda mais a inflamação da mucosa colônica (Chen et al., 2013).

Altos níveis de TNF- α também estão associados à patologia da colite ulcerativa ou doença de Crohn, tanto em pacientes humanos como em modelos animais (YANG et al., 2016). Os achados do presente estudo, apontam que os altos níveis de TNF- α promovido pela instilação de TNBS na mucosa do cólon dos ratos foram revertidos pelo tratamento com a GBP.

Conforme apontado pelo achados anteriores, os danos teciduais promovidos pela instilação colônica de TNBS e orquestrados principalmente pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , foram significativamente diminuídos pelo tratamento com GBP. Com isto, acredita-se que a GBP, de alguma forma atua modulando a liberação ou atividade destas citocinas durante o processo inflamatório intestinal.

A atividade anti-inflamatória intestinal atribuída à gabapentina até aqui, se deve, segundo aponta os dados histológico e celulares, principalmente pela proteção da membrana mucosa intestinal. Sobre esta visão direcionou-se as investigações científicas para um importante constituinte da mucosa intestinal, os mastócitos.

Os mastócitos são células residentes da mucosa do trato gastrointestinal, onde estão idealmente posicionados para responder a antígenos estranhos que cruzaram esta barreira epitelial (REBER et al., 2015). Seu número pode variar significativamente dependendo do tecido estudado, mas também durante infecções ou inflamações. (BOECKXSTAENS, 2015). Acredita-se que numerosos distúrbios intestinais estejam associados às ações dos mastócitos (BISCHOFF, 2016). Os mastócitos são particularmente interessantes, pois não só estão envolvidos na defesa inata e adquirida contra antígenos estranhos (ABRAHAM; ST JOHN, 2010), mas também liberam uma carga de mediadores inflamatórios conhecidos por afetar a função de barreira mucosa (REBER et al., 2015; BISCHOFF, 2016), aumentando assim o acesso

de antígenos intraluminais para o sistema imunológico da mucosa e como consequência aumentando ainda mais o processo inflamatório.

Evidências apontam a participação mastocitária na liberação de mediadores do processo inflamatório na mucosa intestinal de pacientes com DII (BOECKXSTAENS, 2015). Uma prova disto, é que durante a agressão química do intestino, os mastócitos produzem os ânions tóxicos de superóxido no ambiente inflamatório, recrutando neutrófilos para o local da injúria para provocar a reação inflamatória, gerando excesso de ROS e enorme quantidade de enzimas proteolíticas, além de citocinas que funcionam como orquestradores do processo inflamatório e levam a danos teciduais severos (ARIGESAVAN; SUDHANDIRAN, 2015), tais como a IL-1 β e o TNF- α (KIM et al., 2014). Desta forma os mastócitos são apontados como o primeiro e principal componente funcional que determina um processo inflamatório intestinal. É evidente o aumento do número de mastócitos no grupo TNBS. Como consequência do tratamento com GBP, houve uma significativa ($p < 0,05$) redução da marcação mastocitária e do número total de mastócitos, bem como do número de mastócitos degranulados, que são células ativadas e com seus conteúdos citoplasmáticos liberados.

A capacidade de inibição da ativação mastocitária da gabapentina aqui apresentada, abre perspectivas promissoras para o estudo do mecanismo molecular de ação desta droga, uma vez que a GBP pode estar atuando em umas das principais células sinalizadoras para o 'start' do processo inflamatório intestinal que é o mastócito.

Nas doenças inflamatórias intestinais, os mastócitos liberam uma gama diversificada de mediadores que contribuem para os processos inflamatórios (HAMILTON et al., 2014). Destes mediadores, as prostaglandinas são os principais componentes agravantes do quadro inflamatório e suas sínteses se dão pela ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) nos mastócitos (REDDY et al., 2000). Além disto, grânulos mastocitários são fontes ricas em NO, portanto um mediador do processo inflamatório proveniente da NO-sintase induzida (SEZER et al., 2009).

Para evidenciar a contribuição de IL-1 β , COX-2 e iNOS com marcadores do processo inflamatório intestinal, e além disto mostrar o efeito da GBP sobre estes marcadores, avaliou-se a imunomarcação para estes importantes contribuidores do agravamento da colite induzida por TNBS. Desta forma os resultados apresentados,

nos permite observar que a intensa imunomarcaco vista nos grupos TNBS para os três marcadores, foi revertida quando observado o tratamento com a GBP na dose de 15 mg/kg, e este panorama também foi observado na quantificao de células marcadas para cada um dos mediadores envolvidos, o que nos permite suspeitar que há uma possibilidade no descartada de que esta ao da GBP esteja sendo efetivamente aplicada no contexto mastocitário.

Fatos apontam que a etiologia das DIIs resulta de uma resposta imune desregulada que culmina em um processo inflamatório bem sucedido e que em sua maioria se cronificam. Sobre este contexto, muitos estudos apontam as prostaglandinas (PGs), como principais mediadores inflamatórios que participam da patogênese da doena inflamatória intestinal, e sendo estas, resultado da expresso aumentada de ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa do cólon (DONG et al., 2003). A expresso de COX-2 no tecido do cólon de ratos com colite, apresentou-se aumentada, e ao passo em que avaliamos a ao da GBP sobre a expresso destas enzimas, encontrou-se uma reduo significativa ($p < 0,05$), consolidando de forma mais contundente a efetiva atividade da GBP sobre a enzima COX-2 a qual possui uma contribuio importante no agravamento da inflamao intestinal.

Um fato bem mais interessante, acontece ao analisarmos a ao da GBP sobre a imunoexpresso do fator nuclear kappa B (NFkB), onde observa-se uma reduo significativa da expresso deste marcador.

O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrio indutíveis, que regula uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos das respostas imune e inflamatória. Essa família é composta por cinco membros estruturalmente relacionados que medeiam a transcrio de genes alvo por ligao a um elemento de DNA específico. As proteínas NF- κ B (heterodímero, p65 e p50) (TAK; FIRESTEIN, 2001), so normalmente sequestradas no citoplasma por uma família de proteínas inibitórias, incluindo membros da família I κ B e proteínas relacionadas, caracterizadas pela presena de repeties de anquirina. Até hoje, a família I κ B melhor estudada e mais importante membro  I κ B α (LIU et al., 2017). O NFkB é ativado pela degradao de I κ B α após sua fosforilao por IKK e, em seguida, o complexo proteico p65 e p50 ativado se transloca para o núcleo, onde irá ativar vários genes relacionados ao processo inflamatório. Além disso, o complexo IKK pode ser ativado por muitos

processos baseados em quinases, que incluem a proteína quinase C e a família da tirosina quinase (BEINKE; LEY, 2004).

A ativação do NF- κ B pela translocação nuclear de complexos citoplasmáticos, desempenha um papel central na inflamação através de sua capacidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo o gene do TNF- α e IL-1 β (Li et al., 2005). Esta via é ativada mediante estimulação celular apropriada, na maioria das vezes por sinais relacionados a patógenos ou estresse (TAK; FIRESTEIN, 2001).

Nos mastócitos, a ativação dos principais genes pró-inflamatório e de citocinas como TNF- α e IL-1 β é dependente da regulação gênica positiva promovida pelo NF κ B (MARQUARDT et al., 1999). Por isto, acredita-se que a ação da GBP nos mastócitos se deve pela regulação do complexo I κ B α / NF κ B nestas células.

Sobre um aspecto químico, a gabapentina é estruturalmente semelhante à mesalazina, ácido 5-aminossalicílico (anexo IV), um fármaco anti-inflamatório da família do amino-salicilato que é amplamente utilizado para o tratamento da doença inflamatória do intestino. O efeito da mesalazina é devido à sua ligação ao receptor ativado por proliferador de peroxissoma- γ (PPAR- γ) (LACUCCI et al., 2010).

O PPAR- γ , é um membro da família de receptores de hormônios nucleares, que desempenha um papel central na diferenciação de adipócitos e na sensibilidade à insulina. A ativação endógena do PPAR- γ leva à diminuição da produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão (STEINBERG et al., 2006). O PPAR- γ tem sido bem reconhecido como um regulador endógeno da inflamação intestinal (DESREUMAUX et al., 2001), um vez que pacientes com DII exibem níveis diminuídos de PPAR- γ no cólon em comparação com controles normais (MICHALIK; WAHLI, 1999). A ativação do PPAR- γ protege os tecidos intestinais dos danos induzidos pela dextrana sulfato de sódio (DSS), pela administração do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) ou pela lesão de isquemia e reperfusão (NAKAJIMA et al., 2001). A ativação do PPAR- γ exibe os efeitos anti-inflamatórios através da inibição do fator nuclear de ativação- κ B (NF- κ B), resultando em uma diminuição nas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2016).

Portanto, o complexo mesalazina mais PPAR- γ promove uma diminuição na expressão IL-1 β e TNF- α , durante os processos inflamatórios, pois inibem a ativação do NF κ B. Essa similaridade molecular entre gabapentina e mesalazina nos permite considerar a possibilidade de que a gabapentina também esteja atuando de forma a

promover sua ação anti-inflamatória através de uma inter-relação com o PPAR- γ (DE BRITO et al., 2018).

Para verificar a participação do PPAR- γ sobre o efeito anti-inflamatório intestinal da gabapentina na colite induzida por TNBS, usamos um inibidor específico deste receptor, o bisfenol A diglicidil éter (BADGE) na dose de 30 mg/kg (HE et al., 2012), sendo aplicado nos animais com colite e tratado com GBP. Em seguida realizamos todos os ensaios acima abordados.

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ) é um importante mediador anti-inflamatório durante a inflamação colônica (RAHIMIAN et al., 2016). A ativação do PPAR- γ suprime a ativação da via de sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B), inibe a expressão de citocinas inflamatórias e a infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal (ZHANG et al., 2017).

Conforme esperado, a GBP foi efetiva no combate ao processo inflamatório intestinal induzido por TNBS, onde se observa uma diminuição dos parâmetros macroscópicos de lesão, e do peso úmido do cólon, além de uma significativa preservação da arquitetura e funcionalidade da mucosa intestinal. Por outro lado a administração de BADGE fez com que essa atividade a GBP fosse perdida, um vez que todos os parâmetros avaliados: escores macroscópicos, peso úmido e achados histopatológicos se intensificaram e tornaram-se sem diferença estatística significativa para o grupo TNBS somente, provando desta forma um forte envolvimento do receptor PPAR- γ na ação anti-inflamatória da GBP.

A MPO proveniente de grânulos de neutrófilos converte o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso na presença de íons cloro. Diante do processo inflamatório, a infiltração de neutrófilos na mucosa do cólon e a liberação de radicais livres de oxigênio induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o progresso da lesão tecidual (PODOLSKY, 2002). O aumento de radicais livres de oxigênio induz o fator nuclear (NF- κ B), que por sua vez eleva a produção de citocinas e contribui ainda mais para o processo inflamatório (SENOL et al., 2015).

A atividade da MPO é relatada como um marcador de influxo de neutrófilos para o tecido inflamado e, portanto, é considerado como um biomarcador específico de inflamação (KIM et al., 2012). Este estudo mostrou que o TNBS induziu colite revelando níveis elevados de MPO no cólon, o que indica infiltração de neutrófilos (MALLE et al., 2007). Infiltração de neutrófilos contribui significativamente para danos

nos tecidos e disfunção da mucosa na colite (YANG et al., 2016), principalmente devido aos danos causados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) proveniente da liberação por estas células. Contudo a GBP diminuiu significativamente a atividade da MPO, portanto, conseqüentemente reduziu o infiltrado neutrofílico. Além do mais quando ao grupo com colite e tratado com GBP foi administrado o inibidor específico do PPAR- γ , perdeu-se de forma significativa ($p < 0,05$) o efeito da GBP de inibição da infiltração de neutrófilos, evidenciando assim que, de alguma maneira o receptor PPAR- γ está influenciando a ação da GBP em inibir a infiltração de neutrófilos para o local da inflamação.

A infiltração de células inflamatórias é considerada um desencadeador da liberação de radicais livres. Em condições fisiológicas, as ROS são controladas por um grande número de sistemas antioxidantes. ROS estão significativamente aumentadas na doença inflamatória intestinal (HUANG et al., 2018). A peroxidação lipídica causada pela instilação de TNBS no cólon e intensificada pela ação dos radicais livres oriundos do processo de migração neutrofílica, que representa de forma fiel a gravidade da lesão inflamatória, e assim intensificando alguns marcadores de estresse oxidativo como o MDA e o GSH, além dos subprodutos de degradação do óxido nítrico. Os radicais livres derivados do NO têm um importante papel na patogênese das DIIs (KIMURA et al., 1997; CORSI, 2010). Quantidades excessivas de NO são consideradas pró-inflamatórias e citotóxicas. O NO também induz a liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Além disso, o superóxido aumenta nos intestinos inflamados (DIJKSTRA et al., 1998).

A GBP agiu na lesão intestinal induzida por TNBS, diminuindo todos os marcadores de estresse oxidativo acima citados, no entanto quando juntamente com a GBP foi administrado o inibidor do receptor PPAR- γ ocorreu um reversão destes marcadores, dando maior robustez à hipótese o efeito *in vivo* da GBP em diminuir o estresse oxidativo produzido pelo TNBS sofre alguma influência do receptor PPAR- γ .

Durante a colite, a barreira mucosa é danificada, levando à inflamação intestinal. Posteriormente, as células imunes ativadas produzem de forma excessiva citocinas pró-inflamatórias. Em pacientes com DII, IL-1 β e TNF- α são consideradas citocinas críticas para a resposta imune da mucosa (COSKUN et al., 2017). Esta pesquisa mostrou que a GBP diminuiu a síntese ou liberação destas citocinas no tecido colônico. O NF- κ B, um dos principais ativadores gênicos do processo

inflamatório, pode modular a expressão de citocinas como IL-1 β e TNF- α e assim regular o processo inflamatório na DII (FENG et al., 2014). Este ativador gênico por sua vez é controlado pela ação endógena do receptor PPAR- γ , o qual é um fator transcricional altamente expresso nas células epiteliais do cólon e encontra-se diminuído em paciente com DII (AOYAGI et al., 2010). A ativação do PPAR- γ reduz a ativação do NF- κ B induzida pela doença inflamatória intestinal (DII) e com isto suprime a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (DWORZANSKI et al., 2010). Neste estudo os ratos com colite induzido por TNBS e tratados com GBP apresentaram níveis de IL-1 β e TNF- α significativamente diminuídos quando comparados ao grupo TNBS, no entanto quando ao animais tratados com GBP fora administrados o BADGE (inibidor específico do receptor PPAR- γ), os níveis destas citocinas aumentaram de forma a equiparem-se com o grupo TNBS, o que nos permite acreditar que a inter-relação da GBP com o receptor PPAR- γ está bloqueando o ativador gênico NF κ B e desta forma diminuindo a ativação do cluster de genes do processo inflamatório, contudo reduzindo o aporte das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α para o cólon.

Sabendo do envolvimento dos mastócitos na patogênese das doenças inflamatórias intestinais principalmente quanto à síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , e pelo fato destas citocinas serem as principais orquestrantes do processo inflamatório intestinal, acredita-se que a ação da GBP esteja principalmente direcionada aos mastócitos. Além do mais, a ativação e maturação mastocitária depende da ação do receptor PPAR- γ (TACHIBANA et al., 2008). Conforme os resultados mostram, a administração do inibidor do receptor PPAR- γ no grupos com colite e tratados com GBP, promoveu uma reversão do panorama mastocitário apresentado pelo tratamento com a GBP somente, o que torna possível e evidente o envolvimento do receptor PPAR- γ no efeito anti-mastocitário da GBP. Contudo acredita-se que a GBP atua nos mastócitos através do receptor PPAR- γ , o qual por sua vez inibe nestas células, a ativação do complexo de genes relacionados ao início e consolidação do processo inflamatório intestinal. Além da citocina TNF- α , a liberação de IL-1 β a ativação de enzimas como a COX-2 e a NO sintase são diretamente dependente da ativação mastocitária (REDDY et al., 2000; SEZER et al., 2009; HAMILTON et al., 2014;). Assim, para dá mais respaldo aos achados desta pesquisa, a imunomarcção para estes mediadores revelou que a GBP

atua diminuindo a imunomarcção para IL-1 β , COX-2 e a NO sintase, no entanto quando ao grupo com colite e tratado com TNBS foi administrado o inibidor específico do receptor PPAR- γ , ocorreu uma reversão significativa do efeito da GBP sobre a imunomarcção para os mediadores acima citados. E os dados apresentados, confirmam o achado acima, mostrando que na presença do BADGE, a GBP perdeu sua capacidade de diminuir a imunoexpressão para COX-2 e NF κ B. O PPAR- γ interage negativamente com o fator de transcrição NF κ B, inibindo a liberação de citocinas e enzimas pró-inflamatórias, como COX-2, isso reflete sobre um efeito anti-inflamatório do PPAR- γ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; LEIRO et al., 2004). Evidências crescentes documentaram que o PPAR- γ ativado inibe as vias de sinalização do NF κ B para proteger contra a colite (CHOO et al., 2015) Nossos achados mostraram que a GBP inibiu a via NF κ B, através da regulação positiva do PPAR- γ indicando que a GBP regulou negativamente a ativação do NF κ B através do PPAR- γ (WANG et al., 2016). Desta forma pode-se sugerir com segurança que a ação anti-inflamatória intestinal da gabapentina tem uma forte reação com o receptor PPAR- γ especialmente nos mastócitos residente do sítio do processo inflamatório.

7 CONCLUSÕES

Os achados acima evidenciados, nos permitem concluir que a gabapentina na dose de 15 mg/kg, atua diminuindo os parâmetros inflamatórios da doença de Crohn/colite experimental, induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico. Este efeito atribuído à gabapentina, certamente se dá através da interação deste fármaco com o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ), que é um importante regulador do ativador gênico NF κ B, importante marcador e ativador da inflamação colônica. Através dessa interação, a gabapentina foi capaz de reduzir os principais eventos que desencadeiam o processo inflamatório induzido pelo (ácido trinitrobenzeno sulfônico). Portanto pode-se sugerir que a gabapentina age atenuando os eventos do processo inflamatório através do receptor PPAR- γ .

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E.; SLEEM, A. A. Study of the analgesic, anti-inflammatory, and gastric effects of gabapentin. **Drug. Discov. Ther.** v. 3, n.1, p. 18-26, fev, 2009.

ABIODUN, O. O. et al. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): In vitro and in vivo evidences. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 192, p. 309-3194, nov, 2016.

ABRAHAM, S. N.; ST JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat. Ver. Immunol.** v. 10, p. 440-452, jun, 2010.

ADACHI, M. et al. Peroxisome proliferator activated receptor γ in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. **Gut.** v. 55, n. 8, p. 1104–1113, ago, 2006.

AKBAR, A. et al. Review article: visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: molecular mechanisms and therapeutic agents. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 30, n. 5, p. 423-435, set, 2009.

ALMENIER, H.A. et al., Oxidative stress and inflammatory bowel disease. **Front. Biosci.** v. 4, p. 1335–1344, jan, 2012.

ANDERSEN, V. et al. Polymorphisms in NF- κ B, PXR, LXR, PPAR γ and risk of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.** v. 17, n. 2, p. 197-206, jan, 2011.

ANTONIOU, E. et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Annals of Medicine and Surgery.** v. 11, p. 9-15, jul, 2016.

AOYAGI, Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 mutation may cause a subset of ulcerative colitis. **Pediatr. Int.** v. 52, n. 1, p. 729–734, jan, 2010.

APPLEYARD, C.B; WALLACE, J.L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am. J. Physiol.** v. 269, n. 1, p. 119-25, jul, 1995.

ARIGESAVAN, K.; SUDHANDIRAN, G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 461, p. 2, p. 314-320, mai, 2015.

AXELROD, F. B.; HILZ M. J. "Inherited autonomic neuropathies." **Semin. Neurol.** v. 23, n. 4, p. 381-90, out, 2003.

AZIZA, M. et al. Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco. **Sci Res. Essays**. v. 2, n. 10, p. 509–514, out, 2008.

BACKONJA, M. et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: A randomized controlled trial. **JAMA**. v. 280, n. 21, p. 1831–1836, dez, 1998.

BAROLLO, M. et al. Effects of iron manipulation on trace elements level in a model of colitis in rats. **World J. Gastroenterol**. v. 11, n. 28, p. 4396–4399, jul, 2005.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-284, out, 2009.

BAUDITZ, J. et al. Thalidomide reduces tumour necrosis factor α and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut**. v. 50, n. 2, p. 196–200, fev, 2002.

BEAUGERIE, L.; SOKOL, H. Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course. **World J. Gastroenterol**. v. 18, n. 29, p. 3806–3813. 2012.

BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. **Biochem. J**. v. 382, n. 2, p. 393–409, set, 2004.

BIALER, M. et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Tenth Eilat Conference (EILAT X). **Epilepsy Research**. v. 92, n. 2–3, p. 89-124 dez, 2010.

BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **Journal of rheumatology. Supplement.** v. 65, p. 3–9, set, 2002.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev. bras. Coloproct.** v. 23, n. 3, p. 172-182, set, 2003.

BISCHOFF, S. C. Mast cells in gastrointestinal disorders. **European Journal of Pharmacology.** v. 778, p. 139–145, mai, 2016.

BOECKXSTAENS, G. Mast cells and inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Pharmacology.** v. 25, p. 45-49, dez, 2015.

BONE, M.; CRITCHLEY, P.; BUGGY, D.J. Gabapentin in postamputation phantom limb pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. **Reg. Anesth. Pain Med.** v. 27, n. 5, p. 481-486, set, 2002.

BOROUJERDI, Amin et al. Calcium channel alpha-2-delta-1 protein up regulation in dorsal spinal cord mediates spinal cord injury-induced neuropathic pain states. **Pain.** v. 152, n. 3, p. 649–655, mar, 2012.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Invest. Dermato.** v. 78, n. 3, p. 206-209, mar, 1982.

BRANDHORST, G. et al. CD41 immune response as a potential biomarker of patient reported inflammatory bowel disease (IBD) activity. **Clin. Chim. Acta.** v. 421, p. 31–33, jun, 2013.

BRITO, T. V. et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 66, n. 8, p. 1161-1170, ago, 2014.

BRYANS, J. S.; WUSTROW, D. J. 3-Substituted GABA analogs with central nervous system activity: a review. **Med. Res. Rev.** v. 19, n. 2, p. 149–177, mar, 1999.

BURISCH, J.; MUNKHOLM, P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 17, n. 8,1-10, ago, 2015.

CAMELO, A. et al. Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. **Journal of gastroenterology.** v. 47, n. 1, p. 1198–211, nov, 2012.

CAMPELO, S. R. et al. Effects of immunomodulatory drugs on TNF- α and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages. **BMC Research Notes.** v. 4, n. 1, p. 24, jun. 2011.

CAO, M. et al. Amelioration of IFN-gamma and TNF-alpha-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway. **PLoS One.** v. 8, n.5, p. e 61944, mai, 2013.

CARACENI, A. el tal. Gabapentin as an Adjuvant to Opioid Analgesia for Neuropathic Cancer Pain. **Journal of Pain and Symptom Management.** v. 17, n. 6, p. 441–445, jun, 1999.

CAROZZI, S. et al., Peritoneal dialysis fluid (PDF) C++ and 1: 25(OH)2D3 modulate peritoneal macrophage (PM0) antimicrobial activity in CAPD patients. **Adv. Peritoneal Dial.** v. 6, p. 110–113, 1990.

CASTANEDA, A. E. et al. Cognitive functioning and depressive symptoms in adolescents with inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.** V. 19, n. 10, p. 1611–1617, mar, 2013.

CHANDLER, A.; WILLIAMS, J.E. Gabapentin, an adjuvant treatment for neuropathic pain in a cancer hospital. **J. Pain Symptom. Manage.** v. 20, n. 2, p. 82–86, ago, 2000.

CHEN, B. et al. Role of miR-19a targeting TNF alpha in mediating ulcerative colitis. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 48, n. 7, p. 815–824, abr, 2013.

CHENGAND, J.K.; CHIOU, L.C. Mechanisms of the Antinociceptive Action of Gabapentin. **J. Pharmacol. Sci.** v. 100, n. 5, p. 471 – 486, fev, 2006.

CHOO, J. et al. A novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonist 2-hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate exerts anti-inflammatory effects in colitis. *J. Biol. Chem.* v. 290, n. 42, p. 25609–25619, out, 2015.

CORSI, L. Effects of the novel non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC in different models of inflammation: a new perspective in anti-inflammatory therapy. *Curr. Med. Chem.* v. 17, n. 32, p. 3918-3924, 2010.

COSKUN, M. et al. Novel targeted therapies for inflammatory bowel disease. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 38, n. 3, p. 127–142, fev, 2017.

CREER, C. W. et al. Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using k and l-carrageenases and ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* v. 129, p. 189–196, jul, 1984.

DE BRITO, T. V. et al. Gamma-Aminobutyric Acid (Gaba)-Like Gabapentin: Structure, Biosynthesis and Functions. *In: BERHARDT, Leon V. Advances in Medicine and Biology.* New York: NOVA medicine & Helth, 2018, 219-228.

DE CARVALHO, L. R. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v. 102, p. 278–285, jun, 2018.

DE SÁ LIMA, L. et al. Ouabain activates NFkB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology.* v. 73, p. 327-336, out, 2013.

DESREUMAUX, P. et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* v. 193, n. 7, p. 827–838, 2001.

DIAS, J. M. et al. Gabapentin, a synthetic analogue of gamma aminobutyric acid, reverses systemic acute inflammation and oxidative stress in mice. *Inflammation.* v. 37, n. 5, p. 1826-1836, out, 2014.

DIJKSTRA, G. et al. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. **J. Pathol.** v. 186 n. 4, p. 416–421, dez, 1998.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annu. Rev. Immunol.** v. 27, p. 519–550, abr, 2009.

DOCHERTY, M. J. Managing Pain in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology & Hepatology.** v. 7, n. 9, p. 592-601, set, 2011.

DODDA, D. et al. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: Role of quercetin. **Indian Journal of Phamacology.** v. 46, n. 3, p. 286-291, 2014.

DONG, W. G. et al. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. **World J Gastroenterol.** v. 9, n. 6, p. 1307-1311, jun, 2003

DWORZANSKI, T. et al. Influence of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonist, rosiglitazone and antagonist, biphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) on the course of inflammation in the experimental model of colitis in rats. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 61, n. 6, p. 683–693, dez, 2010.

ENGEL, M.A.; NEURATH, M.F. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. **Journal of gastroenterology.** v. 45, n. 6, p. 571–83, jun, 2010.

EVGENIKOS, N.; STEPHEN, J.G. Papillary thyroid carcinoma associated with ulcerative colitis. **Postgrad. Med. Journal.** v. 72, n. 852, p. 621-622, out, 1996.

FARACH, F.J. et al. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. **J. Anxiety. Disord.** v. 26, n. 8, p. 833–843, dez, 2012.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. **University of Connecticut Health Center.** V. 1, n. 1, p. 1-151, fev, 2012.

FENG, J. et al. Baicalin down regulates the expression of TLR4 and NFkB-p65 in colon tissue in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. **Int. J. Clin. Exp. Med.** v. 7, n. 11, p. 4063–4072, nov, 2014.

FERRARI, D. et al. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF-kB signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation. **Toxicology Letters.** v. 264, p. 51–58, dez, 2016.

FERRARI, M. L. A. et al. Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* aderente-invasivas (AIECs) e perfil microbiano de lesões intestinais de pacientes com doença de Crohn, e efeito do tratamento com *Saccharomyces boulardii* em infecções experimentais por AIEC. **Congresso Nacional de Saúde da faculdade de Medicina da UFMG - Cenários da Saúde na Contemporaneidade.** 2014.

FUKADA, C. Prescribing gabapentin off label: Perspectives from psychiatry, pain and neurology specialists. **Can. Pharm. Journal** v. 145, n. 6, p. 280-284, nov, 2012.

GABURRI, P. D. et al. Epidemiologia, aspectos clínicos e evolutivos da doença de Crohn: estudo de 60 casos. **Arq. Gastroenterol.** v. 35, n. 4, p. 240-246, out-dez, 1998.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell.** v. 109, p. S81-S96, abr, 2002.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kB and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** v. 16, p. 225-260, abr, 1998.

GLOCKER, E. O. et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **N. Engl. J. Med.** v. 19, p. 361, n. 21, nov, 2009.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat. Med.** v. 16, n. 11, p. 1248-1257, nov, 2010.

GONZÁLEZ-MAURAZA, H. et al. Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. **J. Physiol. Biochem.** v. 70, n. 1, p. 163–172, mar, 2014.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.** v.126, n. 1, p.131–138, out, 1982.

GURI, A. J. et al. The role of T cell PPAR gamma in mice with experimental inflammatory bowel disease. **BMC Gastroenterology**. v. 10, p. 60, jun, 2010.

GUSTAFSSON, H. et al. Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. **Experimental Neurology**. v. 182, n. 2, p. 427–434, ago, 2003.

HAHN, K. et al. German Neuro-AIDS Working Group. A placebo-controlled trial of neuropathies. **J. Neurol.** v. 251, n. 10, p. 1260–1266, out, 2004.

HAMILTON, M. J. et al. The Multifaceted Mast Cell in Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm. Bowel Dis.** v. 20, n. 12, p. 2364–2378, dez, 2014.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**. v. 26, n. 3, p. 203–234, fev, 2012.

HE, X. et al. Tetramethylpyrazine attenuates PPAR- γ antagonist-deteriorated oxazolone-induced colitis in mice. **Molecular Medicine Reports**. v. 5, p. 645-650, abr, 2012.

HIMUKASHI, B. S. et al. The involvement of the nociceptin receptor in the antinociceptive action of nitrous oxide. **Anesth. Analg.** v. 103, n. 3, p. 738–741, set, 2006.

HOGQUIST, K. A. et al. Interleukin 1 Is Processed and Released during Apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 88, n. 19, p. 8485–8489, out, 1991.

HOLLANDER, D. Crohn's diseases a permeability disorder of the tight junction? **Gut**. v. 29, n. 12, p. 1621–1624, dez, 1988.

HU, Z. et al. Tou Nong San Attenuates Inflammation in TNBS-IBD Model by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2018, p. 11, jun, 2018.

HUANG, Y. et al. Portulacaoleraceal extract alleviates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 105, p. 434-439, set, 2018.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, n. 6852, p. 203-210, set, 2001.

KANNAMPALLI, P.; SENGUPTA. J.N. Role of Principal Ionotropic and Metabotropic Receptors in Visceral Pain. **J. Neurogastroenterol. Motil.** v. 21, n. 2, p. 147-158, abr, 2015.

KIM, D. H. et al. Genistein inhibits pro-inflammatory cytokines in human mast cell activation through the inhibition of the ERK pathway. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 34, p. 1669-1674, set, 2014

KIM, J. J. et al., Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD, **J. Vis. Exp.** v. 60, p. e3B678–e3678, fev, 2012.

KIMURA, H. et al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.** v. 42 , n. 5, p. 1047-1054, mai, 1997.

KONARSKA, K. et al. Treatment with Obestatin-A Ghrelin Gene-Encoded Peptide- Reduces the Severity of Experimental Colitis Evoked by Trinitrobenzene Sulfonic Acid. **International J. Molecular Science**. v. 19, n. 6, p. 1643, jun, 2018.

KUKKAR, A. et al. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. **Arch. Pharm. Res.** v. 36, n. 3, p. 237–251, mar, 2013.

LACUCCI, M. et I. Mesalazine in inflammatory bowel disease: A trendy topic once again? **Canadian Journal of Gastroenterology**. v. 24, n. 2, p. 127-133, fev, 2010.

LARSEN, M. S. et al. In vivo and In vitro Evaluations of Intestinal Gabapentin Absorption: Effect of Dose and Inhibitor son Carrier-Mediated Transport. **Pharmaceutical Research**. v. 32, n. 3, p. 898-909, mar, 2015.

LEIRO, J. et al. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. **Int. Immunopharmacol.** v. 4, n. 6, p. 763–778, jun, 2004.

LEPPKES, M. et al. Pleiotropic functions of TNF-alpha in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. **Int. Immunol.** v. 26, n. 9, p. 509–515, set, 2014.

LETTERMAN, L.; MARKOWITZ, J.S. **Gabapetin: a review of published experience in the treatment of bipolar disorder and other psychiatric conditions.** **Pharmacotherapy.** v. 5, n. 19, p. 565-572, mai, 1999.

LI, J. H. et al. Melatonin Reduces Inflammatory Injury Through Inhibiting NF-κB Activation in Rats With Colitis. **Mediators of Inflammation.** v. 2005, n. 4 p. 185–193, ago, 2005.

LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy.** v. 2, p. e17023, jul, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) method. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 402–408, dez, 2001.

LOEUILLARD, E. et al. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis with fibrosis and modulation of TGF-β1 signaling. **World J. Gastroenterol.** v. 20, n. 48, p. 18207-18215, dez, 2014.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the Mechanism of IL-1 Secretion. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 22, n. 4, p. 189–195, ago, 2011.

LV, Q. et al. Norisoboldine, a natural aryl hydrocarbon receptor agonist, alleviates TNBS-induced colitis in mice, by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. **Chinese Journal of Natural Medicines.** v. 16, n. 3, p. 161-174, mar, 2018.

LV, T. et al. Polydatin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by decreasing oxidative stress and apoptosis partially via Sonic hedgehog signaling pathway. **International Immunopharmacology.** v. 64, p. 256–263, nov, 2018.

MACDONALD, T. T. et al. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of immunology.** v. 51, n. 1, p. 2–9, out, 2000.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br. J. Pharmacol.** v. 152, n. 6, p. 838–854, nov, 2007.

MARKS PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.** v. 347, n. 6, p. 417-429, ago, 2002.

MARKS, D. J. B. Crohn's Disease: an Immune Deficiency State. **Clinic Rev. Allerg. Immunol.** v. 38, n. 1, p. 20–31, fev, 2010.

MARQUARDT, D. L. et al. Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor- κ B activity. **J. Allergy. Clin. Immunol.** v. 105, n. 3, p. 500-505, dez, 1999.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **Journal of gastroenterology.** v. 45, n. 1, p. 9–16, dez. 2010.

MICHALANY, J. Técnica histológica los anatomia patológica: Com instruções para o cirurgião, enfermeiro, citotécnico. **Editora Michalany Ltda.** v. 3, p. 153-155, out-dez, 2008.

MICHALIK, L.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions, **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 10, n. 6, p. 564–570, dez, 1999.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** v. 86, n. 1, p. 271-278, mai, 1978.

MITTAL M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling.** v. 20, n. 7, p. 1126-1167, mar, 2014.

MORRIS, G.P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology.** v. 96, n. 3, p. 795-803, mar, 1989.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology.** v. 6, p. 617-639, dez, 2015.

MURAD-REGADAS, S. M. et al. Effect of soluble fiber or fructooligosaccharide supplementation upon trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats. **Acta. Cir.Bras.** v. 21, n. 5, p. 315-320, set-out, 2006.

NAKAJIMA, A. et al. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. **Gastroenterology.** v. 120, n. 2, p. 460–469, fev, 2001.

NASER, S. A.; ROMERO, C.; URBINA, P.; NASER, N.; VALENTINE, J. Cellular infiltration and cytokine expression correlate with fistulizing state in Crohn's disease. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 18, n. 9, p. 1416–1419, jul, 2011.

OLAMILOSOYE, K. P. et al. The aqueous extract of *Ocimum gratissimum* leaves ameliorates acetic acid-induced colitis via improving antioxidant status and hematological parameters in male Wistar rats. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences.** v. 5, n. 3, p. 220-227, set, 2018.

OLIVEIRA, F. M. et al. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 15, n. 1, 1031-1037, 2010.

OMORI, Y. et al. A Mouse model of sural nerve injury–induced neuropathy: gabapentin inhibits pain-related behaviors and the hyperactivity of wide-dynamic range neurons in the dorsal horn. **J. Pharmacol. Sci.** v.109, n. 4, p. 532-539, abr, 2009.

ORTIZ, M. I. et al. Possible activation of the NO–cyclic GMP–protein kinase G–K+ channels pathway by gabapentin on the formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v. 83, n. 3, p. 420 – 427, mar, 2006.

PASPARAKIS, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. **Nat. Rev. Immunol.** v. 9, n. 11, p. 778–788, nov, 2009.

PAUL, G. et al. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **European journal of clinical investigation.** v. 42, n. 1, p. 95–109, jan, 2012.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.** v. 347, n. 6, p. 417-29, ago, 2002.

PORRAS, M. et al. Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 290, n. 3, p. 423–430, mar, 2006.

PUTHOOR, P. R.; DE ZOETEN, E.F. Pediatric Ulcerative Colitis: The Therapeutic Road to Infliximab. **Biol. Ther.** v. 3, n. 1, p.1-14, jan, 2013.

RAHIMI, R. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for in-flammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.** v. 16, n. 36, p. 4504-4514, set, 2010.

RAHIMIAN, R. et al. Involvement of PPARgamma in the protective action of tropisetron in an experimental model of ulcerative colitis, Immunopharmacol. **Immunotoxicol.** v. 20, n. 6, p. 1–9, set, 2016.

REBER L. L. et al. Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. **Mucosal Immunol.** v. 8, p. 444-463, fev, 2015.

REDDY, S. T. et al. Transcriptional Regulation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Activated Mast Cells. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 275, n. 5, p. 3107–3113, fev, 2000.

REMY, S.; BECK, H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. **Brain.** v. 129, n. 1, p. 18–35, jan, 2006.

RICE, A. S.; MATON, S. Gabapentin in postherpetic neuralgia: A randomised, double blind, placebo-controlled study. **Pain.** v. 94, n. 2, p. 215–224, nov, 2001.

RIGAUD, D. et al. Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet. **Gut.** v. 32, n. 12, p. 1492-1497, dez, 1991.

RODRIGUES, M. et al. Retocolite ulcerativa inespecífica. In: Barbieri e Koda (ed.) Doenças Gastroenterológicas em Pediatria. **Rio de Janeiro: Atheneu,** v. 1, p. 283, 1996.

ROWBOTHAM, M. et al. Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia. A double blind randomized controlled trial. **JAMA**. v. 280, n. 21, p. 1837–1842, dez, 1998.

SAKON, S. et al. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. **EMBO J**. v. 22, n. 15, p. 3898–3909, ago, 2003.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol. Rev.** v. 89, n. 2, p. 707-758, abr, 2009.

SANDS, B. E. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. **J. Gastroenterol.** v. 42, n. 1, p. 16–25, jan, 2007.

SAXON, A. et al. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 86, n. 2, p. 202-210, ago, 1990.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v. 24, n. 1, p. 1992–2005, out, 1968.

SENLÖ, A. et al. Kefir treatment ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **World J Gastroenterol.** v. 21, n. 46, p. 13020-13029, dez, 2015.

SEZER, C. et al. Relationship between mast cell and inos expression in testicular tissue associated with infertility. **Archives of Andrology Journal of Reproductive Systems.** v. 52, n. 2, p. 149-158, jul, 2009.

SHI, X. et al. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 300, n. 1, p. 41–51, jan, 2011.

SHI, Y. et al. Moxibustion activates mast cell degranulation at the ST25 in rats with colitis. **World journal of gastroenterology: WJG.** v. 17, n. 32, p. 3733–8, ago, 2011.

SHIMOYAMA, N. et al. Spinal gabapentin is antinociceptive in the rat formalin test. **Neurosci. Lett.** v. 222, n. 1, p. 65–67, jan, 1997.

SHORVON, S.; STEFAN, H. Overview of safety of newer antiepileptic drugs. **Epilepsia.** v. 38, n. 1, p. 845-851, jan, 1997.

SONNENBERG, A. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. **Dis. Colon Rectum.** v. 29, n. 12, p. 854-61, dez. 1986.

SONNENBERG, A.; WASSERMAN, I.H. Epidemiology of inflammatory bowel disease among U.S. military veterans. **Gastroenterology.** v. 101, n. 1, p. 122–130, jul, 1991.

SOUZA, M. A. L. P. et al. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.** v. 39, n. 2, p. 98-105, 2002.

SPALINGER, M. R. et al. PTPN2 regulates inflammasome activation and controls onset of intestinal inflammation and colon cancer [J]. **Cell Rep.** v. 22, n. 7, p. 1835-1848, fev, 2018.

STEINBERG, K. P. et al. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 354, n. 16, p.1671–1684, abr, 2006.

STEVCEVA, L. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. **BMC Clin. Pathol.** v. 1, n. 1, p. 3, fev, 2001.

SUZUKI, H. et al. Sulfhydryl blocker-induced colitis in the rat: immunological changes in thymus gland and colonic mucosa. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 9, n. 6, p. 544–550, dez, 1994.

SZALAI, Z. et al. Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in 83 TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. **Oxidative medicine and cellular longevity.** v. 2014, p. 925-981, fev, 2014.

SZKARADKIEWICZ, A. et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**. v. 57, n. 4, p. 291–294, jul-ago, 2009.

TACHIBANA, M. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses mast cell maturation involved in allergic diseases. **NIH-PA Author Manuscript**. v. 63, n. 9, p. 1136–1147, set, 2008.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**. v. 107, n. 1, p. 7-11, jan, 2001.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** v. 138, n. 1, p. 93-99, mai, 2008.

TAYLOR, C. P. Emerging perspectives on the mechanism of action of gabapentin. **Neurology**. v. 44, n. 5-6, p. 10–6, jun, 1994.

THOMAS, B.; FARQUHAR-SMITH, P. Extended-release gabapentin in post-herpetic neuralgia. **Expert. Opinion on Pharmacotherapy**. v. 12, n. 16, p. 2565–2571, nov, 2011.

TIAN, L. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF- α in rats with ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology: WJG**. v. 9, n. 5, p. 1028–1033, mai, 2003.

TSUNADA, S. et al. Redox Imbalance in the Colonic Mucosa of Ulcerative Colitis. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 38, n. 9, p. 1002–1003, jul, 2003.

VAN DE WALLE, J. et al. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. **Toxicol. In Vitro**. v. 24, n. 5, p. 1441–1449, ago, 2010.

VITOR, C. E. et al. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, aand B-amyryn, in a mouse model of colitis, **Br. J. Pharmacol.** v. 157, n. 6, p. 1034–1044, jun, 2009.

VOLLMER, K. et al. Pharmacokinetics and metabolism of gabapentin in rat, dog and man. **Arzneimittelforschung**. v. 36, n. 5, p. 830-839, mai, 1986.

WANG, X. et al. Oroxyloside prevents dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting NF- κ B pathway through PPAR γ activation. **Biochemical Pharmacology**. v. 106, p. 70–81, abr, 2016.

WEBER, C. R.; TURNER, J. R. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? **Gut**. v. 56, n. 1, p. 6–8, jan, 2007.

WENDT, E.; KESHAV, S. CCR9 antagonism: potential in the treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. v. 8, p.119–130, abr, 2015.

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**. v. 448, n. 7152, p. 427–434, jul, 2007.

XU, X. R. et al. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**. v. 20, n. 12, p. 3255-3264, mar, 2014.

YANG, X. L. Therapeutic Effect of Ginsenoside Rd in Rats with TNBS-Induced Recurrent Ulcerative Colitis. **Archive Pharm. Res**. v. 35, n.7, 1231-1239, mar, 2012

YANG, Y. et al. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 81, p. 424–430, jul, 2016.

YE, D.; MA, I.; MA, T. Y. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**. v. 290, n. 3, p. G496–504, mar, 2006.

YE, Y. et al. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. v. 8, n. 12, p. 22529-22542, dez, 2015.

YEH, C. Y. et al. Biphasic effects of chronic intrathecal gabapentin administration on the expression of protein kinase C gamma in the spinal cord of neuropathic pain rats.

Acta anaesthesiologica Taiwanica: official journal of the Taiwan Society of Anesthesiologists. v. 49, n. 4, p. 144–148, dez, 2011.

ZENG, C. et al. Beneficial Effects of THSG on Acetic Acid-Induced Experimental Colitis: Involvement of Upregulation of PPAR- γ and Inhibition of the Nf-Kb Inflammatory Pathway. **Molecules.** v. 16, n. 10, p. 8552-8568, out, 2011.

ZHANG, Z. et al. Administration of geniposide ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via inhibition of inflammation and mucosal damage. **International Immunopharmacology.** v. 49, p. 168–177, jun, 2017.

ZINGARELLI, B. et al. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut.** v. 45, n. 2, n. 2, p. 199–209, ago, 1999.

ANEXO I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da participação da via do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ) no efeito anti-inflamatório visceral da Gabapentina na colite induzida por TNBS em ratos**", registrada nº 308/17, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA do Campus Ministro Reis Veloso-Parnaíba/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **30/06/2017**.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/2017 à Agosto/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	132
Peso/ Idade	150-200g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 30 de Junho de 2017.


Prof. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO II

Biomedicine & Pharmacotherapy 102 (2018) 278–285



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Episopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats



Lucas Rodrigues de Carvalho^a, Tarcisio Vieira de Brito^a, José Simião da C. Júnior^a, Genilson José Dias Júnior^a, Diva de Aguiar Magalhães^a, Stefany Guimarães Sousa^a, Renan Oliveira Silva^b, Felipe Rodolfo Pereira da Silva^c, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos^c, Leiz Maria Costa Vêras^d, José Roberto de Sousa de Almeida Leite^d, Dainesy Santos Martins^e, Conceição da Silva Martins^e, Jefferson Soares de Oliveira^f, André Luiz dos Reis Barbosa^{a,*}

^a LAFFEX—Laboratory of Experimental Physiopharmacology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, Parnaíba, 64202-020, PI, Brazil

^b LEFFAG—Laboratory of Physiopharmacology Study of Gastrointestinal Tract, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c LAPHIS - Laboratory of Analysis and Histological Processing, Department of Biomedicine, Federal University of Piauí, Parnaíba, 64202-020, PI, Brazil

^d Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, Campus of Parnaíba, Avenida São Sebastião, 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil

^e NEMPI - Nucleus for Studies in Microscopy and Image Processing, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^f Laboratory of Biochemistry and Microorganisms and Plant Biology, Department of Biomedicine, Federal University of Piauí, Campus Minister Reis Velloso, Parnaíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Anti-inflammatory
Episopiloturine
Crohn's disease
Myeloperoxidase

ABSTRACT

Episopiloturine (EPI) is an important imidazole alkaloid because of its pharmacological properties. The aim of this study was to investigate the effects of episopiloturine on inflammatory parameters of the colonic mucosa in a rat model of Crohn's disease (CD). For this, we induced colitis using trinitrobenzenosulfonic acid and determined myeloperoxidase (MPO), interleukin 1 β (IL-1 β), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) levels in the intestinal mucosa. The location and expression of the inflammatory markers in the colon were investigated by immunohistochemistry for NO synthase induced (iNOS), interleukin 1 beta (IL-1 β), and cyclooxygenase-2 (COX-2) and western blotting (iNOS and COX-2), respectively. Compared with TNBS alone, episopiloturine at 1 mg/kg reduced the macroscopic and microscopic scores, wet weight of the colon, and neutrophilic infiltration and expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Episopiloturine at 1 mg/kg maintained or restored GSH levels and simultaneously decreased MDA levels. Animals treated with episopiloturine exhibited reduced immunostaining for IL-1 β , iNOS, and COX-2 and reduced cell count per field. Episopiloturine reduced the expression of COX-2 and iNOS in the colon. Based on these findings, we conclude that episopiloturine at 1 mg/kg may be an important pharmacological tool against intestinal inflammatory diseases due to its inhibitory action on key enzymes and products involved in inflammation.

1. Introduction

Several species of catalogued plants are reported to have pharmacologic properties, particularly the species *Pilocarpus microphyllus stapf*, popularly known as jaborandi. It is a small, bushy plant belonging to the family Rutaceae, is widely distributed in Northern and Northeastern Brazil, and has great economic importance due to its bioactivity. This species is used as a raw material for the isolation of alkaloids with pharmacological properties, an important class of structurally diverse

compounds that possess nitrogen heterocyclic ring atoms and amino acid derivatives [1,2].

One of the main alkaloids extracted from jaborandi is episopiloturine (EPI), an imidazole derivative. This alkaloid has several proven pharmacological properties, such as activity against *Schistosoma mansoni* [3], anthelmintic, antibacterial, and cytotoxicity activity [4], protection against naproxen-induced gastrointestinal damage [5], and anti-inflammatory properties [6]. The anti-inflammatory activity of the molecule was evaluated in a model of peritonitis and paw edema

* Corresponding author.

E-mail address: andreluiz@ufpi.edu.br (A.L.d.R. Barbosa).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.03.090>

Received 28 August 2017; Received in revised form 6 March 2018; Accepted 14 March 2018
0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

ANEXO III

Successfully received: submission Gabapentin reverses inflammatory intestinal parameters: Role

10 MB

Confirmação de submissão. Paper submetido com sucesso!!

----- Forwarded message -----

De: **Pharmacological Research** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: sex, 19 de abr de 2019 às 17:12

Subject: Successfully received: submission Gabapentin reverses inflammatory intestinal parameters: Role of PPAR- γ receptor participation. for Pharmacological Research

To: <andreluiz@ufpi.edu.br>

This message was sent automatically.

Ref: YPHRS_2019_669

Title: Gabapentin reverses inflammatory intestinal parameters: Role of PPAR- γ receptor participation.

Journal: Pharmacological Research

Dear Dr. Barbosa,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Pharmacological Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=YPHRS and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Pharmacological Research

Have questions or need assistance?

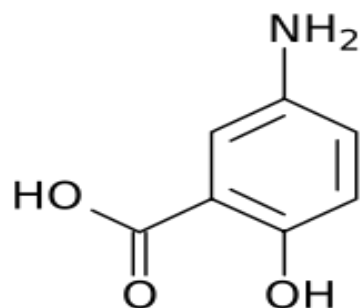
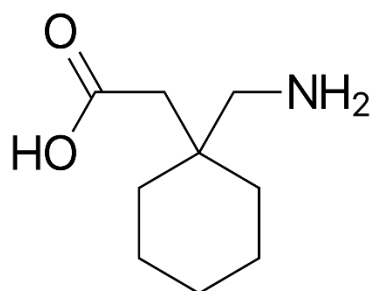
For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

--

Prof. Dr. Andre Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí - UFPI
Campus Ministro Reis Velloso - CMRV
LAFEX - Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental
Av. São Sebastião, 2819
Parnaíba - PI
CEP 64202-020.

ANEXO IV**Estruturas químicas da mesalazina****Acido 5-aminossalicílico****Estrutura química da gabapentina****Ácido 1-(aminometil) ciclohexano acético**