



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBiotec**

DIVA DE AGUIAR MAGALHÃES

**RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO RECEPTOR MUSCARÍNICO
M1 DURANTE A COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

**PARNAÍBA – PI
2017**

DIVA DE AGUIAR MAGALHÃES

**RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO RECEPTOR MUSCARÍNICO
M1 DURANTE A COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

M188r Magalhães, Diva de Aguiar.

Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite induzida por ácido acético [manuscrito] / Diva de Aguiar Magalhães. – 2017.

81 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

Área de concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia.

1. Biotecnologia. 2. Colinérgico. 3. McN-A-343. 4. Colite Ulcerativa. 5. Pirenzepina. 6. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD: 660.6

DIVA DE AGUIAR MAGALHÃES

**RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO RECEPTOR MUSCARÍNICO
M1 DURANTE A COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/ ___/ ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa – UFPI
(Presidente)

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras – UFPI
(Examinador Externo ao Programa)

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira – UFPI
(Examinador Interno ao Programa)

PARNAÍBA – PI

2017

Dedico,

Aos meus pais, irmãos e amigos,
por representarem meu porto seguro
e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por mais esta conquista e por me manter forte em todos os momentos dessa jornada de pesquisadora.

Aos meus pais Francisca e Cesário, pelo amor, apoio e incentivo durante todas as minhas escolhas e decisões.

Aos meus irmãos, Dilma e Diego, pela confiança e incentivo durante os momentos difíceis da pesquisa.

A minha amiga Stefany Guimarães, pela amizade e parceria na pesquisa e na vida, aos ensinamentos e apoio nas decisões que foram todas no andamento do meu projeto e por se tornar uma pessoa essencial na minha vida.

Ao meu amigo Jalles Arruda, pela amizade desde a época da graduação e por sua contribuição no planejamento e execução deste trabalho.

As minhas amigas Rayane, Jordana e Monikelly, por me acompanharem durante a trajetória e por entenderem por diversas vezes os momentos de ausência e estresse rsrss....

A Beatriz Melo e José Júnior, por estarem sempre dispostos a ajudar e por torcerem que tudo desse certo.

Ao meu orientador André Luiz dos Reis Barbosa, pela orientação e ensinamentos a mim dedicados durante a pesquisa, por sempre me incentivar a seguir a carreira acadêmica e ter guiado meus passos por esse caminho.

Ao Tarcísio Brito, pelo grande conhecimento a mim repassado e amizade.

A Cynthia, Victor, Ieda, Lauanda, Afonso e Jayro, nosso grupo do Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFEX) pela ajuda durante todo o percurso.

Aos colegas de turma do mestrado pelo conhecimento e momentos compartilhados.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, pela contribuição ao meu crescimento como pesquisadora.

Ao Professor Dr. Jefferson Soares de Oliveira, pela disponibilidade e orientações.

A Bruna Souza e Naylla Moraes, pelo apoio e contribuição na execução de alguns ensaios bioquímicos.

Ao Professor Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras, pelas orientações, sempre relevantes.

Ao Professor Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, David Di Leonardo e a todos do Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), pela disponibilidade de realizarem a análise histológica dos tecidos do meu trabalho.

Ao Laboratório de Fisiologia Gastrointestinal (LEFFAG), sob a coordenação do Prof. Dr. Pedro Soares, pela disponibilidade para realização de algumas dosagens bioquímicas.

Ao Álvaro Xavier e Carlos Eduardo Monteiro, pelo auxílio generoso nas análises realizadas no LEFFAG.

Ao CNPq e a FAPEPI pelo apoio financeiro na execução deste trabalho.

“Deus, és o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei”

RESUMO

Introdução: A colite ulcerativa é uma doença inflamatória crônica, recidivante que afeta principalmente o cólon e o reto, e se caracteriza por úlceras na mucosa intestinal. Muitos sistemas endógenos estão envolvidos na fisiologia intestinal, sendo o sistema muscarínico fundamental para esse processo. Além disso, o sistema colinérgico demonstra ação anti-inflamatória em modelos experimentais de colite. No entanto, ainda há poucos estudos sobre o efeito anti-inflamatório muscarínico.

Objetivo: Investigar a resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite experimental induzida por ácido acético. **Métodos:** Foram usados camundongos *swiss* machos (25–30 g), divididos em grupos de 6 animais. Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo de colite induzida por ácido acético a 6% utilizando tempos diferentes (6, 18 e 24h) para a avaliação o pico inflamatório deste modelo. Após a indução da colite por ácido acético os camundongos foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com McN-A-343 nas doses de 0,5; 1,0; 1,5 mg/kg ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) com 17h ou 17:30h após a indução da colite, respectivamente. Depois da escolha da concentração do McN-A-343 com melhor efeito anti-inflamatório foi realizado o ensaio para bloquear a ação do receptor muscarínico M1 utilizando a pirenzepina (10 mg/kg, i.p.). Após 18h da indução da colite os animais foram eutanasiados e uma amostra de 5 cm do cólon foi retirado para avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão, peso úmido e dosagens bioquímicas como: atividade da mieloperoxidase, interleucina 1 beta, níveis de glutathiona e malonildialdeído. **Resultados:** Os grupos de animais que receberam ácido acético a 6% intracolônico apresentaram após 18h da indução da colite um aumento significativo do número de lesões inflamatórias intestinais e da concentração de mieloperoxidase, malonildialdeído e uma redução da concentração de glutathiona no tecido intestinal em comparação com os outros tempos analisados. Além disso, foi observado que o tratamento com o McN-A-343 na concentração de 1,5 mg/kg apresentou uma redução da lesão intestinal de forma significativa, bem como uma diminuição do peso úmido, da atividade da mieloperoxidase, da concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 β e dos marcadores de estresse oxidativo *in vivo*. Por outro lado, foi visto que a coadministração de McN-A- 343 e pirenzepina reverteram de forma significativa o efeito do McN-A-343. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o acido acético foi eficaz em induzir a colite ulcerativa, e que o pico inflamatório deste modelo ocorre após de 18h da indução. Este trabalho ainda infere que o receptor muscarínico M1 está envolvido na reversão do efeito pró-inflamatório da colite induzida experimentalmente, podendo esta via representar uma alternativa terapêutica promissora para pacientes com colite ulcerativa.

Palavras-chave: Colinérgico. McN-A-343. Colite ulcerativa. Pirenzepina. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Ulcerative colitis is a chronic, recurrent inflammatory disease that mainly affects the colon and rectum, and is characterized by ulcers in the intestinal mucosa. Many endogenous systems are involved in intestinal physiology, and the muscarinic system is fundamental to this process. In addition, the cholinergic system demonstrates anti-inflammatory action in experimental models of colitis. However, there are still few studies on the muscarinic anti-inflammatory effect. **Objective:** To investigate the anti-inflammatory response mediated by the muscarinic receptor M1 during experimental colitis induced by acetic acid. **Methods:** Male swiss mice (25-30 g) were divided into groups of 6 animals. Initially, the standardization of the 6% acetic acid-induced colitis model using different times (6.18 and 24h) was used to evaluate the inflammatory peak of this model. After induction of colitis by acetic acid the mice were treated intraperitoneally (i.p.) with McN-A-343 at the doses of 0.5; 1.0; 1.5 mg/kg or dexamethasone (2 mg/kg, s.c.) at 17h or 17: 30h after induction of colitis, respectively. After the choice of McN-A-343 concentration with the best anti-inflammatory effect, the assay was performed to block the action of the M1 muscarinic receptor using pirenzepine (10 mg/kg, i.p.). After 18 h of colitis induction, the animals were euthanized and a 5 cm colon sample was taken for evaluation of macroscopic and microscopic lesion, wet weight and biochemical measurements such as: myeloperoxidase activity, interleukin 1 beta, glutathione levels and malonyldialdehyde. **Results:** The groups of animals receiving 6% intracolonic acetic acid showed a significant increase in the number of intestinal inflammatory lesions and myeloperoxidase concentration, malonildialdehyde and a reduction of glutathione concentration in intestinal tissue after 18 h of colitis induction compared with The other analyzed times. In addition, treatment with McN-A-343 at a concentration of 1.5 mg / kg showed a significant reduction in intestinal damage as well as a decrease in moist weight, myeloperoxidase activity, Proinflammatory cytokine IL-1 β and markers of oxidative stress *in vivo*. On the other hand, it was seen that co-administration of McN-A-343 and pirenzepine significantly reversed the effect of McN-A-343. **Conclusion:** The results suggest that acetic acid was effective in inducing ulcerative colitis, and that the inflammatory peak of this model occurs after 18 hours of induction. This work further infers that the M1 muscarinic receptor is involved in the reversal of the proinflammatory effect of experimentally induced colitis, which may represent a promising therapeutic alternative for patients with ulcerative colitis.

Keywords: Cholinergic. McN-A-343. Ulcerative colitis. Pirenzepine. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação da colite ulcerativa de acordo com acometimento da região anatômica.....	16
Figura 2. A ativação da via anti-inflamatória colinérgica intestinal resulta na redução de inflamação.	27
Figura 3. Estrutura química do McN-A-343.....	28
Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental de indução da colite por ácido acético.	33
Figura 5. Representação esquemática dos grupos experimentais e dos tratamentos realizados durante a colite induzida por ácido acético.	34
Figura 6. Ação do ácido acético sobre os escores macroscópicos de lesão em camundongos com e sem colite.....	40
Figura 7. Efeito do ácido acético sobre o peso úmido do cólon dos animais com e sem colite.....	41
Figura 8. Ação do ácido acético sobre a atividade de MPO no tecido intestinal.	42
Figura 9. Ação do ácido acético sobre os níveis colônicos de glutathiona em camundongos com colite e sem colite.	43
Figura 10. Efeito do ácido acético sobre níveis de MDA em tecido intestinal de camundongos.....	44
Figura 11. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os escores macroscópicos de lesão intestinal.....	47
Figura 12. Fotografia do tecido colônico representando a modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os danos inflamatórios macroscópicos na colite experimental induzida por ácido acético.....	48
Figura 13. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a atividade da MPO no cólon dos camundongos com colite.	51
Figura 14. Microfotografia (10x, escala 50 μ m) representando da modulação farmacológica do receptor M1 sobre os danos microscópicos da lesão intestinal na colite experimental induzida por ácido acético.	53
Figura 15. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração da citocina IL-1 β no cólon de animais com colite.....	56
Figura 16. Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 no modelo experimental de colite por ácido acético.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.....	35
Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.....	36
Tabela 3. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os critérios microscópicos de lesão intestinal no modelo de colite experimental.....	54
Tabela 4. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração de GSH e MDA no cólon de animais com colite.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina;

ANOVA – Análise de variância estatística;

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal;

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CU – Colite Ulcerativa.

DC – Doença de Crohn;

DEXA – Dexametasona;

DIIs – Doenças Inflamatórias Intestinais;

DNBS – Ácido Dinitrobenzeno Sulfônico

DSS – Dextrano Sulfato de Sódio

DTNB – Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico);

EDTA – Ácido Etilenomino-tetracético;

ELISA – Ensaio Imunoenzimático;

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutathiona;

HTAB – Tampão de Hexadeciltrimetilamônio;

IL-10 – Interleucina 10;

IL-12 – Interleucina 12;

IL-13 – Interleucina 13;

IL-17 – Interleucina 17;

IL-1 β – Interleucina 1 Beta;

IL-4 – Interleucina 4;

IL-5 – Interleucina 5;

IL-6 – Interleucina 6;

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzível;

MCN- A- 343 – M-clorofenil-carbamoiloxi-2-butiniltrimetilamônio cloreto

MDA – Ácido Malonildialdeido;

MPO – Mieloperoxidase;

NACHR $\alpha 7$ - Receptor Nicotínico de Acetilcolina $\alpha 7$;

NADPH – Nicotinamida dinucleotídio fosfato;

NF-KB – Fator de ativação nuclear K;

NK – Célula Natural Killer;

PBS – Tampão Fosfato de Sódio;

PIR– Pirenzepina

RM1– Receptor Muscarínico M1;

RM2 – Receptor Muscarínico M2;

RM3 – Receptor Muscarínico M3;

TCA – Ácido Tricloroacético;

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta;

Th17 – Células T helper 17;

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alpha;

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1. Colite Ulcerativa.....	16
2.1.1 Epidemiologia da Colite Ulcerativa.....	18
2.1.2 Fisiopatologia da Colite Ulcerativa.....	19
2.1.3 Terapêutica da Colite Ulcerativa.....	21
2.1.4 Modelo experimental de Colite Ulcerativa.....	23
2.2. Farmacologia do Sistema colinérgico.....	24
2.2.1 Sistema colinérgico e o trato gastrointestinal.....	26
2.2.2 Atividade farmacológica do agonista muscarínico: McN-A-343.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Drogas e Reagentes.....	31
4.2. Animais.....	31
4.3. Considerações Éticas.....	31
4.4. Padronização do modelo de colite por ácido acético.....	32
4.5. Avaliação da resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 no curso da colite induzida por ácido acético.....	33

4.5.1 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão.....	34
4.5.2 Mensuração do peso úmido do cólon dos animais.....	35
4.5.3 Avaliação dos escores microscópicos de lesão.....	35
4.5.4 Ensaio de Mieloperoxidase.....	36
4.5.5 Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal.....	37
4.5.6 Determinação de malonilaldeído (MDA) na mucosa intestinal.....	37
4.5.7 Mensuração de IL-1 β intestinal.....	38
4.6. Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Padronização do modelo de colite por ácido acético.....	40
5.1.1 Ação do ácido acético sobre os escores macroscópicos de lesão.....	40
5.1.2 Efeito do ácido acético sobre o peso úmido do cólon dos animais com e sem colite.....	41
5.1.3 Ação do ácido acético sobre a atividade da mieloperoxidase no cólon de camundongos.....	42
5.1.4 Ação do ácido acético sobre a concentração colônica de glutathiona.....	43
5.1.5 Efeito do ácido acético sobre os níveis de malonildialdeído no tecido intestinal.....	44
5.2. Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite experimental induzida por ácido acético.....	45
5.2.1 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os escores macroscópicos de lesão na colite induzida por ácido acético.....	45

5.2.2 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre o peso úmido do cólon de animais com colite.....	48
5.2.3 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a atividade de mieloperoxidase em animais com colite.....	50
5.2.4 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os critérios microscópicos de lesão durante a colite induzida por ácido acético.....	51
5.2.5 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração de GSH e MDA na mucosa intestinal de animais com colite induzida por ácido acético.....	54
5.2.6 Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração da citocina IL-1 β no cólon de animais com colite induzida por ácido acético.....	56
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO I.....	81

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são um grupo de doenças do trato gastrointestinal representadas principalmente pela doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU). A colite ulcerativa é uma doença crônica que acomete o cólon e reto, caracterizada por ulcerações da mucosa e submucosa do cólon sem afetar as camadas mais profundas da parede intestinal. Essa doença apresenta sintomas de dor abdominal, diarreias, febre, tenesmo, fadiga, perda de peso e anemia (CONRAD et al., 2014; HINDRYCKX et al., 2016).

De acordo com os dados epidemiológicos há uma maior prevalência da colite ulcerativa na Europa (505 por 100.000 pessoas) e América do Norte (249 por 100.000 pessoas). A incidência mundial continua a aumentar, principalmente nos países em desenvolvimento (MOLODECKY, 2012; CONRAD et al., 2014). No Brasil, há escassez de estudos epidemiológicos disponíveis sobre a incidência e prevalência da colite ulcerativa, contribuindo para o atraso no diagnóstico e aumento da morbidade.

A etiologia da colite permanece desconhecida, mas evidências mostram que esta doença pode resultar de uma resposta imune desregulada (CETINKAYA et al., 2005; HILL & ARTIS, 2010), sendo caracterizada pelo aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, elevado infiltrado inflamatório com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mucosa do cólon (REIFEN et al., 2004; DAMIANI et al., 2007; ROBERTS-THOMSON et al., 2011).

Na perspectiva da elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia e no tratamento da CU foram criados os modelos experimentais que fizessem uma alusão à fisiopatologia da doença. O modelo experimental de indução da colite pela administração intracolônica de ácido acético é um método simples, reproduzível, de baixo custo e apresenta similaridades com a colite ulcerativa em humanos. Por ser um modelo de características agudas é possível investigar os componentes envolvidos na inflamação, bem como avaliar a eficácia de novas drogas (VARSHOSAZ et al., 2010; GUAZELLI et al., 2013).

Atualmente, as terapias convencionais utilizadas na colite ulcerativa apresentam como objetivo o controle da inflamação, alívio da dor abdominal e manter a remissão da doença. Geralmente os medicamentos usados são os

aminosalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e modificadores da resposta biológica (YADAV & LIU, 2009; BURGER & TRAVIS, 2011; MEIER & STURM, 2011). No entanto, estas terapias estão associadas com uma variedade de efeitos colaterais que incluem dor abdominal, náuseas, vômitos, perda de apetite, dentre outros (SOBCZAK et al., 2014).

Endogenamente, vários sistemas estão envolvidos na homeostase intestinal, dentre esses sistemas, podemos citar o sistema muscarínico. Esse sistema é formado pelos receptores muscarínicos que consistem em cinco subtipos distintos de receptores acoplados à proteína G, denominado de M1 a M5 (KHAN et al., 2013; KONDO et al., 2011). Os receptores muscarínicos são fundamentais para regulação do sistema nervoso central e periférico, fisiologia intestinal, controle da frequência cardíaca e contração do músculo liso (WANG et al., 2004; TIWARI et al., 2013).

Os diferentes tipos de receptores colinérgicos estão distribuídos no sistema nervoso central e periférico, estes apresentam distintas localizações sinápticas e exibem variadas funções na transmissão colinérgica (HABERBERGER et al., 2006; JONGE et al., 2007). Os receptores muscarínicos são os principais reguladores das funções epiteliais do intestino. No trato gastrointestinal, o subtipo M1 localiza-se em neurônios entéricos e pode modificar funções intestinais e a liberação de neurotransmissores (HABERBERGER et al., 2006; KHAN et al., 2013).

Estudos sugerem que os receptores muscarínicos estão presentes em células epiteliais do cólon de rato e consistem em dois subtipos, receptor muscarínico M1 (RM1) 80% e receptor muscarínico M3 (RM3) 20%, no qual o principal subtipo de receptor é o M1, que realiza a regulação da secreção epitelial do intestino e está relacionada à inflamação, sendo, assim, relevante para estudos de doenças inflamatórias do intestino (KHAN et al., 2013).

A ação anti-inflamatória colinérgica tem sido demonstrada em estudos experimentais de colite usando agonistas seletivos de receptores nicotínicos (DE JONGE & ULLOA, 2007), agonistas de receptores muscarínicos (JI et al., 2014; MUNYAKA et al., 2014) e através da vagotomia (GHIA & COLLINS, 2006). No entanto, ainda são escassos os estudos demonstrando o papel anti-inflamatório muscarínico com a participação do receptor M1 em modelos experimentais de colite. Dessa forma, devido à colite ulcerativa causar redução na qualidade de vida de muitos pacientes e altos custos médicos, é importante o estudo de vias bioquímicas

que influenciam esta doença e dessa forma facilitar a busca por novas estratégias terapêuticas eficazes.

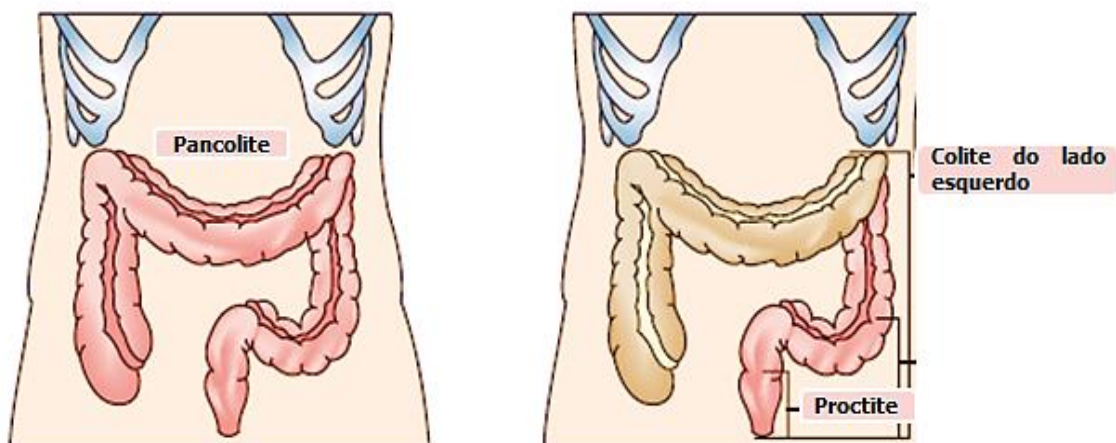
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Colite Ulcerativa

A Doença de Crohn e a colite ulcerativa representam os dois principais tipos de doença inflamatória intestinal. A colite ulcerativa foi nomeada pela primeira vez em 1859 por Samuel Wilks (CARVALHO; COTTER, 2017). Esta é uma doença crônica, recidivante, remittente que se caracteriza por úlceras na mucosa intestinal, sangramento retal, diarreia e dor abdominal (BAUMGART & SANDBORN, 2007; HINDRYCKX et al., 2016).

A colite ulcerativa consiste na inflamação que envolve a mucosa e submucosa do cólon e reto de modo contínuo, podendo ser limitada ao reto ou ao retossigmóide, geralmente afeta a camada superficial do epitélio formando úlceras. Ainda se caracteriza pela presença de abscessos nas criptas intestinais e infiltrado de células inflamatórias (ISKANDAR & CIORBA, 2012). Dependendo da extensão anatômica da colite ulcerosa os pacientes podem ser classificados como tendo proctite (limita-se ao reto) em 11%, colite do lado esquerdo ou colite distal (afeta o reto e o lado esquerdo do cólon) 27% e pancolite ou colite extensa (atinge todo o cólon) em 62% dos pacientes (BAUMGART & SANDBORN, 2007; SOBCZAK et al., 2014) (figura 1).

Figura 1. Classificação da colite ulcerativa de acordo com acometimento da região anatômica.



Fonte: Adaptado de Baumgart & Sandborn (2007).

A colite ulcerosa é caracterizada por formas clínicas graves, períodos de recidiva e remissões em aproximadamente 50-80% dos pacientes. Além disso, há intensa correlação da gravidade com a extensão da doença (ISKANDAR & CIORBA, 2012). As manifestações extras intestinais comuns e clinicamente importantes em pacientes com CU são as artropatias inflamatórias e a colangite esclerosante primária que atingem aproximadamente 11% e 75% dos pacientes, respectivamente (VELOSO, 2011).

Os pacientes com retocolite necessitam frequentemente de tratamento contínuo ou intermitente em todo o curso da doença e 40% dos pacientes requerem intervenção cirúrgica (COHEN et al., 2010) e aproximadamente 20% têm pelo menos uma exacerbação aguda grave da doença durante a sua vida, geralmente requerendo hospitalização (HINDRYCKX et al., 2016).

De acordo com alguns estudos os indivíduos com colite ulcerativa são propensos a ter câncer (EADEN et al., 2001; KISIEL et al., 2016) variando de 0,2 a 34%, dependendo do tempo de diagnóstico, extensão e duração da doença. A incidência de câncer colorretal em pacientes com colite ulcerativa é de 1,6% após 10 anos, 8,3% após 20 anos e 18,4% após 30 anos de duração da doença (HONG et al., 2010; MEYER et al., 2016). Dessa maneira, a prevenção da recidiva e o tratamento eficaz se fazem necessário, como uma forma de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

Os custos diretos e indiretos do tratamento da colite ulcerativa são altos e a qualidade de vida dos pacientes é reduzida, especialmente durante a exacerbação da doença (CHOI et al., 2017). Nos Estados Unidos e países Ocidentais a colite ulcerativa representa uma doença onerosa combinada com a perda de produtividade. Os sistemas de cuidados de saúde nos Estados Unidos gastam 3,4 a 8,6 bilhões dólares com a CU e 5,4 a 12,6 milhões de euros na União Europeia, sendo o custo financeiro com a hospitalização a principal despesa direta da saúde (COHEN et al., 2010). Não há na literatura científica o custo financeiro no Brasil com o tratamento dos pacientes com colite ulcerativa.

2.1.1 Epidemiologia da Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa é uma doença global com incidência e prevalência crescente e com frequências diferentes dependendo da idade e da localização geográfica. As taxas de prevalência para colite ulcerativa é de 90 e 505 por 100.000 pessoas no Norte da Europa e América do Norte, respectivamente (EKBOM, 2003; MOLODECKY et al., 2012). A incidência de CU entre os caucasianos é de 24,3 por 100.000 pessoas na Europa e 19,2 por 100.000 pessoas na América do Norte. Sendo essa doença menos comum na Europa Oriental e Meridional, 10 vezes menos comum em populações asiáticas, africanas e orientais (LOGAN & BOWLUS, 2010; MOLODECKY et al., 2012).

A incidência de colite ulcerativa no Brasil de acordo com o estudo realizado na região centro-oeste de São Paulo durante os anos de 2001 a 2005 foi de 4,48 por 100.000 pessoas e a prevalência foi de 14,81 casos para CU por 100.000 habitantes (VICTORIA, 2009). De acordo com o estudo de Oliveira et al., (2010), durante o período de 1998 a 2005, foram registradas 363 internações hospitalares, em função das doenças intestinais inflamatórias, distribuídas em 184 e 179 casos nos gêneros masculino e feminino, respectivamente, na macrorregião leste do Estado de Minas Gerais. No Brasil, há escassez de estudos epidemiológicos disponíveis sobre a incidência e prevalência da colite ulcerativa por não ser considerada uma doença de notificação compulsória, podendo por esse motivo está sendo subdiagnosticada, contribuindo assim para o atraso no diagnóstico e aumento da morbidade (SOUZA et al., 2008).

A colite ulcerativa apresenta baixa taxa de mortalidade, alta morbidade e complicações clínicas que podem comprometer o desempenho social e pessoal dos pacientes acometidos. Dessa forma, são necessários os estudos epidemiológicos. Recentes estudos têm mostrado que o grupo etário de lactentes a idosos podem ser afetados pela colite ulcerativa. Geralmente o início ocorre entre 15 e 30 anos e de 20% a 30% dos pacientes apresentam os primeiros sintomas com menos de 18 anos (HANAUER, 2006; FUMER et al., 2016).

2.1.2. Fisiopatologia da Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa é considerada um distúrbio imunológico que se desenvolve em indivíduos com susceptibilidade genética por meio de respostas imunes contra antígenos intraluminais (ROUND; MAZMANIAN, 2009). Essa doença apresenta fisiopatologia ainda desconhecida, mas muitos fatores podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da sua patogênese, tais como a genética, fatores ambientais (dieta e tabagismo), resposta imunológica e microbiana (SOBCZAK et al., 20014; VASOVIC, et al., 2016).

O histórico familiar positivo é um fator genético importante para o desenvolvimento da colite ulcerosa, na qual foi demonstrado que gêmeos monozigóticos possuem maior taxa de incidência de CU que gêmeos dizigóticos (GAYA et al., 2006).

O estilo de vida moderno tem sido implicado no aumento da incidência de colite ulcerativa (BERNSTEIN; SHANAHAN, 2008). Muitos comportamentos emergiram como modificadores da imunidade sistêmica e intestinal, como as alterações da microbiota, antibióticos, dieta, tabagismo e vitamina D, sendo que o risco de CU aumenta acentuadamente em crianças repetidamente expostas a antibióticos no início vida (HVIID et al., 2011) e nos eventos provavelmente secundários a alterações na microbiota intestinal. As dietas alimentares similares ao Ocidente também modificam a composição e a função da microbiota, bem como o tabagismo (SOUZA; FIOCCHI, 2016).

O tabagismo é considerado um dos exemplos da influência dos fatores ambientais no desenvolvimento e progressão das DIIs. Porém, o tabagismo desempenha um duplo papel nas DIIs por causar o aumento do risco de Doença de Crohn (HIGUCHI et al., 2012) e por outro lado, a nicotina pode aliviar os sintomas da CU por inibir a produção das células T-helper 2 (Th2), que predominam na patogênese dessa doença (SARTOR, 2006; HIGUCHI et al., 2012). A cessação do tabagismo tem uma influência negativa no curso da doença. No entanto, devido ao aumento do risco de morte associado ao tabagismo, este não representa uma alternativa de tratamento.

Outro fator ambiental importante para a fisiopatogenia da colite ulcerativa de acordo com algumas publicações é a dieta pobre em proteínas, frutas, legumes e rica em açúcar e gordura animal (JANTCHOU et al., 2010; DEVKOTA, et al., 2012).

Há uma correlação positiva entre o desenvolvimento de CU e consumo de sacarose, refrigerante, chocolate e goma de mascar e a diminuição do risco após o consumo de frutas cítricas, legumes, peixe, omega-3 e omega-6 (BOEING et al., 2012). Portanto, é extremamente importante na prática clínica atentar para a dieta alimentar desses pacientes.

Recentemente, estudos demonstraram que a resposta imunológica na CU é mediada principalmente pela ativação excessiva das células Th2, células natural killer (NK) e pelo aumento da produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (GÁLVEZ, 2014). Além disso, estudos com modelos de colite em animais sugerem um importante papel de células Th 17 na inflamação intestinal (BAMIAS & COMINELLI, 2007; FOUSSER et al., 2008). Evidências sugerem ainda que a colite ulcerativa é caracterizada pelo aumento na liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e espécies reativas de oxigênio produzidas a partir de neutrófilos e macrófagos ativados, que, por sua vez, conduzem a inflamação crônica, ulcerações e lesões na mucosa colônica pela infiltração de leucócitos (ROESSNER et al, 2008; SADAR et al., 2016; VILLEGAS et al., 2003). O excesso de EROs causa danos oxidativos aos componentes celulares levando a progressão da inflamação e exacerbação do processo patológico da colite ulcerativa (ZHU & LI, 2012).

Durante o processo inflamatório há um desequilíbrio na regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias contribuindo para a disfunção da função da barreira epitelial intestinal (SHANAHAN, 2000; VAN HEEL et al., 2002). Na colite ulcerativa a citocina pró-inflamatória IL-1 β apresenta sua concentração aumentada (BAMIAS et al., 2011). Essa citocina contribui para a migração celular e destruição da mucosa durante a inflamação intestinal (RADDATZ et al., 2001). A inflamação intestinal também é influenciada pela diminuição de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- β , colaborando para a progressão do processo inflamatório (HANAUER, 2006; SHANAHAN, 2000; PAUL et al., 2012). De acordo com os dados na literatura, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e uma deficiência na produção da citocina IL-10 são indicações de inflamação intestinal (LI & HE, 2004).

2.1.3. Terapêutica da Colite Ulcerativa

As opções atuais de tratamento clínico disponível para a colite ulcerativa baseiam-se principalmente no controle da inflamação, alívio da dor abdominal, em manter a remissão da doença e fornecer uma melhor qualidade de vida para os pacientes. No entanto, a falta de uma terapia eficaz e com menos efeitos colaterais, representa um importante problema de saúde pública, uma vez que a doença gera um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos (BURGER & TRAVIS, 2011; YADAV & LIU, 2009).

O tratamento pode ser convencional pela farmacoterapia, e incluem os aminosalicilatos, a sulfasalazina e mesalamina em formulações orais e retais; Corticosteróides (Prednisolona ou hidrocortisona e corticosteróide tópico como a budesonida), tiopurinas (azatioprina e 6-mercaptopurina), e os medicamentos anti-TNF- α (infliximab e adalimumab) (CARVALHO; COTTER, 2017).

Os principais agentes terapêuticos utilizados na retocolite ulcerativa de média a moderada são os aminossalicilatos, ácido 5-aminossalicílico (mesalazina) e seu derivado, a sulfassalazina, que exibe potencial analgésico e anti-inflamatório (TRAVIS et al., 2008). O mecanismo de ação da sulfassalazina atua por reduzir a produção de interleucinas, a migração de leucócitos polimorfonucleares, a lipoxigenase das células e da produção dos leucotrienos pró-inflamatórios (LTB₄ e 5-HETE) pelos macrófagos da parede intestinal e de prostaglandinas (PODOLSKI, 2002). Porém, podem causar alguns efeitos colaterais (dor abdominal, náuseas, vômitos) e reações alérgicas em mais de um terço dos indivíduos que recebem dose de manutenção do fármaco e em metade dos que recebem doses terapêuticas (GISBERT, 2002; YADAV & LIU, 2009).

Uma alternativa de tratamento para pacientes com CU que não respondem à terapia com os aminosalicilatos são os corticosteroides, sendo a prednisolona o medicamento mais utilizado. Os corticosteroides inibem o desenvolvimento da fase precoce do processo inflamatório por reduzirem a cascata de citocinas inflamatórias e pela inibição da migração de leucócitos (GIRLICH et al., 2012). No entanto, quase 25% dos pacientes que utilizam o fármacos esteroides torna-se dependente após 1 ano de uso (FAUBION, et al., 2001). A utilização prolongada ou com altas doses desse fármaco estão relacionados a efeitos adversos que limitam seu uso, que

incluem: complicações cutâneas, oculares, endócrinas, músculo-esqueléticas, gastrointestinais e infecciosas (ARDIZZONE & PORRO, 2002; PEARSON, 2004).

Os medicamentos imunossupressores também podem ser utilizados na terapia dos pacientes com CU, como a azatioprina e seu metabolito ativo 6-mercaptopurina, que são antimetabólitos estruturais das purinas, essenciais para a formação de ácidos nucléicos. A azatioprina e 6-mercaptopurina inibem a síntese de DNA, causando à inibição da proliferação das células que participam da resposta imune como os linfócitos T e B (PAOLUZI et al., 2002; MALTZMAN et al., 2003; AL HADITHY et al., 2005). Porém, a utilização desses medicamentos causam muitos efeitos adversos ao organismo, como supressão da medula óssea, aumento progressivo dos níveis das enzimas hepáticas e pancreatite, e muitas vezes, é necessário o cancelamento imediato do tratamento (MEIER & STURM, 2011).

Outra opção terapêutica é a terapia biológica, reservado para indivíduos com CU moderada ou severa ou para pacientes não tolerantes ou não responsivos ao tratamento com tiopurinas (BURGER & TRAVIS, 2011), sendo bastante utilizado o Infliximabe, um anticorpo monoclonal que neutraliza a citocina TNF- α produzida pelo sistema imunológico. No entanto, a utilização desse medicamento apresenta efeitos indesejáveis que incluem náuseas, cefaleia, febre, dor abdominal e pode aumentar o risco de infecções graves (CASSINOTTI; TRAVIS, 2009; GENERINI et al., 2004; SOBCZAK et al., 20014). Foi relatada uma significativa melhora dos sintomas apresentado pelos pacientes com DIIs em aproximadamente dois terços dos indivíduos após uma única dose intravenosa de infliximab, e um terço dos pacientes obtiverem remissão completa da doença (CASSINOTTI; TRAVIS, 2009).

As indicações de cirurgias na colite ulcerativa incluem sangramento não controlado, displasia ou malignidade, megacólon tóxico ou nos casos em que os pacientes com CU grave não respondem ao tratamento medicamentoso, ou a medicação contínua não pode ser utilizada por causar efeitos colaterais (CHOI et al., 2017).

A adesão à terapia medicamentosa é um desafio importante no tratamento de doenças crônicas, como a colite ulcerativa, devido essa doença necessitar de um manejo em longo prazo para induzir e manter a remissão clínica da doença. O curso da colite ulcerativa se caracteriza por alternância de períodos de quiescência e recaídas sintomáticas, que geralmente requerem hospitalização dos pacientes (KORNBLUTH; SACHAR, 2010; CHOI et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que sucesso de uma terapia depende adesão do paciente à terapia, bem como sua capacidade de seguir as instruções dadas durante o curso do tratamento. Além disso, a falta de adesão ao tratamento pode determinar a necessidade de exames, aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos (YANG et al., 2001).

Uma vez que nenhuma terapia para colite ulcerativa se mostra totalmente eficaz, e que os efeitos colaterais associados a sua utilização são significativos e comprometem a adesão e progressão ao tratamento, se faz necessário o estudo e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para esta doença, a fim de aumentar a eficácia do tratamento, diminuir os efeitos adversos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

2.1.4. Modelo experimental de Colite Ulcerativa

Diversos mecanismos têm sido implicados como causadores da colite ulcerativa, sem ainda haver consenso em relação à patogênese e a melhor forma tratamento. Nesse contexto, surgiram os modelos experimentais em animais que contribuem para a elucidação dos possíveis mecanismos de instalação da doença e para a avaliação da ação de novos fármacos. Os modelos em animais frequentemente utilizados são induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas que causam as alterações histológicas similares à colite ulcerativa em humanos (GUAZELLI et al., 2013).

A injúria colônica induzida por enema de ácido acético em animais de pequeno porte é um método simples e reproduzível, inclusive apresenta similaridades com a CU em humanos por apresentar inflamação aguda e difusa da mucosa, ulcerações superficiais e redução das células caliciformes (RANI et al., 2011). Caracteriza-se pela migração e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α (AMIRSHAHROKHI et al., 2011; LUO et al., 2010) e elevada produção de EROs (TAHAN et al., 2011).

A administração de solução de ácido acético por via retal causa um edema de submucosa, infiltrado inflamatório, úlceras no cólon, destruição das criptas e depleção das células caliciformes (TÜZÜN et al., 2002; VARSHOSAZ et al., 2010). Por ser um modelo de características agudas pode se investigar os componentes envolvidos na inflamação e assim, contribuir para a proposição de alternativas

terapêuticas promissoras na CU, em especial no que remete ao componente inflamatório desta doença.

2.2. Farmacologia do Sistema colinérgico

O sistema colinérgico desempenha um papel fundamental em muitas funções fisiológicas do organismo, como na regulação da homeostase intestinal, frequência cardíaca, contração do músculo liso e muitas outras funções do sistema nervoso central e periférico (TIWARI et al., 2013; WANG et al., 2004).

A via colinérgica medeia à propagação do impulso nervoso em sinapses no sistema nervoso central, sistema nervoso periférico e na junção neuromuscular através da ação da acetilcolina (ACh) (GALLOWITSCH-PUERTA et al., 2007; TRACEY, 2007). A acetilcolina é um neurotransmissor comum no sistema nervoso entérico e induz contrações do trato gastrointestinal, sendo liberada a partir de neurônios motores entéricos excitatórios que medeiam à contração do músculo liso e o peristaltismo (KHAN et al., 2013).

A ACh é sintetizada no interior de terminações nervosas pela enzima acetiltransferase que realiza a junção de colina com a acetil-coenzima A. Após a sua síntese, esta é armazenado nas vesículas sinápticas até ser libertada, podendo se ligar a receptores específicos expressos na membrana plasmática da célula pós-sináptica como os receptores nicotínicos ou muscarínicos, ou ainda pode ser degradada em metabolitos inativos como a colina e o acetato pela acetilcolinesterase (CAMERON et al., 2007; WESSLER et al., 2003; FORSGREN et al., 2009).

Os receptores nicotínicos e muscarínicos mediam os efeitos fisiológicos da ACh. Os receptores muscarínicos são cinco subtipos designados de M1, M2, M3, M4 e M5 que pertencem a uma família de receptores acoplados a proteína G. Os receptores M1, M3 e M5 são considerados do tipo excitatório e atuam preferencialmente por ativar a via fosfatos de inositol pelo acoplamento seletivo a proteína Gq/11. Enquanto, que os receptores M2 e M4 são do tipo inibitório e agem por acoplamento a proteína Gi inibindo a adenilato ciclase (EGLIN, 2006; KHAN et al., 2013).

No trato gastrointestinal, o subtipo M1 localiza-se em neurônios entéricos e modifica funções intestinais pelo controle da liberação de neurotransmissores

(KHAN et al., 2013). Esse receptor ainda modula os efeitos excitatórios muscarínicos da acetilcolina em gânglios simpáticos. Além disso, recentemente, descobriu que a secreção de citocinas pelos linfócitos e outras células inflamatórias são reguladas pelos receptores M1 e M3 (WESSLER & KIRKPATRICK, 2008). Dos cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, RM1, RM2 e RM3, mostram significativamente influência na atividade intestinal, particularmente na motilidade e secreção (COOKE, 2000; EGLIN, 2001).

De acordo com o estudo de Harrington et al., (2010), o receptor muscarínico M1 está presente no citoplasma de neurônios mioentéricos, na camada submucosa do intestino, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e nas fibras nervosas no músculo circular. Portanto, o RM1 está distribuído em importantes tipos de células, na mucosa e tecido vascular, ilustrando o seu potencial em múltiplos locais de transmissão colinérgica no cólon humano.

Estudos mostram a existência de um sistema colinérgico não neuronal em várias partes do corpo pela expressão de ACh em células não neuronais como células epiteliais, endoteliais e mesoteliais e em diversos tipos de leucócitos (KIRKPATRICK et al., 2003). Além disso, os receptores muscarínicos e nicotínicos são expressos em muitas células imunes como linfócitos e macrófagos. Por exemplo, o receptor nicotínicos $\alpha 7$ é encontrado em vários tipos de macrófagos e linfócitos, bem como em células epiteliais do intestino (GALLOWITSCH-PUERTA & PAVLOV, 2007; WESSLER & KIRKPATRICK, 2008). No cólon de pacientes com CU, foram identificadas células como sendo responsáveis pela síntese de ACh, tais como as células inflamatórias da lâmina própria, das paredes dos vasos sanguíneos e da camada epitelial (FORSGREN et al., 2009).

Em sistemas colinérgicos não neuronais, a ACh produzida localmente pode assumir funções importantes em vários processos celulares, como na proliferação, diferenciação, secreção, locomoção, angiogênese, cicatrização de feridas e funções imunomoduladoras (WESSLER et al., 2003; ÖZYUR et al., 2014), além de regular as funções epiteliais do intestino (CAMERON et al., 2007). Curiosamente, a estimulação colinérgica pode modular ações anti-inflamatórias.

A resposta inflamatória envolve mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no combate da injúria intestinal. Neste contexto, estudos recentes mostraram que o sistema colinérgico foi implicado em uma ação anti-inflamatória

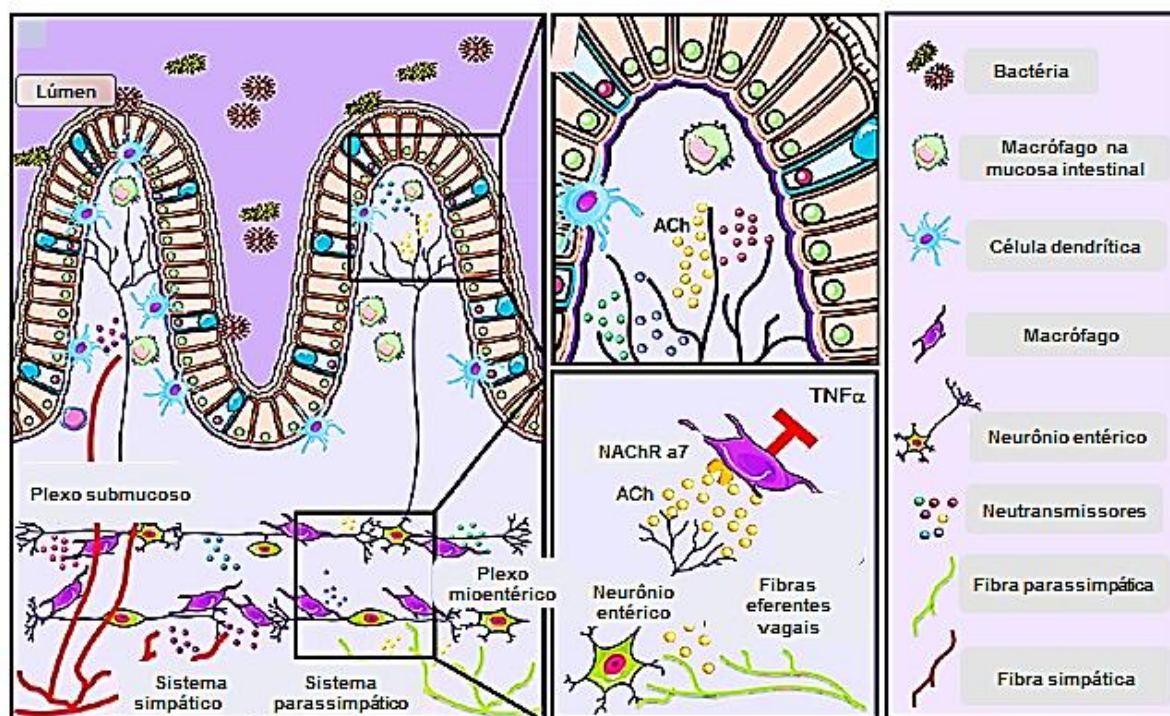
atuando no controle da síntese de citocinas pró-inflamatórias regulada pelo sistema nervoso autônomo (GALLOWITSCH-PUERTA & PAVLOV, 2007).

O efeito anti-inflamatório da via colinérgica é mediada pelas fibras eferentes do nervo vago, que inervam muitos órgãos associados com o sistema imunológico, incluindo coração, fígado e sistema gastrointestinal (SUN et al., 2013). A acetilcolina é libertada nos eferentes vagais e modula as respostas inflamatórias inibindo a sinalização da via NF-kB e conseqüentemente, a síntese e liberação das citocinas, como TNF- α e IL-1 β (BOROVIKOVA et al., 2000; DHAWAN et al., 2015; ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009) pelos receptores nicotínico $\alpha 7$ (nAChRa7) expressos em células imunes, como monócitos (TRACEY, 2007; YOSHIKAWA et al., 2006). É interessante que os efeitos anti-inflamatórios do sistema colinérgico ocorram por via neuronal, mas também por via não neuronal.

2.2.1. Sistema colinérgico e o trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal tem extensa inervação proporcionada pelo sistema nervoso entérico e por fibras extrínsecas do sistema nervoso simpático e parassimpático (GOVERSE et al., 2016; BROWNING et al., 2017). As fibras eferentes simpáticas estão em contato direto com a mucosa e com as células imunes intestinais, tais como macrófagos, células dendríticas que são afetadas pela liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina. A acetilcolina é produzida por fibras neuronais localizadas no compartimento submucoso e mucoso do intestino. As fibras eferentes parassimpáticas inervam a parede intestinal através dos neurônios entéricos localizados na região do plexo mioentérico (GOVERSE et al., 2016). Várias publicações inferem sobre a ativação da via anti-inflamatória colinérgica intestinal, na qual, os neurônios entéricos colinérgicos secretam ACh que se ligam aos receptores nicotínicos alfa-7 (NAChR $\alpha 7$) expressos em macrófagos, promovendo a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (WANG et al., 2003; ROSAS-BALLINA et al., 2011) (Figura 2) .

Figura 2. A ativação da via anti-inflamatória colinérgica intestinal resulta na redução de inflamação.



As fibras eferentes vagais são capazes de promover a liberação de acetilcolina a partir de neurônios entéricos colinérgicos, e assim, ativar a células imunes da parede do intestino, modulando o sistema imune local com objetivo de estabelecer homeostase intestinal. Fonte: Adaptado de Goverse et al., (2016).

Recentemente, diversos estudos mostram a eficácia da via anti-inflamatória colinérgica no controle da inflamação intestinal em modelos experimentais de colite (GHIA & COLLINS, 2006; JI et al., 2013; SUN et al., 2013). Porém, há poucos estudos mostrando a ação anti-inflamatória envolvendo o receptor muscarínico M1, podendo esta via representar uma nova estratégia terapêutica para pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

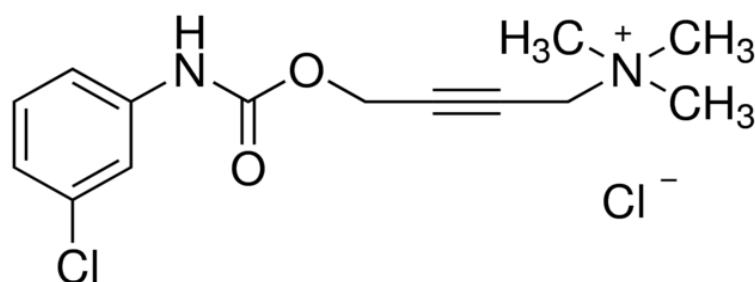
2.2.2. Atividade farmacológica do agonista muscarínico: McN-A-343

O mecanismo de ação dos receptores muscarínicos tem sido muito estudado utilizando agonistas muscarínicos seletivos e antagonistas com especificidade ao subtipo de receptor muscarínico envolvido em estudos *in vitro* e *in vivo*, proporcionando a pesquisa uma promissora ferramenta para descoberta de novas

terapias (FELDER, et al., 2000; FRANCOTTE, et al., 2004; WESS, 2007). O bloqueio dos receptores muscarínicos é realizado pela utilização de antagonistas dos receptores muscarínicos (DE SCHRYVER & SAMSOM, 2000).

Um dos agonistas muscarínicos muito utilizado na pesquisa científica se refere ao McN-A-343 (4-m-clorofenil-carbamoiloxi-2-butiniltrimetilamônio cloreto) (Figura 3), descrito pela primeira vez por Roszowski (1961). O McN-A-343 é um agonista muscarínico do receptor M1 e apresenta como função estimular a transmissão colinérgica muscarínica (MITCHELSON, 2012; ROSZKOWSKI & YELNOSKY, 1967).

Figura 3. Estrutura química do McN-A-343



Fonte: Mitchelson (2012).

O McN-A-343 é um agonista parcial com afinidade com todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina, com maior seletividade e eficácia ao subtipo de receptor muscarínico M1. Por ser um agonista parcial, sua ação é dependente de fatores, tais como a densidade de receptores, eficácia de acoplamento entre a ativação do receptor e a resposta do tecido. No entanto, a eficácia elevada relativamente aos receptores M1 levou ao seu uso generalizado para distinguir as respostas mediadas através dos receptores M1 daqueles utilizando subtipos de receptores muscarínicos M2 ou M3, especialmente no sistema nervoso central (MITCHELSON, 2012). Estudos com McN-A-343 foram usados para caracterizar a presença de receptores M1 no trato gastrointestinal, em comparação com os receptores M2 e M3 (EHLERT, et al., 1999; FIGUEROA, et al., 2009).

O McN-A-343 tem sido utilizado com frequência como um agonista muscarínico em preparações nas quais existem evidências que o receptor muscarínico M1 pode produzir diferentes efeitos farmacológicos em tecidos com múltiplos subtipos de receptores muscarínicos (MITCHELSON, 2012).

A resposta farmacológica do McN-A-343 *in vivo* é bloqueada pela administração do antagonista seletivo do receptor muscarínico M1, a pirenzepina (FIGUEROA, et al., 2010). A pirenzepina está ligada a história da farmacologia dos receptores muscarínicos, sendo o primeiro antagonista a demonstrar afinidade substancialmente seletiva ao receptor muscarínico M1 em diferentes tecidos e regiões do sistema nervoso central contendo diversos receptores muscarínicos. Este antagonista exibe uma afinidade substancial superior ao receptor muscarínico M1. A pirenzepina é utilizada clinicamente no tratamento de úlceras gástricas (PEDIANI et al., 2016). Dessa forma, a utilização de agonistas e antagonistas seletivos ao receptor muscarínico M1 representa uma ferramenta útil para avaliar as ações farmacológicas mediadas por este receptor em diversos tecidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 em modelo experimental de colite induzida por ácido acético.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar o modelo de colite por ácido acético utilizando diferentes tempos de avaliação em camundongos;
- ✓ Avaliar o intervalo de tempo do pico inflamatório provocado pelo ácido acético a 6% como indutor de colite ulcerativa;
- ✓ Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 pela administração do McN-A-343 (agonista do receptor muscarínico M1) ou McN-A-343 e pirenzepina (antagonista do receptor muscarínico M1) durante a colite experimental induzida por ácido acético sobre:
 - Escores macroscópicos e microscópicos de lesão, peso úmido do cólon;
 - Atividade da enzima mieloperoxidase no tecido intestinal;
 - Indicadores de estresse oxidativo como os níveis de glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA);
 - Produção e liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β na mucosa do cólon.

4. METODOLOGIA

4.1. Drogas e Reagentes

O ácido acético, a pirenzepina foram obtidos da “Sigma-Aldrich, Brasil” e o MCN-A-343 pela “Tocris Bioscience, Bristol”. Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina ou solução tampão fosfato-salina (PBS). Todos os outros produtos químicos e reagentes foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2. Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, machos (25–30 g) provenientes da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Para cada experimento foi utilizado um número de 6 animais por grupo ($n=6$). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12h). Além disso, até o momento da realização dos experimentos os animais permaneceram com ração apropriada e água *ad libitum*. Antes dos experimentos os animais foram submetidos ao jejum de 16 horas, mas com livre acesso ao consumo de água.

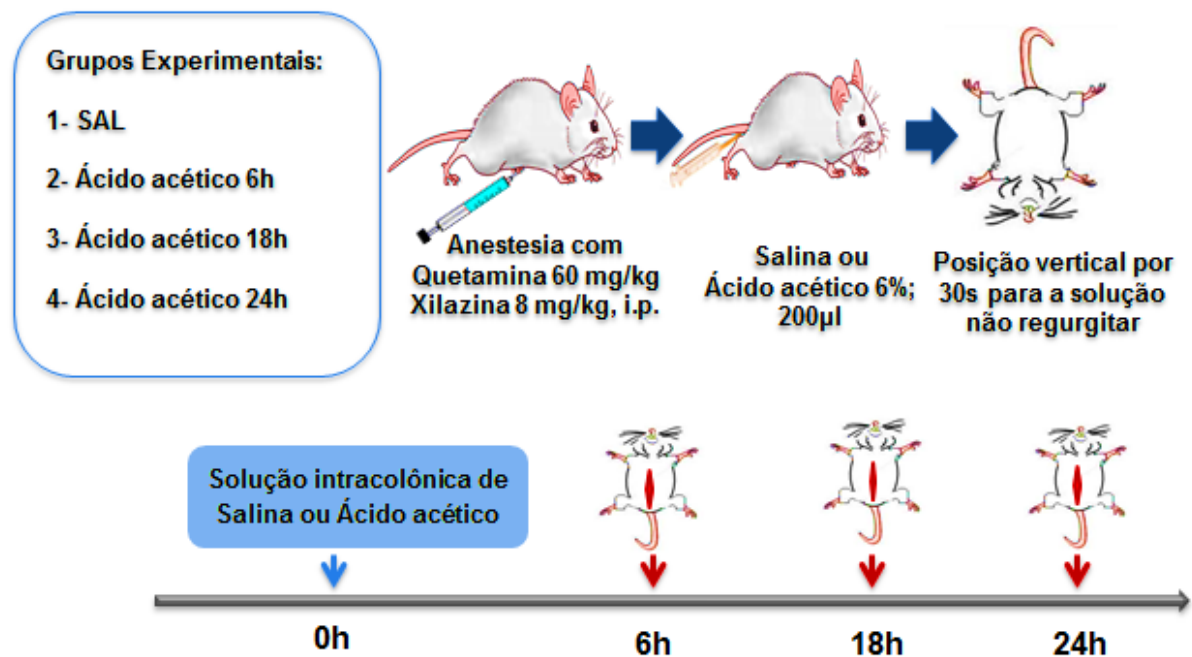
4.3. Considerações Éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (Protocolo nº 087/15) (ver anexo 1). Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.4. Padronização do modelo de colite por ácido acético

A colite foi induzida por ácido acético de acordo com método descrito por Guazelli et al., (2013) com modificações. Os animais foram mantidos em jejum durante 16 horas para a indução da colite e anestesiados com uma associação de xilazina (8 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) via intraperitoneal. Após, foi realizada a lavagem do cólon com 100 µL de solução salina, e administrado uma única dose intracolônica de solução salina a 0,9% ou uma solução de ácido acético a 6% com pH a 2,5 no volume de 200 µL. Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para ser introduzido por via retal uma sonda de polietileno com 3 centímetros de comprimento para a administração das soluções de ácido acético ou salina. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções. Após a indução da colite os animais foram eutanasiados nos seguintes tempos 6, 18 e 24 horas para análise dos parâmetros inflamatórios, utilizando amostras do tecido do cólon para: avaliação dos escores macroscópicos, peso úmido, MPO, GSH e MDA. Foram utilizados esses tempos de acordo com resultados de Guazelli et al., (2013). (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental de indução da colite por ácido acético.

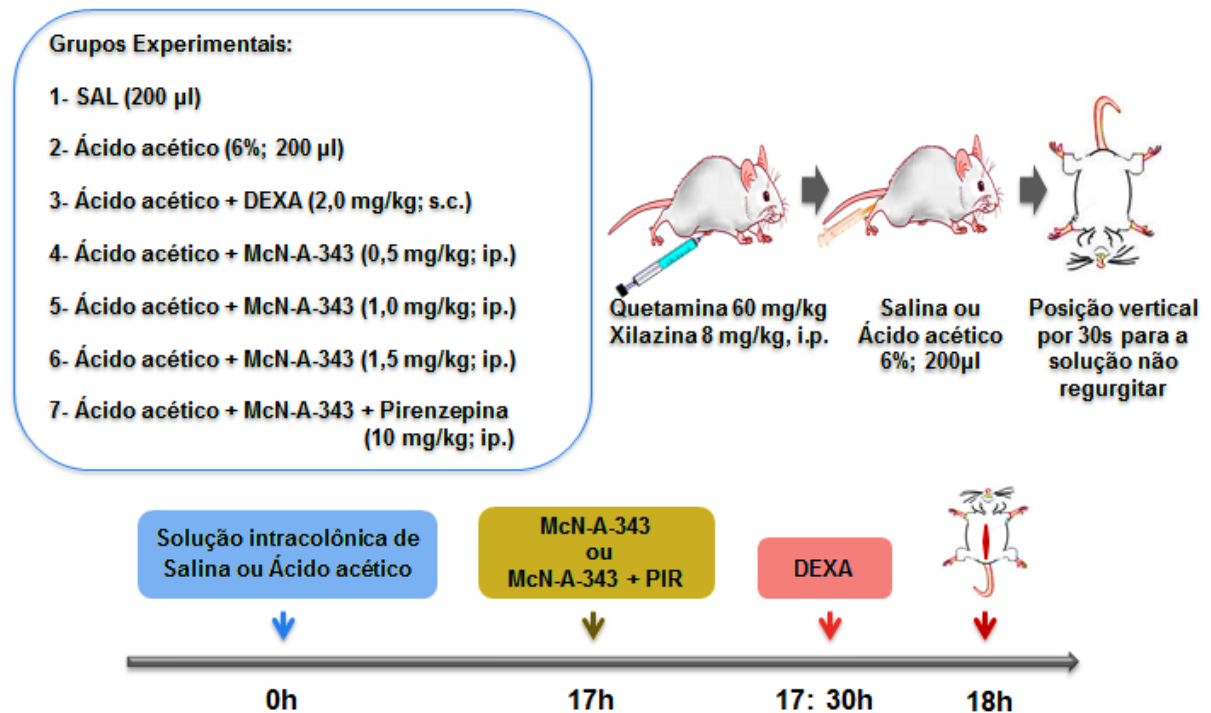


Fonte: Autoria própria.

4.5. Avaliação da resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 no curso da colite induzida por ácido acético.

A colite foi induzida por ácido acético de acordo com os grupos experimentais descrito na figura 5. Para analisar a ação anti-inflamatória da via muscarínica durante a colite, os animais foram tratados com três doses diferentes do McN-A-343 para estabelecer a concentração do agonista muscarínico do receptor M1 com melhor efeito anti-inflamatório de acordo com o estudo de Zhong et al., (2014). Para a confirmação da participação do receptor muscarínico M1 na ação anti-inflamatória, foi utilizada a melhor concentração do McN-A-343 com efeito anti-inflamatório e sua ação foi bloqueada usando pirenzepina (PIR; antagonista do receptor M1) de acordo com o estudo de Mendes et al., (2009). Após 18 h da indução da colite os animais com e sem colite, tratados com McN-A-343 ou dexametasona ou com McN-A-343 e pirenzepina foram eutanasiados e 5 cm dos segmentos intestinais foram coletados para avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão, peso úmido do cólon, análise bioquímica: MPO, dosagens de GSH, MDA e citocina IL-1 β .

Figura 5. Representação esquemática dos grupos experimentais e dos tratamentos realizados durante a colite induzida por ácido acético.



Fonte: Autoria própria.

4.5.1. Avaliação dos escores macroscópicos de lesão

Os animais foram eutanasiados pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose anestésica utilizada por Guazelli et al., (2013). Em seguida, foi realizada uma incisão mediana com abertura da cavidade peritoneal. Após a identificação do cólon, foi isolado uma extensão de 5 cm do intestino dos animais. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para a avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita por Morris (1989), conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.

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).

4.5.2 Mensuração do peso úmido do cólon dos animais

Os segmentos distais do cólon foram seccionados, medindo 5 centímetros, a fim de determinar o peso úmido do cólon. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos como peso úmido em g/5cm de cólon.

4.5.3 Avaliação dos escores microscópicos de lesão

Após a avaliação do peso úmido foi realizada a análise dos escores microscópicos de lesão. Os segmentos intestinais foram fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH=7), lavados e submetidas a desidratação gradual crescente com soluções alcóolicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e por fim no álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos, inclusão em parafina líquida para banho I por 15 durante 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, essa foi aparada em um bloco e cortada com lâmina de aço pelo micrótomo (*LUPETEC®*, MRP 09). A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Em seguida, foi feita a hidratação com álcool

absoluto por 7 minutos, álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por dois minutos cada. A coloração foi feita com hematoxilina por 2 minutos, banho em água corrente por 3,5 minutos, seguido da coloração eosina por 5 minutos e banho em água corrente, foi secado em temperatura ambiente e seguido para a montagem das lâminas para visualização em microscópio de luz (NOVA®). Foram obtidas uma lâmina para cada animal, totalizando 6 lâminas por grupo. Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da colite pela técnica descrita por Appleyard & Wallace (1995) de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.

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 (1995).

4.5.4 Ensaio de Mieloperoxidase

Este ensaio foi realizado para avaliar a infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal induzida por ácido acético de acordo com protocolo estabelecido por Bradley e colaboradores (1982). Para mensurar a concentração dessa enzima, foi utilizado 50-100 mg do cólon dos animais que foram colocados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Posteriormente, foram maceradas em um macerador Polytron (13000 rpm) e centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, do sobrenadante foi pipetado numa placa (10µl) em seguida foram acrescentados nessa placa 200µl da solução de leitura (27 ml de H₂O + 5 mg de O-dianisidina em 3 ml de fosfato de potássio + 15 µl de peróxido de hidrogênio H₂O₂). Em seguida a placa foi lida em um leitor de ELISA a 450nm. O resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido.

4.5.5. Análise dos níveis de glutathiona na mucosa intestinal

Após a eutanásia dos animais foram retiradas amostras do cólon dos animais para a análise dos níveis de glutathiona na mucosa intestinal pelo 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 de cada animal foi homogeneizada em EDTA 0.02 M, seguindo a proporção de 1:10, ou seja, para cada 100 mg de tecido usou-se 1 ml de EDTA. Alíquotas de 400 μ L do homogenato foram misturadas a 320 μ L de água destilada e a 80 μ L 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 μ L do sobrenadante foi adicionado 800 μ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 μ L de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por três minutos e cada amostra foi lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 412 nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em mg de GSH/g de tecido.

4.5.6 Determinação de malonilaldeído 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 H₃PO₄ (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, a fase butanólica de cada amostra foi lida em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda simultâneos: 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

4.5.7. Mensuração de IL-1 β intestinal

Para dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1 β , os segmentos do cólon dos animais foram retirados e adicionados em um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4 $^{\circ}$ C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2 μ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 μ L por poço por 24 horas a 4 $^{\circ}$ C. A placa foi lavada com PBS -Tween 20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi então incubada com a curva padrão das citocinas (IL-1 β) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do intestino a serem dosados, 100 μ L por poço por 24 horas a 4 $^{\circ}$ C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado diluído de 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina peroxidase (DAKO) diluída de 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi então lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão, 100 μ L por poço, no escuro à temperatura ambiente por de 20 minutos. A reação foi parada com 150 μ L por poço de H₂SO₄ 1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados foram expressos como média \pm erro da quantidade de IL-1 β em pg/ml (TAVARES-MURTA et al., 2008).

4.6. Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média (\pm EPM) de animais em cada grupo ($n=6$). Os testes estatísticos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 5.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de

múltiplas comparações de Dunns. Para todos os testes foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

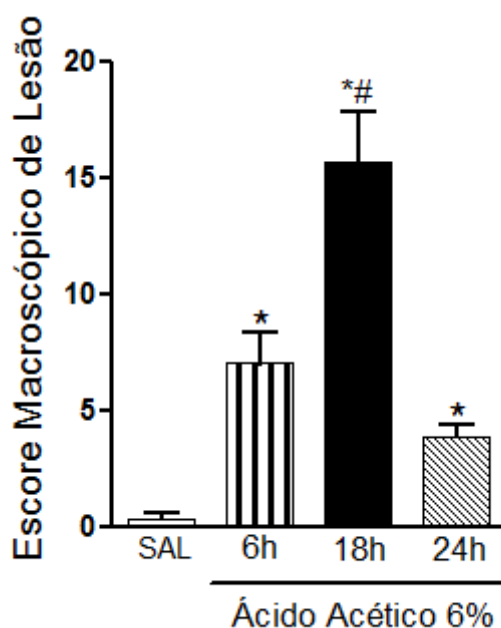
5. RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo de colite por ácido acético.

5.1.1. Ação do ácido acético sobre os escores macroscópicos de lesão.

Na figura 6, pode-se observar um aumento significativo no nível de lesões inflamatórias nos diferentes grupos que receberam ácido acético a 6%, que tiveram os seguintes resultados de média de escores: grupo de 6h - $7,000 \pm 1,342$; grupo de 18h - $15,67 \pm 2,201$; grupo de 24h - $3,857 \pm 0,553$, quando comparados aos animais do grupo controle negativo que receberam apenas solução Salina 0,9% intracolônica (grupo SAL) ($0,333 \pm 0,210$). Além disso, entre os três grupos de animais que receberam a injeção intracolônica de ácido acético, pode-se observar que após 18h da indução da colite houve maior número de lesões inflamatórias intestinais de forma significativa entre todos os grupos analisados e conseqüentemente uma maior média de escores macroscópicos após a indução da colite.

Figura 6. Ação do ácido acético sobre os escores macroscópicos de lesão em camundongos com e sem colite.



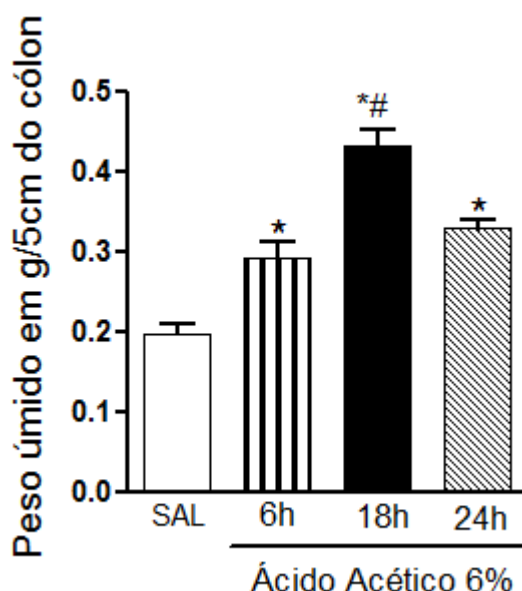
Os camundongos receberam salina 0,9% (200 μ l) ou ácido acético a 6% (200 μ l) para a indução da colite. Após 6h, 18h e 24h os animais foram eutanasiados e os abdômens foram abertos. Após a identificação do intestino, as amostras de tecido (5 cm) foram recolhidas para avaliação dos escores

macroscópicos de lesão. Os resultados foram expressos como EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs os grupos que receberam ácido acético e foram eutanasiados nos tempos de 6 e 24 hora após a indução da colite (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.1.2. Efeito do ácido acético sobre o peso úmido do cólon dos animais com e sem colite.

Após as pesagens dos segmentos de 5 cm do cólon dos animais, observou-se que o grupo dos animais que receberam apenas salina 0,9% apresentaram baixa média de peso úmido dos cólons (SAL: $0,197 \pm 0,012$ g/5cm) em comparação com os grupos que receberam ácido acético 6% (grupo de 6h - $0,291 \pm 0,019$ g/5cm; grupo de 18h - $0,431 \pm 0,020$ g/5cm e grupo de 24h - $0,327 \pm 0,012$ g/5cm) como representado na Figura 7. Foi observado que após 18h da indução da colite obteve-se o máximo aumento do peso úmido dos cólons ($p < 0,05$) entre os grupos de animais que receberam a solução ácida.

Figura 7. Efeito do ácido acético sobre o peso úmido do cólon dos animais com e sem colite



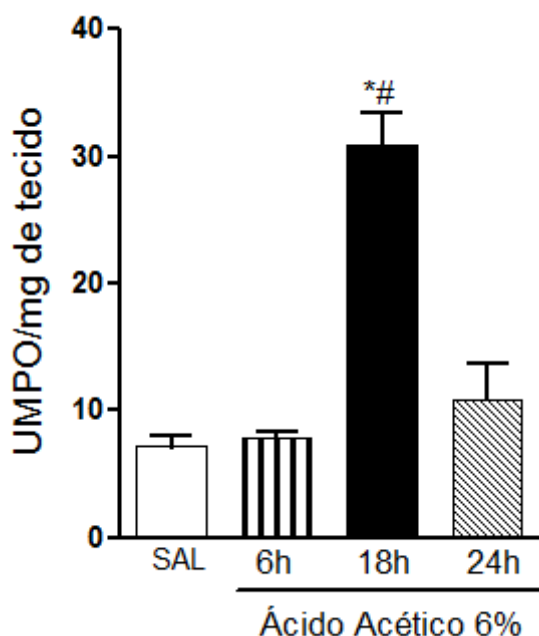
Após, a avaliação dos escores macroscópicos de lesão foram recolhidas as amostras de tecido intestinal (5 cm) para análise de peso úmido. Os resultados foram expressos como EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs os grupos que receberam ácido acético e foram

eutanasiados nos tempos de 6 e 24 hora após a indução da colite (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.1.3. Ação do ácido acético sobre a atividade da mieloperoxidase no cólon de camundongos

O segmento de cólon dos animais foi analisado quanto à atividade da enzima MPO. Observa-se que os animais que receberam ácido acético no cólon (6h - $7,82 \pm 0,41$ UMPO/mg de tecido; 18h - $30,93 \pm 2,53$ UMPO/mg de tecido; 24h - $10,85 \pm 2,79$ UMPO/mg de tecido) apresentaram aumento da atividade da enzima MPO quando comparado aos animais que receberam apenas salina 0,9% (SAL; $7,11 \pm 0,84$ UMPO/mg de tecido). Ainda observou-se aumento significativo da atividade da enzima mieloperoxidase no cólon dos animais no intervalo de 18h após a indução da colite, entre os grupos que receberam somente ácido acético via intracolônica ($p < 0.05$) (Figura 8).

Figura 8. Ação do ácido acético sobre a atividade de MPO no tecido intestinal.



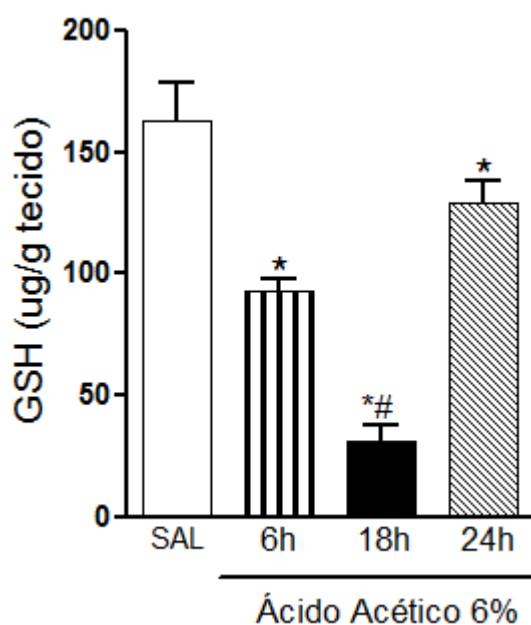
Na indução da colite os animais receberam salina (200 μ l) ou ácido acético a 6% (200 μ l). Após 6h, 18h e 24h os animais foram eutanasiados e realizada a coleta das amostras do cólon para a avaliação da atividade de MPO. Os resultados são expressos como EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs os grupos que receberam ácido acético e foram eutanasiados nos

tempos de 6 e 24 hora após a indução da colite (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.1.4. Ação do ácido acético sobre a concentração colônica de glutathiona

Os grupos dos animais que receberam por via intracolônica ácido acético a 6% apresentaram como resultados um maior nível de consumo de GSH (grupo de 6h - $93,03 \pm 5,13 \mu\text{g/g}$ de tecido; grupo de 18h - $31,22 \pm 6,61 \mu\text{g/g}$ de tecido; grupo de 24h - $129,2 \pm 8,83 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparados aos animais do grupo controle-negativo (grupo SAL) que apresentaram o menor nível de consumo de GSH entre os grupos analisados ($162,9 \pm 15,28 \mu\text{g/g}$ de tecido). Evidenciou-se ainda, que depois de 18h da indução da colite houve maior aumento significativo no consumo de GSH pelos radicais livres provenientes da lesão com uma diferença estatística significativa em relação aos grupos de animais que foram administrado ácido acético e eutanasiados após 6 e 24 horas da indução da colite e também com o grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9. Ação do ácido acético sobre os níveis colônicos de glutathiona em camundongos com colite e sem colite.



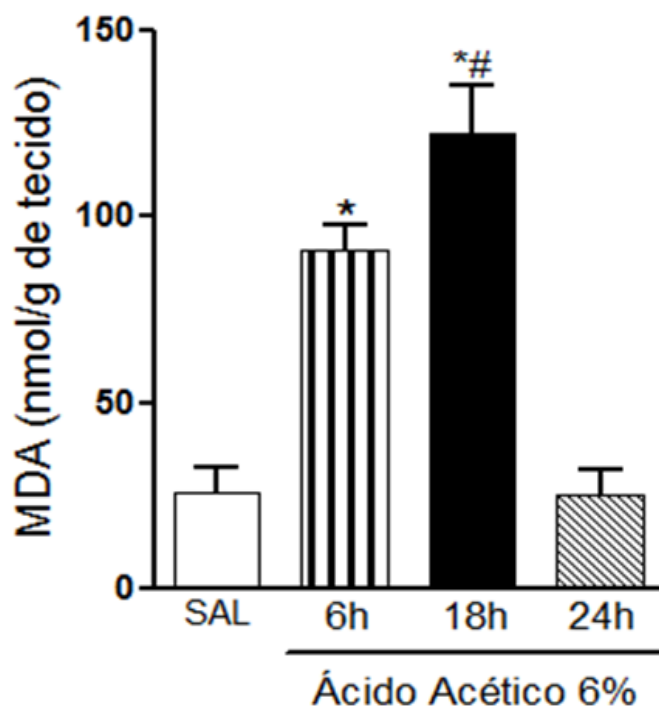
Na indução da colite os animais receberam salina (200 μl) ou ácido acético a 6% (200 μl). Após 6h, 18h e 24h os animais foram eutanasiados e realizada a coleta das amostras do cólon para a mensuração dos níveis de GSH. Os resultados são expressos como EMP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs os grupos que receberam ácido acético e foram eutanasiados nos

tempos de 6 e 24 hora após a indução da colite (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.1.5. Efeito do ácido acético sobre os níveis de malonildialdeído no tecido intestinal

Os resultados mostrados na Figura 10 evidenciam que os grupos que receberam ácido acético (grupo de 6h - $91,11 \pm 6,42$ nmol/g de tecido e grupo de 18h - $122,3 \pm 13,31$ nmol/g de tecido) expressaram um aumento estatisticamente significativo nas concentrações de MDA em comparação ao grupo salina ($25,74 \pm 6,90$ nmol/g de tecido). Contudo, o grupo 24h que recebeu ácido acético ($25,14 \pm 6,61$ nmol/g de tecido) não apresentou uma redução significativa dos níveis de MDA em comparação ao grupo controle negativo (SAL). O grupo que recebeu ácido acético e sofreu eutanásia com 18h após a indução da colite demonstrou um significativo aumento dos níveis de MDA em relação a todos os grupos testados ($p < 0,05$).

Figura 10. Efeito do ácido acético sobre níveis de MDA em tecido intestinal de camundongos.



Na indução da colite os animais receberam salina (200 μ l) ou ácido acético a 6% (200 μ l). Após 6h, 18h e 24h os animais foram eutanasiados e realizada a coleta das amostras do cólon para dosagem

de MDA. Os resultados são expressos como EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs grupo salina; # $p < 0,05$ vs os grupos que receberam ácido acético e foram eutanasiados nos tempos de 6 e 24 hora após a indução da colite (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Estes resultados apresentados acima sugerem que o pico inflamatório da colite induzida por ácido acético ocorre após 18 horas da indução. Então, a partir desse resultado a eutanásia dos animais nos ensaios subsequentes ocorreram nesse horário.

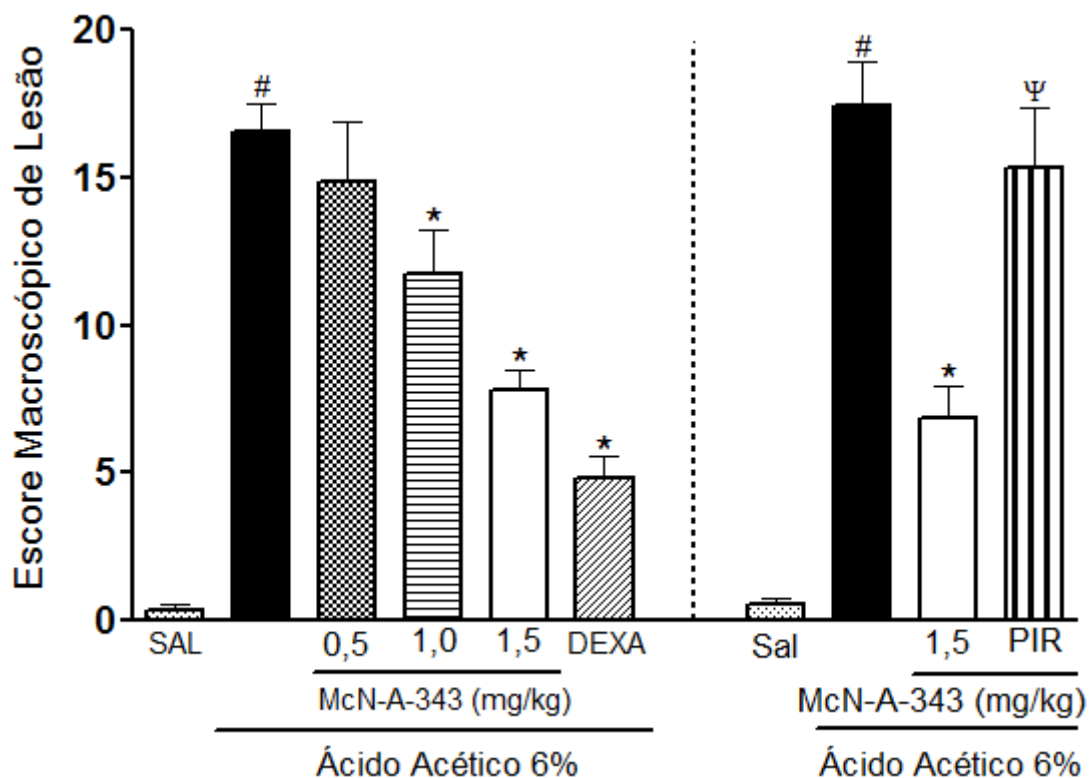
5.2. Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite experimental induzida por ácido acético.

5.2.1. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os escores macroscópicos de lesão na colite induzida por ácido acético.

A pontuação de danos macroscópicos foi atribuída após 18h da indução da colite, de acordo com a gravidade dos danos no cólon de cada camundongo. Como representado na Figura 11, observou-se, que os animais que receberam somente ácido acético a 6% intracólon obtiveram aumento significativo na pontuação de danos macroscópicos de lesão inflamatória colônica ($16,56 \pm 0,94$) em relação ao grupo controle negativo (grupo SAL: $0,33 \pm 0,21$). Tal diferença de escores pode ser vista na Figura 12A e 12B que mostram cólon dos animais que receberam salina e ácido acético, respectivamente. O cólon do animal do grupo salina mostra aparência normal sem foco inflamatório, hiperêmico ou de úlcera; ao contrário do cólon com colite, que apresenta muita hiperemia, aparência inflamada se estendendo por toda a porção do fragmento, com vários focos de ulceração. Por outro, lado os animais tratados com McN-A-343 1,0 mg/kg ($11,73 \pm 1,46$) e McN-A-343 1,5 mg/kg ($7,77 \pm 0,70$) apresentaram diminuição estatisticamente significativa dos escores macroscópicos de lesão em comparação com o grupo ácido acético (Figura 11). O grupo tratado com McN-A-343 (0,5 mg/kg; $14,86 \pm 2,02$) não demonstrou uma diminuição significativa nos escores macroscópicos comparados ao grupo ácido acético. Notou-se que a dose de 1,5 mg/kg de McN-A-343 apresentou um melhor efeito numérico na redução dos escores macroscópicos de lesão. Na Figura 12C está representado o cólon de animal com colite e tratado com McN-A-343 1,5 mg/kg

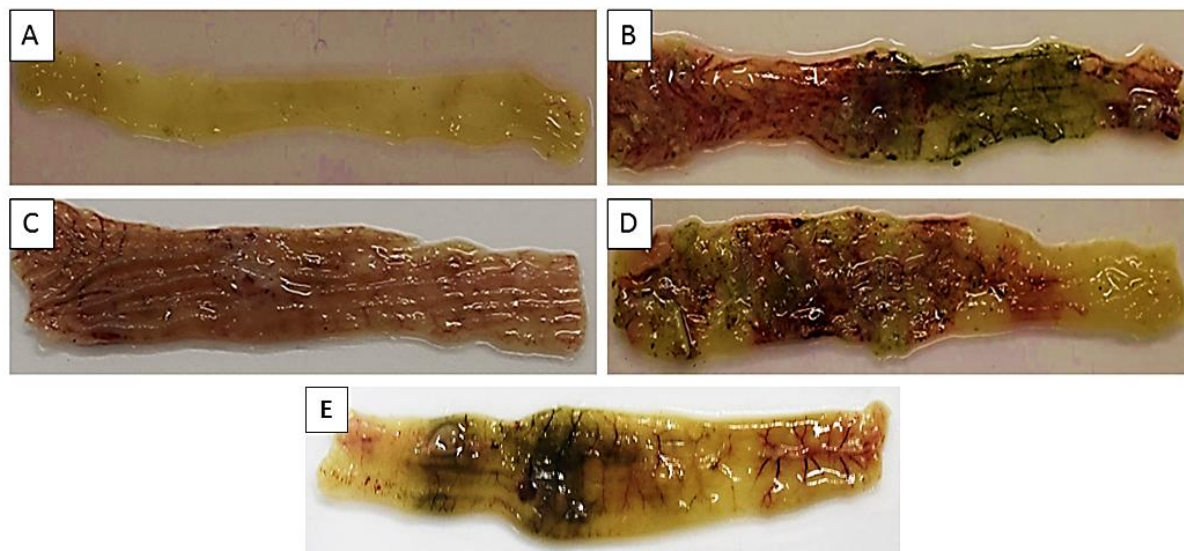
que mostra uma hiperemia notável, não apresenta foco de úlceras e possui aparência menos inflamada que o cólon do animal com colite (Figura 12B). Os animais tratados com o fármaco de referência (grupo DEXA 2 mg/kg; s.c.), tiveram redução da lesão no cólon representada como diminuição significativa dos escores inflamatórios atribuídos ($6,50 \pm 1,80$) em comparação ao grupo controle positivo (grupo ácido acético). Essa diminuição de escores pode ser vista também na Figura 12E que mostra cólon de animal com colite e tratado com a Dexametasona, que por sua vez tem hiperemia local com uma quantidade reduzida de úlceras quando se compara ao grupo ácido acético, mostrado na Figura 12B. Além disso, a coadministração de McN-A-343 (1,5 mg/kg; i.p.) e pirenzepina (PIR; 10 mg/kg; i.p.) aumentou significativamente a pontuação de danos macroscópicos ($15,33 \pm 2,01$) no tecido intestinal quando comparado ao grupo de animais que foi tratado somente com McN-A-343, de tal modo, que não houve diferença estatística significativa também com grupo que recebeu somente ácido acético. Na Figura 12D, vê-se que a aparência do cólon dos animais tratados com McN-A-343 e pirenzepina se assemelha bastante com a aparência do cólon dos animais que foram submetidos à colite (Figura 12B), onde observa-se inflamação aparente com hiperemia e ulceração estendendo-se por uma grande porção do tecido intestinal.

Figura 11. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os escores macroscópicos de lesão intestinal



Os camundongos foram tratados com McN-A-343 (0,5; 1,0 e 1,5 mg/ kg; i.p.) ou DEXA (2 mg/kg, s.c.) ou McN-A-343 (1,5 mg/kg; i.p.) mais PIR (10 mg/kg; i.p.). Após 18 horas da indução da colite por ácido acético a 6% os camundongos foram eutanasiados. Os animais eutanasiados, tiveram os abdômens abertos, retirados os colóns e lavados com solução salina. Em seguida foi feita a análise de lesão inflamatória macroscópica. Cada barra representa a media \pm EPM do somatório dos escores obtidos. # $p < 0.05$ vs o grupo salina; * $p < 0.05$ vs grupo ácido acético e $\Psi p < 0,05$ vs grupo McN-A-343 1,5mg/kg (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 12. Fotografia do tecido colônico representando a modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os danos inflamatórios macroscópicos na colite experimental induzida por ácido acético



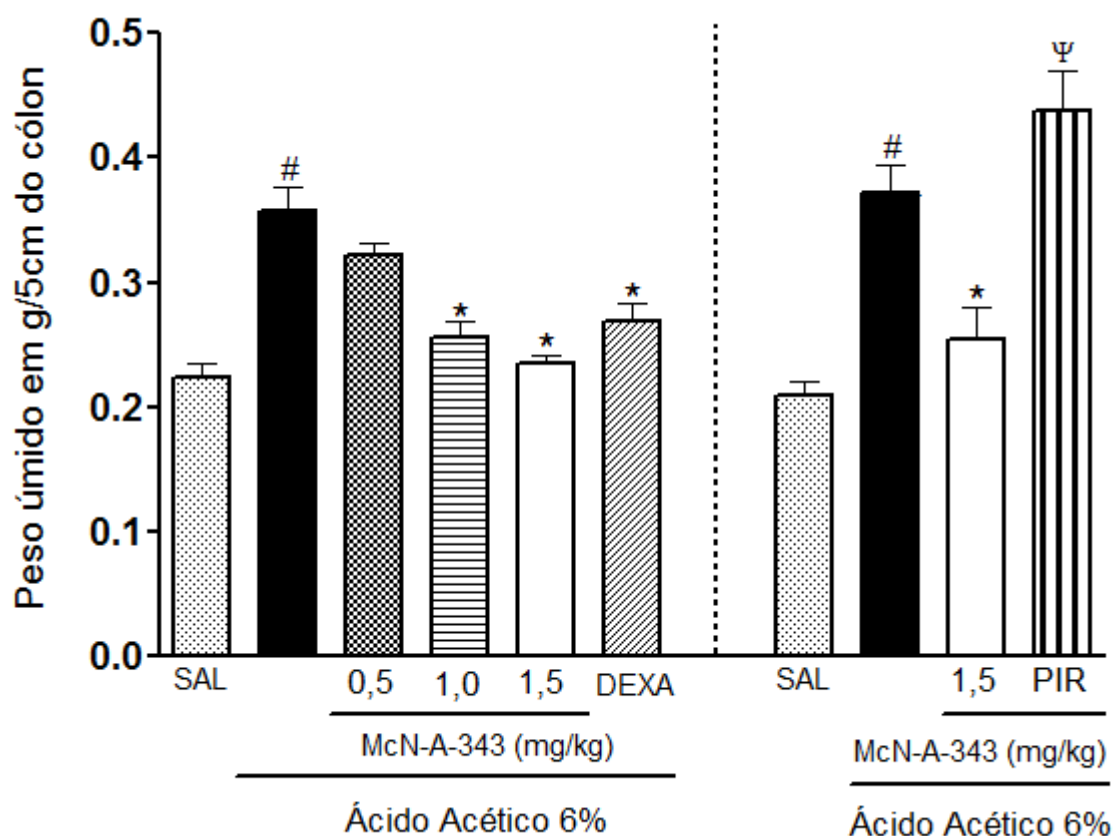
Os segmentos de 5 cm do cólon dos animais após 18h da indução da colite. Cólon de animal que recebeu apenas solução Salina 0,9% intracólon - grupo SAL, controle negativo (A); Cólon de animal com colite induzida por ácido acético 6% intracólon, controle positivo (B); Cólon de animal com colite e tratado com McN-A-343 1,5 mg/kg, i.p. (C); Cólon de animal com colite e tratado com McN-A-343 1,5 mg/kg, i.p. + pirenzepina 10 mg/kg, i.p. (D); e Cólon de animal com colite e tratado com Dexametasona 2 mg/kg s.c. (E).

5.2.2. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre o peso úmido do cólon de animais com colite

Conforme mostra a Figura 13, observou-se aumento estatístico significativo do peso úmido de 5 cm do cólon dos camundongos do grupo ácido acético-controle positivo ($0,3576 \pm 0,0188$ g/5cm) quando comparado ao peso dos 5 cm dos cólon dos camundongos do grupo controle negativo (grupo SAL: $0,2238 \pm 0,0115$ g/5cm). Houve uma diminuição significativa do peso úmido do colón dos animais tratados com McN-A-343 (1,0 mg/kg ip.: $0,2561 \pm 0,0125$ g/5cm; 1,5 mg/kg i.p.: $0,2355 \pm 0,0063$ g/5cm) em comparação com o grupo ácido acético. Efeitos similares foram detectados nos animais tratados com dexametasona 2 mg/kg s.c. ($0,2688 \pm 0,0135$ g/5cm) que apresentaram diminuição significativa do peso úmido dos fragmentos do cólon. Enquanto, que o grupo tratado com McN-A-343 (0,5 mg/kg; $0,3561 \pm 0,0239$

g/5cm) não apresentou diminuição significativa do peso úmido do cólon em relação ao grupo ácido acético. O tratamento na concentração de 1,5 mg/kg de McN-A-343 mostrou uma tendência a apresentar um melhor efeito na redução do peso úmido do intestino em comparação com as outras doses de McN-A-343 (0,5 e 1,0 mg/kg) durante a colite induzida por ácido acético. No entanto, o grupo em que foi co-injetado McN-A-343 (1,5 mg/kg; i.p.) e pirenzepina (PIR; 10 mg/kg; i.p.) ocorreu aumento significativo no peso úmido dos cólons ($0,4370 \pm 0,0318$ g/5cm) quando comparado ao grupo tratado com McN-A-343 1,5 mg/kg, sem apresentar, inclusive, nenhuma diferença estatística significativa com o grupo dos animais que receberam somente ácido acético intracolônico.

Figura 13. Modulação farmacológica receptor muscarínico M1 sobre o peso úmido de 5 cm do cólon dos animais com colite.



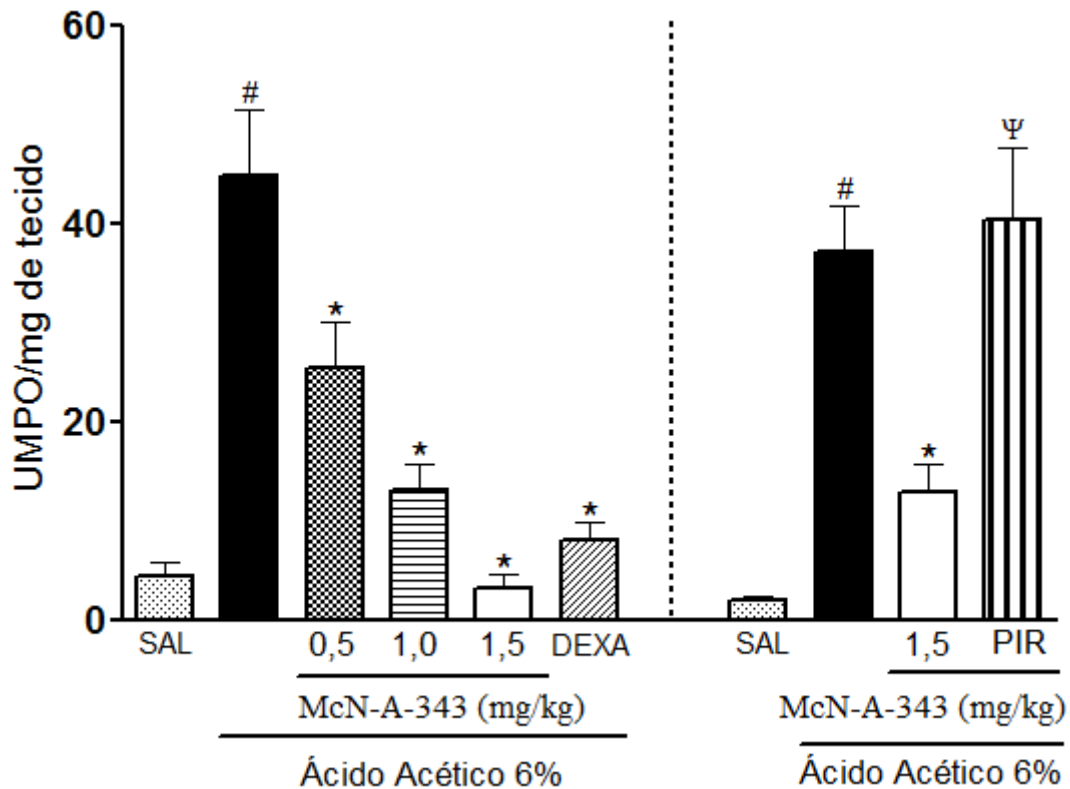
Os camundongos foram tratados com McN-A-343 (0,5; 1,0 e 1,5 mg/kg, i.p.) ou DEXA (2 mg/kg, s.c.) ou McN-A-343 (1,5 mg/kg, i.p.) + PIR (10 mg/kg; i.p.). Após 18 horas da indução da colite os camundongos foram eutanasiados. Em seguida ocorreu a coleta da porção de 5 cm das amostras do cólon dos animais para mensuração do peso úmido. Os dados são expressos como média \pm EPM de

peso úmido em g/5cm do cólon de 6 animais por grupo. # $p < 0.05$ vs o grupo salina; * $p < 0.05$ vs grupo ácido acético e $\Psi p < 0,05$ vs grupo McN-A-343. (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.2.3. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a atividade de mieloperoxidase em animais com colite.

Na avaliação da atividade enzimática de mieloperoxidase no cólon dos animais com colite houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade desta enzima ($44,84 \pm 6,617$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo controle negativo (SAL; $9,273 \pm 2,187$ UMPO/mg de tecido). Os grupos tratados com McN-A-343 na dose de 0,5 mg/kg ($25,55 \pm 4,551$ UMPO/mg de tecido) ou 1,0 mg/kg ($9,606 \pm 2,201$ UMPO/mg de tecido) ou 1,5 mg/kg ($2,866 \pm 1,389$ UMPO/mg de tecido) apresentaram uma diminuição significativa da atividade enzimática quando comparada com o grupo ácido acético. O McN-A-343 (1,5 mg/kg) demonstrou uma melhor resposta na redução da atividade da mieloperoxidase em relação as outras doses de McN-A-343. Os animais tratados com DEXA 2 mg/kg obtiveram uma redução significativa da atividade da MPO ($8,099 \pm 1,747$ UMPO/mg de tecido) em relação aos animais com colite (Figura 14). Os camundongos tratados com McN-A-343 (1,5 mg/kg; i.p.) mais pirenzepina (PIR; 10 mg/kg; i.p.) mostraram aumento da atividade de MPO no cólon ($2,187 \pm 6,617$ UMPO/mg de tecido) quando comparados aos animais tratados apenas com o agonista M1, tal aumento da atividade da enzima se deu de maneira semelhante ao ocorrido no grupo ácido acético.

Figura 13. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a atividade da MPO no cólon dos camundongos com colite.



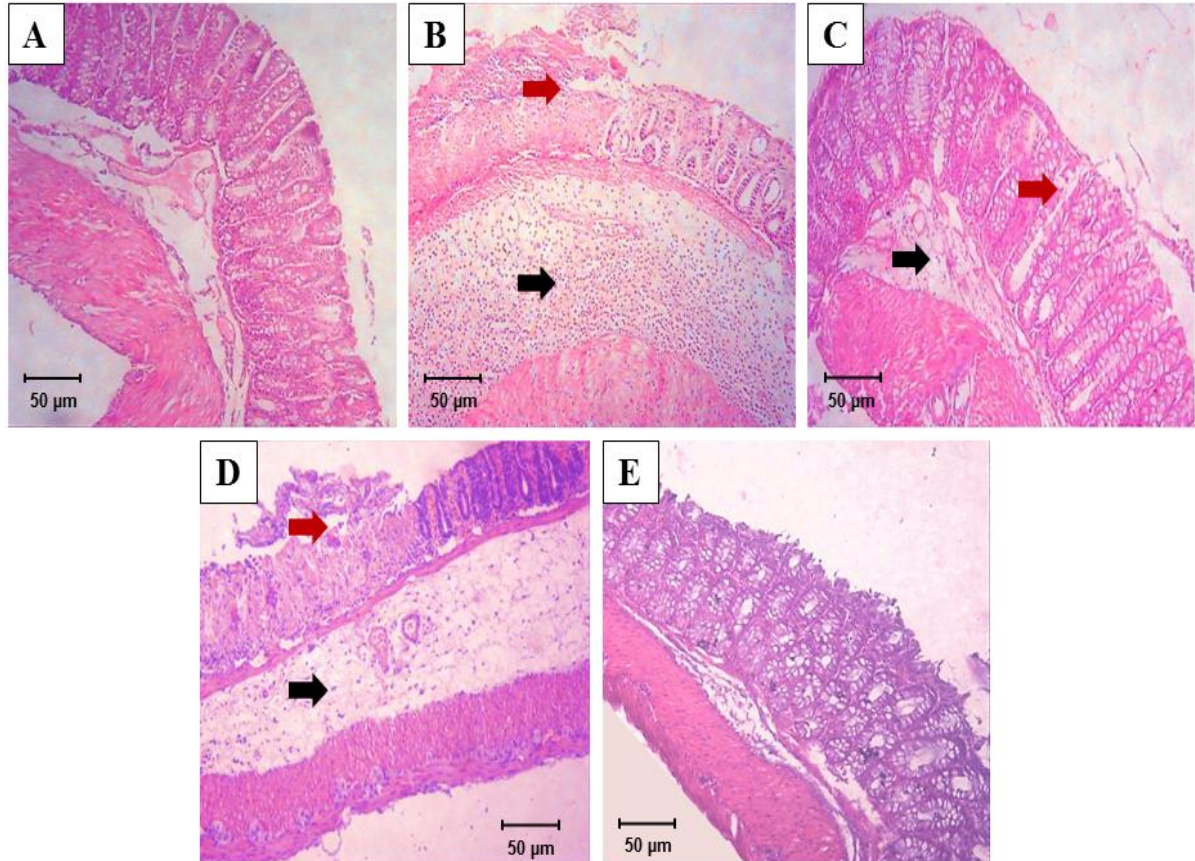
Os camundongos foram tratados com McN-A-343 (0,5; 1,0 e 1,5 mg/kg, i.p.) ou DEXA (2 mg/kg, s.c.) ou McN-A-343 (1,5 mg/kg, i.p.) + PIR (10 mg/kg; i.p.). Após 18 horas da indução da colite os camundongos foram eutanasiados, as amostras do cólons foram recolhidas e realizada a análise da atividade de MPO. Os dados foram expressos como média \pm EPM de UMPO/mg de tecido de 6 animais por grupo. # $p < 0.05$ vs o grupo salina; * $p < 0.05$ vs grupo ácido acético e $\Psi p < 0,05$ vs grupo McN-A-343 (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.2.4. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os critérios microscópicos de lesão durante a colite induzida por ácido acético

Na avaliação histopatológica os animais do grupo controle (grupo SAL; Figura 14 A) obtiveram pontuações mínimas de escores microscópicos para todos os parâmetros avaliados (Tabela 3). Já os animais com colite, sem nenhum tratamento apresentaram uma significativa perda da arquitetura da mucosa 3 (3-3), intensa infiltração de células 3 (3-3), espessamento da camada muscular 3 (3-3), formação

de abscessos em cripta 1 (1-1), e depleção de células caliciformes 1 (1-1), obtendo a maior pontuação total de escores microscópico 11 (11-11) entre os grupos testados (Figura 14 B e Tabela 3). A avaliação histológica dos cólons de camundongos tratados com McN-343 (1,5 mg/kg) mostrou uma redução significativa nos parâmetros inflamatórios avaliados em comparação com o grupo com colite e não tratado, tais como, perda da arquitetura da mucosa 0 (0-1), infiltração de células 0 (0-1), espessamento da camada muscular 1 (0-1), formação de abscessos em cripta 0 (0-0), e depleção de células caliciformes 0 (0-0). Desta forma, foi demonstrado que a dose de 1,5 mg/kg de McN-A-343 apresentou uma redução de 90,9% nos escores totais de danos dos cólons, em comparação com o grupo ácido acético (Figura 14 C e Tabela 3). Contudo, a coadministração de McN-343 (1,5 mg/kg) e pirenzepina (10 mg/kg) aumentou os parâmetros inflamatórios, ocorrendo um aumento da pontuação total de dano microscópico 11 vezes em comparação com o grupo McN-343 (Figura 14 D e Tabela 3). Os animais tratados com dexametasona (2,0 mg/kg) apresentaram redução estatisticamente significativa na pontuação total de escores microscópico de lesão 3 (0-3) (Figura 14 E e Tabela 3) quando comparado aos animais do grupo ácido acético.

Figura 14. Microfotografia (10x, escala 50 μm) representando da modulação farmacológica do receptor M1 sobre os danos microscópicos da lesão intestinal na colite experimental induzida por ácido acético.



Grupo de controle negativo (SAL; A); grupo colite, sem tratamento (B); grupo colite + McN-A-343 (1,5 mg/kg; C); grupo colite + McN-A-343 1,5 mg/kg + Pirenzepina 10 mg/kg (D); grupo colite + DEXA (2,0 mg/kg; E). As setas vermelhas representam perda da arquitetura da mucosa e a seta preta infiltração celular.

Tabela 3. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre os critérios microscópicos de lesão intestinal no modelo de colite experimental.

Critérios	Média dos escores				
	SAL	Ácido Acético 6%	Ácido Acético 6% + McN-A-343 1,5 mg/kg	Ácido Acético 6% + McN-A-343 1,5 mg/kg + PIR 10 mg/kg	Ácido Acético 6% + DEXA 2 mg/kg
Perda da arquitetura da mucosa	0(0-0)	3 (3-3) [#]	0 (0-1) [*]	3 (2-3) ^ψ	1 (0-1)
Infiltração celular	0(0-0)	3 (3-3) [#]	0 (0-1) [*]	3 (3-3) ^ψ	1 (0-1)
Espessamento muscular	0(0-0)	3 (3-3) [#]	1 (0-1) [*]	3 (3-3) ^ψ	1 (0-1)
Abcesso em cripta	0(0-0)	1 (1-1) [#]	0 (0-0) [*]	1 (1-1) ^ψ	0 (0-0) [*]
Depleção de células caliciformes	0(0-0)	1 (1-1) [#]	0 (0-0) [*]	1 (1-1) ^ψ	0 (0-0) [*]
Escores totais de danos	0(0-0)	11 (11-11) [#]	1 (0-3) [*]	11 (10-11) ^ψ	3 (0-3) [*]

Escores de lesão histológica foram expressos como média \pm erro ($n=5-6$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. [#] $p<0.05$ vs grupo salina; ^{*} $p<0.05$ vs grupo ácido acético e ^ψ $p<0,05$ vs grupo McN-A-343.

5.2.5. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração de GSH e MDA na mucosa intestinal de animais com colite induzida por ácido acético.

Na tabela 4, observa-se uma redução significativa nos níveis de GSH e um aumento na concentração do MDA no grupo ácido acético (GSH $34,49 \pm 6,80$ $\mu\text{g/ml}$; MDA $125,8 \pm 14,80$; IL-1 β $3,58 \pm 0,07$ pg/ml) quando comparado ao grupo controle SAL (GSH $148,3 \pm 14,34$ $\mu\text{g/ml}$; MDA $54,34 \pm 13,61$ nmol/ml). A administração de

McN-A-343 conservou os níveis de GSH ($93,15 \pm 12,20 \mu\text{g/ml}$) e reduziu significativamente a concentração de malondialdeído ($43,26 \pm 10,16 \text{ nmol/ml}$) em comparação com o grupo ácido acético. A coadministração de McN-343 (1,5 mg/kg; i.p.) e pirenzepina (10 mg/kg; i.p.) inibiu o efeito do McN-A-343 de forma significativa por reduzir a concentração de GSH $32,16 \pm 3,83 \mu\text{g/ml}$ e aumentar os níveis de malondialdeído $149,1 \pm 14,19 \text{ nmol/ml}$ na mucosa intestinal em comparação com o grupo tratado apenas com o agonista do receptor muscarínico M1.

Tabela 4. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração de GSH e MDA no cólon de animais com colite.

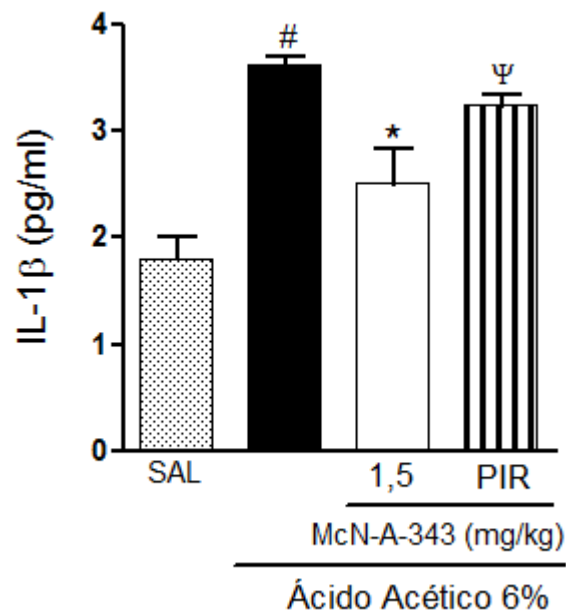
Tratamento	Dose (mg/kg)	Parâmetros	
		GSH ($\mu\text{g/ml}$)	MDA (nmol/ml)
SAL		$148,3 \pm 14,34$	$54,34 \pm 13,61$
Ácido Acético 6%		$34,49 \pm 6,80^{\#}$	$125,8 \pm 14,80^{\#}$
Ácido Acético 6% + McN-A-343	1,5	$93,15 \pm 12,20^*$	$43,26 \pm 10,16^*$
Ácido Acético 6% + McN-A-343 + PIR	1,5 10	$32,16 \pm 3,83^{\Psi}$	$149,1 \pm 14,19^{\Psi}$

Os valores bioquímicos foram expressos como média+ EPM por 5-6 animais por grupo. $^{\#}p < 0,05$ vs o grupo salina; $^*p < 0,05$ vs grupo ácido acético e $^{\Psi}p < 0,05$ vs grupo McN-A-343 (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.2.6. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração da citocina IL-1 β no cólon de animais com colite induzida por ácido acético.

As mucosas intestinais dos animais submetidos à colite induzida por ácido acético apresentaram um significativo aumento da concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 β ($3,631 \pm 0,065$ pg/ml) (Figura 15) quando comparado ao grupo controle salina (SAL; $1,794 \pm 0,208$ pg/ml). O grupo tratado com McN-A-343 (1,5 mg/kg; i.p.) apresentou uma redução significativa desta citocina analisada (IL-1 β - $2,504 \pm 0,336$ pg/ml). Por outro lado, a coadministração de McN-A-343 (1,5 mg/kg) e pirenzepina (PIR; 10 mg/kg; i.p.) inibiu o efeito do McN-A-343 ($3,239 \pm 0,0962$ pg/ml).

Figura 15. Modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sobre a concentração da citocina IL-1 β no cólon de animais com colite



Os camundongos foram tratados com McN-A-343 (1,5 mg/kg, i.p.) ou McN-A-343 (1,5 mg/kg, i.p.) + PIR (10 mg/kg; i.p.). Após 18 horas da indução da colite os camundongos foram eutanasiados, as amostras do cólons foram recolhidas e realizada a dosagem da citocina IL-1 β . Os dados foram expressos como média \pm EPM de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ vs o grupo salina; * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético e $\Psi p < 0,05$ vs grupo McN-A-343 (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

6. DISCUSSÃO

Este estudo iniciou-se pela padronização do modelo experimental de colite induzida por ácido acético, devido à inexistência de um consenso na literatura no que se refere à concentração de ácido acético ideal para induzir a colite ulcerativa em animais. Os estudos que utilizam este modelo experimental preparam o ácido acético em concentrações variáveis de 3 a 7,5% (EL-ABHAR, 2008; GUAZELLI et al., 2013; FANTINI, 2016; NAJAFI, 2017). Além disso, este trabalho teve como objetivo mostrar o período do pico inflamatório provocado pelo ácido acético a 6%, como indutor de colite ulcerativa.

A colite ulcerativa induzida por ácido acético é um modelo experimental amplamente utilizado, caracterizado por uma resposta inflamatória aguda, e apresenta alterações morfológicas e perfil inflamatório similar à colite ulcerativa em humanos (RANI et al., 2011; HARTMANN et al., 2012; MINAIYAN et al., 2014). Este modelo causa uma acidificação intracelular, que resulta em danos epiteliais da porção distal do cólon com inflamação não transmural, necrose das camadas mucosa e submucosa, edema mucoso, infiltração de neutrófilos na mucosa e ulcerações na submucosa (KANDHARE et al., 2012).

No presente trabalho, a administração de uma solução aquosa de ácido acético a 6% por via intracolônica e uma posterior análise do tecido do cólon dos animais 18h após tal administração mostrou uma maior média de escores de lesão inflamatória macroscópica, bem como maior peso úmido das porções de 5 cm desse tecido quando comparados aos valores obtidos com os grupos de animais que também receberam a solução ácida e que tiveram os cólons analisados nos horários de 6 e 24h após indução da colite.

O dano macroscópico na mucosa intestinal pela administração de ácido acético resulta em uma resposta inflamatória com hiperemia na mucosa, edema e ulceração no tecido do cólon. Além disso, o peso úmido do tecido intestinal inflamado representa um indicador macroscópico do grau de inflamação local pela magnitude do edema e do infiltrado celular no tecido, sendo considerado um importante parâmetro para avaliar a severidade e extensão da doença (BUSSEROLLES et al., 2005; D'ARGENIO et al., 2012).

Dados similares aos obtidos nesta pesquisa no que se refere ao aumento do dano macroscópico e o peso úmido do cólon dos animais submetidos à colite em

relação ao grupo controle salina foram obtidos em estudos anteriores utilizando o mesmo modelo experimental, porém com concentrações de ácido acético menores: 3% (AL-REJAIE et al., 2013; MINAIYAN et al., 2015) e 4% (FANTINI, 2016).

No modelo de colite a mieloperoxidase é considerada como a principal enzima responsável pelo dano tecidual. Essa enzima é encontrada nos neutrófilos e sua atividade no cólon está linearmente relacionada à infiltração de neutrófilos. Essa enzima é muito utilizada para mensurar de forma qualitativa a infiltração de neutrófilos para tecido colônico inflamado (PATIL et al., 2012; KUMAR et al., 2014). Sob condições fisiológicas normais, a MPO é liberada a partir de grânulos de azurófilos, quando ocorre um processo inflamatório há o aumento da produção desta enzima (TAHAN et al., 2011).

Verificou-se que após 18 horas da indução da colite experimental por ácido acético a 6% foi detectado um aumento na concentração de mieloperoxidase no tecido intestinal em comparação aos grupos que receberam também a solução de ácido acético a 6% e foram analisados quanto a atividade de MPO em 6 e 24h depois da indução da colite. Diante destes resultados pode-se inferir, que após 18 horas da indução da colite ocorreu uma maior infiltração de neutrófilos para o tecido colônico. Esses dados corroboram diretamente com os danos teciduais macroscópicos e peso úmido dos cólons descritos anteriormente.

A atividade da mieloperoxidase em diferentes intervalos de tempo após indução da colite por ácido acético também foi investigada por Guazelli et al., (2013). Durante sua pesquisa foi utilizada uma concentração mais elevada de ácido acético (7,5%) para indução da colite em camundongos, e foram comparados os períodos de 12 e 18h após a administração do ácido. Foi observado um resultado similar aos encontrados no presente estudo de que a atividade da MPO foi superior em 18h após indução da colite.

Estudos têm indicado uma correlação entre a patogênese de colite ulcerativa com o estresse oxidativo em ensaios pré-clínicos e clínicos (D'ODORICO et al., 2001). Os leucócitos ativados apresentam capacidade de produzir radicais superóxido, ocasionando à produção de espécies reativas de oxigênio (ADIL et al., 2014; ASWAR et al., 2015). Experimentalmente, a colite induzida por ácido acético se caracteriza por danos oxidativos ocasionados pelo desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes (DRÖGE, 2002). Esse modelo de colite causa dilatação vascular, acumulação de neutrófilos, bem como um aumento no fluxo

sanguíneo, que conduz ao aumento da produção de oxigênio, conseqüentemente, uma produção excessiva de EROs (CLOSA; FOLCH-PUY, 2000; HARTMANN et al., 2012). As EROs foram relatadas em amostras colorretais de pacientes com colite ulcerativa (TÜZÜN et al., 2002; BITIREN et al., 2010)

Um importante sistema de defesa contra radicais livres é o grupo sulfidrílico não-protéico, conhecido como glutathiona. Amplamente distribuído em todos os tecidos biológicos e funciona como um antioxidante não-enzimático. O GSH é um tripeptídeo (*L*-g-glutamil-*L*-cisteinilglicina) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzima glutathiona peroxidase. O GSH inibe lesões oxidativas e as EROs diretamente através de seu grupo sulfidril e indiretamente como um co-fator ou como uma coenzima no processo de desintoxicação enzimática (SIVAPRASAD et al., 2004). O GSH desempenha um papel importante no transporte de aminoácidos e na síntese do DNA (RAYGUDE et al., 2012).

Os dados alcançados mostraram que a mensuração dos níveis de GSH após 18h da colite dos resultaram nos menores valores entre todos os grupos que receberam ácido acético (mensuração em 6, 18 e 24h após a colite). Assim, os níveis mais baixos de GSH apontam um maior consumo desta pelas EROs após 18 horas da indução da colite e um conseqüente um excessivo estresse oxidativo neste período.

De maneira semelhante aos dados obtidos neste estudo, Tahan et al. (2011), e Khandare et al. (2012), verificaram que a indução de colite por ácido acético a 4% produziu um significativo decréscimo nas concentrações de GSH colônico em animais que foram submetidos a colite.

O aumento da oxidação e peroxidação lipídica é uma característica importante do modelo de colite induzida por ácido acético, sendo a peroxidação lipídica mensurada pela concentração de malondialdeído no tecido inflamado (KUMAR et al., 2014). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica por via enzimática, derivado da ruptura de ácidos graxos poli-insaturados, sendo utilizado como indicador de dano oxidativo para células e tecidos (DENG et al., 2013; SADAR et al., 2016).

As investigações desta pesquisa mostraram que após 18 horas da indução da colite houve aumento significativo dos níveis de MDA na mucosa intestinal em relação aos grupos que receberam igual concentração de ácido acético a 6% e

analisados em 6 e 24 horas após administração do ácido. Esses achados refletem o pico de estresse oxidativo desse modelo experimental ocorrendo em torno de 18 horas após indução da colite.

Corroborando com o exposto acima, de acordo com os estudos de Harputluoglu et al., (2006), Kandhare et al., (2012) e Kuznietsova et. al., (2016), a administração intrarretal de ácido acético a 4% causou aumento da concentração de malondialdeído no tecido intestinal durante a colite experimental.

A administração de ácido acético a 6% no cólon foi eficiente em provocar colite nos animais testados. Por apresentar um efeito significativo do aumento das lesões macroscópicas e peso úmido dos cólons, aumento da atividade da enzima mieloperoxidase, consumo de GSH e elevação da concentração de MDA após 18h após indução da colite. Desta maneira, sugere-se que o ácido acético a 6% foi eficaz em induzir colite nos animais dos diferentes grupos e, aliado aos resultados obtidos infere-se que o pico inflamatório do modelo experimental se dê 18h após a sua administração. Por isso, esse intervalo de tempo foi utilizado nos demais ensaios por representar o melhor período de avaliação dos diferentes parâmetros inflamatórios durante a colite induzida por ácido acético.

Após a padronização do modelo experimental de colite por ácido acético, e o estabelecimento do pico inflamatório desse modelo experimental foram realizados os ensaios para avaliar a resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 pela administração do McN-A-343 (agonista muscarínico do receptor M1) e pela utilização da pirenzepina (antagonista do receptor muscarínico M1) para confirmar o envolvimento deste receptor na resposta anti-inflamatória durante a colite induzida por ácido acético a 6% em camundongos.

Os resultados da modulação farmacológica do receptor muscarínico M1 sugerem uma resposta anti-inflamatória mediada por este receptor. Tal resposta foi observada pela ação do agonista muscarínico M1, o fármaco McN-A-343 na dose 1,5 mg/kg, administrado por via intraperitoneal. Este apresentou capacidade de reduzir as pontuações de escores macroscópicas de lesão inflamatória e o peso úmido do cólon de animais que sofreram colite quando comparados aos animais do grupo que receberam somente ácido acético. Esta ação foi também apontada através do uso da droga pirenzepina, pois quando foi realizada a coadministração de McN-A-343 e pirenzepina ocorreu um aumento nas pontuações macroscópicas de lesão e do peso úmido dos cólons quando comparados aos animais que receberam

o agonista, se assemelhando aos resultados obtidos com o grupo ácido acético, o que mostra que a inibição do efeito do agonista M1 bloqueou o efeito anti-inflamatório.

Resultados similares foram encontrados nos estudos de Munyaka et al., (2014), na qual a administração intra-cérebro-ventricular de McN-A-343 durante a colite induzida por ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) diminuiu os escores macroscópicos de lesão do cólon e a relação peso comprimento do cólon, proporcionando uma melhora da gravidade da colite. Tal resultado, assim como os achados neste trabalho, mostram o efeito anti-inflamatório do agonista do receptor muscarínico M1 no modelo experimental de colite. A diferença entre os estudos de Munyaka et al. (2014) e o presente estudo se dá basicamente pelo fato da ação anti-inflamatória do agonista muscarínico ter ocorrido em nível central e no nosso estudo a resposta ter ocorrido em nível periférico. No entanto, a possibilidade de controlar a inflamação por administração periférica de agonistas muscarínicos ainda é pouco explorada.

O aumento dos escores macroscópicos e do peso do cólon está associado com grau de inflamação local, visto pela hiperemia da mucosa, magnitude do edema, espessamento muscular, ulceração e infiltrado celular (THIPPESWAMY et al., 2011). Estes parâmetros são indicativos da gravidade e extensão da doença (D'ARGENIO et al., 2012). O processo inflamatório intestinal envolve uma série de eventos celulares e moleculares que resultam no aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Estes eventos promovem a migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como citocinas presentes em macrófagos, linfócitos e outros tipos de células que servem para iniciar e amplificar o processo inflamatório (WITAICENIS, 2010).

Considerando que a enzima mieloperoxidase está contida em grânulos de neutrófilos, sendo associada à lesão tecidual, inflamação e infiltração de neutrófilos em tecidos gastrointestinais (NUSSBAUM et al., 2013; ODOBASIC et al., 2016). Entende-se que uma substância que cause diminuição na atividade desta enzima diminua a infiltração neutrofílica e conseqüentemente o processo inflamatório no intestino. Em conformidade com os outros resultados já encontrados na avaliação dos escores macroscópicos de lesão, peso úmido do cólon, a ativação do receptor muscarínico M1 através do tratamento com McN-A-343 reduziu a atividade da enzima MPO. Não obstante, a administração do agonista muscarínico M1

juntamente com a pirenzepina reverteram o efeito da diminuição da atividade desta enzima. Com isso indica-se que a ativação do receptor M1 promove uma diminuição na migração de neutrófilos para o sítio da lesão, sendo importante para proteção intestinal frente aos danos causados pela colite induzida por ácido acético.

Para se confirmar os resultados observados através dos escores macroscópicos de lesão, peso úmido e da atividade da mieloperoxidase no tecido intestinal, foi realizada a avaliação histopatológica do tecido inflamado do cólon. O modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético resulta em inflamação e ulceração no revestimento do cólon, visto histologicamente como destruição da arquitetura da mucosa, necrose, perda de células epiteliais, hemorragia e intensa infiltração de neutrófilos (ÖZEN et al., 2017).

Os dados histológicos obtidos evidenciam que o McN-A-343 atenuou de forma significativa a gravidade das lesões intestinais, por provocar uma evidente reorganização da camada mucosa, redução do edema, preservação das células epiteliais e das células caliciformes e diminuição do infiltrado celular. Ainda, foi observado na avaliação histopatológica que a pirenzepina provocou efeito contrário; o antagonista do receptor muscarínicos M1 quando administrado juntamente com McN-A-343 inibiu a ação anti-inflamatória mediada pela ativação do receptor muscarínico M1.

Resultado similar foi observado no estudo de Ji et al, (2014), no qual a administração central de McN-A-343 no modelo de colite induzido por dextrano sulfato de sódio (DSS), resultou numa redução dos escores macroscópicos de lesão, da atividade de MPO e dos escores histopatológicos do tecido colônico. Outro estudo de sobre ação anti-inflamatória do sistema colinérgico mostraram os efeitos benéficos da administração intraperitoneal de nicotina e da huperzina A (inibidor da acetilcolinesterase) sobre a inflamação colônica no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos através da redução dos danos macroscópicos e microscópicos de lesão e da atividade da mieloperoxidase no tecido intestinal (KOLGAZI et al., 2013).

Uma das principais características da colite ulcerativa é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio na mucosa colorretal, tais como superóxido e peróxido de hidrogênio, que são responsáveis por promoverem efeitos deletérios sobre proteínas e lipídeos teciduais (DAMIANI et al., 2007). Esta evidência sugere que a inflamação produz altos níveis de oxidantes que provavelmente

excedem a baixa capacidade antioxidante levando a ruptura de células epiteliais (KEEBLE, 2009).

Neste estudo, observou-se que o agonista do receptor muscarínico M1 diminui o consumo de glutatona e reduziu o nível de malonildialdeído na mucosa intestinal após o processo de colite. Porém, esta ação foi inibida pela coadministração de McN-A-343 e pirenzepina que resultou em alto consumo de GSH e aumento dos níveis de MDA de maneira semelhante ao grupo que sofreu colite e não recebeu nenhum tratamento. Dessa forma, observa-se que o agonista do receptor muscarínico M1 pode estar agindo por diminuir na produção de radicais livres e/ou aumento da produção de antioxidantes endógenos. Corroborando com estes resultados referente redução do estresse oxidativo mediado pelo sistema colinérgico, foi visto que o tratamento com nicotina e da huperzina A no modelo experimental de colite resultou numa redução da produção de EROs (KOLGAZI et al., 2013). Portanto, vê-se que o sistema colinérgico apresenta um papel antioxidante importante para restaurando a integridade do tecido inflamado.

A disfunção na regulação da imunidade intestinal, e uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias por infiltração de macrófagos ativados são amplamente documentadas, como sendo o pilar da iniciação e perpetuação da colite ulcerativa (SUN et al., 2013). Em condições inflamatórias, o recrutamento de neutrófilos na mucosa do cólon é regulado por uma série de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (KOBAYASHI, 2007; AL-REJAIE et al., 2013). A citocina IL-1 β é um agente pró-inflamatório produzido pelos macrófagos, monócitos e células dendríticas (GUAZELLI et al., 2013).

Na presente pesquisa, o ácido acético administrado a 6% por via intracolônica aumentou os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β na mucosa intestinal comparado aos níveis encontrados para o grupo controle negativo; enquanto que, a administração intraperitoneal de McN-A-343 reduziu esse efeito. Em contraste, a administração do antagonista do receptor muscarínico M1, a pirenzepina, bloqueou o efeito McN-A-343 quando administrado junto com este agonista. Diante disso, sugere-se mais uma vez o potencial anti-inflamatório mediado pelo receptor muscarínico M1. Este receptor pode possivelmente por inibir a síntese e/ou liberação da citocina IL-1 β .

A liberação de citocinas é um constituinte importante da resposta inflamatória desencadeada durante a infecção ou danos aos tecidos. No entanto, a

superprodução de IL-1 β , TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e diversas células imunológicas de forma sistêmica pode ser deletéria e associada ao desenvolvimento de distúrbios inflamatórios (TRACEY, 2002). Portanto, inibir a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias é uma importante estratégia terapêutica para pacientes com doenças de cunho inflamatório, como a colite ulcerativa.

Recentemente, foi demonstrado que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica em nível central alivia a gravidade da colite e suprime os níveis de citocinas pró-inflamatórias colônicas, tais como IL-6, IL-1 β e TNF- α . Ainda foi visto, que o efeito benéfico da ativação colinérgica central pela administração do agonista muscarínico M1, McN-A-343 no curso da colite induzida por DNBS foi completamente abolido na ausência do nervo vago ou esplênico (MUNYAKA et al., 2014).

Os receptores muscarínicos são uma família de receptores acoplados a proteína G que têm um papel primário na neurotransmissão colinérgica. Agonistas específicos podem ativar os receptores muscarínicos pós-sinápticos a estimular a sinalização colinérgica. A administração central de McN-A-343 resultou numa inibição dos níveis sistêmicos da citocina IL-1 β no modelo de colite por Dextrano Sulfato de Sódio (DSS) (JI et al., 2014), e no estudo de Pavlov et al., (2006) a administração do agonista muscarínico M1, o McN-A-343 apresentou uma redução da concentração da citocina TNF- α induzida pela endotoxina. Sendo, estes efeitos protetores dependentes do nervo vago e da sinalização do nervo esplênico.

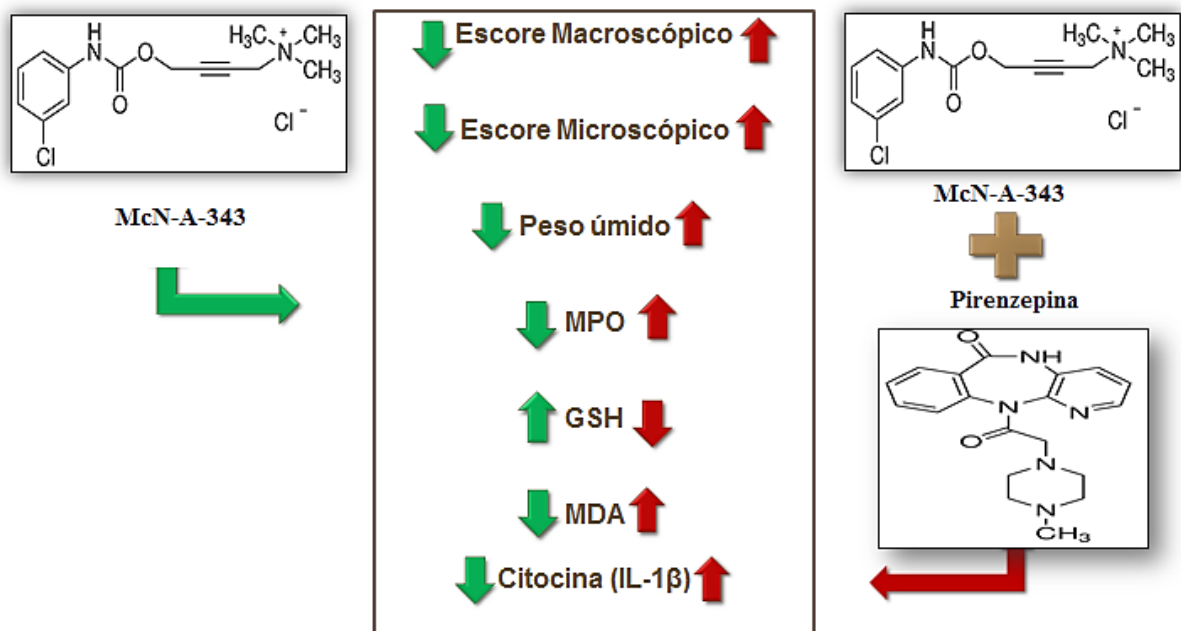
Rosas-Ballina et al., (2015) mostraram que a administração periférica de xanomelina (agonista muscarínico M1 com ação central) promove uma interação neuro-imune, resultando em mecanismo de proteção anti-inflamatória. Nesta interação, a ativação colinérgica central através do receptor muscarínico está associada à sinalização do nervo vago e do nervo esplênico, promovendo uma diminuição de citocinas pró- inflamatórias periféricas durante a endotoxemia. Estes dados confirmam os resultados encontrados neste estudo, pois sugerem a eficácia anti-inflamatória de um agonista muscarínico M1 de ação central, o que abre precedente para uma possível ação também periférica, e dessa forma, representar uma abordagem no tratamento de condições inflamatórias. Portanto, os dados demonstram a importância de uma via endógena no combate a injúria intestinal,

podendo esta via representar uma nova alternativa terapêutica promissora para pacientes com colite ulcerativa.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o ácido acético a 6% foi eficaz em induzir a colite ulcerativa, e que o pico inflamatório deste modelo ocorre após de 18h da indução. Este trabalho ainda infere que a modulação do sistema colinérgico pelo agonista do receptor muscarínico M1 reduziu a inflamação colônica induzida pelo ácido acético. Tal fato, foi visto pela ação do McN-A-343, que foi eficiente em diminuir as pontuações macroscópicas e microscópicas de lesão inflamatória e o peso úmido do cólon, a atividade da MPO, a concentração da citocina IL-1 β , dos níveis de MDA e preservou as concentrações de GSH no tecido intestinal. Em contraste, o bloqueio do receptor muscarínico M1 pela pirenzepina inibiu os efeitos farmacológicos de McN-A-343. As ações mediadas pelo receptor muscarínico M1 são mostradas na figura 16.

Figura 16. Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 no modelo experimental de colite por ácido acético



As setas verdes indicam a ação anti-inflamatória e antioxidante do McN-A-343 nos ensaios farmacológicos da colite induzida experimentalmente e as setas vermelhas indicam o bloqueio desse efeito pela utilização do antagonista do receptor muscarínico M1, a pirenzepina. Fonte: autoria própria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADIL, M.; VISNAGRI, A.; KUMAR, V. S.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Protective effect of naringin on sodium arsenite induced testicular toxicity via modulation of biochemical perturbations in experimental rats. **Pharmacology**, v. 5, p. 222-34, 2014.

AL HADITHY, A. F.; DE BOER, N. K.; DERIJKS, L. J.; ESCHER, J. C.; MULDER, C. J.; BROUWERS, J. R. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, n. 4, p. 282-297, 2005.

AL-REJAIE, S.; ABUOHASHISH, H. M.; AL-ENAZI, M. M.; AL-ASSAF, A. H.; PARMAR, M.Y.; AHMED, M. M. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 34, p. 5633-5644, 2013.

AMIRSHAHROKHI, K.; BOHLOOLI, S.; CHINIFROUSH, M. M. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, n. 3, p. 197-202, 2011.

APPLEYARD, C. B.; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal Physiology**, v. 269, p. 119-25, 1995.

ARDIZZONE, S.; PORRO, G. B. Comparative tolerability of therapies for ulcerative colitis. **Drug Safety**, v. 25, n. 8, p. 561-582, 2002.

ASWAR, U. M.; KANDHARE, A. D.; MOHAN, V.; THAKURDESAI, P.A. Anti-allergic effect of intranasal administration of type-A procyanidin polyphenols based standardized extract of cinnamon bark in ovalbumin sensitized BALB/c mice. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 423-33, 2015.

BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 23, p. 365-9, 2007.

BAMIAS, G.; KAL TSA, G.; LADAS, S. D. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Discovery Medicine**, v. 60, p. 459-467, 2011.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p.1641-57, 2007.

BERNSTEIN, C. N.; SHANAHAN, F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 57, p, 1185-1191, 2008.

BITIREN, M.; KARAKILCIK, A. Z.; ZERIN, M.; OZARDALI, I.; SELEK, S.; NAZLIGÜL, Y.; OZGONUL, A.; MUSA, D.; UZUNKOY, A. Protective effects of selenium and vitamin E combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. **Biological Trace Element Research**, v. 136, p. 87-95, 2010.

BOEING, H.; BECHTHOLD, A.; BUB, A.; ELLINGER, S.; HALLER, D.; KROKE, A. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-63, 2012.

BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-462, 2000.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60 n.3, p. 618-622, 1982.
BROWNING, K. N.; VERHEIJDEN, S.; BOECKXSTAENS, G. E. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. **Gastroenterology**, v. 152, p. 730-744, 2017.

BURGER, D.; TRAVIS, S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1827-1837, 2011.

BUSSEROLLES, J.; PAYÁ, M.; D'AURIA, M. V.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J. Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n.10, p. 1433-40, 2005.

CAMERON, H. L.; PERDUE, M. H. Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 47-56, 2007.

CARVALHO, P. B.; COTTER, J. Mucosal Healing in Ulcerative Colitis: A Comprehensive Review. **Drugs**, v. 77, n. 2, p. 159-173, 2017.

CASSINOTTI, A.; TRAVIS, S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 15 n. 8, p. 1264-75, 2009.

CETINKAYA, E.; BULBULOGLU, E. B.; KURUTAS.; CIRALIK H.; KANTARCEKEN B.; BUYUKBESE M. A. Beneficial effects of Nacetylcysteine on acetic-acid induced ulcerative colitis in rats, J. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 206, 131-139, 2005.

CHOI, C. H.; MOON, W.; KIM, Y.S.; KIM, E. S.; LEE, BI.; JUNG, Y.; YOON, Y. S.; LEE, H.; PARK, DI.; HAN, D. S. IBD Study Group of the Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. Second Korean guidelines for the management of ulcerative colitis. **Intestinal Research**, v. 15, n. 1, p. 7-37, 2017.

CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **IUBMB Life**, v. 56, p. 185-191, 2004.

COHEN, R. D.; YU, A. P.; WU, E. Q.; XIE, J.; MULANI, P. M.; CHAO, J. Systematic review: the costs of ulcerative colitis in Western countries. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 31, n. 7, p. 693-707, 2010.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmun Reviews**, v. 13, p. 463-466, 2014.

COOKE, H. J. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 915, p. 77-80, 2000.

D'ARGENIO, G.; MAZZONE, G.; TUCCILLO, C.; RIBECCO, M. T.; GRAZIANI, G.; GRAVINA, A. G.; CASERTA, S.; GUIDO, S.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N.; ROMANO, M. Apple polyphenols extract (APE) improves colon damage in a rat model of colitis. **Digestive and Liver Disease**, v. 44, p. 555-562, 2012.

DAMIANI, C. R.; BENETTON, C. A.; STOFFEL, C.; BARDINI, K. C.; CARDOSO, V. H.; DI GIUNTA, G.; PINHO, R. A.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. Oxidative stress and metabolism in animal model of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 1846-1851, 2007.

DE JONGE, W. J.; ULLOA, L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 915-529, 2007.

DEVKOTA, S.; WANG, Y.; MUSCH, M. W.; LEONE, V.; FEHLNER-PEACH, H.; NADIMPALLI, A.; DIONYSIOS, A.; ANTONOPOULOS, B. J.; EUGENE, B. C. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. **Nature**, v. 487, p. 104-8, 2012.

DILEK, Ö.; CANSU, B. A.; ANIL, Ö.; OKTAYB., E.; YUNUS, B.; TUNAHAN, S.; DILEK, A.; MERAL, Y.; ÖZGÜR, K. C. Protective effect of alpha -lipoic acid, aerobic or resistance exercise from colitis in second hand smoke exposed young rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 1, p. 62-70, 2017.

D'ODORICO, A.; BORTOLAN, S.; CARDIN, R.; D'INCA, R.; MARTINES, D.; FERRONATO, A.; STURNIOLO, G. C. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 6, p. 1289-94, 2001.

DHAWAN, S.; HIEMSTRA, I. H.; VERSEIJDEN, C.; HILBERS, F. W.; TE VELDE, A. A.; WILLEMSSEN, L. E.; STAP, J.; DEN HAAN, J. M.; DE JONGE, W. J. Cholinergic receptor activation on epithelia protects against cytokine-induced barrier dysfunction. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 4, p. 846-59, 2015.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, v. 48, p. 526-35, 2001.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 26, p. 219-233, 2006.

EGLIN, R.M. Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function. **Life Sciences**, v. 23, p. 2573-8, 2001.

EKBOM, A. The changing faces of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Inflammatory bowel Disease from bench to bedside**, v. 2, p. 5-20, 2003.

EL-ABHAR, H.S.; HAMMAD, L.N.; GAWAD, H.S. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 367-372, 2008.

FANTINI, A. J. Myrrh attenuates oxidative and inflammatory processes in acetic FAUBION, W. A. JR.; LOFTUS, E. V JR.; HARMSSEN, W. S.; ZINSMEISTER, A. R.; SANDBOM, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. **Gastroenterology**, v. 121 n.2, p. 255-60, 2001.

FIGUEROA, K. W.; SUGA, H.; EHLERT, F. J. Investigating the interaction of McN-A-343 with the M1 muscarinic receptor using its nitrogen mustard derivative and ACh mustard. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 1534–1549, 2010.

FORSGREN, S.; ALFREDSON, H.; BJUR, D.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; NORRGÅRD, Ö.; DALÉN, T.; DANIELSON, P. Novel information on the non-neuronal cholinergic system in orthopedics provides new possible treatment strategies for inflammatory and degenerative diseases. **Orthopedic Reviews**, v. 30, n. 1, 2009.

FOUSER, L. A.; WRIGHT, J. F.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 87-102, 2008.

FUMERY, M.; DURICOVA, D.; GOWER-ROUSSEAU, C.; ANNESE, V.; PEYRIN-BIROULET, L.; LAKATOS, P. L. Review article: the natural history of paediatric-onset ulcerative colitis in population-based studies. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 43, p. 346-355, 2016.

GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sciences**, v. 80, p. 2325-2329, 2007.
GÁLVEZ, J. Review Article: Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN Inflammation**, 2014.

GARCIA-RODRIGUEZ, L. A.; RUIGOMEZ, A.; PANES, J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1588-1594, 2006.

GAYA, D. R.; RUSSELL, R. K.; NIMMO, E. R.; SATSANGI, J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? **Lancet**, v. 367, p. 1271-84, 2006.

GENERINI, S.; GIACOMELLI, R.; FEDI, R.; FULMINIS, A.; PIGNONE, A.; FRIERI, G.; DEL ROSSO A.; VISCIDO A.; GALLETTI B.; FAZZI M.; TONELLI F.; MATUCCI-CERINIC M. Infliximab in spondyloarthritis associated with Crohn's disease: an

open study on the efficacy of inducing and maintaining remission of musculoskeletal and gut manifestations. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. 1664-1669, 2004.

GHIA, J. E.; COLLINS, S. M. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**, v. 131, p. 1122-1130, 2006.

GIRLICH, C.; SCHOLMERICH, J. Topical delivery of steroids in inflammatory bowel disease. **Current Drug Delivery**, v. 9, n. 4, p. 345-9, 2012.

GISBERT, J. P.; GOMOLLÓN, F.; MATÉ, J.; PAJARES, J. M. Role of 5-aminosalicylic acid (5-asa) in treatment of inflammatory bowel disease: a systemic review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47 n.3, p. 471-488, 2002.

GOVERSE, G.; STAKENBORG, M.; MATTEOLI, G. The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway. **The Journal of Physiology**, v. 15, n. 20, p. 5771-5780, 2016.

GREEN, L.C.; WAGNER D. A.; GLOGOWSKI J.; SKIPPER P. L.; WISHNOK J. S.; TANNENBAUM S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982. 2010.

GUAZELLI, C. F. S.; FATTORI, V.; COLOMBO, B. B; GEORGETTI, S. R. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 200–208, 2013.

HABERBERGER, R.; SCHULTHEISS, G.; DIENER, M. Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. **European Journal of Pharmacology**, v. 530; p. 229-233, 2006.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, p. 3-9, 2006.

HARPUTLUOĞLU, M. M.; DEMIREL, U.; YÜCEL, N.; KARADAĞ, N.; TEMEL, I.; FIRAT, S.; ARA, C.; ALADAĞ, M.; KARINCAOĞLU, M.; HILMIOĞLU, F. The effects of Gingko biloba extract on acetic acid-induced colitis in rats. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, v. 17, p. 177-182, 2006.

HARRINGTON, A. M.; PECK, C. J.; LIU, L.; BURCHER, E.; HUTSON, J. M.; SOUTHWELL, B. R. Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. **Neurogastroenterology Motility**, v. 22, p. 999-263, 2010.

HARTMANN, R. M.; MORGAN MARTINS, M. I.; TIEPPO, J.; FILLMANN, H. S.; MARRONI, N. P. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, p. 2038-2044, 2012.

HIGUCHI, L. M.; KHALILI, H.; CHAN, A. T.; RICHTER, J. M.; BOUSVAROS, A.; FUCHS, C. S. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. **American Journal Gastroenterology**, v. 107 n. 9, p. 1399-406, 2012.

HINDRYCKX, P.; JAIRATH, V.; D'HAENS, G. Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management. **Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology**, v. 13, n. 11, p. 654-664, 2016.

HOLTMANN, M. H.; GALLE, P. R. Current concept of pathophysiological understanding and natural course of ulcerative colitis. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, p. 341-9, 2004.

HVIID, A.; SVANSTROM, H.; FRISCH, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. **Gut**, v. 60, p. 49-54, 2011.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 313-325, 2012.

ISOZAKI, Y.; YOSHIDA, N.; KURODA, M.; TAKAGI, T.; HANDA, O.; KOKURA, S.; ICHIKAWA, H.; NAITO, Y.; OKANOUE, T.; YOSHIKAWA, T. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 17, p. 497-502, 2006.

JANTCHOU, P.; MOROIS, S.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; CARBONNEL, F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study. **American Journal Gastroenterology**, v. 105, n. 10, p. 2195-201, 2010.

JI, H.; RABBI, M. F.; LABIS, B.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J.; GHIA, J. E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. **Mucosal Immunology**, v. 7(2), p. 335-47, 2014.

JONGE W.J.; ULLOA L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 15; p. 915-929, 2007.

KANDHARE, A. D.; RAYGUDE, K. S.; GHOSH, P.; GHULE, A. E.; GOSAVI, T. P.; BADOLE, S. L.; BODHANKAR, S. L. Effect of hydroalcoholic extract of Hibiscus rosa sinensis Linn. leaves in experimental colitis in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 337-344, 2012.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v. 74, p. 675-96, 2003.

KEEBLE, J. E.; BODKIN, J. V.; LIANG, L.; WODARSKI, R.; DAVIES, M.; FERNANDES, E. S.; COELHO, C. F.; RUSSELL, F.; GRAEPEL, R.; MUSCARA, M. N.; MALCANGIO, M.; BRAIN, S. D. Hydrogenperoxide is a novel mediator of

inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanism. **Pain**, v. 141 p.135–142, 2009.

KHAN, M. R. I.; ANISUZZAMAN, A. S. M.; SEMBA, S. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. **Journal Gastroenterology**, v. 48; p. 885-896, 2013.

KIRKPATRICK, C.; BITTINGER, F.; NOZADZE, K.; WESSLER, I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells, **Life Sciences**. v. 72, p. 2111-2116, 2003.

KISIEL, J. B.; KONIJETI, G. G.; PISCITELLO, A. J. CHANDRA, T. GOSS, T. F.; AHLQUIST, D. A. FARRAYE, F. A. ANANTHAKRISHNAN, A. N. Stool DNA Analysis is Cost-Effective for Colorectal Cancer Surveillance in Patients With Ulcerative Colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**., v. 14, p. 1778-1787, 2016.

KOLGAZI, M.; USLU, U.; YUKSEL, M.; VELIOGLU-OGUNC, A.; ERCAN, F.; ALICAN, I. The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, n. 1, p. 72-80, 2013.

KONDO, T.; NAKAJIMA, M.; TERAOKA, H.; UNNO, T.; KOMORI, S.; YAMADA, M.; KITAZAWA, T. Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: Functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 236-243, 2011.

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D. B. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 105, p. 501-523, 2010.

KUMAR, V. S.; RAJMANE, A. R.; ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of endogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 2, p. 132-145, 2014.

KUZNIETSOVA, H. M.; YENA, M. S.; KOTLYAR, I. P.; OGLOBLYA, O. V.; RYBALCHENKO, V. K. Anti-Inflammatory Effects of Protein Kinase Inhibitor Pyrrol Derivate. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

LI, M. C.; HE, S. H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World Journal Gastroenterology**, v. 10, p. 620-625, 2004.

LOGAN, I.; BOWLUS, C. L. The geoepidemiology of autoimmune intestinal disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. 372-8, 2010.

LUO, J.; CAO, J.; JIANG, X.; CUI, H. Effect of low molecular weight heparin rectal suppository on experimental ulcerative colitis in mice. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, n. 7, p. 441-445, 2010.

MALTZMAN, J. S.; KORETZKY, G.A. Azathioprine: old drug, new actions. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n. 8, p.1122-4, 2003.

MEIER, J.; STURM, A. Current treatment of ulcerative colitis. **World Journal Gastroenterology**, v. 17, p. 3204-3212, 2011.

MENDES, T. C. F.; RAIMUNDO, J. M.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M.; FRAGA, C. A.M.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 70–74, 2009.

MEYER, R.; FREITAG-WOLF, S.; BLINDOW, S.; BÜNING, J.; HABERMANN, J. K. Combining aneuploidy and dysplasia for colitis' cancer risk assessment outperforms current surveillance efficiency: a meta-analysis. **International Journal Colorectal Disease**. 2016.

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

MINAIYAN, M.; ASGHARI, G.; SADRAEI, H.; FEILI, E. Anti-inflammatory effect of *Pycnocyclus spinosa* extract and its component isoacetovanillone on acetic acid induced colitis in rats. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 345-355, 2015.

MINAIYAN, M.; ASGHARI, G.; TAHERI, D.; SAEIDI, M.; NASR-ESFAHANI, S. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on acetic acid induced acute colitis in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, p. 127-136, 2014.

MITCHELSON, F. J. The pharmacology of McN-A-343. **Pharmacology e Therapeutics**. v. 135, p. 216-245, 2012.

MOLODECKY, N.; A, SOON, I. S.; RABI, D. M.; GHALI, W. A.; FERRIS, M.; CHERNOFF, G.; BENCHIMOL E.I.; PANACCIONE R.; GHOSH S.; BARKEMA H. W.; KAPLAN G. G. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**. v. 142, n. 1, p. 46-54, 2012.

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

MUNYAKA, P.; RABBI, M. F.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Central Muscarinic Cholinergic Activation Alters Interaction between Splenic Dendritic Cell and CD4+CD25- T Cells in Experimental Colitis. **Plos One**. v. 9, n. 10, 2014.

NAJAFI, A.; MOTAGHI, E.; HOSSEINI, M. J.; GHASEMI-PIRBALUTI, M. The effect of sodium valproate on acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammopharmacology**, v. 25, p.137-145, 2017.

NUSSBAUM, C.; KLINKE, A.; ADAM, M.; BALDUS, S.; PERANDIO, M. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v, 18, n. 6, p. 692-713, 2013.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; HOLDSWORTH, S. R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

OLIVEIRA, F. M.; EMERICK, A. P. C.; SOARES, E. G. Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais State. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, n.1, p. 1031-1037, 2010.

ÖZYURT, H.; ÖZDEN, A. S.; ÇEVİK, Ö.; ÖZGEN, Z.; CADIRCI, S.; ELMAS, M. A.; ERCAN, F.; ŞENER, G.; GÖREN, M. Z. Investigation into the role of the cholinergic system in radiation-induced damage in the rat liver and ileum. **Journal of Radiation Research**, v. 55, n. 5, p. 866-75, 2014.

PAOLUZI O. A.; PICA R.; MARCHEGGIANO A.; CRISPINO P.; IACOPINI F.; IANNONI C.; RIVERA M.; PAOLUZI P. Azathioprine or methotrexate in the treatment of patients with steroid-dependent or steroid-resistant ulcerative colitis: results of an open-label study on efficacy and tolerability in inducing and maintaining remission. **Alimentary Pharmacology e Therapeutics**, v. 16, n. 10, p. 1751-1759, 2002.

PATIL, M. V. K.; KANDHARE, A. D.; BHISE, S. D. Anti-inflammatory effect of *Daucus carota* root on experimental colitis in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, p. 337-343, 2012.

PAUL, G.; KHARE, V.; GASCHÉ, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42 (1), p. 95-109, 2012.

PAVLOV, V. A.; OCHANI, M.; GALLOWITSCH-PUERTA, M.; OCHANI, K.; HUSTON, J. M.; CZURA, C. J.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 5219–5223, 2006.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Controlling Inflammation: the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 1037-1040, 2006.

PEARSON, C. Inflammatory bowel disease. **Clinical Advanced Nutrition**. v. 1009 n.9, p. 86-90, 2004.

PEDIANI, J. D.; WARD. R. J.; GODIN, A. G.; MARSANGO, S.; MILLIGAN, G. Dynamic Regulation of Quaternary Organization of the M1 Muscarinic Receptor by Subtype-selective Antagonist Drugs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 25, p. 13132-46, 2016.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p.417-429, 2002.

RADDATZ, D.; TOTH, S.; SCHWÖRER, H.; RAMADORI, G. Glucocorticoid receptor signaling in the intestinal epithelial cell lines IEC-6 and Caco-2: evidence of inhibition by interleukin-1beta. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 16, p. 377-383, 2001.

RANI, R.; SMULIAN, A. G.; GREAVES, D. R.; HOGAN, S. P.; HERBERT, D. R. TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 7, p. 2000-2009, 2011.

RAYGUDE, K. S.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; GHULE, A. E.; BODHANKAR, S. L. Evaluation of ameliorative effect of quercetin in experimental model of alcoholic neuropathy in rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 331-341, 2012.

REIFEN, R.; NISSENKORN, A.; MATAS, Z.; BUJANOVER, Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis, **Journal Gastroenterology**, v. 39, p. 514–519, 2004.

ROBERTS-THOMSON I.C.; FON J.; UYLAKI W.; CUMMINS A.G.; BARRY S. Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 6, p. 703-716, 2011.

ROESSNER, A; KUESTER, D; MALFERTHEINER P; SCHNEIDER-STOCK R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology, Research e Practice**, v. 204, n. 7, p.511-524, 2008.

ROSAS-BALLINA, M.; OLOFSSON, P. S.; OCHANI, M.; VALDES-FERRER, S. I.; LEVINE, Y. A.; REARDON, C.; TUSCHE, M. W.; PAVLOV, V. A.; ANDERSSON, U.; CHAVAN, S.; MAK, T. W.; TRACEY, K. J. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit, **Science**, v. 334, p. 98-101, 2011.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, p. 663-679, 2009.

ROSAS-BALLINA, M.; VALDÉS-FERRER, S. I.; DANCHO, M. E.; OCHANI, M.; KATZ, D.; CHENG, K. F.; OLOFSSON, P. S.; CHAVAN, S.S.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J.; PAVLOV, V. A. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 44, p. 19-27, 2015.

ROSZKOWSKI, A. P. An unusual type of sympathetic ganglion stimulant. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 132, p. 156-170, 1961.

ROSZKOWSKI, A. P.; YELNOSKY, J. Structure–activity relationships among a series of acetylenic carbamates related to McN-A-343. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 156, p. 238-245, 1967.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 313-23, 2009.

SADAR, S. S.; VYAWAHARE, N. S.; BODHANKAR, S. L. Ferulic acid ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis through modulation of cytokines, oxidative stress, inos, cox-2, and apoptosis in laboratory rats. **Excli Journal**, v. 15, p. 482-499, 2016.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. USA. Nature Publishing Group: **Gastroenterology & Hepatology**, v. 3 n. 7, p. 390-407, 2006.

SEDLAK J, LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25: p. 192-205, 1968.

SHANAHAN, F. Probiotics and inflammatory bowel disease: Is there a scientific rationale? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 6, n. 2, p. 107-115, 2000.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 18-23, 2004.

SOBCZAK, M.; FABISIAK, A.; MURAWSKA, N. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**. v. 66, p. 766-775, 2014.

SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immuno pathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, p. 13-27, 2016.

SOUZA, M. M.; BELASCO, A. G. S.; AGUIAR-NASCIMENTO, J. E. Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença inflamatória intestinal do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, p. 324-328, 2008.

SUN, P.; ZHOU, K.; WANG, S.; LI, P.; CHEN, S.; LIN, G.; ZHAO, Y.; WANG, T. Involvement of MAPK/NF- κ B Signaling in the Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway in Experimental Colitis by Chronic Vagus Nerve Stimulation. **PLoS One**, v. 8 n. 8, 2013.

TAHAN, G.; GRAMIGNOLI, R.; MARONGIU, F.; AKTOLGA, S.; CETINKAYA A.; TAHAN, V.; DORKO, K. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 3, p. 715-720, 2011.

TAHAN, G.; AYTAC, E.; AYTEKIN, H.; GUNDUZ, F.; DOGUSOY, G.; AYDIN, S.; TAHAN, V.; UZUN, H. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Canadian Journal of Surgery**, v. 11, n. 54:p. 333-8, 2011.

TAVARES-MURTA, B. M.; DE RESENDE, A. D.; CUNHA, F. Q.; MURTA, E. F. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 138, p. 93-99, 2008.

THIPPESWAMY, B. S.; MAHENDRAN, S.; BIRADAR, M. I.; RAJ, P.; SRIVASTAVA, K.; BADAMI, S.; VEERAPUR, V. P. Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 100-105, 2011.

TIWARI, P.; DWIVEDI, S.; SINGH, M. P.; MISHRA, R.; CHANDY, A. Basic and modern concepts on cholinergic receptor. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3 n. 5, p. 413-420, 2013.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 289-296, 2007.

TRACEY, K. J. The Inflammatory Reflex. **Nature**. p. 420, p. 853-859, 2002.

TRAVIS, S. P. L.; STANGE, E. F.; LÉMANN, M.; ORESLAND, T.; BEMELMAN, W. A.; CHOWERS, Y. et al. European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 2 n. 1, p. 24-62, 2008.

TÜZÜN, A.; ERDİL, A.; INAL, V.; AYDIN, A.; BAĞCI, S.; YEŞİLOVA, Z.; SAYAL, A.; KARAEREN, N.; DAĞALP, K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 569-572, 2002.

VAN HEEL, D. A.; MCGOVERN, D. P. B.; JEWELL, D. P. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. **The Lancet**, v. 441, p. 1902-1904, 2001.

VARSHOSAZ, J.; EMAMI, J.; FASSIHI, A.; TAVAKOLI, N.; MINAIYAN, M.; AHMADI, F.; MAHZOUNI, P.; DORKOOSH, F. Effectiveness of budesonidesuccinatedextran conjugate as a novel prodrug of budesonide against acetic acid-induced colitis in rats. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 25, p. 1159-1165, 2010.

VASOVIC, M.; GAJOVIC, N.; BRAJKOVIC, D.; JOVANOVIC, M.; ZDRAVKOVAIC, N.; KANJEVAC, T. The relationship between the immune system and oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review. **Central European Journal Immunology**, v. 41, n. 3, p. 302-310, 2016.

VELOSO, F. T. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Do they influence treatment and outcome? **World Journal Gastroenterology**, v. 17 n.22, p. 2702-2707, 2011.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. **Archives of Gastroenterology**, v. 46, p. 20-25, 2009.

VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C. A.; ORJALES, A.; CASA, C. A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1731-1741, 2003.

WANG, H.; YU, M.; OCHANI, M.; AMELLA, C. A.; TANOVIC, M.; SUSARLA, S.; LI, J. H.; YANG, H.; ULLOA, L.; AL- ABED, Y.; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation, **Nature**, v, 421, 384-8, 2003.

WANG, J. C.; HINRICHS, A. L.; STOCK, H.; BUDDE, J. Evidence of common and specific genetic effects: association of the muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2) gene with alcohol dependence and major depressive syndrome. **Human Molecular Genetics**. v. 13, p. 1903-1911, 2004.

WESS, J.; EGLIN, R. M.; GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 721–733, 2007.

WESSLER, I.; KILBINGER, H.; BITTINGER, F. et al. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. **Life Sciences**, v. 72, p. 2055-2061, 2003.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal of Pharmacology**. v. 154, p. 1558-1571, 2008.

WITAICENIS, A. **Estudo comparativo dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos**. Botucatu: Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2010.

YADAV, P. K.; LIU, Z. Current strategies for the treatment of ulcerative colitis. **Recent Patents on Inflammation Allergy Drug Discovery**, v. 3, p. 65-72, 2009.

YANG. S. K.; LOFTUS JR, E. V.; SANDBORN, W. J. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 7, p. 260-270, 2001.

YOSHIKAWA, H.; KUROKAWA, M.; OZAKI, N.; NARA, K.; ATOU, K.; TAKADA, E.; KAMOCHI, H.; SUZUKI, N. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- κ B phosphorylation and nuclear factor- κ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor α 7. **Clinical e Experimental Immunology**, v. 146, p. 116-123, 2006.

ZHONG, W.; CHEBOLU, S.; NISSAR, A. Darmani Broad-spectrum antiemetic efficacy of the L-type calcium channel blocker amlodipine in the least shrew (*Cryptotis parva*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 120 p. 124–132, 2014.

ZHU, H.; LI, Y. R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 5, p. 474-80, 2012.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734, e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

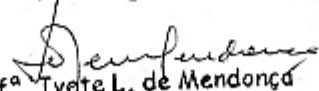


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **"Possível participação do sistema canabinoide no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo visceral do sistema colinérgico muscarínico na colite experimental induzida por ácido acético"**, protocolo nº **087/15**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da 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 **11/12/2015**.

Vigência do Projeto	30/12/2015 à 30/12/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/ <i>Swiss</i> .
Nº de Animais	210
Peso/ Idade	25-30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal do Piauí-UFPI

Teresina, 11 de Dezembro de 2015.


 Prof.^a **Ivetete L. de Mendonça**
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora