

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Rafaela Franco Claudino**

**ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS, ATUANDO ATRAVÉS  
DE RECEPTORES ET<sub>A</sub>, NA MANIFESTAÇÃO DOS SINTOMAS  
DE COLITE EXPERIMENTAL EM MODELOS MURINOS**

Florianópolis

2010



Rafaela Franco Claudino

**ENVOLVIMENTO DAS ENDOTELINAS, ATUANDO ATRAVÉS  
DE RECEPTORES ET<sub>A</sub>, NA MANIFESTAÇÃO DOS SINTOMAS  
DE COLITE EXPERIMENTAL EM MODELOS MURINOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Daniela Ferraz Pereira Leite

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C615e Claudino, Rafaela Franco

Envolvimento das endotelinas, atuando através de receptores eta, na manifestação dos sintomas de colite experimental em modelos murinos [tese] / Rafaela Franco Claudino ; orientador, Giles Alexander Rae , co-orientadora, Daniela Ferraz Pereira Leite. - Florianópolis, SC, 2010.

143 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Endotelinas. 3. Intestinos - Doenças - Inflamação. 4. Hiperalgesia. 5. Colite. I. Rae, Giles Alexander. II. Leite, Daniela Ferraz Pereira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

CDU 615

Dedico esta tese a minha família,  
em especial as minhas avós  
“Centenárias” Ita e Lena.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, ajudando a transpor os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Renato e Goreti por todo o apoio, incentivo, dedicação, paciência e principalmente pelo amor, que me deram durante minha vida. À minha irmã Renata e ao meu cunhado Emanuel por todo apoio e carinho. Sem vocês nada seria família Franco Claudino!

Ao meu orientador, Professor Dr. Giles Alexander Rae, meu especial agradecimento pela inestimável orientação que possibilitou meu crescimento científico e, sobretudo pelo apoio, paciência, incentivo e amizade, os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite, pela incondicional ajuda na realização deste trabalho e pelos momentos de discussão científica que certamente contribuíram muito para o meu crescimento profissional. Gostaria muito de agradecer também à grande amiga Dani Leite, pela amizade, carinho, paciência e ajuda incondicional, agora como amiga! Dani, você é o máximo!

A Juliana, uma grande amiga, colaboradora deste trabalho e agora professora da UFPR! Tenho muito orgulho de você! Muito obrigada pelo carinho, e pela força mesmo a distância.

Aos meus grandes amigos, colaboradores deste trabalho, Allisson e Rodrigo, pela amizade, apoio, pelos momentos de alegria, companheirismo e principalmente “suporte técnico” neste tempo em que trabalhamos juntos. Como eu sempre digo, não tenho palavras para agradecer! Vocês são meus grandes “irmãos”, não de sangue, mas de coração!

Ao meu grande amigo Carlos Vitor por toda a ajuda, pela presença constante mesmo a distância, pelo companheirismo, amizade e principalmente paciência. Amigo para a vida toda! Amo você!





A Maria Appel, minha grande amiga, pela amizade, companheirismo, apoio e ajuda incondicional nos momentos bons e ruins durante todo esse período. Você é a minha irmã que mora em Floripa!

Aos amigos que aqui conquistei e que, com carinho, compreensão, amizade e amor, contribuíram para a realização desta etapa da minha vida: Alessandra, Amélia, Edinéia, Emerson, Jarbas, Leandro, Maíra, Natália, Maria Fernanda, Rafael e Stefânia.

A mulherada do “Lab Giles”: Ana Paula, Cibelle, Daniela, Giselle, Lenyta, Samilla. Obrigada por todo o apoio, carinho e pela excelente convivência!

As meninas do “Lab Rosa”: Andreza, Cris, Mari e Paula pelos ótimos momentos que passamos juntas!

Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Prof. Dr. João Batista Calixto, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela rica convivência e por contribuir para minha formação.

Para todo o pessoal do LAFEX: Aline, Andrey, Ana Flávia, Cláudia, Diogo, Flávia, Gecioni, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Juliana Gonçalves, Katryn, Maíra Bicca, Marianne, Patrícia e Robson, pelo carinho, respeito e toda a ajuda!

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Diana, Pedro e Rita pela atenção e suporte.

Ao Jackson, agora noivo, pelo amor transmitido a cada dia, por dar significado à minha vida, pelo constante incentivo, apoio e companheirismo.

Ao Dariu, Elizabeth e Alexandre Carneiro que me acolheram em sua família com muito carinho, amor e respeito!

Ao meu amigo, cunhado, figura Leandro Carneiro, pela amizade e pelos momentos, de muita descontração, regados a muitas risadas, imprescindíveis na vida cotidiana.



Aos amigos “extra farmacologia”, que formam presença constante, por compartilhar os momentos de dificuldades bem como das minhas conquistas. Em especial à grande amiga Joice, uma pessoa tão especial, pelo carinho e companheirismo.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, por viabilizar a realização deste doutorado.

E por fim, a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e a todos àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.*

Mahatma Gandhi

## RESUMO

Embora alguns estudos impliquem as endotelinas na patogênese das doenças inflamatórias intestinais (IBDs), as evidências disponíveis sobre a participação destes mediadores na progressão ou na manutenção da resposta inflamatória do cólon ainda são escassas. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo investigar se o tratamento terapêutico com antagonistas seletivos para os receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> poderia reverter ou atenuar a progressão de sinais e sintomas da colite experimental induzida por TNBS em camundongos, incluindo a dor visceral associada a esta condição, bem como identificar alguns dos mecanismos de ação envolvidos. Também foi avaliado se o atrasentan (antagonista do receptor ET<sub>A</sub>) seria capaz de minimizar parâmetros inflamatórios em outro modelo experimental, o de colite causada por sulfato sódico de dextrana (DSS). A instilação de TNBS (1,5 mg por animal) induziu perda de peso corporal, alta mortalidade e danos macro e microscópicos no cólon, associados a acúmulo de neutrófilos, aumentos da atividade da enzima MPO, dos níveis de IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC, da expressão de moléculas de adesão e do RNAm para receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no cólon dos animais. O TNBS ainda reduziu os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-13, e alterou a expressão de RNAm para prepro ET-1 e prepro ET-2 no tecido, além de causar (na dose de 0,5 mg) hiperalgesia mecânica na parede abdominal e pata traseira. O tratamento com atrasentan (10 mg/kg/dia, e.v.), iniciado 24 h após o TNBS, reduziu marcadamente todos esses efeitos do TNBS, exceto as alterações de IL-13 e da expressão de RNAm para prepro ET-1 e prepro ET-2. Em contraste, em todos os ensaios com TNBS em que foi testado, o tratamento semelhante com A192621 (antagonista do receptor ET<sub>B</sub>) não mostrou qualquer efeito. O atrasentan foi ainda capaz de reduzir diversos parâmetros inflamatórios avaliados no modelo de DSS. Além disso, em leucócitos peritoniais estimulados com LPS *in vitro*, a produção de MIP-2 e KC por macrófagos e de KC (mas não IL-1 $\beta$ ) por neutrófilos foi bloqueada por um antagonista do receptor ET<sub>A</sub>. Este conjunto de resultados demonstra que o bloqueio seletivo do receptor ET<sub>A</sub> mostra-se eficaz em reduzir a inflamação colônica nos modelos de colite induzida por TNBS e DSS, sugerindo que antagonistas deste receptor possam ser úteis no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

**Palavras-chave:** Doenças Inflamatórias Intestinais. Endotelina. Hiperalgesia Mecânica. Colite.



## ABSTRACT

Although some studies have implicated endothelins in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBDs), the evidence available on the participation of these mediators in the progression or maintenance of colonic inflammation in such states is limited. Thus, the current study aimed to investigate if treatment with selective antagonists of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors could reduce or reverse the progression of signs and symptoms of experimental colitis induced by TNBS in mice, including visceral pain, as well as identify some of the putative mechanisms of action involved. The capacity of atrasentan (an ET<sub>A</sub> receptor antagonist) to reduce some symptoms of colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) was also assessed. TNBS instillation (1.5 mg/mouse) induced sustained body weight loss, high mortality and marked macro and microscopic damage of the colon, associated with enhanced colonic neutrophil infiltration, MPO activity, IL-1 $\beta$ , MIP-2 and KC levels, and expression of adhesion molecules and mRNA for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors. TNBS also reduced colonic levels of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-13, altered prepro ET-1 and prepro ET-2 mRNA levels and (at 24 h after 0.5 mg/mouse) induced mechanical hyperalgesia of the abdomen and hind paw. Treatment with atrasentan (10 mg/kg/day, i.v.), starting 24 h after TNBS administration, markedly reduced all these effects of TNBS, except the changes in IL-13 and in prepro ET-1 and prepro ET-2 mRNA levels. In contrast, similar treatment with A-192621 (an ET<sub>B</sub> receptor antagonist) failed to modify the effects of TNBS in all assays in which it was tested. Atrasentan treatment was also effective in reducing several inflammatory parameters in DSS-induced colitis. In addition, in cultured peritoneal leukocytes, the production of MIP-2 and KC by macrophages and of KC (but not IL-1 $\beta$ ) by neutrophils stimulated by incubation with LPS was reduced by an ET<sub>A</sub> receptor antagonist. Altogether, these results demonstrate that selective blockade of ET<sub>A</sub> receptors is effective in alleviating signs and symptoms of colonic inflammation in experimental colitis induced by TNBS e DSS, suggesting that antagonists of this receptor might constitute useful new candidates for the treatment of IBDs in humans.

**Keywords:** Inflammatory Bowel Diseases. Endothelin. Mechanical Hyperalgesia. Colitis.





## LISTA DE FIGURAS

pág.

<b>Figura 1</b> - Sistema imune associado ao trato gastrointestinal nas IBDs .....	8
<b>Figura 2</b> – Características histopatológicas de pacientes com DC ou UC.....	10
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática das estruturas e terminações nervosas na parede intestinal .....	13
<b>Figura 4</b> - Protocolo experimental .....	26
<b>Figura 5</b> - Quantificação do RNAm para os receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> e para as isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2 no cólon de camundongos após a colite induzida por TNBS .....	40
<b>Figura 6</b> - Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o dano macroscópico nos cólons de animais com colite induzida pelo TNBS .....	41
<b>Figura 7</b> - Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre a atividade da enzima mieloperoxidase nos cólons de animais com colite induzida pelo TNBS .....	42
<b>Figura 8</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos .....	43
<b>Figura 9</b> - Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o peso corporal de animais com colite induzida pelo TNBS .....	44
<b>Figura 10</b> - Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o aumento do peso do cólon de camundongos com colite induzida pelo TNBS .....	45
<b>Figura 11</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o dano microscópico colônico induzido pelo TNBS em camundongos .....	46
<b>Figura 12</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento dos níveis colônicos de IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 induzido pelo TNBS .....	48
<b>Figura 13</b> - Efeito do tratamento com antagonista do receptor ET <sub>A</sub> , Atrasentan, ou com a dexametasona sobre a redução dos níveis de IL-10 e IL-13, induzida no cólon dos animais, pelo TNBS .....	49
<b>Figura 14</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão E-selectina induzida pelo TNBS.....	50



<b>Figura 15</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão P-selectina induzida pelo TNBS .....	52
<b>Figura 16</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão $\beta 2$ integrina induzida pelo TNBS .....	53
<b>Figura 17</b> - Efeito da adição de ET-1 e ET-2 sobre a produção de MIP-2 e KC induzida por LPS em cultura de macrófagos .....	55
<b>Figura 18</b> - Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o receptor $ET_A$ e $ET_B$ sobre a produção de MIP-2 e KC induzida por LPS em cultura de macrófagos .....	55
<b>Figura 19</b> - Efeito da adição de ET-1 e ET-2 sobre a produção de IL-1 $\beta$ e MIP-2 induzida por LPS em cultura de neutrófilos .....	56
<b>Figura 20</b> - Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o receptor $ET_A$ e $ET_B$ sobre a produção de IL-1 $\beta$ e MIP-2 induzida pelo LPS em cultura de neutrófilos peritoneais .....	57
<b>Figura 21</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a quantificação do RNAm para os receptores $ET_A$ e $ET_B$ no cólon de camundongos após a colite induzida por TNBS .....	58
<b>Figura 22</b> - Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a quantificação do RNAm para as isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2 no cólon de camundongos após a administração do TNBS .....	59
<b>Figura 23</b> - Efeito da administração intracolônica de TNBS na sensibilidade dos camundongos à estimulação mecânica na região abdominal e na pata traseira .....	61
<b>Figura 24</b> - Influência dos tratamentos com Atrasentan, A-192621 ou morfina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen .....	62
<b>Figura 25</b> - Influência dos tratamentos com Atrasentan, A-192621 ou morfina na hiperalgesia mecânica referida na pata traseira .....	63
<b>Figura 26</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre o índice de atividade da doença (IAD) induzida por DSS em camundongos .....	64
<b>Figura 27</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre a perda de peso induzida por DSS em camundongos .....	65
<b>Figura 28</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre o encurtamento induzido por DSS do cólon de camundongos .....	66
<b>Figura 29</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano macroscópico no cólon de camundongos com colite induzida pelo DSS.....	67



<b>Figura 30</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon de animais com colite induzida por DSS .....	68
<b>Figura 31</b> - Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano microscópico no cólon de animais com colite induzida por DSS .....	69
<b>Figura 32</b> - Possíveis mecanismos de ação do Atrasentan na colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos .....	87



## LISTA DE TABELAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabela 1</b> - Características histopatológicas e clínicas das IBDs.....	12
<b>Tabela 2</b> - Grade de escores para avaliação do dano macroscópico na colite induzida por TNBS .....	27
<b>Tabela 3</b> - Grade de escores para avaliação do dano microscópico na colite induzida por TNBS.....	28
<b>Tabela 4</b> - Grade de escores para avaliação do dano macroscópico na colite induzida por DSS .....	30





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AT** - Atrasentan  
**CARD15** - Domínio de recrutamento de caspase 15  
**CD** - Doença de Crohn  
**DAB** - 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico  
**DEX** - Dexametasona  
**DMEM** - Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco  
**DNA** - Ácido desoxirribonucléico  
**DNAc** - Ácido desoxirribonucléico complementar  
**DNBS** - Ácido dinitrobenzeno sulfônico  
**dNTPs** - Deoxinucleotídeos  
**DSS** - Sulfato de dextrana sódica  
**DTT** - Ditioneitol  
**ECE** - Enzima conversora de endotelina  
**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético  
**ET-1** - Endotelina-1  
**ET-2** - Endotelina-2  
**e.v.** - Endovenoso  
**H&E** - Hematoxilina e eosina  
**HTAB** - Hexadeciltrimetilamônio  
**IAD** - Índice de atividade da doença  
**i. col.** - Intracolônico  
**IBD** - Doenças inflamatórias intestinais  
**ICAM1** - Molécula intercelular de adesão 1  
**i.c.v.** - Intracerebroventricular  
**IFN** - Interferon  
**IL** - Interleucina  
**KC** - Quimiocina derivada de queratinócitos  
**LPS** - Lipopolissacarídeo  
**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade  
**MIP** - Proteína inflamatória de macrófagos  
**M-MLV** - Moloney Murine Leukemia Virus  
**MPO** - Mieloperoxidase  
**MUC-2** - Mucina 2  
**NOD** - Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo  
**OCTN1** - Transportador de cátions orgânicos do tipo N1  
**PMSF** - Fluoreto de fenilmetilsulfonila  
**RNA** - Ácido ribonucléico  
**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro



**RNasin** - Inibidor de RNase  
**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**s.c.** - Subcutâneo  
**TCR** - Receptores de células T  
**TGF** - Fator de crescimento transformante  
**TH** - Célula T auxiliar  
**Tr** - Célula T regulatória  
**TMB** - Tetrametilbenzidina  
**TNBS** - Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
**TLR** - Receptores de reconhecimento padrão do tipo toll  
**TRPA1** - Receptor de potencial transitório com domínios anquirina 1  
**TRPV1** - Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1  
**UC** - Colite Ulcerativa  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina  
**UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas  
**VCAM** - Molécula vascular de adesão celular  
**VEGF** - Fator de crescimento do endotélio vascular



# SUMÁRIO

	pág.
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Doença Inflamatória Intestinal .....	1
1.2 Epidemiologia .....	1
1.3 Patogênese .....	1
1.3.1 Fatores genéticos .....	2
1.3.2 Fatores ambientais .....	3
1.4 Imunobiologia .....	4
1.5 Histopatologia e manifestações clínicas .....	8
1.5.1 Colite ulcerativa .....	8
1.5.2 Doença de Crohn .....	9
1.6 A dor como sintomas das IBDs .....	12
1.7 Diagnóstico e avaliação da atividade da doença .....	16
1.8 Tratamento das IBDs .....	17
1.8.1 Colite ulcerativa .....	17
1.8.2 Doença de Crohn .....	18
1.9 As endotelinas e seu envolvimento nas IBDs .....	19
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo geral .....	24
2.2 Objetivos específicos .....	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Animais .....	25
3.2. Colite experimental induzida por TNBS .....	25
3.2.1 Tratamentos .....	26
3.2.2 Escore Macroscópico .....	26
3.2.3 Análise Histológica .....	27
3.2.4 Escore Microscópico .....	28
3.3 Colite experimental induzida por DSS .....	28
3.3.1 Tratamentos .....	29



3.3.2	Escore macroscópico.....	29
3.3.3	Escore microscópico .....	30
3.4	Atividade da Mieloperoxidase .....	31
3.5	Dosagem de citocinas .....	31
3.6	Análise imunoistoquímica .....	32
3.7	Extração do RNA total .....	33
3.8	Confecção do DNA complementar (Reação de Transcrição Reversa).....	34
3.9	Reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	34
3.10	Obtenção e cultura primária de células mononucleares e polimorfonucleares peritoneais .....	35
3.11	Avaliação da hiperalgesia secundária .....	36
3.12	Reagentes e Drogas .....	37
3.13	Análise estatística .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Expressão do RNAm para receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> e para prepro ET-1 e prepro ET-2 em cólon de camundongo com colite induzida por TNBS .....	39
4.2	Influência do tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> , Atrasentan e A192621, sobre o dano macroscópico, e atividade da enzima mieloperoxidase, no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS .....	40
4.3	Influência do tratamento com Atrasentan e A192621 sobre a mortalidade induzida por TNBS .....	42
4.4	Influência do tratamento com Atrasentan e A192621 sobre o peso corporal de camundongos com colite induzida pelo TNBS .....	43
4.5	Influência do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> , Atrasentan e A192621, sobre o peso do cólon nos animais na colite induzida por TNBS .....	45
4.6	Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano microscópico presente no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS .....	45





4.7 Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre os níveis de IL-1 $\beta$ , KC, MIP-2, IL-10 e IL-13 presentes no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS .....	47
4.8 Influência do tratamento com Atrasentan sobre a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e $\beta$ 2-integrina .....	50
4.9 Efeito do bloqueio dos receptores endotelinérgicos, ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> sobre a produção de citocinas induzida pelo LPS em macrófagos e neutrófilos peritoneais .....	54
4.10 Influência do tratamento Atrasentan sobre a expressão do RNAm para os receptores endotelinérgicos ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> e das isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS .....	57
4.11 Efeito da administração intracolônica de TNBS na sensibilidade dos camundongos à estimulação mecânica na região abdominal ou na pata .....	59
4.12 Influência do tratamento com Atrasentan sobre a colite induzida por DSS .....	63
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença Inflamatória Intestinal

O termo Doença Inflamatória Intestinal (do inglês *inflammatory bowel disease*, IBD) é utilizado para definir um grupo de doenças inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal que podem ser divididas em dois grupos principais, a colite ulcerativa (do inglês *ulcerative colitis*, UC), que acomete a região do cólon e a Doença de Crohn (do inglês *Crohn's disease*, CD), que pode acometer todo o trato gastrointestinal. A primeira descrição de uma patologia que acometia o intestino foi realizada em 1623 pelo cirurgião alemão Guilhelmus Fabricius Hildanus, conhecido como Wilhelm Fabry. No entanto, a UC foi descrita somente em 1859, pelo médico britânico Samuel Wilks. Em 1932, os médicos Burril Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg localizaram a doença em segmentos do íleo e a denominaram de CD (para revisão ver 2007; Strober et al., 2007; Abraham e Cho, 2009).

## 1.2 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência das IBDs no mundo ocidental vem aumentando consideravelmente desde 1950. Em contraste, até a última década, havia baixa prevalência dessas doenças em países da Europa Oriental, América do Sul, Ásia e da região do Oceano Pacífico. Porém, estudos recentes indicam uma mudança na epidemiologia das IBDs, sendo que sua incidência está em ascensão em áreas antes consideradas de baixa prevalência, como Sul da Europa, Ásia e países em desenvolvimento, mas vem se estabilizando em regiões consideradas de alta prevalência, como a América do Norte e o Norte da Europa. Foi demonstrado que na América do Norte a incidência da CD para latinos (4,1 para 100.000) e asiáticos (5,6 para 100.000) é muito menor do que a incidência observada em brancos (43,6 para 100.000) e negros (29,8 para 100.000). Embora as IBDs ocorram em todos os grupos étnicos, existe uma maior prevalência em judeus, sugerindo que fatores ambientais e o estilo de vida predispõem ao desenvolvimento dessas doenças (Niv et al., 2000; Lakatos, 2006).

## 1.3 Patogênese

A etiologia das IBDs é pouco compreendida e algumas hipóteses sugerem uma origem multifatorial, envolvendo fatores

genéticos e ambientais, que conferem predisposição à doença, além de alterações na resposta imune. Essas doenças estão associadas a manifestações extra-intestinais, como disfunções nutricionais e metabólicas, erupções cutâneas, complicações oculares, complicações renais e problemas psico-sociais como a depressão (Blumberg e Strober, 2001; Hanauer e Present, 2003; Varghese et al., 2006).

### 1.3.1 Fatores genéticos

O componente hereditário tem se mostrado bastante relacionado ao desenvolvimento das IBDs. O primeiro relato da participação de fatores genéticos como um fator de risco para as IBDs foi feito em 1930, no qual foi demonstrado que parentes de primeiro grau de pacientes afetados parecem ter um risco de 4 a 20 vezes maior no desenvolvimento desta patologia (para revisão ver Podolsky, 2002; Xavier e Podolsky, 2007). Pacientes com CD e UC apresentam parentes de primeiro grau com a mesma doença em 2,2-16,2 % e 5,7-15,5 %, respectivamente (Baumgart e Carding, 2007). Outra forte evidência de que um componente genético contribui para a susceptibilidade da doença é uma maior incidência das IBDs entre gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos, especialmente na CD (Podolsky, 2002).

Nos últimos anos muito tem se descoberto acerca dos genes que podem estar associados com às IBDs. As IBDs são doenças poligênicas, e já se sabe que cerca de doze regiões genômicas mapeadas parecem conter genes que podem contribuir para o desenvolvimento de ambas as formas de IBDs. O primeiro gene específico associado com as IBDs identificado foi o membro 15 da família dos domínios de ativação e recrutamento de caspases (CARD15, do inglês, *caspase activation and recruitment domain molecule 15*), que codifica o NOD2 (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain 2*), o qual é preferencialmente expresso em macrófagos, células dendríticas e células de Paneth (Hugot et al., 2001; Korzenik e Podolsky, 2006). Este gene codifica proteínas intracelulares que desencadeiam vias das proteínas quinases e de fatores de transcrição, em resposta à estimulação bacteriana (Bamias e Cominelli, 2007). Estudos evidenciaram mutações no gene CARD15 em cerca de 10-20 % dos pacientes com CD. Os pacientes homocigotos apresentam uma predisposição 20 a 40 vezes maior para o desenvolvimento da doença, enquanto nos heterocigotos o risco aumenta de 2 a 4 vezes (Strober et al., 2007).

Com a utilização da seleção genética de microsátélites para a identificação de regiões do genoma humano, foi possível identificar 9

locos relevantes denominados IBD1-9. Embora alguns locos pareçam ser específicos para CD (IBD1) ou à UC (IBD2), outros estão associados com ambas patologias (IBD3). Mais recentemente, foi identificado um gene que predispõe indivíduos ao desenvolvimento de CD na região IBD5. Esse gene foi identificado como sendo o do transportador de cátions orgânicos 1 e 2 (do inglês *organic cation transporter*, OCTN1 ou OCTN2). Anormalidades nesse gene podem resultar em um defeito na resposta imunológica, favorecendo a proliferação de bactérias na mucosa intestinal, podendo levar ao surgimento das IBDs (Lamhonwah et al., 2003).

### 1.3.2 Fatores ambientais

Como dito anteriormente, a maior taxa de incidência e prevalência dessas patologias são relatadas na América do Norte e Norte da Europa e a menor na América do Sul, sudeste da Ásia, África e Austrália. Embora esses dados sugiram que exista um gradiente de norte a sul, eles também indicam que existem variações no acesso e na qualidade dos cuidados da saúde, bem como em diferentes graus de industrialização, saneamento e higiene (Baumgart e Carding, 2007).

De maneira interessante, foi demonstrado que o aleitamento materno confere proteção contra as IBDs (Klement et al., 2004). Com relação à dieta, foi relacionado que o excesso no consumo de carboidratos e gorduras poliinsaturadas são fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças (Riordan et al., 1998; Geerling et al., 2000).

Outro fator ambiental interessante é o efeito dicotômico do tabagismo para as duas principais formas de IBD. Diversos trabalhos têm mostrado que os fumantes apresentam exacerbações menos frequentes de UC. Inversamente, em pacientes com CD, o tabagismo agrava o curso da doença, promove a formação de fístulas e estenoses e ao exacerbar a doença, aumenta a necessidade do uso de corticosteróides. Embora os componentes do cigarro responsáveis por essas observações não tenham sido identificados, o uso de adesivos transdérmicos de nicotina, juntamente com terapias convencionais, amenizam os sintomas de pacientes com UC moderada (Pullan et al., 1994). Estudos experimentais sugerem que o efeito benéfico da nicotina na UC esteja relacionado ao aumento na produção de muco, diminuição na produção de citocinas proinflamatórias e óxido nítrico e melhorias na função da barreira intestinal, enquanto o efeito da nicotina da CD parece

estar relacionado ao aumento no influxo de neutrófilos na lâmina própria (Cosnes, 2004).

As IBDs são mais comuns após infecções intestinais e pacientes acometidos com essas doenças têm maior concentração de bactérias na mucosa do que as pessoas saudáveis. A concentração de bactérias na mucosa aumenta progressivamente com a severidade da doença (Swidsinski et al., 2002; Garcia Rodriguez et al., 2006).

#### 1.4 Imunobiologia

Várias evidências sugerem que um desequilíbrio dinâmico entre os microorganismos, especialmente os da flora comensal, a barreira epitelial da mucosa e a resposta imunológica do hospedeiro, exercem um papel central na iniciação e desenvolvimento da patogênese das IBDs (Xavier e Podolsky, 2007).

Com relação à flora intestinal, foi demonstrado que ocorre um desequilíbrio da flora intestinal, com redução no número de bactérias benéficas dos gêneros *Bifidobactérias* e *Lactobacillus* e aumento no número de bactérias patogênicas do gênero *Bacteróides* e *Escherichia coli*. Esse desequilíbrio desencadeia a síndrome da permeabilidade intestinal, contribuindo para a inflamação intestinal (Darfeuille-Michaud et al., 1998; Barnich e Darfeuille-Michaud, 2007). A importância da flora intestinal nas IBDs é evidenciada por estudos que utilizam linhagens murinas específicas, nas quais o desenvolvimento da colite espontânea parece depender da presença da flora luminal (Xavier e Podolsky, 2007).

O epitélio intestinal é formado por uma única camada de células que atua como barreira primária e têm como principal função prevenir que os antígenos e bactérias do lúmen encontrem as células do sistema imune na lâmina própria. Neste sentido, a proteção da mucosa pela barreira epitelial é uma função tão importante quanto a função de absorção de nutrientes e secreção de fluidos. As células *goblet* constituem um componente importante do epitélio intestinal. Elas são responsáveis pela produção de muco, que são cruciais para a defesa e reparo do epitélio intestinal (Mashimo et al., 1996). O epitélio intestinal é recoberto por muco, onde as bactérias da flora comensal estão incorporadas (Swidsinski et al., 2002). Estudos têm demonstrado que a mucina-2 (MUC-2), a glicoproteína mais secretada pelas células *goblet*, é expressa com defeito em pacientes com IBD (Buisine et al., 2001; Smithson et al., 1997). Foi demonstrado ainda que camundongos com

deleção gênica para a MUC-2 (MUC-2<sup>-/-</sup>) são deficientes em células goblet e desenvolvem colite espontânea (An et al., 2007).

Além disso, existe no intestino delgado um tipo especializado de células, denominadas células de Paneth, que participam na resposta imune inata e na regulação da densidade de bactérias, através da secreção de proteínas antimicrobianas (Elphick e Mahida, 2005). As principais proteínas dessa classe são conhecidas como defensinas, e podem ser divididas em duas famílias,  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas. Devido às suas propriedades anfipáticas, as defensinas interagem com e conseqüentemente rompem a membrana das bactérias (Brogden, 2005).

O sistema imunológico associado ao trato gastrointestinal é extremamente complexo, sendo formado por populações de células linfóides e não linfóides, bem como por fatores humorais. Os antígenos presentes no lúmen, como os das bactérias da flora comensal, patógenos e nutrientes são capturados por células especializadas e não especializadas em apresentar os mesmos a outras células. As células apresentadoras de antígenos não especializadas, como células epiteliais intestinais, podem interagir com células T não diferenciadas (ou *naive*), através dos receptores do complexo principal de histocompatibilidade de classe II, produzindo sinais co-estimulatórios na ausência de inflamação, promovendo supressão ou anergia das células T presentes na mucosa (Baumgart e Carding, 2007). Por outro lado, as células apresentadoras de antígenos especializadas, como células dendríticas, expressam receptores de reconhecimento padrão e moléculas co-estimulatórias que permitem controlar a resposta imune adaptativa através da diferenciação de linfócitos T em células efetoras (Th1, Th2 e Th17) ou células T regulatórias (Treg), bem como a resposta imune inata por ativação de células *natural killer* (Banchereau e Steinman, 1998). Na presença de bactérias da flora comensal e quando não existe inflamação, há um balanço entre células efetoras e regulatórias, de modo a controlar a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, o que permite manter a homeostasia do trato gastrointestinal (Macdonald e Monteleone, 2005; Rescigno et al., 2001).

Soderholm e colaboradores (2002) demonstraram que a barreira epitelial é descontínua em pacientes com IBDs. Além disso, esses pesquisadores demonstraram uma menor resistência epitelial e um aumento na permeabilidade da mucosa de pacientes com IBDs. A expressão dos receptores de reconhecimento padrão (TLR, do inglês *toll-like receptor*) é diferenciada em pacientes com essas doenças. Os TLR são receptores que geralmente estão presentes na superfície celular

e são os responsáveis pelo desencadeamento da sinalização em resposta a um agente infeccioso. As células do epitélio intestinal normalmente expressam os receptores do tipo TLR3 e TLR5, enquanto os receptores TLR2 e TLR4 são pouco expressos. Em pacientes com CD a expressão do receptor TLR3 está reduzida, enquanto a expressão do TLR4 está aumentada tanto em pacientes com CD quanto com UC (Cario e Podolsky, 2000).

O reconhecimento e o processamento dos antígenos pelas células apresentadoras de antígenos especializadas são alteradas em pessoas com IBD. Estudos *in vitro* e em animais demonstram que as células dendríticas reconhecem incorretamente bactérias da flora comensal e induzem uma resposta imune do tipo Th1. Esses estudos sugerem que uma disfunção ou uma resposta exagerada dos receptores do tipo *toll-like* podem ser causas de IBDs (Franchimont et al., 2004).

Outra alteração interessante na resposta imune em pacientes com IBD é que células apresentadoras de antígenos não especializadas se tornam potentes ativadores de células T efetoras. Embora células apresentadoras de antígenos não especializadas, como as células epiteliais, normalmente induzam anergia de células T CD4<sup>+</sup>, na presença de citocinas pró-inflamatórias elas apresentam alterações no seu fenótipo, como o aumento na expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade (Cruickshank et al., 2004). Além disso, as células epiteliais de pacientes com IBD expressam moléculas co-estimulatórias alternativas, as quais podem melhorar a sua capacidade de apresentar antígenos (Nakazawa et al., 2004).

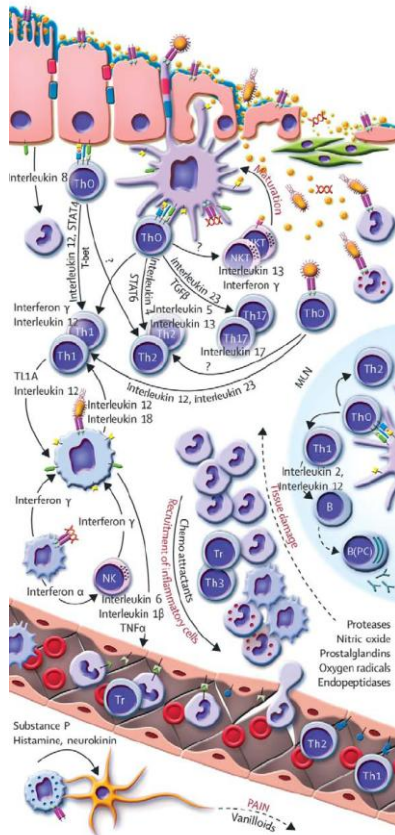
Pacientes com IBD também apresentam deficiências na remoção de populações de células T autoreativas ou super-reativas, as quais persistem no tecido e não sofrem apoptose (Ina et al., 1999).

Em pacientes com UC há uma predominância de linfócitos CD4+ com fenótipo Th2, caracterizada pela alta produção de fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleucina-5 (IL-5), entre outros fatores. Por outro lado, na mucosa de pacientes com CD predomina a resposta do fenótipo Th1, que é caracterizada pela produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2) e interleucina 13 (IL-13) (Fuss et al., 1996; Sanchez-Munoz et al., 2008). Esses conceitos patofisiológicos para as IBDs estão mudando rapidamente, como resultado de descobertas recentes sobre a patogênese dessas doenças. A maior descoberta recente foi a descrição de um terceiro tipo de célula T efetora, conhecida como Th17 (Xavier e Podolsky, 2007; Lee et al., 2008). Esse desbalanço entre



as sub-populações de linfócitos T, quais sejam as células T regulatórias, Th1, Th2 e Th17, acarreta uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e redução de citocinas anti-inflamatórias, de modo a impactar negativamente sobre a homeostasia do cólon (Sanchez-Munoz et al., 2008).

Em resumo, conforme ilustra a Figura 1, existe nas IBDs, uma ruptura na homeostase do sistema imune intestinal. Devido à quebra na barreira epitelial, os antígenos presentes no lúmen entram em contato com as células do sistema imune presentes na mucosa. Existe uma alteração no fenótipo das células da resposta imune inata e adaptativa, as quais passam a expressar um perfil diferente e um número maior de TLR. Os antígenos da flora comensal disparam uma resposta inflamatória por diferentes vias: as células dendríticas reconhecem erroneamente bactérias comensais como patógenos, ocorre um aumento na expressão dos TLRs, no complexo de histocompatibilidade e de moléculas co-estimulatórias. Essas alterações levam a uma mudança funcional de tolerância para ativação e diferenciação de células T *naive* em células efectoras (Th1, Th2 e Th17) e células natural killer. O epitélio intestinal passa a expressar moléculas co-estimulatórias, e atuar como células apresentadoras de antígenos. Isso culmina em um desbalanço nas populações de células T regulatórias e efectoras, que se reflete em alterações importantes na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células efectoras estimulam os macrófagos a secretarem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Além do desbalanço na resposta imune adaptativa, as células dendríticas podem ser responsáveis pela desregulação da resposta imune inata. As células natural killer podem contribuir para o dano tecidual por exercerem os seus efeitos citotóxicos e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Finalmente, inúmeros leucócitos migram para a mucosa e liberam quimiocinas que atraem mais células inflamatórias, amplificando e perpetuando esse ciclo vicioso (Baumgart e Carding, 2007). É importante citar que no trato gastrointestinal existem ainda, conforme ilustra a figura 3, terminações nervosas e mastócitos que, em conjunto, podem contribuir para a dor associada às IBDs, além dos outros aspectos associados a estas doenças.



**Figura 1.** Sistema imune associado ao trato gastrointestinal nas IBDs. Para maiores explicações ver texto do esquema adaptado de Baumgart e Carding, 2007.

## 1.5 Histopatologia e manifestações clínicas

### 1.5.1 Colite ulcerativa

A UC é uma doença não transmural, ou seja, uma doença que acomete basicamente a mucosa. Macroscopicamente, a região afetada parece ulcerada, com hiperemia e geralmente hemorrágica. A inflamação é uniforme e contínua, sem áreas de mucosa normal intercaladas. O reto normalmente é afetado em 95% dos casos e,

dependendo da extensão anatômica envolvida, a doença pode se apresentar como proctite (quando atinge o reto), colite do lado esquerdo (envolvimento do cólon sigmóide com ou sem envolvimento do cólon descendente) ou pancolite (atinge todo o cólon). Quando há o envolvimento de todo o cólon, pode haver ainda o envolvimento mínimo de alguns centímetros do íleo terminal, que é designado como ileíte de refluxo, porém isso acontece em um número pequeno de pacientes (Baumgart e Sandborn, 2007).

Como pode ser observado na figura 2A, as alterações histológicas iniciais incluem infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria, danos epiteliais e distorção das criptas. Na fase de inflamação ativa, as células inflamatórias acumulam-se nas proximidades do epitélio e invadem as criptas, o que leva à formação de abscessos das criptas. Além disso, pode haver a perda de células epiteliais, perda de células goblet (produtoras de muco) e edema na mucosa.

A inflamação recorrente leva a manifestações típicas de cronicidade, como fibrose e a retração longitudinal, que levam ao encurtamento do cólon. Além disso, a musculatura lisa do cólon fica mais espessa. Nas inflamações de longa duração pode ocorrer displasia epitelial, que tem uma forte associação com o desenvolvimento de câncer no cólon (Podolsky, 2002).

Os sintomas da UC dependem da extensão e gravidade da inflamação. Os principais sinais e sintomas da UC são diarreia sanguinolenta e dor abdominal e, nos casos mais graves, febre e perda de peso. Os pacientes com proctite, que representam 95 % dos casos, apresentam sangramento retal, sensação dolorosa na região anal, eliminação de muco e pus pelo ânus, mas muitas vezes apresentam constipação ao invés de diarreia (Baumgart e Sandborn, 2007).

### 1.5.2 Doença de Crohn

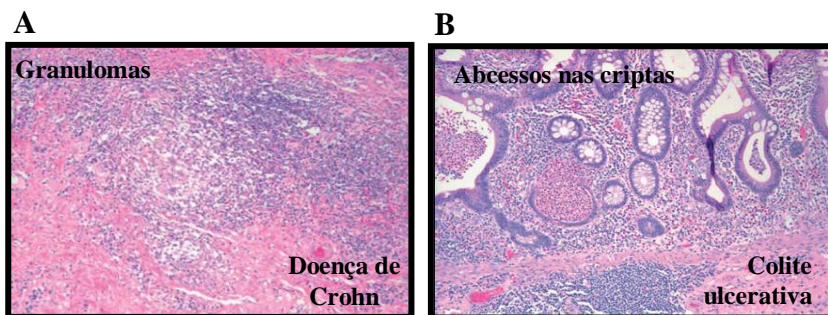
Em contraste com a UC, a CD é uma doença transmural, ou seja, se caracteriza por uma inflamação crônica que afeta todas as camadas da parede intestinal. Além disso, a inflamação pode acometer todo o trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus (Strober et al., 2007).

Ao contrário do que acontece na UC, podem ser observadas alterações microscópicas em regiões onde não há alterações macroscópicas. Macroscopicamente o intestino parece mais espesso, e tem a luz mais estreita. Esta estenose pode ocorrer em qualquer região

do intestino e associar-se a graus variáveis de obstrução intestinal. A aparência da mucosa é variável, dependendo do estágio e da gravidade da doença, mas pode parecer relativamente normal em contraste à UC. Outra característica morfológica que a distingue a CD da UC é o envolvimento descontínuo do trato gastrointestinal, onde segmentos intestinais gravemente afetados podem estar separados entre si por áreas de aparência normal (Baumgart e Sandborn, 2007).

Microscopicamente, os granulomas são muito úteis para diferenciar a CD da UC. Com relação à distribuição da doença, aproximadamente 47% dos casos de CD envolve o intestino delgado (geralmente o íleo terminal) sem acometimento do cólon, 28 % deles apresentam apenas o envolvimento do cólon, 21 % um acometimento íleo-cólico e em 3% existe o envolvimento do trato gastrointestinal superior (Louis et al., 2001).

Conforme já mencionado, na CD o processo inflamatório está presente em todas as camadas da parede intestinal, apresentando um denso infiltrado de linfócitos, macrófagos, ulceração e muitas vezes fibrose, como pode ser observado na figura 2B (Baumgart e Carding, 2007).



**Figura 2. Características histopatológicas de pacientes com DC ou UC.** (A) Uma característica comum em pacientes com DC é um grande infiltrado de células inflamatórias e formação de granulomas. (B) Na colite ulcerativa há um proeminente infiltrado de células inflamatórias nas criptas (abscessos nas criptas) e destruição da arquitetura do tecido. Adaptado de Baumgart e Sandborn (2007).

Os sinais e sintomas da CD também são determinados pela localização e pela extensão do processo inflamatório. No entanto, as principais manifestações clínicas da CD são febre, perda de peso, dor abdominal e diarreia, freqüentemente com presença de sangue e muco. Em casos do envolvimento do cólon, os sinais e sintomas mais freqüentes são diarreia e dor. Os pacientes com acometimento do intestino delgado apresentam-se com cólicas abdominais, diarreia e dor abdominal. Dentre as complicações da doença destacam-se a obstrução intestinal e a formação de fístulas (Gasche et al., 2000; Louis et al., 2001; Silverberg et al., 2005).

A tabela 1 destaca as principais características histopatológicas e clínicas das IBDs.

**Tabela 1 - Características histopatológicas e clínicas das IBDs.**

<b>CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E CLÍNICAS DAS IBDs</b>	<b>Colite ulcerativa</b>	<b>Doença de Crohn</b>
<b>HISTOPATOLÓGICAS</b>		
Segmentares	0	++
Envolvimento transmural	+/-	++
Granulomas	0	+ / ++
Fibrose	+	++
Fissuras, fístulas	+/-	++
Envolvimento do tecido adiposo e dos linfonodos mesentéricos	0	++
<b>CLÍNICAS</b>		
Diarreia	++	++
Sangramento retal	++	+
Dor abdominal	+	++
Estreitamento	+	++
Envolvimento do intestino delgado	+/-	++
Envolvimento retal	++ (95 %)	+ / ++ (50%)

0= nunca; +/- = raro; + = ocasional; ++ = freqüente (Adaptado de Fauci, 2008).

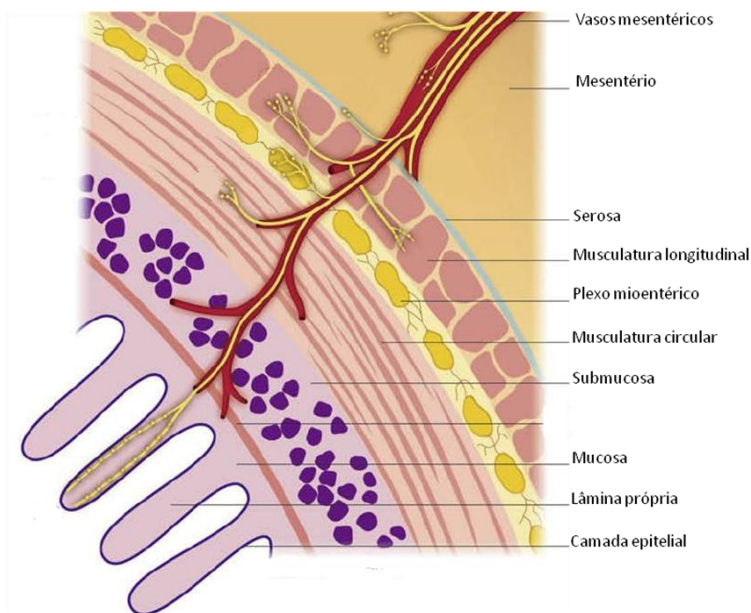
## 1.6 A dor como sintoma das IBDs

Como descrito anteriormente, um dos principais sintomas dos pacientes com IBDs é a dor visceral. A dor visceral é desencadeada sempre que se aumenta a tensão da parede da víscera, seja por distensão, inflamação, isquemia ou contração exagerada da musculatura. A dor visceral é uma sensação dolorosa profunda, mal localizada, de início gradual e de longa duração.

O sistema nervoso entérico integra o sistema nervoso autônomo, mas pode funcionar de forma independente do sistema nervoso central (para revisão ler Furness et al., 1990). No sistema nervoso entérico, os corpos celulares encontram-se agrupados em pequenos gânglios que são conectados por feixes nervosos, chamados de plexos mioentérico (ou Auerbach) e submucoso (ou Meissner). Os gânglios entéricos contêm uma variedade de neurônios funcionalmente distintos (aproximadamente 20 tipos), incluindo aferentes primários, interneurônios e neurônios motores, ligados sinapticamente um ao outro em microcircuitos que são conhecidos por controlar funções gastrointestinais como a motilidade, secreções exócrinas e endócrinas, fluxo sanguíneo e o sistema imune local. Além disso, as células ganglionares entéricas são suportadas pelas células gliais.

O plexo mioentérico situa-se entre as camadas de musculatura longitudinal lisa e circular, e se estende em todo o comprimento do intestino. Ele fornece inervação motora para as duas camadas musculares e inervação secretomotor à mucosa. Existem também inúmeras projeções do plexo mioentérico para os gânglios submucosos e gânglios entéricos da vesícula biliar e do pâncreas (Goyal e Hirano, 1996).

O plexo submucoso, localizado na submucosa entre a camada de musculatura lisa vascular e a mucosa, é melhor desenvolvido no intestino delgado, onde ele desempenha um papel importante no controle da secreção. Além de inervarem o epitélio glandular, os neurônios do plexo submucoso inervam a células endócrinas intestinais, vasos sanguíneos e a submucosa. Além disso, as células da glia presentes no intestino são capazes de produzir citocinas e expressam antígenos MHC classe II em resposta à estimulação por citocinas (Ruhl et al., 2001). Isso sugere um papel para essas células na modulação da resposta inflamatória no intestino.



**Figura 3. Representação esquemática das estruturas e terminações nervosas na parede intestinal.** Adaptado de Knoles e Aziz (2009).

Todas as fibras aferentes viscerais estão contidas em nervos que terminam na medula espinhal, com exceção do nervo vago, que termina no tronco cerebral para fornecer uma inervação supraespinhal. O nervo vago é o nervo com maior alcance no corpo. Pelo menos 80% dos axônios vagais são aferentes, e a maioria dos órgãos internos são inervados pelo nervo vago. Os corpos celulares das fibras aferentes vagais estão localizados principalmente no gânglio nodoso e suas terminações nervosas no núcleo do trato solitário. Evidências recentes sugerem que as fibras aferentes vagais são importantes para a quimionocicepção e contribuem para a sensação de desconforto associada à dor visceral (Berthoud e Neuhuber, 2000; Cervero, 1994; Ness e Gebhart, 1990).

Os nervos espinhais apresentam seus corpos celulares nos gânglios das raízes dorsais. Ao contrário dos nervos somáticos, a maioria das fibras aferentes viscerais passam através dos gânglios pré- e para-vertebrais antes de alcançarem a medula espinhal. Nos gânglios pré-vertebrais, os axônios dos nervos viscerais freqüentemente se ramificam e fazem sinapses com neurônios motores ou secretores contidos nos gânglios e desta maneira influenciam as funções do trato gastrointestinal, como a motilidade. Independente de como as fibras aferentes viscerais chegam à medula espinhal, elas terminam nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (laminas I e II de Rexed), onde também estão as terminações nervosas dos nociceptores, ou então na lâmina X (Goyal e Hirano, 1996; Knowles e Aziz, 2009).

Apesar do grande alcance dos nervos espinhais e vagais na inervação nos órgãos viscerais, o número de axônios que inervam as vísceras é relativamente pequeno em comparação à inervação somática. Considera-se que apenas 5-8% das fibras aferentes à medula espinhal são de nervos viscerais (Cervero, 1994). No entanto, o pequeno número de aferentes viscerais na medula espinhal é compensado pela enorme arborização e espalhamento destes terminais aferentes espinhais dentro da medula espinhal.

Os neurônios nociceptivos viscerais são muito semelhantes aos que inervam a pele e os músculos. Eles respondem tanto aos estímulos mecânicos (geralmente distensão) quanto químicos, especialmente os liberados no processo inflamatório, sendo que a resposta predominante é à estimulação mecânica (Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000).

Os neurônios nociceptivos mecânicos ou mecanorreceptores existentes na musculatura lisa de todas as vísceras ocas constituem fibras do tipo A $\delta$  e C, e respondem a estímulos mecânicos leves, tensão aplicada ao peritônio, contração e distensão da musculatura lisa. Esses neurônios podem ser subdivididos em duas classes, segundo a resposta à distensão: (1) os que apresentam baixo limiar de ativação (70%), que codificam as intensidades dos estímulos numa escala fisiológica, isto é, reagem a distensões próximas de 1-5 mmHg, respondendo a estímulos inócuos e nocivos; (2) os que possuem um limiar de resposta elevado à distensão (mais de 30%) e que codificam estímulos potencialmente dolorosos (Cervero, 1991; Cervero, 1994; Gebhart, 2000). O segundo grupo é encontrado na bexiga urinária, coração, esôfago, sistema biliar, pulmões, intestino delgado e cólon, enquanto o primeiro ocorre apenas



no coração, esôfago, bexiga urinária e cólon (Cervero e Janig, 1992; Cervero e Laird, 1999).

Outro aspecto interessante é que alguns nociceptores viscerais tornam-se ativos somente em determinadas condições, como hipóxia e inflamação tissular (Cervero e Janig, 1992). Isto resulta da sensibilização de receptores de alto limiar e de nociceptores silenciosos previamente não-responsivos, os quais perfazem 40% a 45% da inervação visceral aferente do cólon (Knowles e Aziz, 2009). Estes neurônios nociceptivos contribuem de modo importante na manifestação da dor visceral crônica, quando há alterações prolongadas dos reflexos espinhais, ou quando ocorre regulação autonômica anormal dos órgãos internos. A sensibilização desses receptores persiste mesmo após a cessação do estímulo nociceptivo, e é traduzida por alterações das funções motora e sensitiva (hiperalgesia visceral). Assim, estímulos fisiológicos como comer e beber são traduzidos e amplificados de forma inadequada, provocando uma descarga periférica exagerada, que é interpretada no sistema nervoso central como sinalização dolorosa. Isso sugere que nociceptores silenciosos ativados podem favorecer a iniciação e manutenção da hiperalgesia visceral por mecanismos centrais e periféricos. Além disso, dano e inflamação visceral afetam a fisiologia gastrointestinal habitual de motilidade e secreção, produzindo mudanças drásticas em torno do ambiente no qual estão as terminações nervosas nociceptivas. Dessa forma, pode haver excitação de nociceptores distantes do local inicial da agressão (Cervero e Janig, 1992; Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000).

Outra característica peculiar da dor visceral é sua localização imprecisa. Esse tipo de dor, contrariamente à dor somática, é basicamente difusa e difícil de ser localizada. Ela se situa frequentemente num local diferente da estrutura de origem, porque é referida ou projetada em estruturas cutâneas (Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000). Muitos são os fatores que dificultam a localização de uma dor visceral. Primeiro, os nervos aferentes das vísceras para o sistema nervoso central são menos numerosos que os da pele, como discutido anteriormente, mas ativam uma porcentagem muito grande de neurônios espinhais (50 a 75 % do total). Essa disparidade é explicada pela distribuição intramedular das aferentes viscerais, que atingem um número maior de mielômeros, que as aferentes cutâneas. Segundo, as aferentes viscerais espinhais convergem para os mesmos neurônios de segunda ordem que as aferentes cutâneas mais numerosas e menos dispersas. Isso quer dizer que todos os neurônios de segunda ordem que recebem estímulos viscerais recebem também estímulos cutâneos. A

convergência de impulsos aferentes é uma característica que define os neurônios sensoriais de segunda ordem do corno dorsal da medula espinhal, os quais recebem informações dos aferentes viscerais. Esta convergência de impulsos aferentes viscero-somáticos explica porque a dor visceral é percebida em outros locais, isto é, explica porque as dores viscerais normalmente são dores referidas. Além disso, a convergência de impulsos provenientes de diferentes vísceras também é comum, fato que determina a sua característica difusa e de difícil localização (Cervero e Janig, 1992; Cervero e Laird, 1999; Cervero, 2000; Gebhart, 2000).

### 1.7 Diagnóstico e avaliação da atividade da doença

A UC é diagnosticada clinicamente e confirmada por estudos endoscópicos e histológicos. A doença é tipicamente descrita como leve quando há até quatro evacuações com sangue diariamente, sem toxicidade sistêmica, moderada quando ocorrem quatro a seis evacuações com sangue e toxicidade mínima, ou grave quando há mais de seis evacuações com sangue e sinais de toxicidade sistêmica, como febre, taquicardia e anemia. Pacientes com UC fulminante normalmente tem mais de 10 evacuações com sangue, anemia grave (muitas vezes com necessidade de transfusão sanguínea), sensibilidade abdominal e dilatação do cólon em radiografia simples do abdômen. A UC fulminante também é caracterizada por febre alta, sangramento intenso e profunda perda de peso (Baumgart e Sandborn, 2007).

Da mesma maneira que na UC, não existe diagnóstico definitivo para a CD. No entanto, o diagnóstico é feito com base no histórico e exame físico, suplementados com endoscopia, radiografia, análises laboratoriais e histológicas. Na prática clínica, a atividade da CD é geralmente descrita como leve a moderada quando os pacientes são capazes de tolerar alimentação por via oral sem manifestações de desidratação, toxicidade, dor abdominal, obstrução ou perda de peso maior do que 10%, moderada a grave quando o paciente não responde ao tratamento para a doença leve e apresenta febre, perda de peso, dor abdominal, náuseas e vômitos intermitentes, sem obstrução ou anemia, e grave a fulminante quando os sintomas persistem mesmo com tratamento com corticosteróides e o paciente apresenta febre alta, vômitos persistentes, obstrução intestinal e caquexia (Baumgart e Sandborn, 2007).

## 1.8 Tratamento das IBDs

### 1.8.1 Colite ulcerativa

O tratamento na UC tem como objetivo controlar a inflamação, reduzir os sintomas e repor líquidos e nutrientes perdidos.

A primeira linha de tratamento para pacientes com UC leve a moderada é o ácido 5-aminosalicílico (mesalazina), nas formulações oral e retal, ou ainda formulações orais das pró-drogas sulfasalazina, olsalazina e balsalazida. Pacientes com proctite ou colite no lado esquerdo respondem melhor à mesalazina ou corticóide retal do que ao tratamento sistêmico. Alguns corticóides (hidrocortisona, budesonida e beclometasona) podem ser utilizados por via retal, no entanto são menos efetivos do que o tratamento retal com mesalazina (Marshall e Irvine, 1997; Scholmerich, 2004). Pacientes que não respondem ao tratamento com compostos relacionados ao ácido 5-aminosalicílico, tanto por via oral quanto retal, podem ser tratados, por via oral, com prednisona (Lichtenstein et al., 2006).

Estudos demonstram que 34% dos pacientes com colite ulcerativa necessitam de tratamento com corticóides para entrarem em remissão. Após quatro semanas de tratamento, 54% dos pacientes entram em remissão completa e 30 % em remissão parcial. Entretanto, um ano após o final do tratamento, 49 % dos pacientes têm uma resposta prolongada, 22% tornam-se dependentes de corticóides e 29% necessitam de cirurgia (Faubion et al., 2001).

Pacientes com colite moderada a severa podem ser tratados com ácido 5-aminosalicílico, corticóides, imunomoduladores como azatioprina ou 6-mercaptopurina ou com anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$ , como o infliximab. Quando os pacientes não respondem ao tratamento oral com corticóide, deve-se administrá-lo por via endovenosa. No caso de pacientes que não respondem a este tratamento, pode-se utilizar imunossupressores como ciclosporina ou tacrolimus, ou ainda o infliximab (Baumgart e Sandborn, 2007).

A intervenção cirúrgica emergencial é indicada em pacientes com complicações graves como sangramento retal intermitente e cólon megatóxico, que não respondem aos tratamentos medicamentosos mencionados. O procedimento cirúrgico também é indicado em casos de pacientes com displasia ou câncer, UC refratária ou tratamento medicamentoso, ou intolerância a imunossupressores ou outras terapias medicamentosas (Larson e Pemberton, 2004; Itzkowitz e Present, 2005).

### 1.8.2 Doença de Crohn

Não existe um tratamento curativo para a CD. No entanto, muitos tratamentos ajudam a reduzir a inflamação e a aliviar os sintomas. A primeira linha de tratamento para pacientes com CD depende da localização da doença. Os pacientes com doença no íleo podem ser tratados com budesonida. Em pacientes com acometimento leve no íleo ou cólon podem ser tratados com sulfasalazina, porém o seu uso é restrito devido à sua toxicidade (Baumgart e Sandborn, 2007).

Pacientes que não respondem a sulfasalazina, mesalazina ou budesonida, ou que apresentam doença moderada a severa, são tratados com prednisona. Faubion e colaboradores (2001) demonstraram que 44% dos pacientes com CD precisam ser tratados com corticóide para a indução da remissão. Após quatro semanas de tratamento, 58% dos pacientes entram em remissão completa e 26% em remissão parcial. Ao final de um ano de tratamento com corticóide, 32% dos pacientes têm uma resposta prolongada, 28% tornam-se dependentes de corticóides e 40 % necessitam de cirurgia. Os pacientes com CD moderada a severa podem ser tratados com infliximab. Para manter os pacientes na fase de remissão, os pacientes podem ser tratados com budesonida, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato ou infliximab (Hanauer e Sandborn, 2001; Lichtenstein et al., 2006). Para pacientes com fístulas associadas à CD é indicado ainda o tratamento com antibióticos como primeira linha de tratamento ou com imunossupressores como segunda linha de tratamento (Hanauer e Sandborn, 2001; Sandborn et al., 2003).

A intervenção cirúrgica pode ser necessária para induzir a remissão ou tratar as complicações, mas não cura a doença. A cirurgia é indicada para pacientes com estenose e fístulas (Larson e Pemberton, 2004).

Com relação à dieta de pacientes com IBDs recomenda-se que aqueles em remissão façam uma dieta rica e variada que inclua frutas, legumes, carnes, azeite e peixe. Os pacientes com estenose ou com síndrome do intestino irritável devem evitar a ingestão de fibras insolúveis. Os pacientes em tratamento com corticóides devem ainda utilizar suplementação de cálcio e vitamina D, pois esse medicamento interfere na absorção de cálcio. A suplementação de ferro pode controlar a anemia causada pela perda contínua de sangue nas fezes (Lucendo e De Rezende, 2009).

Embora existam inúmeros tratamentos farmacológicos para as IBDs, existem pacientes que não respondem a esses tratamentos mesmo quando combinados, de modo que em muitos casos, uma intervenção

cirúrgica se faz necessária. Em outros casos, os pacientes se tornam dependentes das medicações e o uso de imunossupressores pode aumentar o risco de infecções oportunistas. O tratamento com anticorpos anti-TNF, como o infliximab, apresenta eficácia quando usado em altas doses, o que pode aumentar os seus efeitos colaterais. Outro grande problema do tratamento com infliximab é o alto preço, podendo custar até 30 mil dólares por ano.

Em vista das eficácias limitadas dos tratamentos disponíveis para as IBDs, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que combinem alta eficácia com baixa incidência de efeitos indesejáveis, se faz preemente. Neste sentido, também urge a necessidade de ampliar os conhecimentos acerca da fisiopatologia subjacente às IBDs. Os modelos animais de CD e UC têm colaborado de maneira importante para o entendimento da inflamação intestinal e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e serão detalhados na discussão.

## 1.9 As endotelinas e seu envolvimento nas IBDs

Alguns estudos introduziram o conceito de que o sistema endotelinérgico pode contribuir de maneira importante na patogênese das IBDs.

As endotelinas são peptídeos que produzem diversos efeitos em múltiplos tecidos e sistemas. A endotelina-1 (ET-1) é o representante mais importante desta família, que inclui ainda a ET-2 e a ET-3, sendo que todas elas são constituídas por 21 aminoácidos e apresentam duas fontes dissulfeto unindo pares de cisteínas. Embora as células endoteliais vasculares sejam consideradas a principal fonte de ET-1, os genes que codificam os três peptídeos são expressos, em graus variados, por uma ampla variedade de células, incluindo miócitos cardíacos, células renais, gliais, intestinais, células da musculatura lisa vascular, além de células do sistema imune, como macrófagos e mastócitos, entre outras (para revisão ver Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

Ainda que o precursor de cada isoforma de endotelina seja codificado a partir de um gene específico, a biossíntese de cada uma delas ocorre de maneira semelhante. A síntese da ET-1 ocorre a partir de um polipeptídeo com aproximadamente 212 aminoácidos denominado prepro ET-1, o qual é clivado por convertases ou peptidases, dando origem à big-endotelina-1, um peptídeo que pode conter de 37 a 38 aminoácidos, dependendo da espécie. O segundo passo para a síntese da ET-1 é a clivagem da big-ET-1 por endopeptidases específicas, denominadas enzimas conversoras de endotelina (ECE). Já foram

descritas pelo menos duas isoformas, ECE-1 e ECE-2, as quais apresentam 59 % de homologia e constituem metalopeptidases (para revisão ver (Nussdorfer et al., 1999). Da mesma maneira, a síntese de ET-2 e ET-3 ocorre a partir de polipeptídeos denominados prepro ET-2 e prepro ET-3, os quais são clivados por convertases ou peptidases em big-ET-2 e big-ET-3, que sofrem então a ação da ECE, dando origem a ET-2 e ET-3, respectivamente.

Em mamíferos, as ações das endotelinas são mediadas através de dois receptores específicos, denominados ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, os quais pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G. O receptor ET<sub>A</sub> apresenta uma afinidade (70-100 vezes) maior pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3, enquanto o receptor ET<sub>B</sub> exibe afinidade semelhante pelas três isoformas (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Ambos os receptores podem ativar múltiplas vias intracelulares de transdução de sinal (Sokolovsky, 1995).

Os receptores endotelinérgicos, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, podem ainda ser discriminados pelo uso de agonistas ou antagonistas seletivos. Assim, receptores ET<sub>A</sub> são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123, ou não peptídicos, como o atrasentan entre outros. Por outro lado, os receptores ET<sub>B</sub> são ativados seletivamente por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala<sup>1,3,11,15</sup>] ET-1, o BQ-3020 e o IRL 1620, e seletivamente bloqueados por antagonistas peptídicos, como o BQ-788, ou não peptídicos, como o A-192621 entre outros (para revisão ver Masaki et al., 1994; Webb e Meek, 1997).

A meia vida da ET-1 no plasma é de aproximadamente 1,5 min. Depois da ligação da ET-1 aos seus receptores, a qual é considerada praticamente irreversível, ambos são rapidamente internalizados. No entanto, após a internalização, os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> são alvos de diferentes sistemas intracelulares. Enquanto que os receptores ET<sub>A</sub> são reciclados e retornam à superfície da membrana, os receptores ET<sub>B</sub> são encaminhados para os lisossomos, onde são degradados. O processo de reciclagem rápida dos receptores ET<sub>A</sub> contribui, por exemplo, para sua capacidade de induzir respostas contráteis de longa duração em vasos sanguíneos isolados, enquanto que os receptores ET<sub>B</sub> são importantes para a função de depuração de ET-1 da circulação (Fukuroda et al., 1994; Bremnes et al., 2000).

Embora as endotelinas estejam relacionadas ao controle fisiológico de algumas funções, sua maior relevância parece ser no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, câncer, inflamação e dor (para

revisão ver Remuzzi et al., 2002; Herrmann et al., 2006; Liu e Chen, 2006).

A primeira evidência da participação das endotelinas nas IBDs foi apresentada por Murch e colaboradores (1992), quatro anos após a descoberta da ET-1 (Yanagisawa et al., 1988). Neste estudo, foi detectado um aumento nos níveis de ET-1 na submucosa e na lâmina própria no cólon de pacientes com CD e UC, respectivamente. Também em humanos, Letizia e colaboradores (1998) demonstraram que os níveis plasmáticos de ET-1 encontravam-se aumentados em pacientes com IBD.

Por outro lado, McCartney e colaboradores (2002) demonstraram uma redução nos níveis de ET-1/ET-2 no cólon de pacientes com UC e CD, e sugeriram que esses peptídeos possivelmente não estão relacionados com essas patologias.

Paralelamente a estes estudos, foram desenvolvidos alguns estudos experimentais que tinham como objetivo investigar a participação das endotelinas em modelos animais de IBDs. O primeiro trabalho foi realizado por Hogaboam e colaboradores (1996), os quais reportaram que o tratamento profilático de ratos com bosentan (um antagonista dual de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, na dose de 30 mg/kg) foi eficaz em reduzir o dano colônico macroscópico causado pelo TNBS, mas não foi efetivo quando administrado 1 hora após a indução da colite. Evidências sugerem que, através da sua potente ação vasoconstritora, as endotelinas contribuem para a vasculite nas IBDs por induzir uma isquemia intestinal, e que esta seria uma importante etapa na iniciação da inflamação no intestino (Murch et al., 1992). De fato, na colite induzida por TNBS em ratos ocorre uma redução drástica do fluxo sanguíneo, o qual é restaurado pelo tratamento com bosentan ou antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> (LU-135252 e BQ-485), mas não ET<sub>B</sub> (BQ-788), sugerindo um importante papel dos receptores ET<sub>A</sub> nas alterações de fluxo sanguíneo. Essas evidências, obtidas em animais tratados com antagonistas endotelinérgicos antes da indução da colite, sugerem que as endotelinas contribuem à iniciação do processo inflamatório.

Diferentemente, Gulluoglu e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento terapêutico com o bosentan (100 mg/kg), foi capaz de reduzir o dano tecidual e a atividade da mieloperoxidase do cólon, tanto na fase aguda quanto na fase crônica do modelo de TNBS em ratos.

Um ano mais tarde, Padol e colaboradores (2000) demonstraram o efeito do antagonista não seletivo para os receptores

ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, Ro 48-5695, na colite experimental induzida por TNBS e DNBS. O tratamento terapêutico com Ro 48-5695 (10 mg/kg, uma vez ao dia), durante 5 dias, foi capaz de reduzir o dano tecidual, a atividade da mieloperoxidase e a incidência de diarreias e adesões. No modelo de colite induzida por DNBS, o dano tecidual foi inibido pelas doses de 1 e 3 mg/kg, enquanto a atividade da mieloperoxidase foi inibida somente nos animais tratados com Ro 48-5694 na dose de 3 mg/kg.

Anthoni e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento terapêutico com bosentan (30 mg/kg) reduziu o dano tecidual associado à colite induzida por DSS, possivelmente por reduzir a adesão de leucócitos nas vênulas presentes na submucosa do cólon e conseqüentemente inibindo o recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado. Ainda em relação ao modelo de colite induzida por DSS, recentemente foi demonstrado que o inibidor da ECE-1, SM19712, também reduziu o dano tecidual, embora não tenha alterado a atividade da mieloperoxidase (Lee et al., 2009).

Como descrito anteriormente, um dos principais sintomas em pacientes com IBD é a dor. A primeira evidência da participação das endotelinas na dor foi apresentada por Ferreira e colaboradores (1989), um ano após a sua descoberta (Yanagisawa et al., 1988). Neste estudo, foi demonstrado que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos, incapacitação articular em cães, e sensação de prurido e hipernocicepção mecânica no antebraço de humanos. Dois anos mais tarde, Raffa e colaboradores demonstraram que as três isoformas de endotelina, bem como a big-ET-1, causavam contorções abdominais em camundongos, e que ao menos o efeito da ET-1 era bloqueado pela administração sistêmica, intratecal ou intracerebroventricular (i.c.v.) de morfina (Raffa et al., 1991; Raffa e Jacoby, 1991). Além disso, Raffa e colaboradores (1996) demonstraram que receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> medeiam as contorções abdominais evocadas por ET-1 em camundongos. Em 1994, foram produzidos os primeiros camundongos que não expressavam receptores ET<sub>B</sub> (Hosoda et al., 1994) e através desta ferramenta, Griswold e colaboradores (1999) demonstraram a participação destes receptores nas contorções abdominais (respostas nociceptivas) induzidas pela administração intraperitoneal de fenil-benzoquinona, um modelo de dor inflamatória visceral.

Apesar das evidências disponíveis sobre a participação das endotelinas nas IBDs, o papel desses peptídeos na progressão ou na manutenção da resposta inflamatória do cólon ainda não está claro. Neste sentido, e considerando que os pacientes com IBDs procuram



atendimento médico quando a doença já está instalada, o presente estudo tem como objetivo investigar se o tratamento com antagonistas seletivos para os receptores  $ET_A$  ou  $ET_B$  após a indução da colite (i.e. tratamento terapêutico) poderia reverter ou atenuar a progressão do quadro, bem como, identificar alguns mecanismos envolvidos. Além disso, apesar de todas as evidências acerca da participação das endotelinas e de seus receptores em diferentes modelos de dor, até o momento o número de estudos envolvendo esses peptídeos em modelos de dor visceral é limitado. Desta maneira, pretendemos avaliar a participação das endotelinas e de seus receptores no desenvolvimento da dor visceral em um modelo experimental de colite.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar, através da utilização de antagonistas seletivos para os receptores endotelinérgicos  $ET_A$  e  $ET_B$ , a participação das endotelinas sobre alguns parâmetros inflamatórios em modelos de colite experimental em camundongos.

### 2.2 ESPECÍFICO

Para atingir o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, de modo a alcançar os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a cinética de expressão dos receptores endotelinérgicos  $ET_A$  e  $ET_B$  no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS;
- Avaliar o papel dos receptores endotelinérgicos na manutenção da colite induzida por TNBS, analisando o efeito da administração repetida de antagonistas seletivos para os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , sobre alguns parâmetros inflamatórios analisados na colite induzida por TNBS após o aparecimento dos sintomas clínicos;
- Investigar alguns dos possíveis mecanismos relacionados ao efeito anti-inflamatório causado pelo bloqueio dos receptores  $ET_A$ ;
- Averiguar se a ação anti-inflamatória do antagonista dos receptores  $ET_A$ , atrasentan, se restringe ao modelo do TNBS, através de observações sobre sua ação em outro modelo experimental, o da colite induzida por DSS;
- Avaliar o desenvolvimento e decurso temporal da hiperalgesia mecânica (visceral) associada à colite induzida por TNBS, bem como a participação dos receptores endotelinérgicos nesta resposta.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *BALB/c* machos pesando entre 20 – 25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas, SP). Os animais foram mantidos no biotério setorial do laboratório de Peptídeos, Departamento de Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (06:00-18:00). Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC (CEUA, processo número PP00062).

#### 3.2 Colite experimental induzida por TNBS

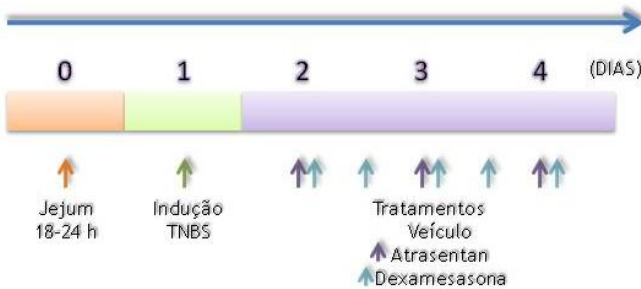
A colite experimental foi induzida conforme método descrito originalmente para ratos (Wallace et al., 1989) e modificado para camundongos (McCafferty et al., 1999), com poucas adaptações às nossas condições experimentais (Bento et al., 2008).

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e colocados em gaiolas com chão de grade para evitar coprofagia onde foram mantidos em jejum sólido com livre acesso à solução de glicose 5% por 24 horas. Após o jejum sólido, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (80 mg/kg, i.p.), e a colite foi induzida através da administração intracolônica de 0,1 mL do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS, 1,5 % em 50 % de etanol), utilizando-se um cateter de polietileno PE – 50 (4 cm) acoplado a uma microseringa. Os animais controle receberam 0,1 mL de uma solução de salina 0,9 %. Após a indução de colite, os animais foram mantidos, durante dois minutos na posição de Trendelenburg, isto é, em decúbito dorsal com corpo inclinado a 45 ° e cabeça posicionada abaixo do trem posterior, por 2 minutos. Decorridas 4 horas da indução, os animais tiveram livre acesso a ração e água filtrada. Durante todo o experimento, os animais foram monitorados em relação à mudança de peso corporal e mortalidade. Os animais foram eutanasiados 72 horas após a indução de colite. Os cólons foram removidos e as fezes presentes retiradas. Para algumas análises os tecidos colônicos foram abertos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, lavados com solução

salina estéril, pesados e acondicionados em freezer  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para outras, após a retirada das fezes, os cólons foram acondicionados em formaldeído tamponado a 10 % e mantidos a temperatura ambiente até seu processamento.

### 3.2.1 Tratamentos

A fim de avaliar os subtipos de receptores endotelinérgicos envolvidos na colite experimental induzida por TNBS, os animais foram tratados com Atrasentan (antagonista seletivo dos receptores  $\text{ET}_A$ , nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) ou A-192621 (antagonista seletivo dos receptores  $\text{ET}_B$ , 20 mg/kg, e.v.), ambos uma vez ao dia, sendo o primeiro tratamento realizado 24 horas após a indução de colite (Figura 4). Setenta e duas horas após a indução da colite e 4 horas após o último tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Para o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c) foi seguido o mesmo protocolo experimental, no entanto os animais foram tratados duas vezes ao dia, sendo esta droga escolhida como controle positivo para efeito de comparação.



**Figura 4. Protocolo experimental.** Após 24 h de jejum os animais receberam por via intracolônica 0,1 mL de uma solução do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) 1,5 % em 50 % de etanol. Os animais controle receberam 0,1 mL de salina 0,9 %. Vinte e quatro horas após a indução, quando o quadro de colite já estava instalado foram iniciados os tratamentos. O tratamento com os antagonistas dos receptores  $\text{ET}_A$  e  $\text{ET}_B$  foram realizados uma vez ao dia, enquanto a dexametasona, utilizada como controle positivo, foi administrada a cada 12 horas. O último tratamento foi realizado 4 h antes do sacrifício dos animais.

### 3.2.2 Escore Macroscópico

Após a eutanásia dos animais, a porção final do cólon foi removida, aberta longitudinalmente e cuidadosamente limpa com

solução salina 0,9 %. A severidade do dano ao cólon foi avaliada usando-se uma escala de dano macroscópico baseada na tabela descrita por Wallace (1989) para ratos, mas adaptado para camundongos por McCafferty (1999) com poucas modificações para as nossas condições experimentais (Bento et al., 2008) (Tabela 4).

**Tabela 2** - Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS (Bento et al., 2008; McCafferty et al., 1999; Wallace et al., 1989).

<b>Grade numérica</b>	<b>Parâmetros</b>
0	Ausência de danos
1	Hiperemia sem úlceras
2	Hiperemia e espessamento da parede do intestino sem a presença de úlceras.
3	Um sítio de ulceração sem espessamento da parede do intestino.
4	Dois ou mais sítios de ulceração ou inflamação.
5	0,5 cm de inflamação.
6-10	1 cm de inflamação. O escore é aumentado em 1 para cada 0,5 cm de dano observado chegando ao máximo de 10.
0 ou 1	Ausência ou presença de diarreia
0 ou 1	Ausência ou presença de estreitamento (estreitamento do lúmen dificultando a passagem das fezes).
0; 1 ou 2	Ausência ou presença de adesão média ou severa.

### 3.2.3 Análise Histológica

Em outra série de experimentos, 72 h após a administração do TNBS, a porção distal do cólon foi removida, lavada com solução salina estéril para a retirada das fezes e imediatamente fixada em solução de formaldeído 10 %. Os tecidos foram emblocados em parafina, seccionados a uma espessura de 5  $\mu$ m, transferidos para lâminas de vidro, desparafinizados e corados com o uso de hematoxilina e eosina, por empresa terceirizada (Lab OnLine, Florianópolis, SC) e analisadas em microscópio óptico, conforme descrito abaixo.

### 3.2.4. *Escore Microscópico*

Após a remoção da porção distal do cólon, o tecido foi histologicamente analisado em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 x. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, USA). Para avaliar a severidade do dano, foram analisados três cortes histológicos de amostras de cada animal, sendo que cada grupo experimental possuía no mínimo um número de três animais. A severidade do dano foi avaliada usando-se a escala proposta por Neurath (1995) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Grade de escores para avaliação de dano microscópico na colite induzida por TNBS (Neurath et al., 1995).

<b>Grade Numérica</b>	<b>Descrição</b>
0	Sem sinais de inflamação.
1	Pouca infiltração celular para o tecido.
2	Moderada infiltração celular para o tecido.
3	Grande quantidade de infiltração celular; aumento da densidade vascular; espessamento da parede do intestino.
4	Infiltração transmural; perda de células goblet.

### 3.3 Colite experimental induzida por DSS

A colite experimental induzida por DSS foi realizada através da administração de sulfato de dextrana sódica (DSS, de peso molecular: 36,000-50,000, obtido da ICN Biomedicals, EUA) na água de beber. Os animais receberam DSS (3 % em água filtrada) *ad libitum* por um período de cinco dias seguido por um período de dois dias recebendo apenas água filtrada (Wirtz et al., 2007). Ao longo do protocolo foi avaliado o índice de atividade da doença (IAD), onde os animais foram monitorados em relação a mudanças de peso corporal, presença de sangue nas fezes e consistência das mesmas. Ao final de sete dias, os animais foram eutanasiados, os cólons coletados, lavados, pesados e seus comprimentos mensurados. Os tecidos colônicos foram armazenados em freezer -70 °C para análise da atividade da enzima

mieloperoxidase, ou alternativamente, armazenados em formaldeído tamponado a 10 % a temperatura ambiente até o processamento das amostras para análise histológica.

### 3.3.1 Tratamento

Com o objetivo de avaliar o efeito do antagonista seletivo para os receptores  $ET_A$  na colite experimental induzida por DSS, os animais foram tratados com Atrasentan (10 mg/kg, e.v.), uma vez ao dia, ao longo de 7 dias, sendo que o primeiro tratamento foi realizado concomitante ao início da administração de DSS.

### 3.3.2 Escore macroscópico

Sete dias após o início do tratamento com DSS, os animais foram eutanasiados, os cólons removidos e abertos longitudinalmente (em toda a extensão), sendo cuidadosamente limpos com solução salina 0,9 %. A severidade do dano ao cólon foi avaliada utilizando-se uma escala de dano macroscópico conforme descrita originalmente por Kimball e colaboradores (Kimball et al., 2004; Kimball et al., 2005) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Grade de escores para avaliação do dano macroscópico total na colite induzida por DSS (Kimball et al., 2004; 2005).

<b>PESO DO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Ganho de peso <5%.
1	Ganho de peso de 5 – 14%.
2	Ganho de peso de 15 – 24%.
3	Ganho de peso de 25 – 35%.
4	Ganho de peso > 35%.
<i>*Presença de sangue visível nas fezes: somar +1 ao escore.</i>	
<b>ENCURTAMENTO DO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Encurtamento <5%.
1	Encurtamento de 5 – 14%.
2	Encurtamento de 15 – 24%.
3	Encurtamento de 25 – 35%.
4	Encurtamento > 35%.
<b>CONSISTÊNCIA DAS FEZES PRESENTES NO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Normal (bolos fecais bem formados).
1	Bolos fecais úmidos e frouxamente formados.
2	Bolos fecais amorfos, úmidos e pegajosos.
3	Diarréia.
<i>*Presença de sangue visível nas fezes: somar +1 ao escore.</i>	
<b>DANO AO CÓLON</b>	
Escore	Avaliação
0	Sem sinais de inflamação.
1	Inflamação leve, hiperemia localizada.
2	Inflamação moderada ou distribuída mais amplamente.
3	Inflamação severa e/ou distribuída extensivamente.
4	Úlceras penetrantes e lesões sanguinolentas.

### 3.3.3 Escore microscópico

Após a confecção das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina, por empresa terceirizada (Lab onLine, Florianópolis –SC) o tecidos colônicos foram analisados em



microscópico óptico (Nikon Eclipse 50i, Melville, NY, USA) inflamação intestinal foi quantificada conforme escala proposta por Van der Sluis e colaboradores (2006): presença de células *goblet* (0-4), espessamento da mucosa (0-4), presença de células inflamatórias (0-4), infiltração celular na submucosa (0-4), destruição da arquitetura (0-4), ulceração (0-4) e abscessos nas criptas (0-4). Os escores obtidos em cada parâmetro (graduados conforme a intensidade de cada um) foram somados para a quantificação do dano microscópico total. Foram analisados três cortes histológicos obtidos do cólon de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído por no mínimo três animais.

### 3.4 Atividade da Enzima Mieloperoxidase

A migração de neutrófilos para o tecido do cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para isso, os cólons foram removidos, limpos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (10 mM; pH 4,7) e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 111 µl de tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; EDTA sódico 0,015 M; pH 7,4) ao qual foi adicionado 333 µl de NaCl 0,2 % gelado e, após 30 segundos, 333 µl de NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado formado foi outra vez suspenso em tampão 2 gelado (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); pH 5,4). As amostras obtidas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em banho Maria (36 °C), sendo esse procedimento repetido 3 vezes. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C, e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática para análise da atividade da MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm e os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

### 3.5 Dosagem de Citocinas

Os níveis teciduais de IL-1β, KC, MIP-2, IL-10 e IL-13 foram avaliados como descrito anteriormente (Campos et al., 2002) com poucas modificações. Resumidamente, os cólons foram removidos e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS,

composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4). contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA sódico 10 mM, e aprotinina A 2 ng/mL. O homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos como a quantidade de citocina por miligrama de proteína da amostra. Em outra série de experimentos as citocinas IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC foram dosadas no sobrenadante da cultura de células, sendo estes resultados expressos como a concentração de citocina no meio de cultura. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se *Kits* específicos de ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.6 Análise imunoistoquímica

A expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina foi detectada em cortes histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras da porção final do cólon. Os cortes teciduais de espessura de 5  $\mu$ m foram mantidos em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente os tecidos foram desparafinizados em xilol (xileno) e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, etanol 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 M e 820 mL de citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0. As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à

temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

Os anticorpos primários anti-P-selectina (1:500), anti-E-selectina (1:500) e anti- $\beta_2$ -integrina (1:500) foram diluídos em Solução Reinascence (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com um polímero de detecção (PicTure™ MAX Polymer detection kit), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas a uma revelação colorimétrica com *kit* comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico (DAB). Após a revelação, foram realizadas: a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris; a desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto); a diafanização em xilol e a montagem em ENTELLAN®. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 x, sendo analisados todos os campos da lâmina. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, USA). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Foram analisados três cortes histológicos da amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de, no mínimo, três animais. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. Todos os grupos experimentais foram processados sob as mesmas condições experimentais. As configurações para aquisição das imagens foram idênticas para todos os tecidos. As imagens foram transferidas para um computador onde a intensidade da coloração dos pixels para a P-selectina, E-selectina ou  $\beta_2$ -integrina foram calculadas para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### 3.7 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em 1 mL de reagente de TRizol® (Invitrogen, SP, Brazil), conforme recomendações do fabricante. Para isso foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio ao homogenato, sendo

este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 min, 4 °C), sendo o pellet resultante ressuspenso em 1 mL de etanol gelado. O RNA foi novamente centrifugado (7.000 x g, 5 min, 4 °C), o etanol desprezado e o pellet foi dissolvido em água ultra pura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro pela absorbância a 260 nm (A260) e pela razão das absorbâncias A260/A280, respectivamente. O RNA foi alíquotado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### 3.8 Confeção do DNA complementar (Reação de Transcrição Reversa)

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e dos precursores de ET-1 (prepro-ET-1) e ET-2, (prepro-ET-2), no cólon de camundongos, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para a reação da transcrição reversa, as amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µL de oligo dT 15, 1 µL do mix de dNTP (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12 µL. Essas amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C, resfriadas por 5 min a 4 °C e acrescidas de 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 mM, e 1 µL de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37 °C por 2 min e a enzima M-MLV (1 µL, 200 U) adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 min e a inativação da reação foi realizada por incubação a 75 °C por 15 min. O DNA complementar (DNAc) foi estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

### 3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNAc foi amplificado em triplicada utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para o receptor ET<sub>A</sub> (Mm01243722\_m1), receptor ET<sub>B</sub> (Mm01224433\_m1), prepro ET-1 (Mm00438656\_m1), prepro ET-2 (Mm00432983\_m1) e GAPDH (NM\_008084.2), o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 µL de DNAc, 5 µL de master mix, 0,5 µL de primer e

3,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 40 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para a quantificação relativa.

### 3.10 Obtenção e cultura primária de células mononucleares e polimorfonucleares peritoneais

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio 3 % (1mL/animal) e foram eutanasiados por deslocamento cervical decorridas 4 horas (para obtenção de neutrófilos) ou 72 horas (para obtenção de macrófagos). Os peritônios foram lavados duas vezes com PBS (8 mL) com um auxílio de uma seringa e o lavado peritoneal coletado foi centrifugado a 200 x g por 10 min a 4°C. Para a remoção das hemácias, o pellet resultante foi rapidamente lavado com água estéril (por 5 segundos) e a osmolaridade foi reajustada em seguida acrescentando um mesmo volume de PBS 2 vezes concentrado. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10 %, penicilina 10 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL. O número total de células, bem como as populações celulares presentes no lavado peritoneal foram determinados utilizando o hemocítmetro Poch (Sysmex Corporation, São Paulo, SP, Brazil) e confirmados por contagem total e diferencial das células.

A contagem total foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico (Nikon-Eclipse E200), utilizando o corante Azul de Trypan, para verificação da viabilidade celular. Para a contagem diferencial, cerca de  $10^5$  células foram citocentrifugadas a 20 x g por 10 min (Cytospin 3, Shandon Southern Products, Ats Moore, UK) e as lâminas coradas com Diffquick, conforme recomendações do fabricante. As lâminas foram então secadas ao ar livre e posteriormente avaliadas por microscopia óptica, onde cerca de 100 células foram analisadas por lâmina.

A maior parte das células (cerca de 85 %) isoladas do lavado peritoneal 4 h após a injeção de tioglicolato era composta por neutrófilos, sendo o restante constituído por células mononucleares. Esses polimorfonucleares foram subsequentemente colocados em cultura ( $2 \times 10^6$  células por ml) sem nenhuma purificação adicional. Setenta e duas horas após a injeção de tioglicolato o exsudato era composto principalmente por células mononucleares (cerca de 95 %).

Para retirar os linfócitos contaminantes, os macrófagos foram purificados por aderência à placa. Resumidamente,  $2 \times 10^5$  células foram incubadas em placas de 96 poços por 2 h a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub>, sendo posteriormente lavadas. As células remanescentes foram utilizadas subsequentemente.

Os neutrófilos e macrófagos isolados do lavado peritoneal foram incubados a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub> e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (100 ng/mL) por 4 e 24 horas, respectivamente, na presença ou ausência de BQ-123 (antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub>, 1 µM), BQ-788 (antagonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub>, 1 µM), ET-1 (30 ou 100 nM) ou ET-2 (30 ou 100 nM).

### 3.11 Avaliação da hiperalgesia secundária

Para a avaliação da ocorrência de hiperalgesia secundária em camundongos com colite, os animais foram colocados em compartimentos de acrílico transparentes individuais (7 x 9 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada, de modo a permitir o fácil acesso ao abdômen e região subplantar das patas para aplicação de estímulos mecânicos. Os camundongos foram aclimatizados por pelo menos 2 horas antes dos testes comportamentais. As frequências de resposta de retirada do abdômen e da pata foram determinadas através de 10 aplicações consecutivas de filamentos de von Frey de forças 0,07 g e 0,14 g (VFH, Stoelting), respectivamente. Os estímulos foram aplicados perpendicularmente à superfície do abdômen dos animais por um período máximo de 2 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta nociceptiva de retirada do abdômen, caracterizada por: salto imediato após a aplicação do filamento, estiramento abdominal, lambida do abdômen ou retração abdominal. A resposta nociceptiva à estimulação da pata foi caracterizada por retirada da pata imediatamente após a aplicação do filamento.

Para análise do decurso temporal da hiperalgesia mecânica, os animais foram estimulados em intervalos de 24, 48 e 72 horas após a administração intracolônica de TNBS (0,5; 1 e 1,5 mg/animal). Em outros experimentos, para investigar a participação das endotelinas na hiperalgesia mecânica induzida pela inflamação do cólon, os animais foram tratados com Atrasentan (antagonista seletivo dos receptores ET<sub>A</sub>) ou A-192621 (antagonista seletivo dos receptores ET<sub>B</sub>), 24 h após a indução da colite experimental por 0,5 mg de TNBS. As frequências de resposta ao estímulo mecânico foram avaliadas imediatamente antes dos diferentes tratamentos e em intervalos de 1 hora e até 4 horas após os mesmos.

### 3.12 Reagentes e Drogas

Os reagentes ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), aprotinina A, brometo de hexadecilmetilamônio (HTAB), cloreto de benzametônio, cloridrato de morfina, dexametasona, estreptomicina, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), lipopolissacarídeo (sorotipo 0111:B4), peróxido de hidrogênio, tetrametilbenzidina (TMB), tioglicolato de sódio, Tween 20 e Tween 80 foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA).

Os anticorpos primários anti- $\beta$ 2-integrina, anti-E-selectina e anti-P-selectina eram provenientes da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EUA).

Os Kits para a dosagem de IL-1 $\beta$ , KC, MIP-2, IL-10 e IL-13 eram provenientes da R&D systems (Minneapolis, USA).

O Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), o Azul de Trypan, o soro fetal bovino, água ultrapura a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas da GIBCO BRL Life technologies (Gaithersburg, EUA).

A Enzima transcriptase reversa, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), o oligo dT 15, os deoxinucleotídeos (dNTPs), o tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa, o inibidor de RNase (RNasin) e o Dietiltreitol (DTT), eram procedentes da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

O kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, a placa de reação óptica de 96 poços, os primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os receptores ET<sub>A</sub> (Mm01243722\_m1), receptores ET<sub>B</sub> (Mm01224433\_m1), prepro ET-1 (Mm00438656\_m1), prepro ET-2 (Mm00432983\_m1) e GAPDH (NM\_008084.2) foram todos procedentes da Applied Biosystems (São Paulo, Brasil).

O antagonista peptídico seletivo para receptores ET<sub>A</sub>, BQ-123 (ciclo [DTrp-DAsp-Pro-DVal-Leu]), e o antagonista peptídico seletivo para receptores ET<sub>B</sub>, BQ-788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- $\gamma$ -metileucil-D-1 metoxicarbonil-D-norleucina) foram comprados da Research Biochemicals International (Natick, EUA). A endotelina-1 e a endotelina 2 foram provenientes da American Peptides (Sunnyvale, USA).

O DAB, o entellan, o formaldeído e a hematoxicilina de Harris foram adquiridos da Merck, (Darmstadt, Alemanha), o reagente de Bradford foi proveniente da Bio-Lab Laboratories (Richmond, EUA,; a quetamina da Sespo (São Paulo, Brazil), o sulfato sódico de dextrana

(DSS) foi proveniente da MP Biomedicals (Cleveland, EUA); a xilazina da Vetbrands (São Paulo, Brasil) e o xilol da Labsynth (Diadema, Brasil). O corante Diffquick foi adquirido da Laborclin (Pinhais, Brazil).

O antagonista não peptídico seletivo para receptores ET<sub>B</sub>, A-192621 [2R-(2a, 3b, 4a)]-4-(1,3-benzodioxol-5il)-1-[2-(2, 6 dietilfenil amino)-2-oxoetil]-2-(4-propoxifenil)-3- ácido pirrolidinacarboxílico] e o antagonista não peptídico seletivo para receptores ET<sub>A</sub>, Atrasentan, foram doados pelo laboratório Abbott (Abbott Park, EUA).

O Atrasentan e o A-192621 foram dissolvidos em PBS contendo 100 µL de NaOH 0,1 N. As soluções estoque de ET-1(100 µM), ET-2 (100 µM), BQ-123 e BQ-788 (1 mM) foram preparadas em PBS e mantidas a uma temperatura de -20°C, sendo diluídas para as doses desejadas momentos antes dos experimentos, com o mesmo veículo.

### 3.13 Análise estatística

Todos os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. Para análise estatística de dados não paramétricos entre mais de 2 grupos, foi utilizado o teste estatístico de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*. Para dados paramétricos, a análise das diferenças estatísticas foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste *Student Newman-Keuls*. Os resultados referentes à hiperalgesia mecânica foram analisados com ANOVA de duas vias seguida do teste *Bonferroni*. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software *Graphpad Prism 4* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Em todas as análises, diferenças com P<0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

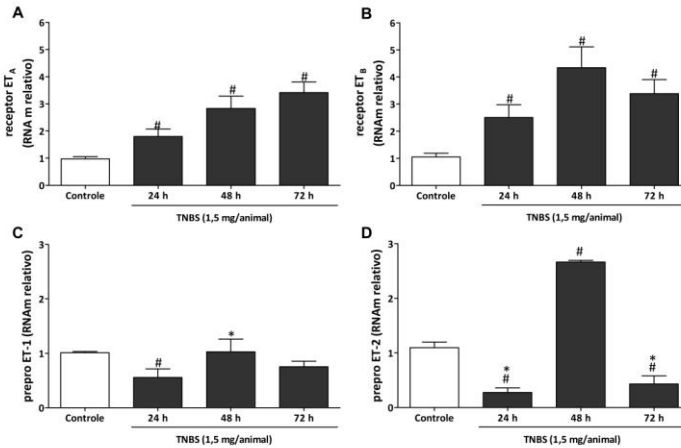


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão do RNAm para receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e para prepro ET-1 e prepro ET-2 em cólon de camundongo com colite induzida por TNBS

Com o objetivo de avaliar a influência da colite induzida pelo TNBS na expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> para as endotelinas, bem como na expressão das isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2, os níveis de RNAm para estas proteínas foram quantificados, por RT-PCR em tempo real, em cólons de animais do grupo controle (tratados com salina) e do grupo TNBS. Os resultados das figuras 5A e 5B demonstram que existe uma expressão basal (constitutiva) do RNAm para ambos os receptores no cólon não inflamado. Por outro lado, 24, 48 e 72 horas após a administração de TNBS, houve aumentos significativos nos níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> (1,8; 2,9 e 3,5 vezes) e ET<sub>B</sub> (2,4; 4,1 e 3,2 vezes), respectivamente.

Contrastando com os aumentos sustentados observados na expressão do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, as figuras 5C e 5D indicam que a administração de TNBS causa variações complexas na expressão de RNAm para prepro ET-1 e prepro ET-2. A expressão do RNAm para ambas as isoformas estava reduzida 24 horas após a administração de TNBS em aproximadamente 2-3 vezes. O RNAm para a prepro ET-1 retornou aos níveis basais 48 horas após a administração do TNBS, permanecendo assim até 72 horas. Já os níveis do RNAm para a isoforma prepro ET-2 estavam aumentados em 48 horas (2,4 vezes acima dos valores basais), mas apresentavam-se novamente reduzidos 72 horas após a indução da colite (2,5 vezes).



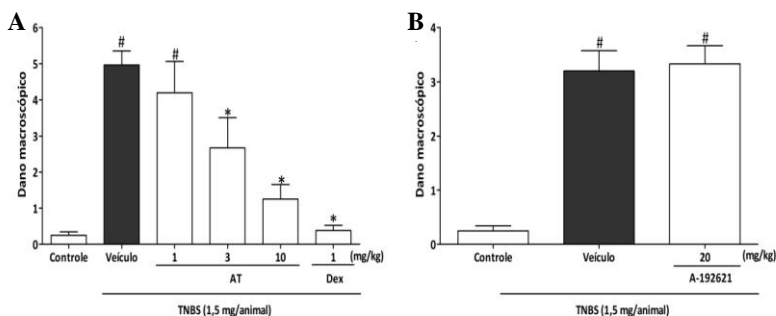
**Figura 5. Quantificação do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e para as isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2 no cólon de camundongos após a colite induzida por TNBS.** Os resultados demonstram os níveis relativos do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> (A), ET<sub>B</sub> (B) e para as isoformas prepro ET-1 (C) e prepro ET-2 (D) em amostras de cólon obtidas de animais controle e de animais eutanasiados 24, 48 e 72 horas após a administração de TNBS. Cada amostra foi normalizada a partir dos níveis de GAPDH endógenos, e depois a quantificação relativa foi realizada utilizando as amostras do grupo controle como padrão de comparação. Cada valor representa a média de 4-7 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo TNBS (24 horas em C e 48 horas em D) conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

#### 4.2 Influência do tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, Atrasentan e A192621, sobre o dano macroscópico e atividade da enzima mieloperoxidase no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS

Sabendo que o cólon dos animais já apresenta um infiltrado inflamatório significativo 24 horas após a indução da colite experimental por TNBS (Bento et al., 2008), e que nesse período os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> encontram-se aumentados no cólon, fomos verificar o potencial terapêutico dos antagonistas seletivos para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, Atrasentan e A192621, respectivamente. Para isso os animais foram tratados com Atrasentan (1, 3 ou 10 mg/kg, uma vez ao dia, e.v.), A-192621 (20 mg/kg, uma vez ao dia por via e.v.), ou com o fármaco de referência, Dexametasona (1 mg/Kg, duas vezes por

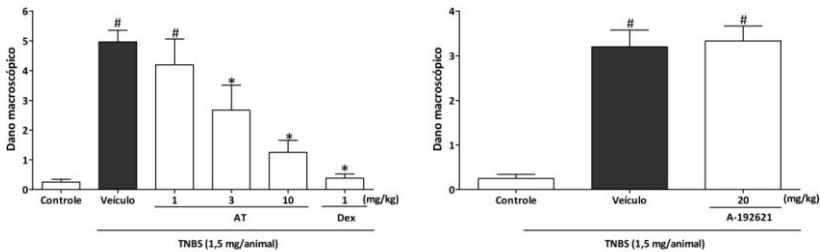
dia, s.c.) por 3 dias, iniciando o tratamento 24 horas após a administração do TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite e 4 horas após o último tratamento, os animais foram eutanasiados.

O tratamento terapêutico com o antagonista do receptor  $ET_A$ , atrasentan, foi capaz de reduzir o dano macroscópico de forma dependente da dose. As doses de 3 e 10 mg/kg foram eficazes em reduzir esse parâmetro, com porcentagens de inibição de  $45,6 \pm 17,2$  e  $74,5 \pm 8,4\%$ , respectivamente. A menor dose de Atrasentan, no entanto, não foi capaz de reduzir de forma significativa o dano induzido pelo TNBS. O tratamento com dexametasona também reduziu de forma significativa o dano macroscópico com porcentagem de inibição de  $94,6 \pm 2,1\%$  (figura 6A). Diferentemente do observado para o antagonista seletivo dos receptores  $ET_A$ , o tratamento terapêutico com o antagonista seletivo para o receptor  $ET_B$ , A-192621, não foi capaz de reduzir o escore macroscópico (que indica o dano tecidual) induzido pelo TNBS (Figura 6B).



**Figura 6.** Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o dano macroscópico nos cólons de animais com colite induzida pelo TNBS. Setenta e duas horas após a indução da colite os cólons foram removidos e avaliados quanto ao dano macroscópico, determinado conforme escala de escores proposta por Wallace (1989), e adaptada para camundongos (McCafferty, 1999). (A) O Tratamento terapêutico com Atrasentan (AT), ou com a dexametasona (Dex), foi capaz de reduzir o dano induzido pelo TNBS. Em contrapartida, o tratamento com A192621 não foi capaz de alterar esse parâmetro (B). As colunas representam a média do escore macroscópico do cólon de 6 – 8 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS, conforme análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

O acúmulo de células polimorfonucleares pode ser verificado indiretamente através da análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Como citado anteriormente, 24 h após a indução da colite com TNBS (momento em que o tratamento terapêutico inicia), já há um aumento significativo na atividade desta enzima, no entanto, 72 h horas após a administração do TNBS a atividade desta enzima está ainda mais aumentada (Bento et al., 2008). Como demonstrado na figura 7A, a atividade da MPO é 20 vezes maior em animais com colite do que em animais controle. O tratamento com o Atrasentan, na dose de 10 mg/kg/dia, foi capaz de inibir em  $83,0 \pm 5,7 \%$  a atividade da MPO, quando comparado ao grupo que recebeu apenas TNBS, mas as doses de 1 e 3 mg/kg/dia se mostraram inefetivas. A administração de dexametasona também reduziu significativamente a atividade dessa enzima em  $94,4 \pm 4,1\%$  (Fig 7A). O tratamento com o antagonista seletivo para os receptores  $ET_B$ , A-192621, não foi capaz de reduzir a atividade desta enzima (Figura 7B).



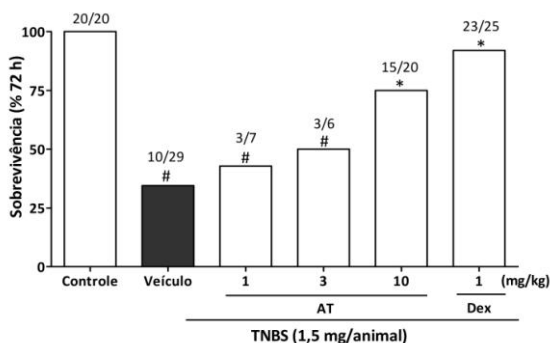
**Figura 7. Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre a atividade da enzima mieloperoxidase nos cólons de animais com colite induzida pelo TNBS.** Setenta e duas horas após a indução da colite os cólons foram removidos e avaliados quanto a atividade da enzima mieloperoxidase. O Tratamento terapêutico com Atrasentan (AT), ou com a dexametasona (Dex), foi capaz de reduzir a infiltração de polimorfonucleares induzida pelo TNBS (A). Em contrapartida, o tratamento com A192621 não foi capaz de alterar esse parâmetro (B). As colunas representam a média da atividade da enzima MPO do cólon de 6 – 8 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS, segundo análise estatística realizada através do teste de ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

### 4.3 Influência do tratamento com Atrasentan e A192621 sobre a mortalidade induzida por TNBS

Durante o período experimental, os animais foram acompanhados com relação ao índice de sobrevivência. Vinte e quatro

horas após a indução da colite por TNBS (1,5 mg/animal) o índice de mortalidade dos animais passou a ser observado. Como demonstrado na figura 8, apenas 35% dos camundongos sobrevivem até 72 horas após a indução da colite no grupo TNBS tratado com veículo. Os tratamentos com Atrasentan (10 mg/kg, e.v.) ou dexametasona (1 mg/kg, s.c.) foram capazes de diminuir a mortalidade dos animais de forma significativa, com taxas de mortalidade de 25 e 8%, respectivamente. O tratamento terapêutico com Atrasentan nas doses de 1 e 3 mg/kg não foi capaz de diminuir a mortalidade dos animais de forma significativa em relação ao grupo TNBS.

O tratamento terapêutico com A192621 não foi capaz de alterar o índice de mortalidade (dados não mostrados). Contudo, é importante salientar que o índice de mortalidade nos animais tratados apenas com TNBS foi menor do que nos experimentos realizados para analisar os efeitos do Atrasentan.



**Figura 8. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos.** Vinte e quatro horas após a indução da colite os animais passaram a ser monitorados quanto ao índice de mortalidade até o final de todo o experimento. As colunas representam a porcentagem de sobrevivência verificada 72 horas após a indução da colite em relação ao número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os números acima de cada barra indicam quantidade de animais vivos ao final de 72 horas em relação ao número total de animais que havia no início do experimento. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS tratados com veículo, segundo o teste estatístico do Qui-quadrado.

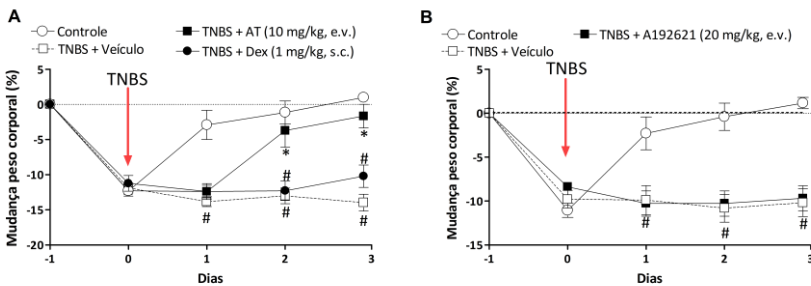
#### 4.4 Influência do tratamento com Atrasentan e A192621 sobre o peso corporal de camundongos com colite induzida pelo TNBS

Como a dose de 10 mg/Kg foi a única capaz de reduzir o dano macroscópico, a infiltração de polimorfonucleares e a mortalidade, os

demais experimentos foram conduzidos somente com esta dose. Durante o período experimental, os animais foram acompanhados com relação à mudança do peso corporal. Como ilustra a Figura 9A, animais submetidos a jejum sólido por 24 horas (entre Dia -1 e Dia 0) apresentaram marcada redução do peso corporal, que foi revertida 24 horas depois da sua suspensão em camundongos do grupo controle. Em contraste, animais que receberam TNBS no Dia 0 e foram tratados com veículo nos dias subseqüentes mantiveram a perda de peso verificada logo após o jejum.

Vinte e quatro horas após o início do tratamento, ou seja, 48 h após a indução da colite, os animais tratados com Atrasentan apresentaram uma recuperação significativa do peso corporal. No terceiro dia, os animais do grupo controle e do grupo tratado com Atrasentan apresentaram pesos similares aos aferidos no início do protocolo experimental (no dia -1), diferindo de forma significativa do grupo TNBS.

Diferentemente do observado para o antagonista seletivo dos receptores  $ET_A$ , o tratamento com A192621 (20 mg/kg, e.v., uma vez ao dia) ou dexametasona (1 mg/kg, s.c., duas vezes ao dia) não foi capaz de restaurar o peso dos animais em relação ao grupo controle (Figura 9B e 9A, respectivamente).

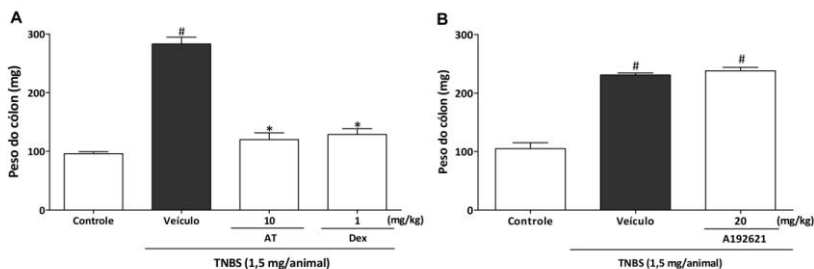


**Figura 9. Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o peso corporal de animais com colite induzida pelo TNBS.** Após jejum (dia 0) todos os animais exceto os do grupo controle, receberam TNBS (1,5 mg/animal). Os animais foram tratados a partir do dia 0 com atrasentan (AT), A192621, dexametasona (Dex) ou salina (grupo TNBS e grupo controle). Ao longo do experimento, os animais que receberam Atrasentan apresentaram ganho de peso significativo em comparação ao grupo TNBS (em A). Os grupos TNBS tratados com A192621 (em B), Dexametasona (em A) ou veículo não recuperaram o peso corporal. Os resultados representam a média do percentual de mudança no peso corporal em relação ao peso original antes do jejum de 6 – 8 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

#### 4.5 Influência do tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores $ET_A$ e $ET_B$ , Atrasentan e A192621, sobre o peso do cólon de animais com colite induzida por TNBS

Para averiguar a ação dos antagonistas para os receptores endotelinérgicos sobre o edema do tecido colônico induzido pelo TNBS, os animais tiveram a porção final de seus cólons, correspondendo a 4 cm, removidos e pesados, 72 horas após a administração do TNBS. Os animais com colite apresentaram um aumento no peso do cólon de 2,9 vezes em comparação ao grupo controle. O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg, e.v.) foi capaz de reverter de forma significativa esse aumento em  $87,2 \pm 6,2$  % (Figura 10A). Os animais que receberam dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) apresentaram uma redução do índice de edema do cólon de  $92,6 \pm 2,1$  %, figura 10A.

Em contrapartida, o tratamento com o antagonista seletivo para os receptores  $ET_B$ , A-192621, não foi capaz de reduzir o peso do cólon (Figura 10B).



**Figura 10. Influência do tratamento com Atrasentan, A192621 ou dexametasona sobre o aumento do peso do cólon de camundongos com colite induzida pelo TNBS.** Os cólons foram removidos setenta e duas horas após a indução da colite e a porção final (4 cm) foi devidamente pesada. Cada coluna representa a média do peso correspondente aos 4 cm finais de 4 – 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

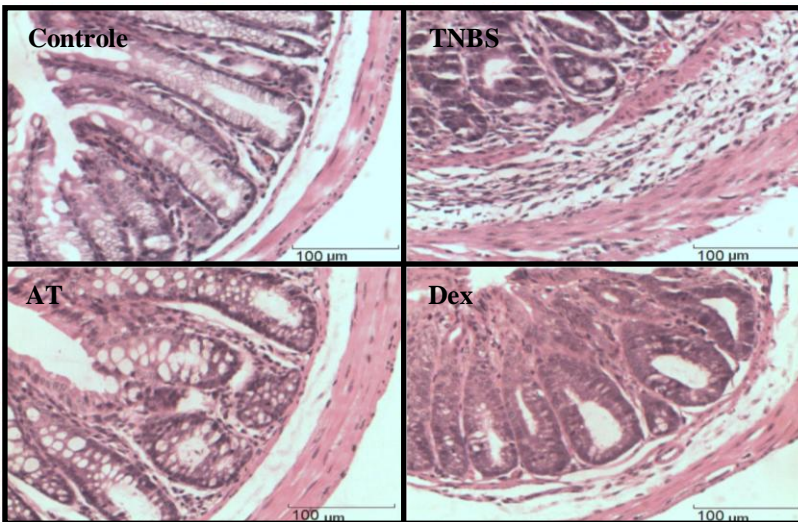
#### 4.6 Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano microscópico presente no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS

Como somente o tratamento com o antagonista do receptor  $ET_A$ , Atrasentan, foi capaz de alterar os parâmetros anteriormente

avaliados, os demais experimentos foram conduzidos somente com esta droga.

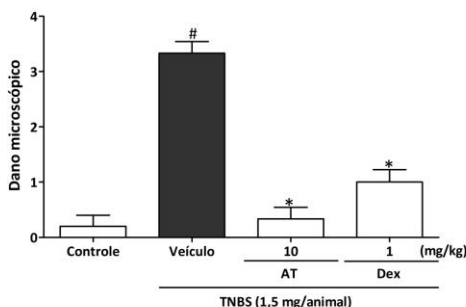
Conforme exemplificado na Figura 11A, as imagens histológicas dos cólons de animais controle revelaram níveis muito discretos de infiltração colônica de células inflamatórias. Em contrapartida, 72 horas após a indução de colite por TNBS, os cólons dos animais tratados apenas com salina apresentaram grande infiltração de polimorfonucleares no interior da lâmina própria da mucosa do cólon. Tal acúmulo foi acompanhado de diversos outros sinais de dano tecidual, como espessamento da parede da mucosa, destruição das criptas e perda de células *goblet*, que em conjunto resultaram em um escore elevado de dano microscópico. Os tratamentos com Atrasentan ou dexametasona reduziram a resposta inflamatória, reduzindo a infiltração de polimorfonucleares, o espessamento da parede intestinal, mantendo a integridade das criptas e desta maneira reduzindo o escore de dano microscópico em  $91.4 \pm 5.4$  e  $70.9 \pm 7.3\%$ , respectivamente, em relação ao grupo com colite tratado com veículo (Figura 11B).

(A)





(B)

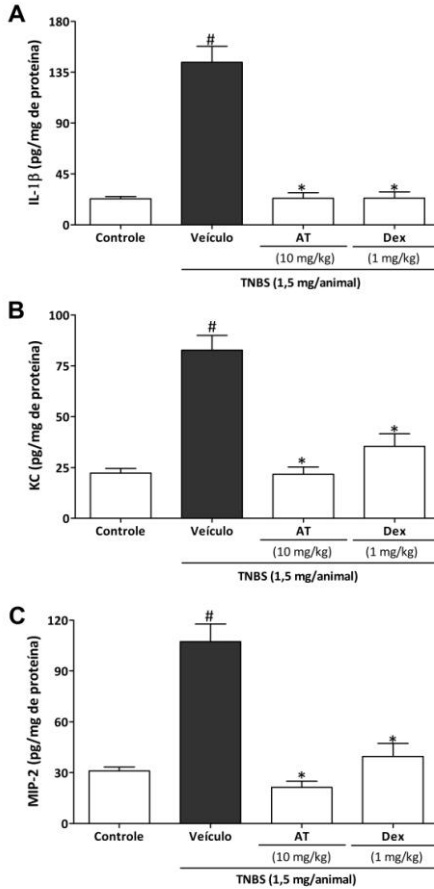


**Figura 11. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o dano microscópico colônico induzido pelo TNBS em camundongos.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Os cólons foram removidos setenta e duas horas após a instilação do TNBS e processados para análise do dano microscópico. (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do cólon de animais controle, TNBS, TNBS + Atrasentan (AT) e TNBS + Dexametasona (Dex), corados com H& (aumento de 200 X). (B) Análise do dano microscópico do cólon, determinado conforme escala de escore proposta por Neurath et al., 1995). As colunas representam a média do escore de dano microscópico dos cólons de 4-6 animais e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS segundo análise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn.

#### 4.7 Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre os níveis de IL-1 $\beta$ , KC, MIP-2, IL-10 e IL-13 presentes no cólon de camundongos com colite induzida por TNBS

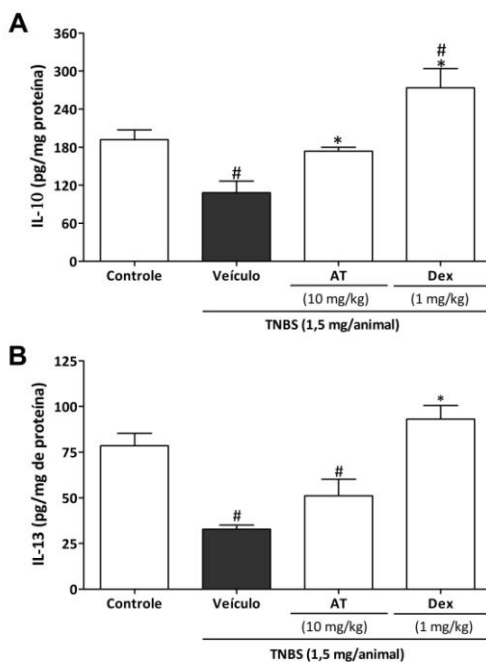
Os níveis teciduais das citocinas IL-1 $\beta$ , KC, MIP-2, IL-10 e IL-13, que segundo a literatura apresentam um importante papel na patofisiologia do cólon, foram quantificados no tecido colônico dos animais de todos os grupos experimentais, 72 h após a instilação do TNBS. A indução da colite resultou em um aumento marcante dos níveis de IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 (6,5; 3,7; e 3,4 vezes, respectivamente), em comparação aos animais do grupo controle. Os cólons dos animais tratados com Atrasentan (10 mg/ kg/dia, e.v.) ou com dexametasona (2 vezes ao dia, 1 mg/kg, s.c.) apresentaram os níveis dessas citocinas reduzidos quando comparados aos animais que receberam apenas TNBS. O tratamento terapêutico com Atrasentan reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  em  $96,1 \pm 2,6\%$  e de KC em  $95,1 \pm 2,9\%$ . O tratamento com dexametasona diminuiu os níveis de IL-1  $\beta$  em  $95,6 \pm 2,4\%$  e os de KC

em  $75,9 \pm 8,3\%$ . O tratamento com Atrasentan reduziu os níveis de MIP-2 para abaixo dos valores basais, enquanto a dexametasona reduziu os níveis de MIP-2 em  $85,5 \pm 8,5\%$  (Figura 12).



**Figura 12. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento dos níveis colônicos de IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 induzido pelo TNBS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg, s.c.) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Os cólons foram removidos setenta e duas horas após a instilação do TNBS e processados para análise dos níveis de IL-1 $\beta$  (A), KC (B) e MIP-2 (C). As colunas representam a média dos níveis dessas citocinas presentes nos cólons de 4 – 6 animais e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Nos animais do grupo TNBS, 72 h após a indução da colite, os níveis teciduais das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-13 estavam reduzidos em  $43,3 \pm 9,4$  e  $58,1 \pm 2,8$  %, respectivamente, quando comparados aos do grupo controle (Figuras 13A e 13B). O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg/dia, e.v.) foi capaz de recuperar parcialmente os níveis de IL-10, cerca de 90% em relação ao controle, mas não foi capaz de alterar os níveis de IL-13. O tratamento com dexametasona (2 vezes ao dia, 1 mg/kg, s.c.) foi capaz de recuperar os níveis teciduais de ambas as citocinas atingindo valores acima dos basais (Figuras 13A e 13B).

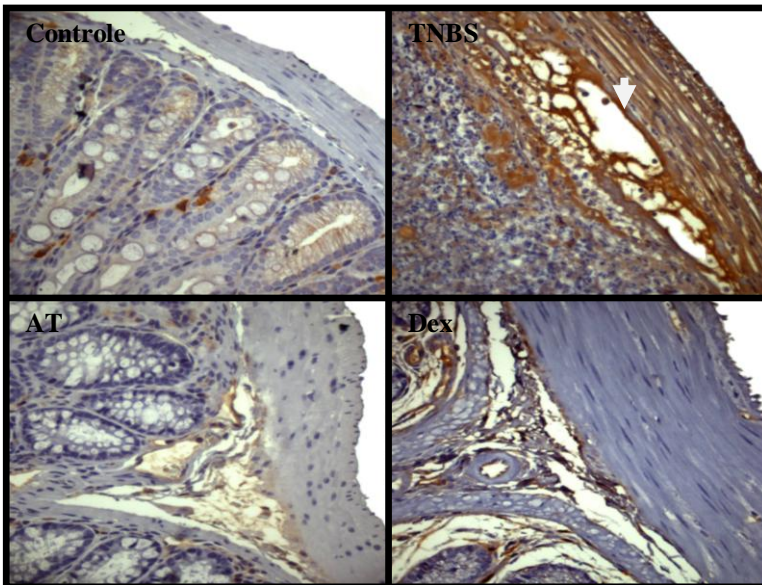


**Figura 13. Efeito do tratamento com antagonista do receptor  $ET_A$ , Atrasentan, ou com a dexametasona sobre a redução dos níveis de IL-10 e IL-13, induzida no cólon dos animais, pelo TNBS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Setenta e duas horas após a instilação do TNBS, os animais foram eutanaziados, os cólons removidos e processados para análise dos níveis teciduais de IL10 (A) e IL-13 (B). As colunas representam a média dos níveis teciduais dessas citocinas presente no cólon de 4 – 6 animais e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo TNBS conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

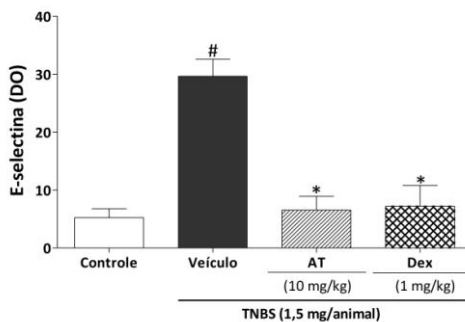
#### 4.8 Influência do tratamento com Atrasentan sobre a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e $\beta_2$ -integrina

Com o objetivo de avaliar um possível efeito modulador do tratamento com Atrasentan sobre a expressão aumentada das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina em resposta ao TNBS, os cólons dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram processados para a realização do ensaio de imunohistoquímica. Os resultados das figuras 14, 15 e 16 demonstram que, 72 h após a indução de colite, houve um aumento significativo na expressão das moléculas de adesão E-selectina (5,7 vezes), P-selectina (5,2 vezes) e  $\beta_2$ -integrina (3,7 vezes), em relação ao grupo controle. Os animais que receberam Atrasentan (10 mg/kg, e.v.) apresentaram uma redução pronunciada da expressão de E-selectina ( $85,7 \pm 8,0\%$ ), P-selectina ( $76,4 \pm 15,4\%$ ) e  $\beta_2$ -integrina ( $73,8 \pm 11,4\%$ ). Os animais tratados com dexametasona (1 mg/kg, s.c.) também apresentaram redução da expressão de E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina em  $82,9 \pm 12,4$ ;  $70,1 \pm 18,2$  e  $66,0 \pm 13,0\%$ , respectivamente.

(A)

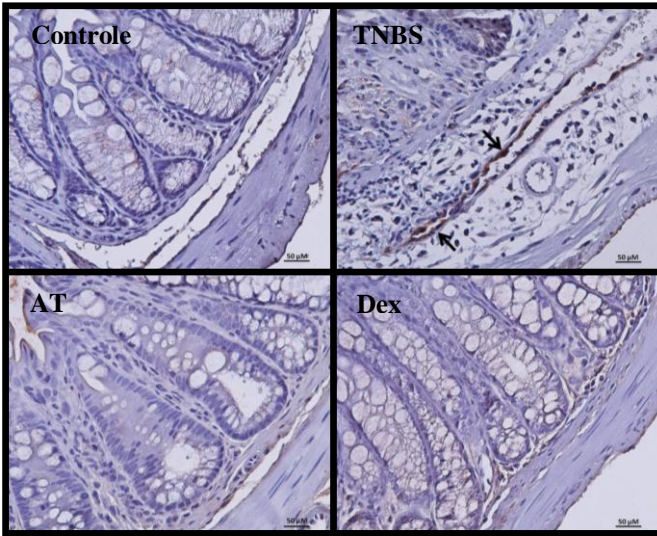


(B)

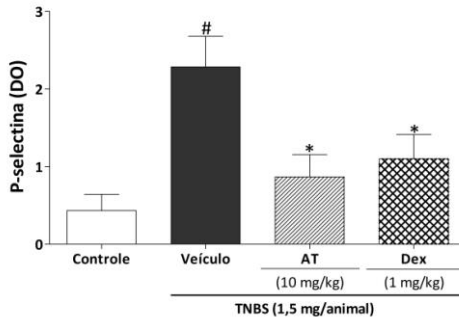


**Figura 14. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão E-selectina induzida pelo TNBS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Setenta e duas horas após a instilação do TNBS, os animais foram eutanaziados, os cólons removidos e processados para análise da expressão de E-selectina. (A) Fotomicrografias representativas de 4 cortes histológicos de cólons de 3-4 animais dos grupos: Controle, TNBS, TNBS + Atrasentan (AT) e TNBS + Dexametasona (Dex) marcados com anti-E-selectina (aumento de 200 X). (B) A quantificação da expressão da E-selectina está expressa por unidades arbitrárias, conforme descrito na seção materiais e métodos. O tratamento com Atrasentan, assim como com dexametasona, reduziu a expressão de E-selectina. As colunas representam a média da intensidade de expressão de E-selectina obtida com a análise do cólon de 3-4 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média. #  $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS, conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

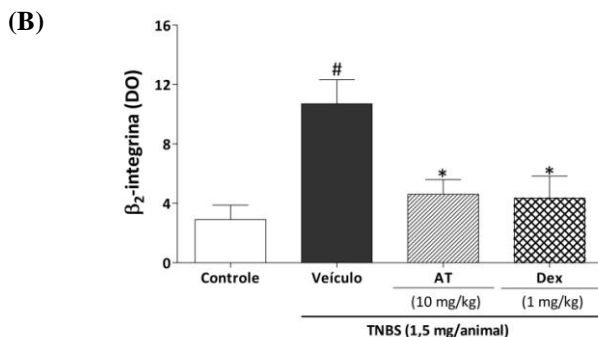
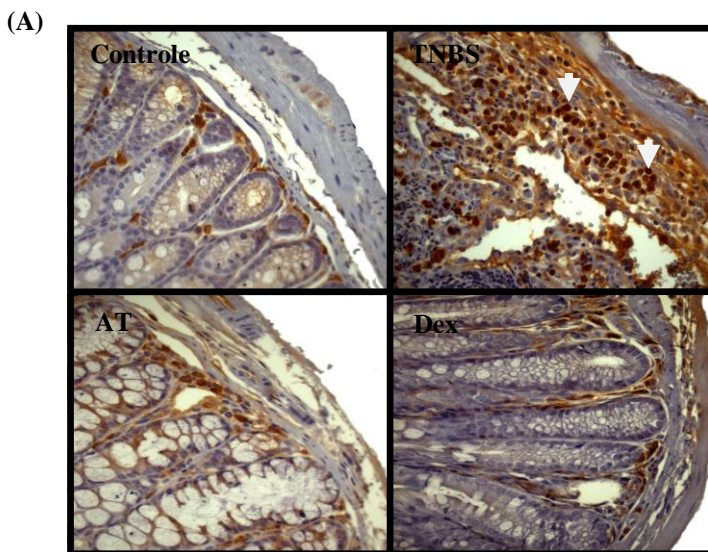
(A)



(B)



**Figura 15. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão P-selectina induzida pelo TNBS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Setenta e duas horas após a instilação do TNBS, os animais foram eutanaziados, os cólons removidos e processados para análise da expressão de P-selectina. (A) Fotomicrografias representativas de 4 cortes histológicos de cólons de 3-4 animais dos grupos: Controle, TNBS, TNBS + Atrasentan (AT) e TNBS + Dexametasona (Dex) marcados com anti-P-selectina (aumento de 200 X). (B) A quantificação da expressão da P-selectina está expressa por unidades arbitrárias, conforme descrito na seção materiais e métodos. O tratamento com Atrasentan, assim como com dexametasona, reduziu a expressão de E-selectina. As colunas representam a média da intensidade de expressão de P-selectina obtida com a análise do cólon de 3-4 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS, conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



**Figura 16. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre o aumento da expressão colônica da molécula de adesão  $\beta_2$  integrina induzida pelo TNBS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v.) ou com Dexametasona (1 mg/Kg) foi iniciado 24 h após a indução da colite. Setenta e duas horas após a instilação do TNBS, os animais foram eutanaziados, os cólons removidos e processados para análise da expressão da  $\beta_2$  integrina. (A) Fotomicrografias representativas de 4 cortes histológicos de cólons de 3-4 animais dos grupos: Controle, TNBS, TNBS + Atrasentan (AT) e TNBS + Dexametasona (Dex) marcados com anti- $\beta_2$  integrina (aumento de 200 X). (B) A quantificação da expressão da  $\beta_2$  integrina está expressa por unidades arbitrárias, conforme descrito na seção materiais e métodos. O tratamento com Atrasentan, assim como com dexametasona, reduziu a expressão de  $\beta_2$  integrina. As colunas representam a média da intensidade de expressão de  $\beta_2$  integrina obtida com a análise do cólon de 3-4 animais e as linhas verticais representam o erro padrão da média. #  $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo TNBS, conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls.

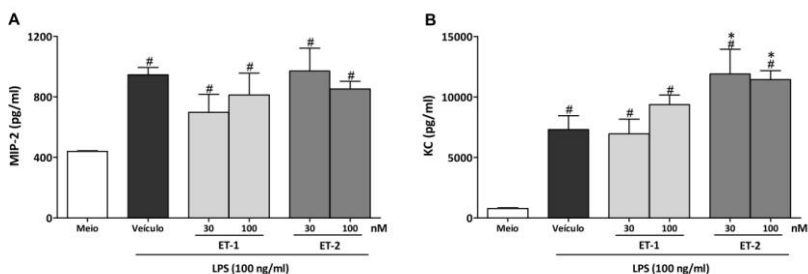
#### 4.9 Efeito do bloqueio dos receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> sobre a produção de citocinas induzida pelo LPS em macrófagos e neutrófilos peritoneais

Para elucidar se receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> poderiam modular diretamente a produção leucocitária de mediadores inflamatórios induzida por LPS (componente da membrana de bactérias gram-negativas, importantes na patogênese das IBDs), foram realizados ensaios *in vitro* com macrófagos e neutrófilos. Essas células foram isoladas do peritônio de camundongos Balb-c, após a injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio (3 %), conforme descrito na seção material e métodos.

A estimulação *in vitro* de macrófagos peritoneais com LPS (100 ng/mL) por 24 horas aumentou em 2,1 vezes a produção de MIP-2. Para melhor verificar o envolvimento das endotelinas na ativação dessas células, os macrófagos foram incubados com ET-1 e ET-2. Ambos os peptídeos mostraram-se incapazes de alterar, *per se*, a produção dessa citocina (dados não mostrados), bem como, de alterar a produção de MIP-2 induzida por LPS (Figura 17A).

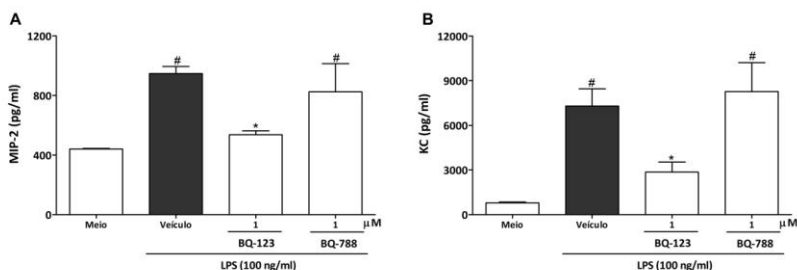
Da mesma maneira, a estimulação *in vitro* de macrófagos com LPS (100 ng/mL) por 24 horas aumentou a produção de KC em 9,2 vezes. A incubação com ET-1 (30 e 100 nM) ou ET-2 (30 e 100 nM), na ausência de LPS, foi incapaz de modular a produção de KC (dados não mostrados). Por outro lado, em macrófagos estimulados com LPS, a adição de ET-2, mas não de ET-1, nas doses de 30 e 100 nM, por 24 horas, foi capaz de potencializar o efeito do LPS, aumentando a produção de KC em 1,6 e 1,5 vezes, respectivamente (Figura 17B).





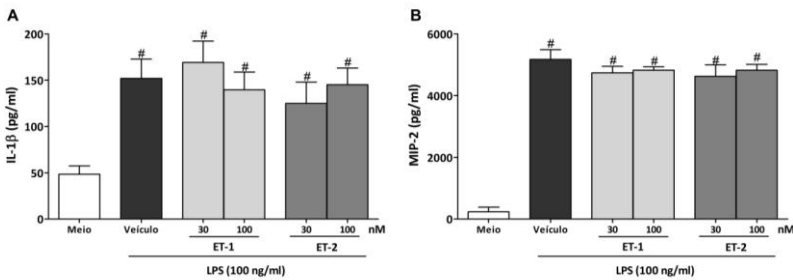
**Figura 17. Efeito da adição de ET-1 e ET-2 sobre a produção de MIP-2 e KC induzida por LPS em cultura de macrófagos.** Os macrófagos peritoneais foram coletados, lavados e estimulados *in vitro* com LPS (100ng/mL) por 24 horas, na presença ou ausência de ET-1 (30 - 100 ng/mL) ou ET-2 (30 -100 ng/mL). As colunas representam a média dos níveis de MIP-2 (A) e KC (B) e as linhas verticais o erro padrão da média, obtidos em quatro experimentos realizados em triplicata. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (meio); \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (LPS), conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Outra abordagem utilizada para verificar se haveria um papel autócrino de endotelinas endógenas na produção de citocinas por leucócitos ativados por LPS foi a adição dos antagonistas do receptor  $ET_A$  (BQ-123, 1  $\mu$ M) e  $ET_B$  (BQ-788, 1  $\mu$ M) na cultura. De maneira interessante, o BQ-123 foi capaz de inibir significativamente a produção de MIP-2 induzida em macrófagos pelo LPS em  $80,9 \pm 5,2$  % (Figura 18A). De maneira similar, BQ-123 (1  $\mu$ M), mas não BQ-788 (1  $\mu$ M), também foi capaz de inibir significativamente a produção de KC induzida em macrófagos pelo LPS, em  $70,8 \pm 8,8$  % (Figura 18B).



**Figura 18. Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o receptor  $ET_A$  e  $ET_B$  sobre a produção de MIP-2 e KC induzida por LPS em cultura de macrófagos.** Os macrófagos peritoneais foram coletados, lavados e estimulados *in vitro* com LPS (100ng/mL) por 24 horas, na presença ou ausência do antagonista do receptor  $ET_A$  (BQ-123, 1  $\mu$ M) ou do receptor  $ET_B$  (BQ-788, 1  $\mu$ M). As colunas representam a média dos níveis de MIP-2 (A) e KC (B) e as linhas verticais o erro padrão da média, obtidos em quatro experimentos realizados em triplicata. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (meio); \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (LPS), conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

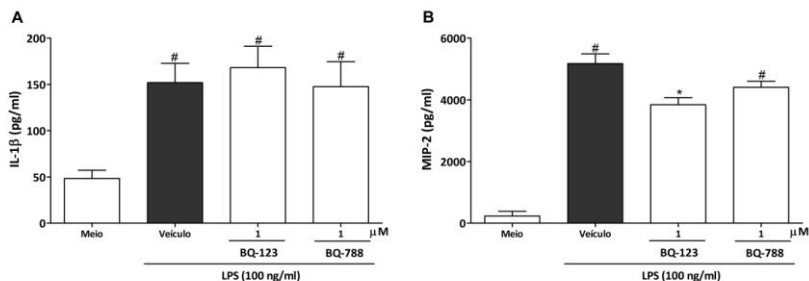
De maneira similar ao observado em macrófagos, neutrófilos peritoneais em cultura produzem citocinas pró-inflamatórias quando estimulados com LPS. Como demonstrado na figura 19A, a produção de IL-1 $\beta$  por neutrófilos encontrava-se aumentada em 3,1 vezes, na presença do LPS. Todavia, a adição de ET-1 (30 e 100 nM) ou ET-2 (30 e 100 nM) não foi incapaz de alterar a produção de IL-1 $\beta$  induzida pelo LPS (figura 19A). Da mesma forma, esses peptídeos não foram capazes de alterar a produção de IL-1 $\beta$ , *per se* (dados não mostrados).



**Figura 19. Efeito da adição de ET-1 e ET-2 sobre a produção de IL-1 $\beta$  e MIP-2 induzida por LPS em cultura de neutrófilos.** Os neutrófilos peritoneais foram coletados, lavados e estimulados *in vitro* com LPS (100 ng/mL) por 4 horas, na presença ou na ausência de ET-1 (30 e 100 nM) ou ET-2 (30 e 100 nM). As colunas representam a média dos níveis de IL-1 $\beta$  (A) e MIP-2 (B) e as linhas verticais o erro padrão da média, obtidos em quatro experimentos realizados em triplicata. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (meio), conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

A estimulação de neutrófilos *in vitro* com LPS (100 ng/mL) por 4 horas também foi capaz de aumentar a produção de MIP-2 em 22,3 vezes. A incubação com ET-1 (30 e 100 nM) ou ET-2 (30 e 100 nM) não foi capaz de modular a produção de MIP-2, seja na ausência (dados não mostrados) ou na presença de LPS (Figura 19B).

De maneira interessante, a adição do antagonista do receptor ET<sub>A</sub> BQ-123 (1  $\mu$ M), mas não do antagonista ET<sub>B</sub> BQ-788 (1  $\mu$ M), foi capaz de inibir parcialmente a produção de MIP-2 induzida pelo LPS, em  $26,9 \pm 4,6$  % (Figura 20B). Em contraste, nenhum dos antagonistas mostrou-se efetivo em inibir a produção de IL-1 $\beta$  estimulada pelo LPS (Figura 20A).



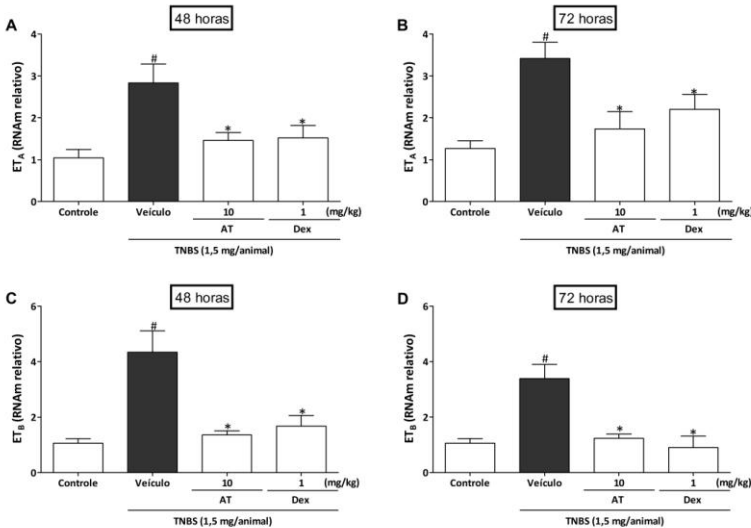
**Figura 20.** Efeito da adição dos antagonistas seletivos para o receptor  $ET_A$  e  $ET_B$  sobre a produção de  $IL-1\beta$  e  $MIP-2$  induzida pelo LPS em cultura de neutrófilos peritoneais. Os neutrófilos peritoneais foram coletados, lavados e estimulados *in vitro* com LPS (100 ng/mL) por 4 horas, na presença ou ausência do antagonista do receptor  $ET_A$  (BQ-123, 1  $\mu$ M) ou do receptor  $ET_B$  (BQ-788, 1  $\mu$ M). As colunas representam a média dos níveis de  $IL-1\beta$  (A) e  $MIP-2$  (B) e as linhas verticais o erro padrão da média, obtidos em quatro experimentos realizados em triplicata. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (meio); \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (LPS), conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

#### 4.10 Influência do tratamento Atrasentan sobre a expressão do RNAm para os receptores endotelinérgicos $ET_A$ e $ET_B$ e das isoformas prepro $ET-1$ e prepro $ET-2$ , em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS

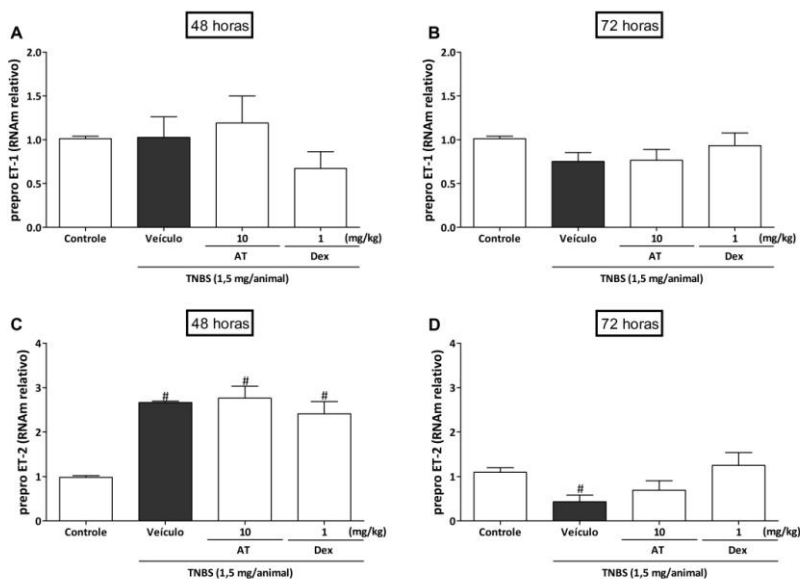
O conjunto de resultados apresentados até este ponto indicam que o Atrasentan melhora diversos aspectos da colite induzida por TNBS. Como o TNBS causou aumentos significativos e sustentados nos níveis colônicos de RNAm para os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , fomos verificar se haveria alguma correlação entre o efeito benéfico do tratamento com Atrasentan e a modulação da expressão de RNAm para ambos os receptores e para prepro- $ET-1$  e prepro  $ET-2$ . Para analisar a expressão dos receptores endotelinérgicos, no período de 48 e 72 horas após a indução da colite, os animais foram tratados com Atrasentan 24, 44 e 68 horas antes do sacrifício. O tratamento com Atrasentan foi capaz de reduzir os níveis do RNAm para os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  em cólons avaliados 48 e 72 horas após a administração de TNBS (Figura 21). As porcentagens de inibição da expressão do RNAm foram  $73,9 \pm 8,3$  % e  $71,9 \pm 14,4$  % para o receptor  $ET_A$  e de  $90,9 \pm 4,5$  % e  $91,4 \pm 5,5$  % para os receptores  $ET_B$  em 48 e 72 horas, respectivamente. A

exemplo do Atrasentan, o tratamento com dexametasona também foi capaz de reduzir os níveis de RNAm de ambos os receptores, tanto nos cólons removidos 48 quanto 72 horas após a indução da colite por TNBS (Figura 21).

Nos cólons dos animais do grupo TNBS, os níveis de RNAm para a prepro ET-1 retornaram aos níveis basais 48 horas após a indução da colite, permanecendo assim até 72 horas (Figura 22A e 22B). Já os níveis da isoforma prepro ET-2 estavam aumentados em 48 horas, mas apresentaram-se reduzidos novamente 72 horas após a indução da colite (Figura 22C e 22D). Os tratamentos com Atrasentan ou dexametasona, iniciados 24 horas após a indução da colite, não foram capazes de alterar os níveis de prepro ET-1 ou prepro ET-2 nos cólons removidos 48 e 72 horas após a administração de TNBS (Figura 22).



**Figura 21. Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a quantificação do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no cólon de camundongos após a colite induzida por TNBS.** Os resultados demonstram os níveis relativos de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em amostras de cólon obtidas de animais controle e de animais sacrificados 48 e 72 h após a administração de TNBS. O tratamento com Atrasentan (AT) ou Dexametasona (Dex), iniciado 24 h após a administração do TNBS, reduziu os níveis do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em cólons removidos 48 e 72 horas após a indução da colite. Cada amostra foi normalizada a partir dos níveis de GAPDH endógenos, e depois a quantificação relativa foi realizada utilizando as amostras do grupo controle como padrão de comparação. Cada valor representa a média de 4-7 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).



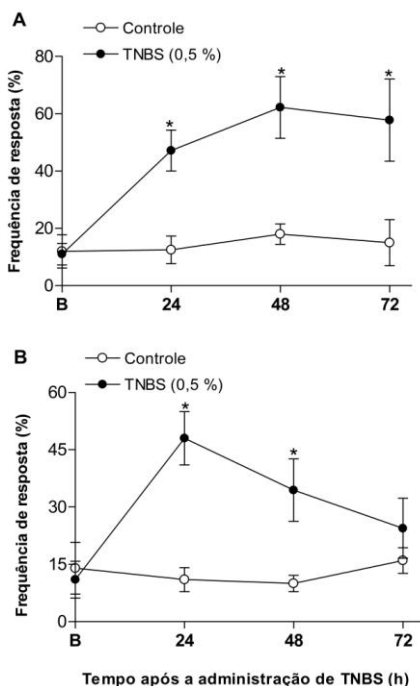
**Figura 22.** Influência do tratamento com Atrasentan ou dexametasona sobre a quantificação do RNAm para as isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2 no cólon de camundongos após a administração do TNBS. Os resultados demonstram níveis relativos de RNAm para as isoformas prepro ET-1 e prepro ET-2 em amostras de cólon obtidas de animais controle e de animais sacrificados 48 e 72 horas após a administração de TNBS. O tratamento com Atrasentan (AT) ou com dexametasona (Dex), iniciado 24 h após a indução da colite, não foi capaz de alterar os níveis de RNAm para nenhuma das isoformas. Cada amostra foi normalizada a partir dos níveis de GAPDH endógenos, e depois a quantificação relativa foi realizada utilizando as amostras do grupo controle como padrão de comparação. Cada valor representa a média de 4-7 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS conforme análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

4.11 Efeito da administração intracolônica de TNBS na sensibilidade dos camundongos à estimulação mecânica na região abdominal ou na pata

Como pode ser observado na figura 23, não houve diferença significativa entre os valores de limiar basal dos grupos de camundongos controle e TNBS avaliados quanto à sensibilidade mecânica. Porém, 24 horas após a indução de colite por TNBS (0,5 mg/100  $\mu$ L) os camundongos desenvolveram uma hiperalgesia

mecânica, evidenciada pelo aumento da frequência de respostas à estimulação mecânica com o filamento de von Frey na região abdominal (0,07 g) e na pata (0,4 g). A hiperalgesia mecânica na região abdominal decorrente da colite induzida por TNBS caracterizou-se como a resposta de hipersensibilidade nociceptiva pronunciada e duradoura. O aumento na frequência de resposta na região abdominal foi observada em 24 h (controle  $11,0 \pm 3,1\%$ , TNBS  $48,0 \pm 6,9\%$ ,  $P < 0.05$ ) e persistiu até 72 h após a indução da colite (Figura 23A). A hiperalgesia mecânica na pata, induzida pela administração intracolônica de TNBS, iniciou-se 24 horas (controle  $12,5 \pm 4,7\%$ , TNBS  $47,1 \pm 7,1\%$ ,  $P < 0.05$ ) e persistiu até 48 horas após a indução da colite (Figura 23B).

Por outro lado, camundongos tratados com doses mais elevadas de TNBS não foram capazes de desencadear um aumento da frequência da retirada da pata em resposta à estimulação mecânica em ambos os sítios (dados não mostrados). Na verdade, quando foram estimulados na parte inferior do abdômen os animais assumiram uma postura com as costas arqueadas e se tornaram imóveis, comportamentos esses que poderiam sugerir um desencadeamento excessivo de dor.

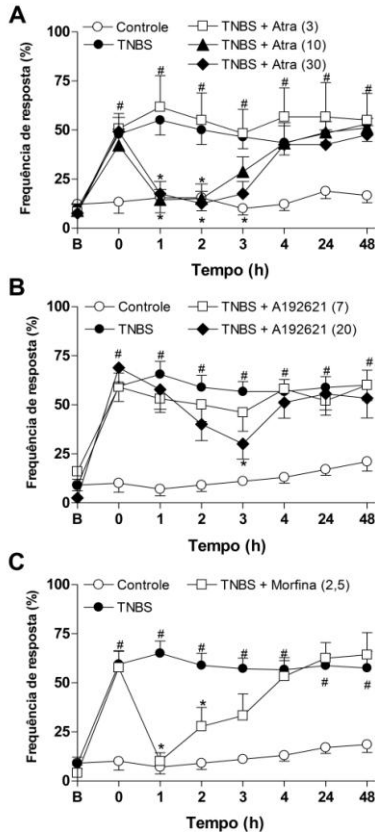


**Figura 23.** Efeito da administração intracolônica de TNBS (0,5 mg em 100  $\mu$ L 35% etanol) na sensibilidade dos camundongos à estimulação mecânica na região abdominal (A) e na pata traseira (B). Os dados representam a frequência de retirada em resposta a 10 aplicações do filamento de Von Frey no abdômen (0,07 g) ou na pata (0,4 g) antes, 24, 48 e 72 horas após a indução da colite. Cada ponto representa a média de retirada da pata  $\pm$  erro padrão da média de 5 a 6 animais. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle, conforme análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Para verificar o possível envolvimento das endotelinas na manutenção do quadro hiperálgico induzido pela colite experimental, o antagonista seletivo do receptor  $ET_A$ , Atrasentan (3, 10 e 30 mg/kg, e.v.), ou o antagonista seletivo do receptor  $ET_B$ , A-192621 (7 e 20 mg/kg, e.v.) foi administrado sistemicamente 24 horas após a indução da colite. A Figura 24A mostra que um único tratamento com o antagonista do receptor  $ET_A$  (10 e 30 mg/kg) foi capaz de abolir a hiperálgia mecânica no abdômen por 2 e 3 horas, respectivamente. Essas mesmas doses de Atrasentan também aboliram a hiperálgia mecânica na pata traseira pelos mesmos períodos (Figura 25A). Não foi observado nenhum efeito antihiperálgico em camundongos tratados com Atrasentan na dose de 3 mg/kg. O tratamento dos animais com A-

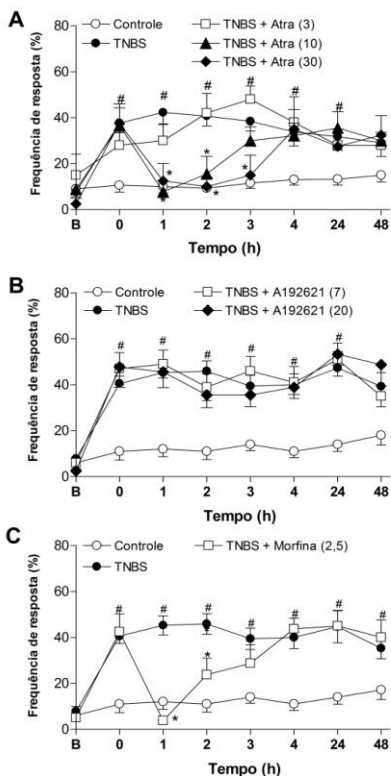
192621, na dose de 20 mg/kg (mas não 7 mg/kg) inibiu parcialmente a hiperalgesia mecânica no abdômen, somente 3 horas após a sua administração (Figura 24B).

O tratamento com morfina (2,5 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo, aboliu a hiperalgesia mecânica no abdômen e na pata traseira por até 2 horas após a sua administração (Figura 24C e 25C).



**Figura 24. Influência dos tratamentos com Atrasentan, A-192621 ou morfina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen.** Vinte e quatro horas após a instilação de TNBS (0,5 mg), os camundongos foram tratados com (A) Atrasentan (3, 10 ou 30 mg/kg, e.v.), (B) A-192621 (7 ou 20 mg/kg, e.v.) ou (C) morfina (2,5 mg/kg, s.c.). Os dados representam a frequência de retirada em resposta a 10 aplicações do filamento de Von Frey no abdômen (0,07 g) antes (basal) ou em diferentes pontos após a administração das drogas. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 a 6 animais. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).



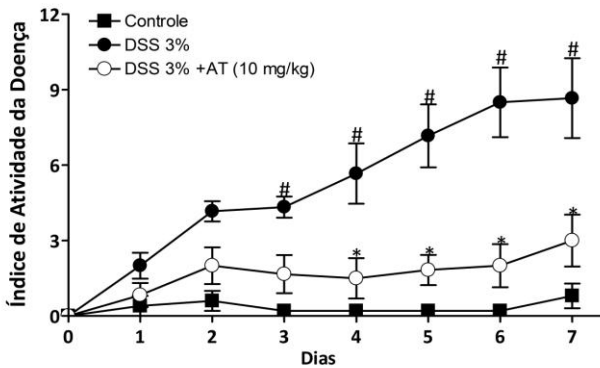


**Figura 25. Influência dos tratamentos com Atrasentan, A-192621 ou morfina na hiperalgesia mecânica referida na pata traseira.** Vinte e quatro horas após a instilação de TNBS (0,5 mg), os camundongos foram tratados com (A) Atrasentan (3, 10 ou 30 mg/kg, e.v.), (B) A-192621 (7 ou 20 mg/kg, e.v.) ou (C) morfina (2,5 mg/kg, s.c.). Os dados representam a frequência de retirada em resposta a 10 aplicações do filamento de Von Frey na pata traseira (0,4 g) antes (basal) ou em diferentes pontos após a administração das drogas. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 a 6 animais. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

#### 4.12 Influência do tratamento com Atrasentan sobre a colite induzida por DSS

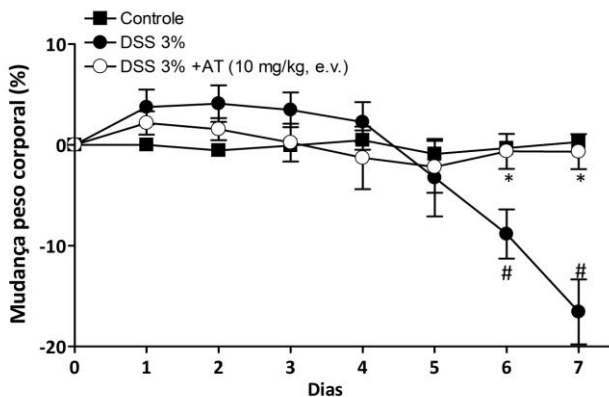
Embora o tratamento com DSS, durante 5 dias, seguidos por 2 dias de água de beber sem DSS, não tenha causado a morte de qualquer animal, a administração de DSS causou mudanças importantes, como perda de peso corporal, aparecimento de sangue nas fezes e diarreia.

Esses sinais são característicos da colite induzida por esse agente e podem ser quantificados para gerar um escore denominado índice da atividade da doença (IAD). Neste sentido, observamos que o aumento no IAD já era significativo a partir do terceiro dia, permanecendo elevado até o último dia de experimento, quando os animais foram eutanasiados. O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg), uma vez ao dia, iniciado concomitantemente à administração de DSS, minimizou o IAD significativamente do 3º ao 7º dia (Figura 26), ao recuperar a consistência das fezes, reduzir o sangramento nas fezes e a perda de peso corporal.



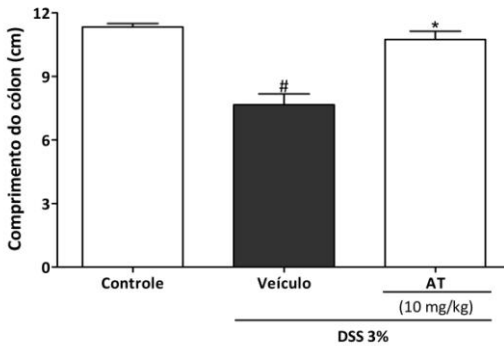
**Figura 26. Influência do tratamento com Atrasentan sobre o índice de atividade da doença (IAD) induzida por DSS em camundongos.** Durante o período experimental, os animais foram acompanhados diariamente com relação ao índice de atividade da doença. O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado 24 concomitantemente à administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Cada ponto representa a média do IAD de 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DSS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Como citado anteriormente, o tratamento com DSS induziu perda de peso corporal, que foi estatisticamente significativa no sexto e sétimo dias. O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg/dia) foi capaz de impedir a perda de peso dos animais induzida por DSS (Figura 27).



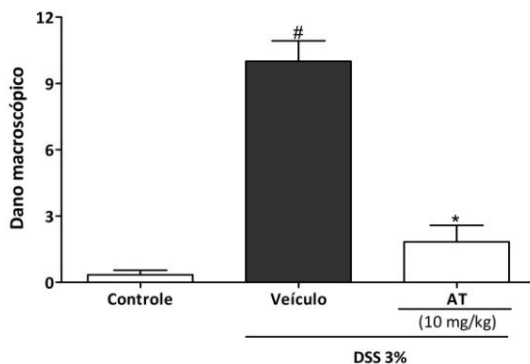
**Figura 27. Influência do tratamento com Atrasentan sobre a perda de peso induzida por DSS em camundongos.** Durante o período experimental os animais foram acompanhados diariamente com relação à perda de peso. O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado 24 concomitantemente a administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Os resultados representam a média da mudança no peso corporal de 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DSS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Outro parâmetro avaliado foi o encurtamento do cólon. Para isso, 7 dias após a primeira administração de DSS, a porção intestinal compreendida desde o cecum até ao ânus foi retirada e medida. Como demonstrado na figura 28, os animais que receberam apenas DSS apresentaram uma redução no comprimento do cólon de  $32,1 \pm 4,5$  %, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o tratamento dos animais com Atrasentan (10 mg/kg, e.v.) foi capaz de reverter o encurtamento.



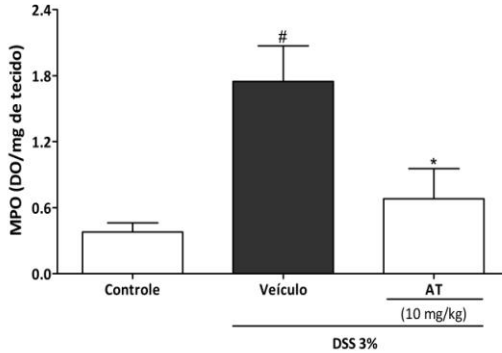
**Figura 28. Influência do tratamento com Atrasentan sobre o encurtamento induzido por DSS do cólon de camundongos.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado concomitantemente a administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Sete dias após a primeira administração de DSS, os animais tiveram a porção intestinal que corresponde desde o cecum até ao ânus, removida e medida. As colunas representam a média do comprimento dos cólons de 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo DSS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

A administração de DSS durante 5 dias, seguidos por 2 dias de água de beber sem DSS, induziu um dano de cólon macroscópico, analisado no sétimo dia de acordo com a tabela de escores proposta por Kimball e colaboradores (2004) (Tabela 6). O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg, e.v.) foi capaz de reduzir, de maneira significativa, o dano macroscópico induzido por DSS (Figura 29).



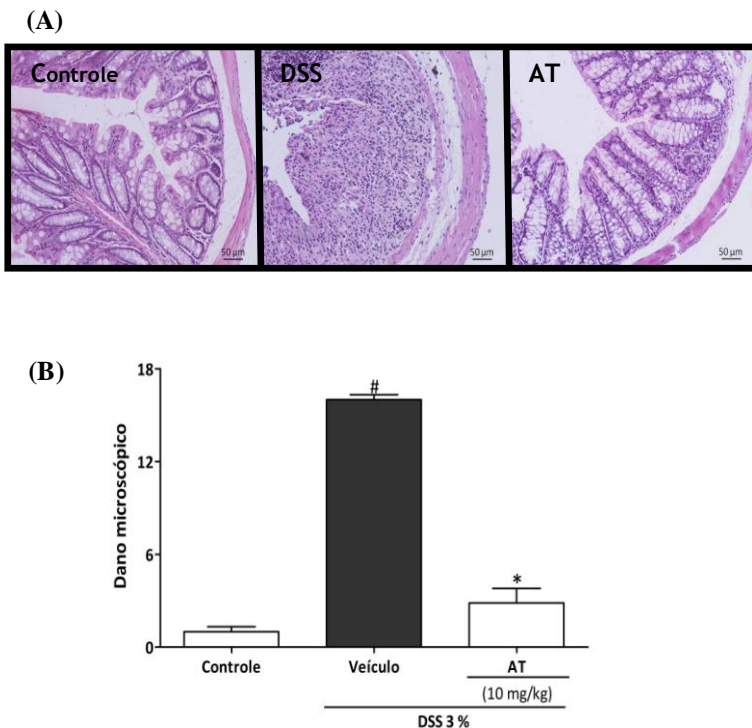
**Figura 29. Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano macroscópico no cólon de camundongos com colite induzida pelo DSS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado concomitantemente à administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Sete dias após a primeira administração de DSS, os cólons foram removidos e avaliados quanto ao dano macroscópico (Tabela 6). As colunas representam a média do dano macroscópico de 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DSS (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn).

O acúmulo de células polimorfonucleares, indicado pela atividade da enzima MPO no tecido do cólon, foi 4,6 vezes maior em animais com colite experimental induzida por DSS, do que no de animais controle. O tratamento com o Atrasentan, na dose de 10 mg/kg, inibiu de maneira marcante a atividade da MPO em  $70,9 \pm 16,6$  %, quando comparado ao grupo que recebeu apenas DSS (Figura 30).



**Figura 30. Influência do tratamento com Atrasentan sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon de animais com colite induzida por DSS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado concomitantemente à administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Sete dias após a primeira administração de DSS, os animais tiveram seus cólons removidos e analisados quanto à atividade desta enzima. As colunas representam a média da MPO do cólon de 6 animais por grupo e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle e \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DSS (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Como pode ser observado na figura 31A, as imagens histológicas de animais controle, não apresentaram, ou apresentaram de maneira muito discreta, sinais de infiltração de células inflamatórias para o tecido do cólon. Em contrapartida, foi observado uma grande infiltração de polimorfonucleares no interior da lâmina própria da mucosa do cólon de animais que receberam apenas DSS. Além disso, houve uma pronunciada destruição das criptas e perda de células goblet, resultando em dano tecidual. O tratamento com Atrasentan (10 mg/kg) reduziu a resposta inflamatória, diminuindo a infiltração de polimorfonucleares, o espessamento da parede intestinal e manteve a integridade das criptas, reduzindo desta maneira o escore de dano microscópico em  $86,6 \pm 5,8$  % (Figura 31B).



**Figura 31. Influência do tratamento com Atrasentan sobre o dano microscópico no cólon de animais com colite induzida por DSS.** O tratamento com Atrasentan (10 mg/Kg, e.v., 1 x ao dia) foi iniciado concomitantemente à administração do DSS, e perdurou até o sétimo dia. Os cólons foram removidos sete dias após a primeira administração de DSS e processados para análise do dano microscópico. (A) Fotomicrografias representativas de quatro cortes histológicos de tecido de cólon fixadas em H&E (aumento de 200 X) de 3-4 animais dos: Controle, DSS, DSS + AT (AT). (B) O dano microscópico avaliado conforme proposto por Van der Sluis e colaboradores (2006). As colunas representam a média do escore microscópico dos cólons de 4-6 animais e as linhas verticais o erro padrão da média. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo DSS conforme análise estatística utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a participação das endotelinas em dois modelos experimentais de colite. Nossos resultados demonstram claramente que o tratamento terapêutico com um antagonista do receptor  $ET_A$ , mas não do receptor  $ET_B$ , foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios macro- e microscópicos, a infiltração de células inflamatórias, os níveis de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de algumas proteínas importantes para a migração celular no modelo de colite experimental induzida por TNBS. Resultados semelhantes foram observados no modelo de colite experimental induzido pelo DSS, onde o bloqueio farmacológico do receptor  $ET_A$  foi capaz de minimizar o dano tecidual macroscópico e microscópico, a migração celular e o índice de atividade da doença observado neste modelo. Esse conjunto de resultados sugere que os efeitos anti-inflamatórios do atrasentan não se restringem a um modelo específico de colite.

Vários modelos animais vêm sendo desenvolvidos para melhor compreender os mecanismos envolvidos na patogênese das IBDs. Embora esses modelos pré-clínicos não representem a complexidade da doença que acomete o homem na totalidade, eles constituem valiosas ferramentas para análise de muitos aspectos importantes das IBDs. Esses modelos são divididos em quatro categorias: modelos de colite espontânea, modelos de colite induzida por agentes químicos em animais de experimentação com respostas imunes normais, modelos de transferência adaptativa e modelos de modificação genética (deleção gênica e transgênica) (Hibi et al., 2002).

Os modelos de colite induzidos por agentes químicos são os mais comumente utilizados e reproduzem vários aspectos imunológicos e histopatológicos observados nas IBDs em humanos. O aparecimento da inflamação intestinal nesses modelos é rápido, o que torna sua utilização relativamente simples. Alguns modelos químicos são realizados através da inserção de um cateter no colón do animal (camundongos, ratos ou coelhos) para instilação de um determinado agente. Dois modelos bastante conhecidos e que utilizam esse tipo de técnica são o do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e o da oxazolona. Ambos agentes requerem a diluição em etanol, que tem como função quebrar a barreira da mucosa facilitando o contato de antígenos luminais com as células do sistema imune presentes na lâmina própria.



Outra forma de induzir inflamação intestinal por um agente químico é a utilização, por via oral, do sulfato de dextrana sódico (DSS). Esse agente é diluído na água que os animais bebem e pode ser administrado durante vários dias, permitindo assim analisar tanto aspectos agudos como crônicos das IBDs. Ainda não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual o DSS induz colite, mas acredita-se que seja um efeito tóxico direto sobre as células epiteliais do trato gastrointestinal. Animais deficientes em linfócitos T e B desenvolvem colite severa, por esta razão, sugere-se que a resposta imune adaptativa não seja tão importante para o desenvolvimento da colite experimental (pelo menos na fase aguda). Desta maneira, a colite experimental aguda induzida por DSS é particularmente útil para se estudar o papel do sistema imune inato nesta resposta (Wirtz e Neurath, 2007). A inflamação intestinal aguda causada pelo DSS é caracterizada principalmente por forte diarreia, ulcerações no epitélio intestinal e infiltração maciça de granulócitos, sendo este modelo um dos que melhor mimetizam a doença observada em humanos.

No presente estudo foram padronizados e utilizados os modelos de colite experimental induzidos por TNBS e DSS em camundongos BALB-c.

O modelo de colite induzido por TNBS em ratos foi descrito por Morris e colaboradores em 1989 e modificado para a utilização em camundongos por Neurath e colaboradores (1995). Esse modelo vem sendo amplamente utilizado em vários estudos, devido sua similaridade com as IBDs em humanos, e tem contribuído para a investigação dos mecanismos envolvidos e também para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para essas doenças (Morris et al., 1989; Elson et al., 1995; Elson et al., 2005; Menozzi et al., 2006).

Neste modelo experimental, a inflamação intestinal é geralmente mais acentuada nos primeiros três a cinco dias após a administração do TNBS. Em função disso, a maioria dos pesquisadores avalia os diferentes parâmetros dentro deste período (Wirtz et al., 2007). Dados recentes indicam que a suscetibilidade para o desenvolvimento da colite por TNBS varia entre as diferentes linhagens de camundongos. Por exemplo, camundongos das linhagens SJL e Balb/c são mais suscetíveis, enquanto que C57BL/6 são mais resistentes à indução da colite por TNBS (Kawada et al., 2007).

O TNBS penetra na parede intestinal causando ulcerações e necrose no tecido do cólon, que estão associadas à perda das junções entre as células epiteliais e ao aumento do infiltrado celular na lâmina própria, causando lesão das criptas intestinais (Menozzi et al., 2006;

Torres et al., 1999). Essas alterações teciduais desencadeiam outras complicações sistêmicas, como a diminuição da absorção de nutrientes, perda de peso, diarreia e prolapso retal (Kawada et al., 2007; Neurath et al., 1995). De acordo com essas alterações previamente descritas, o presente estudo demonstrou que, no transcorrer das 72 horas que se seguem à administração de TNBS, os animais desenvolveram sinais severos de colite, caracterizados por diarreia sanguinolenta, prolapso retal e uma profunda e sustentada perda de peso, efeitos estes que resultaram em alta mortalidade, enquanto os do grupo controle recuperaram rapidamente a perda de peso induzida pelo período de jejum e mantiveram-se saudáveis. Dessa forma, nossos dados demonstraram que, em nossas condições experimentais, o TNBS foi eficaz na indução da colite, mostrando-se, portanto, reprodutível e concordante com os dados da literatura (Antonioli et al., 2007; Sugimoto et al., 2002; Zhang et al., 2006; Zhao et al., 2007).

O modelo murino de inflamação intestinal induzida por DSS foi descrita por Okayasu e colaboradores em (1990). Esse modelo, assim como o modelo do TNBS, vem sendo amplamente utilizado. O presente estudo demonstrou que os camundongos que receberam DSS ao longo de 5 dias, seguido de 2 dias de água de beber sem DSS, desenvolveram sinais severos de colite, como diarreia sanguinolenta e perda de peso. Além disso, a análise histológica do cólon destes animais revelou um proeminente infiltrado de células inflamatórias, uma considerável perda de criptas no epitélio e ulceração (Okayasu et al., 1990; Kimball et al., 2004; Van der Sluis et al., 2006).

Apesar de suas limitações, de forma geral, os modelos de colite experimental têm contribuído para o entendimento dos mecanismos imunológicos, patológicos e fisiológicos, além de serem importantes ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, mesmo que muitos desses modelos sejam de grande valor para a análise experimental dos mecanismos envolvidos nas IBDs, poucos deles parecem reproduzir a IBD observada em humanos. Por este motivo, o desenvolvimento de novos modelos que permitam avaliar as alterações da IBD, principalmente quanto à cronicidade da doença, ainda são necessários (Bouma e Strober, 2003).

Relatos na literatura sugerem a participação das endotelinas na inflamação intestinal em diferentes modelos experimentais de colite. O tratamento com bosentan e Ro 38-5695, ambos antagonistas não seletivos (ou duais) de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, foi capaz de reduzir a progressão do dano tecidual na colite induzida por TNBS em ratos (Gulluoglu et al., 1999; Hogaboam et al., 1996; Padol et al., 2000). Na

colite induzida por DSS, o inibidor da ECE-1, SM19712, também reduziu o dano tecidual (Lee et al., 2009). Esses resultados são evidências de que o sistema das endotelinas atua em modelos animais de colite.

Existem controvérsias quanto à possível relevância das endotelinas na iniciação e ou manutenção dos sintomas da doença, bem como acerca de qual regime de tratamento com os antagonistas dos receptores endotelinérgicos seria mais adequado. Hogaboam e colaboradores (1996) reportaram que o tratamento profilático de ratos com bosentan foi eficaz em reduzir o dano colônico macroscópico causado pelo TNBS, mas não foi efetivo quando administrado 1 hora após a indução da colite. De fato, evidências sugerem que, as endotelinas contribuem para a vasculite nas IBDs por induzir uma isquemia intestinal através da sua potente ação vasoconstritora, e que esta seria uma importante etapa na iniciação da inflamação no intestino (Murch et al., 1992). Na colite induzida por TNBS em ratos ocorre uma redução drástica do fluxo sanguíneo, o qual é restaurado pelo tratamento com bosentan ou antagonistas de receptores  $ET_A$  (LU-135252 e BQ-485), mas não  $ET_B$  (BQ-788), sugerindo um importante papel dos receptores  $ET_A$  nas alterações de fluxo sanguíneo. Essas evidências, obtidas em animais tratados com antagonistas endotelinérgicos antes da indução da colite, sugerem que as endotelinas contribuem para a iniciação do processo inflamatório.

No entanto, a participação das endotelinas na progressão ou manutenção da resposta inflamatória do cólon ainda não está clara. Considerando que os pacientes com IBDs procuram atendimento médico quando a doença já está instalada, o presente estudo investigou se o tratamento com antagonistas seletivos para os receptores  $ET_A$  ou  $ET_B$  após a indução da colite (i.e. tratamento terapêutico) poderia reverter ou atenuar a progressão do quadro. Nesse contexto, Anthoni e colaboradores (2006) haviam demonstrado que o tratamento terapêutico com bosentan reduz o dano tecidual associado à colite induzida por DSS. Contudo, como o bosentan é um antagonista dual dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , o papel de cada receptor no desenvolvimento da colite, bem como a ocorrência de possíveis alterações nas taxas de expressão de prepro ET-1 e prepro ET-2 no transcorrer deste quadro permaneciam desconhecidos.

Portanto, fomos analisar como o tratamento com TNBS modificaria a expressão do RNAm dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  e dos precursores de ET-1 e ET-2 (prepro ET-1 e prepro ET-2, respectivamente), no cólon em três diferentes momentos após a

instilação desse agente indutor da colite, utilizando a técnica de *real time* RT-PCR. Os resultados do presente estudo demonstram que existe uma expressão basal (constitutiva) do RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no cólon, e que durante o processo inflamatório (24, 48 e 72 horas) os níveis de RNAm desses receptores encontram-se aumentados. Embora a expressão do RNAm para ambos os receptores estivesse aumentada nos diferentes intervalos de tempo avaliados, os níveis de expressão de RNAm para a prepro ET-1 e prepro ET-2 variaram de modo independente. Os níveis de RNAm para ambas isoformas apresentaram-se reduzidos 24 horas após a administração de TNBS, mas os para a prepro ET-1 retornaram aos níveis basais 48 horas após a administração do TNBS, permanecendo assim até 72 horas. Já os níveis de RNAm para a prepro ET-2 estavam aumentados acima dos níveis de expressão constitutiva em 48 horas, mas reduziram novamente 72 horas após a indução da colite. McCartney e colaboradores (2002) demonstraram que, na colite experimental induzida por TNBS em ratos, os níveis do RNAm para prepro ET-1 e prepro-ET-2 estavam aumentados 24 horas após a indução da colite. Todavia, Takisawa e colaboradores (2005) demonstraram, através de imunistoquímica, uma redução na expressão da proteína ET-2 24 horas após a indução da colite por DSS em camundongos. Estes resultados sugerem que existem diferenças importantes entre os modelos experimentais de colite, bem como entre as espécies utilizadas, nas alterações de expressão de ET-1 e ET-2 no cólon.

McCartney e colaboradores (2002) sugeriram que as endotelinas não apresentam relevância nas IBDs em humanos, uma vez que pacientes com UC e CD apresentaram níveis reduzidos desses peptídeos. Vale a pena ressaltar que, no nosso modelo, a expressão desses peptídeos variou ao longo do tempo. Logo, pode ser que a redução encontrada nesses pacientes tenha sido apenas uma questão na cinética de expressão desses peptídeos. De qualquer modo, é relevante mencionar que nosso estudo sugere que a colite por TNBS está associada a um aumento expressivo na expressão colônica de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, que poderia compensar os níveis mais baixos de endotelinas produzidos no tecido.

Sabendo que os animais tratados com TNBS já apresentam um infiltrado inflamatório significativo no cólon 24 horas após a indução da colite (Bento et al., 2008), e que ambos os receptores se encontravam aumentados nesse tecido, fomos verificar o potencial terapêutico dos antagonistas seletivos para os receptores ET<sub>A</sub> (Atrasentan) e ET<sub>B</sub> (A192621). O tratamento com antagonista seletivo dos receptores ET<sub>B</sub>

A-192621 não foi capaz de reduzir o dano macroscópico, o peso do cólon ou a mortalidade nem em recuperar a perda de peso corporal. Por outro lado, o antagonista seletivo do receptor ET<sub>A</sub> atrasentan reduziu o dano macroscópico e o edema do cólon de maneira dose-dependente. Além disso, os animais tratados com atrasentan recuperaram o peso corporal e apresentaram uma taxa de mortalidade reduzida. Esses resultados sugerem que mecanismos sinalizados por receptores ET<sub>A</sub>, mas não ET<sub>B</sub>, desempenham papel importante na progressão da colite experimental induzida por TNBS.

Está bem estabelecido na literatura que as células polimorfonucleares têm um papel fundamental no dano tecidual induzido pelo TNBS, por liberarem diversos mediadores inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio, mediadores lipídicos, proteases e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Bento et al., 2008; Kuhl et al., 2007). Como observamos uma redução do dano tecidual após o tratamento com o antagonistas seletivo para o receptor ET<sub>A</sub>, fomos averiguar se esta melhora estaria associada à redução do infiltrado celular, quantificando o influxo de neutrófilos indiretamente através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO está presente nos grânulos do citoplasma dos neutrófilos ativados, onde é responsável pela destruição dos microorganismos que são fagocitados por essas células, clivando estes agentes externos em pequenos peptídeos (Nauseef, 2007). Além disso, a MPO pode ser liberada para o exterior da célula, podendo dessa forma aumentar, junto às espécies reativas de oxigênio, a destruição tecidual (Klebanoff, 2005). De fato, nossos resultados e de outros autores (Klebanoff, 2005; Bento et al., 2008) demonstram uma correlação direta entre os níveis elevados de MPO e lesão tecidual. Três dias após a indução da colite, os animais que receberam TNBS apresentaram um aumento significativo na atividade da MPO em comparação ao grupo controle. O tratamento com atrasentan, antagonista do receptor ET<sub>A</sub>, foi capaz de reduzir a atividade desta enzima de maneira significativa, enquanto o tratamento com A-192621, antagonista seletivo do receptor ET<sub>B</sub>, não apresentou nenhum efeito, corroborando os dados anteriores que demonstram que o tratamento com o antagonista do receptor ET<sub>B</sub> não melhorava o dano macroscópico.

Esses dados foram ainda validados pela análise histológica, que revelou a ocorrência, 72 horas após a indução da colite por TNBS, de grande infiltração de polimorfonucleares no interior da lâmina própria da mucosa do cólon, bem como de sinais de espessamento da parede da mucosa, destruição das criptas e perda de células *goblet*. O tratamento

com atrasentan atenuou o dano tecidual microscópico, reduzindo a infiltração de polimorfonucleares e o espessamento da parede intestinal, de modo a manter a integridade das criptas. Nossos dados sugerem que a sinalização mediada através de receptores  $ET_A$ , mas não de receptores  $ET_B$ , desempenha um papel nos processos de migração celular em períodos posteriores ao início da colite. Outros estudos sugerem que as endotelinas estão envolvidas na migração celular, uma vez que exercem efeitos quimiocinéticos sobre neutrófilos *in vitro* (Elferink e de Koster, 1994) e promovem agregação deste tipo de célula (Gomez-Garre et al., 1992; Lopez-Farre et al., 1995). Além disso, já foi descrito que a ET-1 aumenta a produção de IL-8, uma quimiocina importante da migração de neutrófilos, por células endoteliais derivadas de cérebro humano em cultura, e que o meio de cultura das células estimuladas com ET-1 apresenta atividade quimiotática para migração de polimorfonucleares (Hofman et al., 1998). Anthoni e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com bosentan, antagonista dual dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , reduz a adesão de leucócitos em vênulas na submucosa do cólon em animais com colite induzida por DSS. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que as endotelinas estão envolvidas fortemente no influxo de neutrófilos e ainda sugere que esses peptídeos constituem um fator causal importante do dano tecidual que se verifica na colite.

O processo de transmigração de neutrófilos ocorre através de fases distintas: marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia. A marginação é o processo do movimento do neutrófilo da região central do fluxo sanguíneo para a periferia, o que permite sua adesão fraca a células endoteliais vasculares, que é mediada por moléculas de adesão expressas nas membranas celulares, denominadas selectinas (Marshall et al., 2003). As selectinas (E-selectina e P-selectina) são expressas pelas células endoteliais e são proteínas fundamentais para ao processo de rolamento do neutrófilo, permitindo a sua desaceleração na passagem por sobre o endotélio (Ley et al., 2007).

Outras moléculas de adesão, como as integrinas, também participam do processo de rolamento auxiliando na adesão leucocitária. As integrinas, como a  $\beta_2$  e a molécula intercelular de adesão 1 (ICAM-1), estão intimamente ligadas ao processo de adesão firme do leucócito sobre o endotélio vascular (Ley et al., 2007), o que facilita a sua transmigração celular ao foco inflamatório. Posteriormente, os neutrófilos atravessam o endotélio através de junções entre as células, caracterizando assim o processo de diapedese (transmigração), que

também pode ser facilitada por moléculas de adesão (Kelly et al., 2007). Além disso, as moléculas quimioatraentes facilitam a migração de neutrófilos pois, ao se ligarem a receptores presentes nas células endoteliais, convertem as integrinas para um estado de alta afinidade, resultando em uma ligação firme dos leucócitos ao endotélio no local da inflamação (Simon e Green, 2005).

Para melhor entender os mecanismos pelos quais os receptores ET<sub>A</sub> estão envolvidos na migração de leucócitos, fomos investigar se tratamento com atrasentan poderia modular a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina no cólon. A análise imunoistoquímica do cólon de animais controle demonstrou uma pequena expressão constitutiva da  $\beta_2$ -integrina em leucócitos e da P-selectina e da E-selectina em células endoteliais presentes no cólon. A instilação de TNBS aumentou significativamente a expressão dessas três moléculas, enquanto o tratamento com atrasentan (a exemplo da dexametasona) reduziu significativamente a expressão de E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina.

Dentro desse contexto, foi demonstrado que a ET-1 modula a expressão de algumas moléculas de adesão, como L-selectina, CD11b/CD18 e CD45a, na superfície de neutrófilos (Zouki et al., 1999). ET-1, ET-2 e ET-3 aumentam a expressão das moléculas de adesão E-selectina, ICAM-1 e VCAM (molécula vascular de adesão celular) em células endoteliais isoladas de cérebro humano, de maneira dose e tempo dependentes (McCarron et al., 1993). Foi demonstrado ainda que a ET-1 aumenta a expressão de VCAM na superfície de neutrófilos e o acúmulo de seu RNAm em células endoteliais humanas tratadas com TNF- $\alpha$  (Ishizuka et al., 1999). Em conjunto, nossos dados e os da literatura sugerem que as endotelinas, atuando através dos receptores ET<sub>A</sub>, alteram a migração celular em parte por modularem a expressão de moléculas de adesão, contribuindo desta maneira para a manutenção do quadro inflamatório.

No processo inflamatório intestinal, os macrófagos, as células endoteliais, os fibroblastos e as células epiteliais secretam citocinas e quimiocinas (moléculas quimioatraentes), que atuam na migração de neutrófilos. Além disso, as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que são liberadas por estes tipos celulares, aumentam a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (MacDermott, 1999). Esse aumento na produção de citocinas e quimiocinas e na expressão de moléculas de adesão promove uma maior migração de macrófagos e granulócitos para a mucosa intestinal inflamada. Sabendo-se que a

expressão de moléculas de adesão pode ser regulada por citocinas e quimiocinas (Osborn et al., 1989; Sanders et al., 1992; Weller et al., 1992; Collins et al., 1995; Yao et al., 1996; Stocker et al., 2000) e que IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC estão especialmente envolvidas na migração de neutrófilos (Carolan et al., 1997; Feniger-Barish et al., 2003; Ramos et al., 2003; Fuhler et al., 2005; Bachmann et al., 2006), fomos avaliar o efeito do atrasentan sobre os níveis desses quimioatraentes em amostras de cólon obtidas 72 horas após a indução da colite. A administração de TNBS resultou em um aumento marcante nos níveis de IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC no cólon dos animais. O tratamento com atrasentan foi capaz de reduzir os níveis teciduais dessas citocinas, sugerindo que o receptor ET<sub>A</sub> está envolvido na produção desses mediadores e conseqüentemente na expressão de moléculas que contribuem para a migração de neutrófilos.

Além da migração celular, as endotelinas são capazes de modular a produção de IL-8 e IL-1 em macrófagos, células endoteliais e epiteliais, sugerindo um papel desses peptídeos na ativação celular (Cunningham et al., 1997; Hofman et al., 1998; Peng et al., 2008; Speciale et al., 1998). Uma vez que as células inflamatórias presentes no cólon tratado com TNBS produzem citocinas e quimiocinas, a diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC, observada em resposta ao tratamento com atrasentan, poderia envolver outros mecanismos adicionais à simples a redução da migração de células inflamatórias para o sítio de lesão. Para elucidar se receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> poderiam modular diretamente a produção leucocitária de mediadores inflamatórios induzida por LPS (componente da membrana de bactérias gram-negativas, importantes na patogênese das IBDs), foram realizados ensaios *in vitro* com macrófagos e neutrófilos peritoneais. A estimulação *in vitro* de macrófagos com LPS aumentou a produção de MIP-2 e KC, sendo que a administração combinada do antagonista do receptor ET<sub>A</sub> BQ-123 foi capaz de inibir significativamente a produção dessas citocinas. De maneira similar, a estimulação de neutrófilos com LPS aumentou a produção de IL-1 $\beta$  e MIP-2, sendo que o tratamento com BQ-123 inibiu parcialmente o efeito do LPS sobre a produção de MIP-2, mas não de IL-1 $\beta$  nessas células. Esses dados sugerem fortemente que a redução dos níveis de mediadores inflamatórios observada no cólon de animais tratados com antagonista ET<sub>A</sub> não é apenas um reflexo da redução da migração celular. A capacidade do atrasentan reduzir a produção de citocinas por leucócitos ativados por LPS é especialmente relevante pelo fato do tratamento *in vivo* ter sido iniciado 24 horas após o TNBS, momento em que já existem células inflamatórias no tecido



colônico. A IL-1 $\beta$  é uma importante citocina capaz de ativar muitas células imunes e inflamatórias. Embora o tratamento *in vivo* com o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> tenha sido capaz de reduzir os níveis colônicos desta citocina, o bloqueio *in vitro* deste receptor não foi capaz de alterar a produção de IL-1 $\beta$  induzida por LPS em neutrófilos. Esses dados sugerem que a IL-1 $\beta$  não é exclusivamente produzida por essas células. De fato, essa citocina pode ser produzida por vários outros tipos celulares, entre eles, monócitos/macrófagos e células endoteliais (Dinarello, 1994).

Para melhor verificar o envolvimento das endotelinas na ativação celular, macrófagos e neutrófilos foram ainda incubados com ET-1 e ET-2. Ambos os peptídeos mostraram-se incapazes de alterarem, *per se*, a produção de IL-1 $\beta$ , KC ou MIP-2. De maneira interessante, porém, a produção de KC por macrófagos estimulados com LPS foi potencializada pela presença de ET-2 no meio de cultura. Esses resultados demonstram que as endotelinas podem potencializar a produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos, os quais contribuem para o aumento na expressão de moléculas de adesão e conseqüente influxo de leucócitos. É importante ressaltar ainda que, 48 h após a indução da colite, os níveis de expressão de RNAm para prepro ET-2 estavam aumentados, em contraste com os do RNAm que codifica prepro ET-1. Esses dados sugerem ainda que a principal isoforma envolvida na patogênese das IBDs possa ser a ET-2.

A IL-1 $\beta$  é um importante e potente mediador inflamatório que atua ativando diferentes células através de sua ligação ao seu receptor específico (IL-1R). Esta citocina induz a síntese e a secreção de quimiocinas e outras interleucinas, promovendo indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Lin et al., 2002). Além disso, relatos na literatura demonstram que a citocina próinflamatória IL-1 $\beta$  é capaz de aumentar a expressão de endotelinas na aorta bovina (Corder et al., 1995) ou de porcos (Yoshizumi et al., 1990), em células endoteliais isoladas do cordão umbilical humano (Molet et al., 2000), assim como na musculatura lisa vascular isolada de artéria mamária ou veia safena humana (Woods et al., 1998). A IL-1 $\beta$  também é capaz de aumentar a expressão dos receptores ET<sub>A</sub>, em células da musculatura lisa vascular isoladas de humanos (Newman et al., 1995). Muitos trabalhos têm verificado que a expressão de IL-1 $\beta$  (Mahida et al., 1989; Ligumsky et al., 1990; Isaacs et al., 1992; Youngman et al., 1993; Casini-Raggi et al., 1995; Radford-Smith e Jewell, 1996; Andus et al., 1997), bem como a expressão das endotelinas (Murch et al., 1992;

Letizia et al., 1998), está aumentada em pacientes com IBD. Desta maneira, podemos sugerir que o aumento nos níveis de RNAm para a endotelina-2 pode ser modulado pela IL-1 $\beta$ . Desta maneira, é possível que a IL-1 $\beta$  produzida durante o processo inflamatório induzido pelo TNBS possa aumentar a produção de ET-2, que por sua vez, atuando nos receptores ET<sub>A</sub>, potencializaria a produção de IL-1 $\beta$ , causando um ciclo vicioso de ativação.

Outra importante citocina que atua na modulação dos níveis de endotelina é o TNF- $\alpha$  (Corder et al., 1995; Golden et al., 1995; Zhao et al., 2005. No entanto, esta não foi detectada no presente estudo, possivelmente devido a sua cinética de produção, uma vez que o TNF- $\alpha$  parece atuar no início do processo inflamatório. Desta forma, o aumento nos níveis de ET-2, observado 48 horas após a indução da colite pode ser, pelo menos em parte, causada pelo aumento de TNF- $\alpha$ .

Como descrito anteriormente, a resposta imune desempenha um importante papel na patogênese das IBDs. As células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e os macrófagos, secretam diversas citocinas que modulam a diferenciação das células T. Nas IBDs ocorre um desbalanço entre as sub-populações de linfócitos T, quais sejam as células T regulatórias, Th1, Th2 e Th17. Conseqüentemente, há uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e redução de citocinas anti-inflamatórias, de modo a impactar negativamente sobre a homeostasia do cólon (Sanchez-Munoz et al., 2008). Desta forma, analisamos também os níveis colônicos das citocinas IL-10 e IL-13, que se mostraram reduzidos durante a colite induzida por TNBS e cujo papel anti-inflamatório já havia sido reportado neste modelo (Hong et al., 2002; Kolios et al., 1998; Ukil et al., 2003). De forma interessante, o tratamento com atrasentan aumentou os níveis teciduais de IL-10 para valores acima daqueles detectados em cólon de animais controle, mas não alterou os níveis de IL-13. A IL-10 é produzida por uma variedade de células, incluindo linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos, queratinócitos e células do epitélio intestinal (Papadakis e Targan, 2000). Ela é responsável pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando como um modulador negativo direto do acúmulo de polimorfonucleares e da geração de quimiocinas (Fiorentino et al., 1991; Saleem et al., 1998). Isso acontece porque a IL-10 reduz a expressão do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II, reduzindo a apresentação de antígenos e, conseqüentemente, a proliferação de linfócitos T (de Waal Malefyt et al., 1991). Além disso, a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-

6 e TNF- $\alpha$  secretadas por macrófagos e outras células. A relevância desta citocina na colite também pode ser exemplificada pelo desenvolvimento de colite espontânea em animais com deleção gênica para a IL-10 (Kuhn et al., 1993; Shiraki et al., 2004), e pela prevenção dessa patologia pelo tratamento com IL-10 (Lindsay et al., 2002; Lindsay et al., 2004). Dessa forma, a IL-10 parece desenvolver um papel fundamental no mecanismo de defesa do organismo e na regulação da resposta inflamatória intestinal. A demonstração de que o tratamento com atrasentan aumentou os níveis de IL-10 em camundongos tratados com TNBS sugere que esta citocina contribuiu para limitar a inflamação, e por conseqüência os danos ao tecido colônico. Outros trabalhos também já demonstraram uma relação entre o sistema endotelinérgico e IL-10 em outro contexto (Giachini et al., 2009; Zemse et al., 2008).

A IL-13 também possui propriedades anti-inflamatórias e imunoregulatórias importantes nas IBDs (Kucharzik et al., 1996). Esta citocina é estruturalmente semelhante à IL-4 e assim como essa citocina, possui atividades imunoregulatórias em pacientes com IBDs, inibe a liberação de mediadores inflamatórios em macrófagos e células epiteliais humanas (Kucharzik et al., 1996). Como descrito anteriormente, nossos resultados demonstraram redução significativa nos níveis de IL-13 no cólon dos animais que receberam apenas TNBS, quando comparado ao grupo controle. No entanto, o tratamento com atrasentan não foi capaz de alterar a produção dessa citocina, sugerindo que a fonte de IL-10 não é a mesma de IL-13.

Embora o tratamento com atrasentan não tenha sido capaz de aumentar a produção da IL-13, essa droga mostrou-se mais eficaz que o tratamento com dexametasona, o fármaco de referência utilizado, pois foi capaz de recuperar a perda de peso dos animais com colite induzida por TNBS e melhorar todos os parâmetros avaliados no modelo de DSS. A droga de referência não foi capaz de melhorar esses parâmetros, parecendo inclusive exacerbar o quadro inflamatório nesse modelo experimental (dados não mostrados). De fato, van Meeteren e colaboradores (2000) já haviam demonstrado que a dexametasona não previne a colite aguda induzida por DSS, exacerbando o quadro inflamatório com aumento nos danos macro- e microscópicos. Deste modo, antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> para endotelina podem vir a constituir uma abordagem mais eficaz que glicocorticóides para a terapia das IBDs.

Evidentemente, diversos aspectos importantes acerca do envolvimento das endotelinas na colite permanecem a serem investigados, tais como a caracterização das células que expressam os receptores ET<sub>A</sub> em resposta ao desenvolvimento da colite, das fontes celulares e a identidade das endotelinas produzidas nesta condição, bem como a determinação da janela temporal mais propícia para a reversão da colite com antagonistas de receptores ET<sub>A</sub>, entre outros. Contudo, a modulação da atividade sinalizadora deste tipo de receptor pode constituir uma importante ferramenta para o tratamento das IBDs.

Por outro lado, é importante destacar que o tratamento com atrasentan bloqueou o aumento na expressão dos níveis colônicos de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> induzido pelo TNBS, embora não tenha modificado as alterações na expressão os níveis de expressão de prepro ET-1 ou prepro ET-2 associados à colite induzida por este agente. Estes achados sugerem a ocorrência de um mecanismo de ação potencialmente relevante pelo qual o atrasentan possa reduzir a colite induzida pelo TNBS, adicional àquele sugerido anteriormente nesta Discussão (na página 105), pelo qual o bloqueio do receptor ET<sub>A</sub> acarretaria ainda uma diminuição na expressão do RNAm para o receptor ET<sub>A</sub> no cólon.

O presente estudo também demonstrou que a colite induzida por TNBS promove hiperalgesia mecânica, a qual não se restringe apenas ao abdômen, mas também é observada quando se estimula mecanicamente a superfície plantar das patas traseiras dos camundongos. Além disso, nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que as endotelinas participam deste mecanismo hiperalgésico, em que a inflamação colônica visceral aumenta a sensibilidade de outras áreas do corpo à estimulação mecânica.

Estudos prévios em camundongos já haviam demonstrado que a instilação intracolônica de capsaicina ou óleo de mostarda (os quais ativam os receptores TRPV1 e TRPA1, respectivamente) induz comportamentos de dor visceral de maneira dose-dependente, bem como hiperalgesia mecânica na parte inferior do abdômen, planta da pata e cauda. Essas respostas se desenvolvem rapidamente, são inibidas pela morfina e acompanhadas de inflamação colônica (Laird et al., 2001). No presente estudo demonstrou-se que a administração de TNBS no cólon, um dos modelos de colite mais utilizados, também induz hiperalgesia mecânica no abdômen inferior e na planta da pata (o teste da cauda não foi realizado). No entanto, diferentemente das respostas observadas com a capsaicina e óleo de mostrada, a hiperalgesia evocada por TNBS se desenvolve mais lentamente e tem uma duração mais prolongada,

podendo persistir por 3 dias. Embora o TNBS claramente induza hiperalgesia na dose de 0,5 mg/animal não conseguimos observar esse fenômeno em resposta a doses mais altas (1 ou 1,5 mg). Entretanto, estas doses promoveram inflamação colônica de grau mais elevado, como demonstrado por Neurath e colaboradores (1995) após análise microscópica do dano do cólon, e por análise microscópica em amostras coletadas 72 horas após a administração de TNBS (dados não mostrados). Neste sentido, Laird e colaboradores (2001) reportaram que a hiperalgesia abdominal induzida pela instilação de óleo de mostarda a 2,5 % foi menor que a observada em resposta a este mesmo agente a 0,25%, e observaram que uma grande parte dos camundongos que receberam a maior dose apresentou comportamento de *freezing* (por exemplo, exibem imobilidade marcada). No presente estudo, observamos que camundongos que receberam 1 ou 1,5 mg de TNBS (mas não 0,5 mg) apresentaram-se imóveis e com as costas arqueadas quando submetidos à estimulação mecânica do abdômen. Estes dados sugerem que altas doses do TNBS podem levar ao desenvolvimento de dor excessiva, o que pode ter inibido a manifestação comportamental da hiperalgesia, originando uma curva em forma de U invertido para este parâmetro. Interessantemente, outro estudo detectou a hiperalgesia mecânica na pata de camundongos 7 dias após a indução de colite com 5,0 mg de TNBS (Lamb et al., 2006), indicando que este fenômeno pode ser observado em estágios mais tardios da colite, quando esta é provocada por doses mais elevadas deste agente.

A hiperalgesia mecânica induzida por TNBS (0,5 mg) no abdômen e na pata foi revertida, de maneira dose-dependente e transitória, pela administração intravenosa de uma única dose de atrasentan (um antagonista seletivo do receptor  $ET_A$ ). O tratamento semelhante com A-192621 (um antagonista seletivo do receptor  $ET_B$ ) causou uma reversão bem mais modesta. Estes dois antagonistas não peptídicos utilizados possuem meia vida plasmática de 5 a 6 horas em ratos e foram administrados em doses suficientemente altas para bloquear seus respectivos alvos (Wessale et al., 2002). Portanto, esses resultados fornecem uma forte evidência farmacológica para uma importante participação das endotelinas, atuando principalmente através de receptores  $ET_A$  na hiperalgesia induzida pelo TNBS.

É importante mencionar que a administração intraperitoneal de endotelinas induz contorções abdominais em camundongos, uma resposta sugestiva de dor visceral (Ferreira et al., 1989; Raffa e Jacoby, 1991). Já a instilação colônica de TNBS induz tanto uma hipersensibilidade à distensão colorretal quanto hiperalgesia mecânica

na planta da pata, sugerindo a comunicação entre as vias aferentes sensoriais somática e visceral (Lamb et al., 2006). Este aspecto levanta a questão de como as endotelinas, atuando através dos receptores ET<sub>A</sub>, poderiam participar da hiperalgesia induzida por instilação colônica de TNBS. No cólon humano, imunorreatividade para endotelinas foi identificada em feixes nervosos distribuídos ao longo de todo órgão, bem como na maioria dos gânglios dos dois maiores plexos (Inagaki et al., 1991). Com relação aos receptores para endotelinas, os mesmos foram encontrados em neurônios e células gliais presentes no plexo mioentérico, em células da musculatura lisa vascular na submucosa, em células endoteliais, epiteliais, miofibroblastos e mononucleares presentes na mucosa (Egidy et al., 2000). Em adição, a imunorreatividade para endotelinas encontra-se aumentada em amostras de cólon de pacientes com colite ulcerativa ativa ou doença de Crohn (Murch et al., 1992). Esses estudos não identificaram quais isoformas de endotelinas estão presentes, porém no cólon de camundongos sabe-se que a isoforma predominante é a ET-2, e que seus níveis estão aumentados durante a colite induzida por DSS (Takizawa et al., 2005).

As endotelinas, atuando através de receptores ET<sub>A</sub>, também participam da hiperalgesia observada após a realização de incisão no dorso lombar de ratos (Mujenda et al., 2007). Neste estudo, o tratamento local com um antagonista peptídico do receptor ET<sub>A</sub> (BQ-123), no local da lesão e após a incisão, suprimiu tanto a hiperalgesia mecânica primária, a qual se desenvolveu no sítio da lesão, quanto a hiperalgesia mecânica secundária, observada na região do dorso lombar contralateral. Estes dados sugerem que o bloqueio da ativação e ou sensibilização dos aferentes primários pelo antagonista ET<sub>A</sub> resulta no bloqueio da sensibilização de circuitos espinhais, o que impede o desenvolvimento da hiperalgesia secundária.

Vários estudos têm demonstrado que a ativação de receptores vanilóides TRPV1, expressos principalmente em fibras C, representa um dos mecanismos envolvidos na hiperalgesia colônica durante a colite (Jones et al., 2005; Miranda et al., 2007). Adicionalmente, existem evidências de que a ET-1, através da ativação de receptores ET<sub>A</sub>, induz a sensibilização dos receptores TRPV1 e, desta maneira, medeia a nocicepção e hiperalgesia evocadas pela injeção de capsaicina na pata de ratos (Motta et al., 2009). Em vista destas considerações, nossa hipótese é que o TNBS possa estar induzindo a produção de endotelinas (especialmente ET-2) e/ou aumento na expressão de receptores ET<sub>A</sub> no cólon, o que resultaria, por sua vez, no aumento da ativação ou sensibilização dos nervos sensoriais aferentes entéricos, levando à

hiperalgesia visceral. Este aumento na sinalização nociceptiva alteraria a sensibilidade de neurônios espinhais que são somatotopicamente organizados com os neurônios que inervam o cólon, resultando na hiperalgesia mecânica somática do abdômen inferior e da planta da pata. É importante salientar que observamos um aumento nos níveis de ET-2 em cólons removidos 48 horas após a administração de TNBS (1,5 mg/animal). Além disso, os níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> estavam aumentados 24, 48 e 72 horas após a instilação de TNBS (1,5 mg/animal).

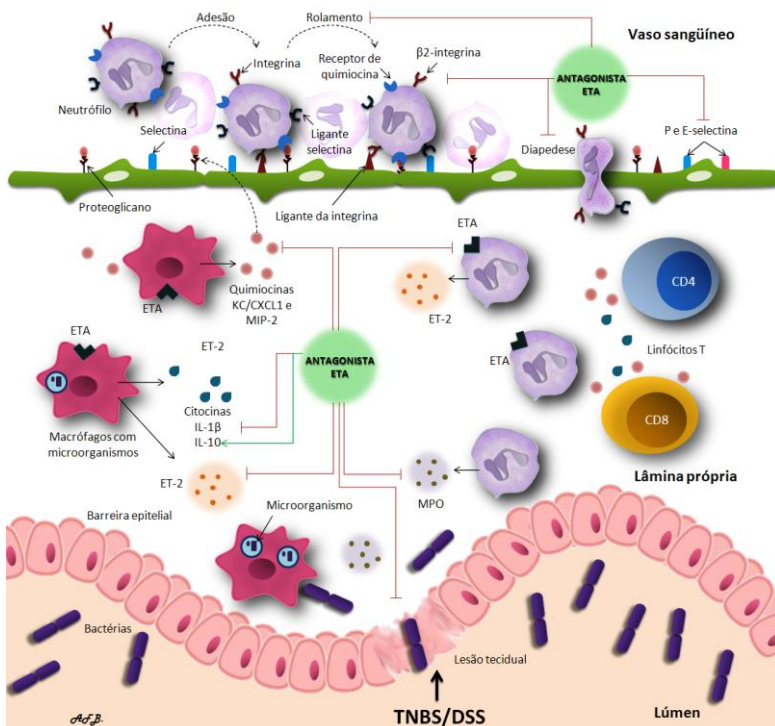
No presente estudo, o tratamento com morfina mostrou-se tão eficaz quanto o atrasentan em reverter a hiperalgesia mecânica induzida pelo TNBS, mas a duração do efeito dos antagonistas dos receptores ET<sub>A</sub> foi ligeiramente maior. Atualmente, até um sexto dos pacientes com IBD são tratados cronicamente com opióides para o alívio da dor decorrente da condição (para revisão ver Bielefeldt et al., 2009). No entanto, devido aos inúmeros efeitos adversos associados ao uso crônico de opióides, outras alternativas terapêuticas para estes pacientes merecem ser investigadas. Neste sentido, acreditamos que antagonistas seletivos do receptor ET<sub>A</sub> podem representar um alvo farmacológico importante, pois além de atenuar a dor de origem visceral exercem efeitos anti-inflamatórios que poderiam ser benéficos ao tratamento da colite.

Antagonistas duais de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> ou seletivos para receptores ET<sub>A</sub> já estão aprovados para uso clínico no tratamento de pacientes com hipertensão pulmonar ou acometidos de úlceras digitais associadas à esclerose múltipla. Nesse sentido, pareceria oportuno que fosse investigado se, naqueles pacientes que também sofrem de IBDs, o tratamento com antagonistas duais ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> ou seletivos para receptores ET<sub>A</sub> seriam efetivos em atenuar os sintomas daquelas condições.

Em conclusão, esse estudo demonstra o papel importante das endotelinas na manifestação de sintomas de colite experimental e esclarece alguns dos mecanismos pelos quais os antagonistas ET<sub>A</sub> melhoram a colite. Esses dados demonstram que a inibição farmacológica do receptor ET<sub>A</sub> se mostrou eficaz em inibir vários parâmetros analisados nos modelos de inflamação intestinal. O bloqueio desse receptor parece ter levado a redução drástica na migração dos neutrófilos para a mucosa, possivelmente por reduzir a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e  $\beta_2$ -integrina. Esse menor influxo de neutrófilos pode ter ocasionado menor atividade da MPO, bem como a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio,

proteases e mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC. Além disso, macrófagos residentes e/ou células endoteliais podem ter contribuído para o aumento dos níveis colônicos da citocina anti-inflamatória IL-10. Deste modo, esse conjunto de fatores pode ter contribuído para a redução do dano tecidual, dos sinais de inflamação e principalmente para o aumento na sobrevivência dos animais com colite induzida por TNBS. Interessantemente, o atrasentan foi capaz de atenuar o quadro inflamatório quando administrado de maneira terapêutica, ou seja, depois da instalação do processo inflamatório deflagrado pelo TNBS, demonstrando que, apesar da expressão de ambos os receptores estar aumentada, o receptor ET<sub>A</sub> constitui um importante alvo terapêutico na colite, mas o receptor ET<sub>B</sub> não. Além disso, o bloqueio farmacológico do receptor ET<sub>A</sub> também inibiu os parâmetros inflamatórios avaliados no modelo de DSS.





**Figura 32. Possíveis mecanismos de ação do Atrasentan na colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.** A administração de TNBS no cólon causa infiltração massiva de neutrófilos em resposta à produção de quimiocinas no foco inflamatório. Além disso, os macrófagos produzem grandes quantidades de KC e MIP-2, que podem induzir aumento significativo na expressão das moléculas de adesão. Os neutrófilos presentes no tecido também podem liberar IL-1 $\beta$  e MIP-2, que contribuiriam para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade da mieloperoxidase, amplificando a resposta inflamatória. O tratamento com o antagonista do receptor ET<sub>A</sub> atrasentan (antagonista ET<sub>A</sub>) reduz drasticamente a migração dos neutrófilos para a mucosa, possivelmente por reduzir a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e  $\beta$ 2-integrina. O influxo reduzido de neutrófilos ocasionaria menor atividade da MPO, bem como a redução da liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases e mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC. Além disso, macrófagos residentes e/ou células endoteliais podem ter contribuído para o aumento dos níveis colônicos da citocina antiinflamatória IL-10. É importante salientar que a redução na produção de citocinas próinflamatórias observada nos animais tratados com atrasentan, não parece ser apenas um reflexo da redução da migração celular, pois o bloqueio *in vitro* do receptor ET<sub>A</sub> também é capaz de inibir a produção dessas em resposta à exposição ao LPS, principalmente em macrófagos. Como o atrasentan também bloqueou o aumento na expressão dos níveis colônicos de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> induzido pelo TNBS, é possível que este seja um mecanismo adicional pelo qual este tratamento é eficaz na colite.

## 6 CONCLUSÕES

- A colite induzida pela injeção intracolônica de TNBS causou um aumento nos níveis de expressão do RNAm para os receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em cólons removidos 24, 48 ou 72 horas após a indução da colite. Todavia, a expressão de RNAm para prepro ET-1 e prepro ET-2 estava reduzida 24 horas após a administração de TNBS. Os níveis de RNAm para a prepro ET-1 retornaram aos níveis basais 48 horas após a administração do TNBS, permanecendo assim até 72 horas. Já os níveis de RNAm para prepro ET-2 estavam aumentados em 48 horas, mas reduziram novamente 72 horas após a indução da colite.
- O antagonista seletivo para os receptores ET<sub>A</sub>, atrasentan, apresentou potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, uma vez que esse composto revelou-se altamente eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados nos animais com colite induzida pelo TNBS, caracterizado pela diminuição do dano tecidual e conseqüente redução da mortalidade dos animais. Em contraste, o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor ET<sub>B</sub>, A192621, não foi capaz de inibir a resposta inflamatória intestinal induzida por TNBS. Além disso, atrasentan foi capaz de minimizar os parâmetros inflamatórios avaliados no modelo do DSS.
- A colite experimental induzida por TNBS induziu hiperalgesia à estimulação mecânica secundária na região abdominal e na pata com decursos temporais semelhantes.
- A hiperalgesia a estímulos mecânicos induzida pela colite experimental, na pata e na região abdominal, foi abolida pelo bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub>. Em contraste, a hiperalgesia mecânica foi pouco sensível ao tratamento com o antagonista de receptores ET<sub>B</sub>, o qual inibiu parcialmente a hiperalgesia no abdômen, mas não na pata.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Abraham, C., e Cho, J. H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, 361(21): 2066-2078, 2009.

An, G., Wei, B., Xia, B., McDaniel, J. M., Ju, T., Cummings, R. D., Braun, J., Xia, L. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. **J Exp Med**, 204(6): 1417-1429, 2007.

Andus, T., Daig, R., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Lock, G., Hollerbach, S., Kollinger, M., Scholmerich, J., Gross, V. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa--association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2. **Gut**, 41(5): 651-657, 1997.

Anthoni, C., Mennigen, R. B., Rijcken, E. J., Laukotter, M. G., Spiegel, H. U., Senninger, N., Schurmann, G., Krieglstein, C. F. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, reduces leucocyte adhesion and inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. **Int J Colorectal Dis**, 21(5): 409-418, 2006.

Antonoli, L., eFornai, M., eColucci, R., eGhisu, N., eDa Settimo, F., eNatale, G., eKastsyuchenka, O., eDuranti, E., eViridis, A., eVassalle, C., eLa Motta, C., eMugnaini, L., eBreschi, M. C., eBlandizzi, C., e Del Taca, M. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. **J Pharmacol Exp Ther**, 322(2): 435-442, 2007.

Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348(6303): 730-732, 1990.

Bachmann, M. F., Kopf, M., Marsland, B. J. Chemokines: more than just road signs. **Nat Rev Immunol**, 6(2): 159-164, 2006.

Bamias, G., e Cominelli, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Curr Opin Gastroenterol**, 23(4): 365-369, 2007.

Banchereau, J., e Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, 392(6673): 245-252, 1998.

Barnich, N., e Darfeuille-Michaud, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 13(42): 5571-5576, 2007.

Baumgart, D. C., e Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, 369(9573): 1627-1640, 2007.

Baumgart, D. C., e Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, 369(9573): 1641-1657, 2007.

Bento, A. F., Leite, D. F., Claudino, R. F., Hara, D. B., Leal, P. C., Calixto, J. B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol**, 84(4): 1213-1221, 2008.

Berthoud, H. R., e Neuhuber, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Auton Neurosci**, 85(1-3): 1-17, 2000.

Bielefeldt, K., Davis, B., Binion, D. G. Pain and inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, 15(5): 778-788, 2009.

Blumberg, R. S., e Strober, W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. **Jama**, 285(5): 643-647, 2001.

Bouma, G., e Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, 3(7): 521-533, 2003.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72(248-254), 1976.

Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., Attramadal, H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. **J Biol Chem**, 275(23): 17596-17604, 2000.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**, 3(3): 238-250, 2005.

Buisine, M. P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M. C., Colombel, J. F., Porchet, N., Aubert, J. P. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. **Gut**, 49(4): 544-551, 2001.

Campos, M. M., de Souza, G. E., Ricci, N. D., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M., Calixto, J. B. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. **Br J Pharmacol**, 135(5): 1107-1114, 2002.

Cario, E., e Podolsky, D. K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. **Infect Immun**, 68(12): 7010-7017, 2000.

Carolan, E. J., Mower, D. A., Casale, T. B. Cytokine-induced neutrophil transepithelial migration is dependent upon epithelial orientation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 17(6): 727-732, 1997.

Casini-Raggi, V., Kam, L., Chong, Y. J., Fiocchi, C., Pizarro, T. T., Cominelli, F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **J Immunol**, 154(5): 2434-2440, 1995.

Cervero, F. Mechanisms of acute visceral pain. **Br Med Bull**, 47(3): 549-560, 1991.

Cervero, F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. **Physiol Rev**, 74(1): 95-138, 1994.

Cervero, F. Visceral hyperalgesia revisited. **Lancet**, 356(9236): 1127-1128, 2000.

Cervero, F., e Janig, W. Visceral nociceptors: a new world order? **Trends Neurosci**, 15(10): 374-378, 1992.

Cervero, F., e Laird, J. M. Visceral pain. **Lancet**, 353(9170): 2145-2148, 1999.

Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., Maniatis, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **Faseb J**, 9(10): 899-909, 1995.

Corder, R., Carrier, M., Khan, N., Klemm, P., Vane, J. R. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, 26 Suppl 3(S56-58), 1995.

Cosnes, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 18(3): 481-496, 2004.

Cruickshank, S. M., McVay, L. D., Baumgart, D. C., Felsburg, P. J., Carding, S. R. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. **Gut**, 53(5): 678-684, 2004.

Cunningham, M. E., Huribal, M., Bala, R. J., McMillen, M. A. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. **Crit Care Med**, 25(6): 958-964, 1997.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., Colombel, J. F. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, 115(6): 1405-1413, 1998.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med**, 174(4): 915-924, 1991.

Dinarello, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **Faseb J**, 8(15): 1314-1325, 1994.

Egidy, G., Juillerat-Jeanneret, L., Korth, P., Bosman, F. T., Pinet, F. The endothelin system in normal human colon. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 279(1): G211-222, 2000.

Elferink, J. G., e de Koster, B. M. Endothelin-induced activation of neutrophil migration. **Biochem Pharmacol**, 48(5): 865-871, 1994.

Elphick, D. A., e Mahida, Y. R. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. **Gut**, 54(12): 1802-1809, 2005.

Elson, C. O., Cong, Y., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G., Weaver, C. T. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immunol Rev**, 206(260-276), 2005.

Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., Riddell, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 109(4): 1344-1367, 1995.

Faubion, W. A., Jr., Loftus, E. V., Jr., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., Sandborn, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. **Gastroenterology**, 121(2): 255-260, 2001.

Fauci, A. S., Harrison, T. R. **Harrison Medicina Interna**. 17 ed. McGraw-Hill Medical, Rio de Janeiro, 2008.

Feniger-Barish, R., Yron, I., Meshel, T., Matityahu, E., Ben-Baruch, A. IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase. **Biochemistry**, 42(10): 2874-2886, 2003.

Ferreira, S. H., Romitelli, M., de Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol**, 13 Suppl 5(S220-222, 1989.

F Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol**, 147(11): 3815-3822, 1991.

Franchimont, D., eVermeire, S., eEl Housni, H., ePierik, M., eVan Steen, K., eGustot, T., eQuertinmont, E., eAbramowicz, M., eVan Gossum, A., eDeviere, J., e Rutgeerts, P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, 53(7): 987-992, 2004.

Fuhler, G. M., Knol, G. J., Drayer, A. L., Vellenga, E. Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. **J Leukoc Biol**, 77(2): 257-266, 2005.

Fukuroda, T., Kobayashi, M., Ozaki, S., Yano, M., Miyauchi, T., Onizuka, M., Sugishita, Y., Goto, K., Nishikibe, M. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. **J Appl Physiol**, 76(5): 1976-1982, 1994.

Furness, J. B., Bornstein, J. C., Smith, T. K. The normal structure of gastrointestinal innervation. **J Gastroenterol Hepatol**, 5 Suppl 1(1-9), 1990.

Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C., Strober, W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **J Immunol**, 157(3): 1261-1270, 1996.

Garcia Rodriguez, L. A., Ruigomez, A., Panes, J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 130(6): 1588-1594, 2006.

Gasche, C., eScholmerich, J., eBrynskov, J., eD'Haens, G., eHanauer, S. B., eIrvine, E. J., eJewell, D. P., eRachmilewitz, D., eSachar, D. B., eSandborn, W. J., eSutherland, L. R. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. **Inflamm Bowel Dis**, 6(1): 8-15, 2000.

Gebhart, G. F. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 278(6): G834-838, 2000.

Geerling, B. J., Dagnelie, P. C., Badart-Smook, A., Russel, M. G., Stockbrugger, R. W., Brummer, R. J. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**, 95(4): 1008-1013, 2000.



Giachini, F. R., Zemse, S. M., Carneiro, F. S., Lima, V. V., Carneiro, Z. N., Callera, G. E., Ergul, A., Webb, R. C., Tostes, R. C. Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1 via effects on ERK1/2-dependent pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 296(2): H489-496, 2009.

Golden, C. L., Kohler, J. P., Nick, H. S., Visner, G. A. Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 12(5): 503-512, 1995.

Gomez-Garre, D., Guerra, M., Gonzalez, E., Lopez-Farre, A., Riesco, A., Caramelo, C., Escanero, J., Egido, J. Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. **Eur J Pharmacol**, 224(2-3): 167-172, 1992.

Goyal, R. K., e Hirano, I. The enteric nervous system. **N Engl J Med**, 334(17): 1106-1115, 1996.

Griswold, D. E., eDouglas, S. A., eMartin, L. D., eDavis, T. G., eDavis, L., eAo, Z., eLuttmann, M. A., ePullen, M., eNambi, P., eHay, D. W., e Ohlstein, E. H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Mol Pharmacol**, 56(4): 807-812, 1999.

Gulluoglu, B. M., Kurtel, H., Gulluoglu, M. G., Yegen, C., Aktan, A. O., Dizdaroglu, F., Yalin, R., Yegen, B. C. Role of endothelins in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Digestion**, 60(5): 484-492, 1999.

Hanauer, S. B., e Present, D. H. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. **Rev Gastroenterol Disord**, 3(2): 81-92, 2003.

Hanauer, S. B., e Sandborn, W. Management of Crohn's disease in adults. **Am J Gastroenterol**, 96(3): 635-643, 2001.

Herrmann, E., Bogemann, M., Bierer, S., Eltze, E., Hertle, L., Wulfig, C. The endothelin axis in urologic tumors: mechanisms of tumor biology and therapeutic implications. **Expert Rev Anticancer Ther**, 6(1): 73-81, 2006.

Hibi, T., Ogata, H., Sakuraba, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol**, 37(6): 409-417, 2002.

Hofman, F. M., Chen, P., Jeyaseelan, R., Incardona, F., Fisher, M., Zidovetzki, R. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. **Blood**, 92(9): 3064-3072, 1998.

Hogaboam, C. M., Muller, M. J., Collins, S. M., Hunt, R. H. An orally active non-selective endothelin receptor antagonist, bosentan, markedly reduces injury in a rat model of colitis. **Eur J Pharmacol**, 309(3): 261-269, 1996.

Hong, T., Jin, G. B., Yoshino, G., Miura, M., Maeda, Y., Cho, S., Cyong, J. C. Protective effects of Polygalae root in experimental TNBS-induced colitis in mice. **J Ethnopharmacol**, 79(3): 341-346, 2002.

Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A., Yanagisawa, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. **Cell**, 79(7): 1267-1276, 1994.

Hugot, J. P., eChamaillard, M., eZouali, H., eLesage, S., eCezard, J. P., eBelaiche, J., eAlmer, S., eTysk, C., eO'Morain, C. A., eGassull, M., eBinder, V., eFinkel, Y., eCortot, A., eModigliani, R., eLaurent-Puig, P., eGower-Rousseau, C., eMacry, J., eColombel, J. F., eSahbatou, M., eThomas, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, 411(6837): 599-603, 2001.

Ina, K., eItoh, J., eFukushima, K., eKusugami, K., eYamaguchi, T., eKyokane, K., eImada, A., eBinion, D. G., eMusso, A., eWest, G. A., eDobrea, G. M., eMcCormick, T. S., eLapetina, E. G., eLevine, A. D., eOttaway, C. A., eFiocchi, C. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. **J Immunol**, 163(2): 1081-1090, 1999.

Inagaki, H., Bishop, A. E., Escrig, C., Wharton, J., Allen-Mersh, T. G., Polak, J. M. Localization of endothelinlike immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. **Gastroenterology**, 101(1): 47-54, 1991.

Isaacs, K. L., Sartor, R. B., Haskill, S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. **Gastroenterology**, 103(5): 1587-1595, 1992.

Ishizuka, T., Takamizawa-Matsumoto, M., Suzuki, K., Kurita, A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. **Eur J Pharmacol**, 369(2): 237-245, 1999.

Itzkowitz, S. H., e Present, D. H. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, 11(3): 314-321, 2005.

Jones, R. C., 3rd, Xu, L., Gebhart, G. F. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. **J Neurosci**, 25(47): 10981-10989, 2005.

Kawada, M., Arihiro, A., Mizoguchi, E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 13(42): 5581-5593, 2007.

Kedzierski, R. M., e Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41(851-876, 2001.

Kelly, M., Hwang, J. M., Kubes, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 120(1): 3-10, 2007.

Kimball, E. S., Palmer, J. M., D'Andrea, M. R., Hornby, P. J., Wade, P. R. Acute colitis induction by oil of mustard results in later development of an IBS-like accelerated upper GI transit in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 288(6): G1266-1273, 2005.

Kimball, E. S., Wallace, N. H., Schneider, C. R., D'Andrea, M. R., Hornby, P. J. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. **Neurogastroenterol Motil**, 16(6): 811-818, 2004.

Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, 77(5): 598-625, 2005.

Klement, E., Cohen, R. V., Boxman, J., Joseph, A., Reif, S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, 80(5): 1342-1352, 2004.

Knowles, C. H., e Aziz, Q. Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain. **Pain**, 141(3): 191-209, 2009.

Kolios, G., Rooney, N., Murphy, C. T., Robertson, D. A., Westwick, J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. **Gut**, 43(1): 56-63, 1998.

Korzenik, J. R., e Podolsky, D. K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Drug Discov**, 5(3): 197-209, 2006.

Kucharzik, T., Luger, N., Weigelt, H., Adolf, M., Domschke, W., Stoll, R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. **Clin Exp Immunol**, 104(3): 483-490, 1996.

Kuhl, A. A., eKakirman, H., eJanotta, M., eDreher, S., eCremer, P., ePawlowski, N. N., eLoddenkemper, C., eHeimesaat, M. M., eGrollich, K., eZeit, M., eFarkas, S., e Hoffmann, J. C. Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. **Gastroenterology**, 133(6): 1882-1892, 2007.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, 75(2): 263-274, 1993.

Laird, J. M., Martinez-Caro, L., Garcia-Nicas, E., Cervero, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, 92(3): 335-342, 2001.

Lakatos, P. L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? **World J Gastroenterol**, 12(38): 6102-6108, 2006.

Lamb, K., Zhong, F., Gebhart, G. F., Bielefeldt, K. Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 290(3): G451-457, 2006.

Lamhonwah, A. M., Skaug, J., Scherer, S. W., Tein, I. A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). **Biochem Biophys Res Commun**, 301(1): 98-101, 2003.

Larson, D. W., e Pemberton, J. H. Current concepts and controversies in surgery for IBD. **Gastroenterology**, 126(6): 1611-1619, 2004.

Lee, J. W., Wang, P., Kattah, M. G., Youssef, S., Steinman, L., DeFea, K., Straus, D. S. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. **J Immunol**, 181(9): 6536-6545, 2008.

Lee, S., Carter, P. R., Watts, M. N., Bao, J. R., Harris, N. R. Effects of the endothelin-converting enzyme inhibitor SM-19712 in a mouse model of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, 15(7): 1007-1013, 2009.

Letizia, C., Boirivant, M., De Toma, G., Cerci, S., Subioli, S., Scuro, L., Ferrari, P., Pallone, F. Plasma levels of endothelin-1 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Ital J Gastroenterol Hepatol**, 30(3): 266-269, 1998.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, 7(9): 678-689, 2007.

Lichtenstein, G. R., Abreu, M. T., Cohen, R., Tremaine, W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 130(3): 940-987, 2006.

Ligumsky, M., Simon, P. L., Karmeli, F., Rachmilewitz, D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, 31(6): 686-689, 1990.

Lindsay, J., Van Montfrans, C., Brennan, F., Van Deventer, S., Drillenburg, P., Hodgson, H., Te Velde, A., Sol Rodriguez Pena, M. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. **Gene Ther**, 9(24): 1715-1721, 2002.

Lindsay, J. O., Sandison, A., Cohen, P., Brennan, F. M., Hodgson, H. J. IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Dig Dis Sci**, 49(7-8): 1327-1334, 2004.

Liu, C., e Chen, J. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. **Cochrane Database Syst Rev**, 3(CD004434, 2006.

Lopez-Farre, A., Caramelo, C., Esteban, A., Alberola, M. L., Millas, I., Monton, M., Casado, S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. **Circulation**, 91(7): 2080-2088, 1995.

Louis, E., Collard, A., Oger, A. F., Degroote, E., Aboul Nasr El Yafi, F. A., Belaiche, J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. **Gut**, 49(6): 777-782, 2001.

Lucendo, A. J., e De Rezende, L. C. Importance of nutrition in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 15(17): 2081-2088, 2009.

MacDermott, R. P. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. **J Clin Immunol**, 19(5): 266-272, 1999.

Macdonald, T. T., e Monteleone, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, 307(5717): 1920-1925, 2005.

Mahida, Y. R., Wu, K., Jewell, D. P. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. **Gut**, 30(6): 835-838, 1989.

Marshall, B. T., Long, M., Piper, J. W., Yago, T., McEver, R. P., Zhu, C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, 423(6936): 190-193, 2003.

Marshall, J. K., e Irvine, E. J. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut**, 40(6): 775-781, 1997.

Masaki, T., Vane, J. R., Vanhoutte, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol Rev**, 46(2): 137-142, 1994.

Mashimo, H., Wu, D. C., Podolsky, D. K., Fishman, M. C. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. **Science**, 274(5285): 262-265, 1996.

McCafferty, D. M., Miampamba, M., Sihota, E., Sharkey, K. A., Kubes, P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut**, 45(6): 864-873, 1999.

McCarron, R. M., Wang, L., Stanimirovic, D. B., Spatz, M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. **Neurosci Lett**, 156(1-2): 31-34, 1993.

McCartney, S. A., Ballinger, A. B., Vojnovic, I., Farthing, M. J., Warner, T. D. Endothelin in human inflammatory bowel disease: comparison to rat trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. **Life Sci**, 71(16): 1893-1904, 2002.

Menozi, A., Pozzoli, C., Poli, E., Lazzaretti, M., Grandi, D., Coruzzi, G. Long-term study of TNBS-induced colitis in rats: focus on mast cells. **Inflamm Res**, 55(10): 416-422, 2006.

Miranda, A., Nordstrom, E., Mannem, A., Smith, C., Banerjee, B., Sengupta, J. N. The role of transient receptor potential vanilloid 1 in mechanical and chemical visceral hyperalgesia following experimental colitis. **Neuroscience**, 148(4): 1021-1032, 2007.

Molet, S., Furukawa, K., Maghazechi, A., Hamid, Q., Giaid, A. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. **J Allergy Clin Immunol**, 105(2 Pt 1): 333-338, 2000.

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**, 96(3): 795-803, 1989.

Motta, E. M., Chichorro, J. G., Rae, G. A. Role of ET(A) and ET(B) endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. **Neurosci Lett**, 457(3): 146-150, 2009.

Mujenda, F. H., Duarte, A. M., Reilly, E. K., Strichartz, G. R. Cutaneous endothelin-A receptors elevate post-incisional pain. **Pain**, 133(1-3): 161-173, 2007.

Murch, S. H., Braegger, C. P., Sessa, W. C., MacDonald, T. T. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Lancet**, 339(8790): 381-385, 1992.

Nakazawa, A., Dotan, I., Brimnes, J., Allez, M., Shao, L., Tsushima, F., Azuma, M., Mayer, L. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, 126(5): 1347-1357, 2004.

Nauseef, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunol Rev**, 219(88-102), 2007.

Ness, T. J., e Gebhart, G. F. Visceral pain: a review of experimental studies. **Pain**, 41(2): 167-234, 1990.

Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp Med**, 182(5): 1281-1290, 1995.

Newman, P., Kakkar, V. V., Kanse, S. M. Modulation of endothelin receptor expression in human vascular smooth muscle cells by interleukin-1 beta. **FEBS Lett**, 363(1-2): 161-164, 1995.

Niv, Y., Abuksis, G., Fraser, G. M. Epidemiology of ulcerative colitis in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. **Am J Gastroenterol**, 95(3): 693-698, 2000.



Nussdorfer, G. G., Rossi, G. P., Malendowicz, L. K., Mazzocchi, G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. **Pharmacol Rev**, 51(3): 403-438, 1999.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, 98(3): 694-702, 1990.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., Lobb, R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. **Cell**, 59(6): 1203-1211, 1989.

Padol, I., Huang, J. Q., Hogaboam, C. M., Hunt, R. H. Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 12(3): 257-265, 2000.

Papadakis, K. A., e Targan, S. R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annu Rev Med**, 51(289-298, 2000.

Peng, H., Chen, P., Cai, Y., Chen, Y., Wu, Q. H., Li, Y., Zhou, R., Fang, X. Endothelin-1 increases expression of cyclooxygenase-2 and production of interleukin-8 in human pulmonary epithelial cells. **Peptides**, 29(3): 419-424, 2008.

Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, 347(6): 417-429, 2002.

Pullan, R. D., eRhodes, J., eGanesh, S., eMani, V., eMorris, J. S., eWilliams, G. T., eNewcombe, R. G., eRussell, M. A., eFeyerabend, C., eThomas, G. A., e et al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **N Engl J Med**, 330(12): 811-815, 1994.

Radford-Smith, G., e Jewell, D. P. Cytokines and inflammatory bowel disease. **Baillieres Clin Gastroenterol**, 10(1): 151-164, 1996.

Raffa, R. B., e Jacoby, H. I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sci**, 48(17): PL85-90, 1991.

Raffa, R. B., Schupsky, J. J., Jacoby, H. I. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, 276(2): 647-651, 1996.

Raffa, R. B., Schupsky, J. J., Martinez, R. P., Jacoby, H. I. Endothelin-1-induced nociception. **Life Sci**, 49(11): PL61-65, 1991.

Ramos, C. D., Heluy-Neto, N. E., Ribeiro, R. A., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. **Cytokine**, 21(5): 214-223, 2003.

Remuzzi, G., Perico, N., Benigni, A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nat Rev Drug Discov**, 1(12): 986-1001, 2002.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, 2(4): 361-367, 2001.

Riordan, A. M., Ruxton, C. H., Hunter, J. O. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. **Eur J Clin Nutr**, 52(4): 229-238, 1998.

Ruhl, A., Trotter, J., Stremmel, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterol Motil**, 13(1): 95-106, 2001.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, 348(6303): 732-735, 1990.

Saleem, S., Dai, Z., Coelho, S. N., Konieczny, B. T., Assmann, K. J., Baddoura, F. K., Lakkis, F. G. IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation. **J Immunol**, 160(2): 979-984, 1998.

Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., Yamamoto-Furusho, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 14(27): 4280-4288, 2008.

Sandborn, W. J., Fazio, V. W., Feagan, B. G., Hanauer, S. B. AGA technical review on perianal Crohn's disease. **Gastroenterology**, 125(5): 1508-1530, 2003.

Sanders, W. E., Wilson, R. W., Ballantyne, C. M., Beaudet, A. L. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. **Blood**, 80(3): 795-800, 1992.

Scholmerich, J. Review article: systemic and topical steroids in inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, 20 Suppl 4(66-74), 2004.

Shiraki, M., Aihara, H., Kinouchi, Y., Takahashi, S., Oki, M., Noguchi, M., Takahashi, K., Miyazaki, J., Shimosegawa, T. IL-12 p40 prevents the development of chronic enterocolitis in IL-10-deficient mice. **Lab Invest**, 84(11): 1491-1500, 2004.

Silverberg, M. S., eSatsangi, J., eAhmad, T., eArnott, I. D., eBernstein, C. N., eBrant, S. R., eCaprilli, R., eColombel, J. F., eGasche, C., eGeboes, K., eJewell, D. P., eKarban, A., eLoftus Jr, E. V., ePena, A. S., eRiddell, R. H., eSachar, D. B., eSchreiber, S., eSteinhart, A. H., eTargan, S. R., eVermeire, S., eWarren, B. F. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Can J Gastroenterol**, 19 Suppl A(5-36), 2005.

Simon, S. I., eGreen, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, 7(151-185), 2005.

Smithson, J. E., Campbell, A., Andrews, J. M., Milton, J. D., Pigott, R., Jewell, D. P. Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. **Gut**, 40(2): 234-240, 1997.

Soderholm, J. D., Olaison, G., Peterson, K. H., Franzen, L. E., Lindmark, T., Wiren, M., Tagesson, C., Sjodahl, R. Augmented increase

in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. **Gut**, 50(3): 307-313, 2002.

Sokolovsky, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmacol Ther**, 68(3): 435-471, 1995.

Speciale, L., Roda, K., Saresella, M., Taramelli, D., Ferrante, P. Different endothelins stimulate cytokine production by peritoneal macrophages and microglial cell line. **Immunology**, 93(1): 109-114, 1998.

Stocker, C. J., Sugars, K. L., Harari, O. A., Landis, R. C., Morley, B. J., Haskard, D. O. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. **J Immunol**, 164(6): 3309-3315, 2000.

Strober, W., Fuss, I., Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, 117(3): 514-521, 2007.

Sugimoto, K., Hanai, H., Tozawa, K., Aoshi, T., Uchijima, M., Nagata, T., Koide, Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, 123(6): 1912-1922, 2002.

Swidsinski, A., eLadhoff, A., ePerntaler, A., eSwidsinski, S., eLoening-Baucke, V., eOrtner, M., eWeber, J., eHoffmann, U., eSchreiber, S., eDietel, M., eLochs, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 122(1): 44-54, 2002.

Takizawa, S., Uchide, T., Adur, J., Kozakai, T., Kotake-Nara, E., Quan, J., Saida, K. Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. **J Mol Endocrinol**, 35(2): 201-209, 2005.

Torres, M. I., Garcia-Martin, M., Fernandez, M. I., Nieto, N., Gil, A., Rios, A. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. **Dig Dis Sci**, 44(12): 2523-2529, 1999.

Ukil, A., Maity, S., Karmakar, S., Datta, N., Vedasiromoni, J. R., Das, P. K. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces

mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **Br J Pharmacol**, 139(2): 209-218, 2003.

Van der Sluis, M., eDe Koning, B. A., eDe Bruijn, A. C., eVelcich, A., eMeijerink, J. P., eVan Goudoever, J. B., eBuller, H. A., eDekker, J., eVan Seuning, I., eRenes, I. B., e Einerhand, A. W. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, 131(1): 117-129, 2006.

Van Meeteren, M.E., Meijssen, M.A., Zijlstra, F.J. The effect of dexamethasone treatment on murine colitis. **Scand J Gastroenterol**, 35(5): 517-21, 2000.

Varghese, A. K., Verdu, E. F., Bercik, P., Khan, W. I., Blennerhassett, P. A., Szechtman, H., Collins, S. M. Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. **Gastroenterology**, 130(6): 1743-1753, 2006.

Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., Beck, P. L. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 96(1): 29-36, 1989.

Webb, M. L., e Meek, T. D. Inhibitors of endothelin. **Med Res Rev**, 17(1): 17-67, 1997.

Weller, A., Isenmann, S., Vestweber, D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. **J Biol Chem**, 267(21): 15176-15183, 1992.

Wessale, J. L., eAdler, A. L., eNovosad, E. I., eCalzadilla, S. V., eDayton, B. D., eMarsh, K. C., eWinn, M., eJae, H. S., evon Geldern, T. W., eOpgenorth, T. J., e Wu-Wong, J. R. Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621: ex vivo and in vivo studies. **Clin Sci (Lond)**, 103 Suppl 48(112S-117S), 2002.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc**, 2(3): 541-546, 2007.

Wirtz, S., e Neurath, M. F. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Adv Drug Deliv Rev**, 59(11): 1073-1083, 2007.

Woods, M., Bishop-Bailey, D., Pepper, J. R., Evans, T. W., Mitchell, J. A., Warner, T. D. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol**, 31 Suppl 1(S348-350), 1998.

Xavier, R. J., e Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, 448(7152): 427-434, 2007.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332(6163): 411-415, 1988.

Yao, L., Pan, J., Setiadi, H., Patel, K. D., McEver, R. P. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. **J Exp Med**, 184(1): 81-92, 1996.

Yoshizumi, M., Kurihara, H., Morita, T., Yamashita, T., Oh-hashii, Y., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yazaki, Y. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 166(1): 324-329, 1990.

Youngman, K. R., Simon, P. L., West, G. A., Cominelli, F., Rachmilewitz, D., Klein, J. S., Focchi, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, 104(3): 749-758, 1993.

Zemse, S. M., Hilgers, R. H., Simkins, G. B., Rudic, R. D., Webb, R. C. Restoration of endothelin-1-induced impairment in endothelium-dependent relaxation by interleukin-10 in murine aortic rings. **Can J Physiol Pharmacol**, 86(8): 557-565, 2008.

Zhang, M., Deng, C., Zheng, J., Xia, J., Sheng, D. Curcumin inhibits trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats by activation of

peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Int Immunopharmacol**, 6(8): 1233-1242, 2006.

Zhao, J., de Vera, J., eNarushima, S., eBeck, E. X., ePalencia, S., eShinkawa, P., eKim, K. A., eLiu, Y., eLevy, M. D., eBerg, D. J., eAbo, A., eFunk, W. D. R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, 132(4): 1331-1343, 2007.

Zhao, R. Z., Chen, X., Yao, Q., Chen, C. TNF-alpha induces interleukin-8 and endothelin-1 expression in human endothelial cells with different redox pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, 327(4): 985-992, 2005.

Zouki, C., Baron, C., Fournier, A., Filep, J. G. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. **Br J Pharmacol**, 127(4): 969-979, 1999.