

EFEITO DA RESOLVINA D2 - UM MEDIADOR LIPÍDICO DE PRÓ-RESOLUÇÃO NA COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR DSS

Palavras-Chave: doença inflamatória intestinal; colite experimental; mediadores lipídicos

Autores/as:

Bruna Biazon Palma (aluna de Iniciação Científica) [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

Lívia Bitencourt Pascoal [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

Fabio Henrique Mendonça Chaim [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

Bruno Lima Rodrigues [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Raquel Franco Leal (orientadora) [Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem duas apresentações principais: a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Ambas apresentam evolução crônica, marcada por períodos de remissão e de exacerbação dos sintomas, como dor abdominal, urgência em evacuar, diarreia e perda de peso(1, 2). A etiologia dessas doenças ainda não está completamente compreendida, mas estudos sugerem que a inflamação intestinal decorre de uma interação disfuncional entre ambiente, microbiota intestinal e sistema imune, em indivíduos suscetíveis geneticamente(1, 3). Nas últimas décadas, a incidência e a prevalência dessas doenças aumentaram de maneira importante, sobretudo em países ocidentalizados(2, 4). O início precoce das DII – acometendo majoritariamente adultos jovens – e seu caráter perene, as tornam um potencial problema de saúde pública(5), visto que comprometem indivíduos em sua fase economicamente ativa, causando prejuízos econômicos, sociais e psicológicos(6, 7).

Atualmente, o tratamento das DII tem como intenção induzir e manter a remissão da doença, promovendo a melhora da qualidade de vida do paciente. Dentre as terapias disponíveis estão os aminossalicilatos, corticoides, imunomoduladores e intervenções cirúrgicas, que são empregados segundo a extensão e gravidade da doença em vigor(8, 9). Apesar de apresentarem boa efetividade no manejo das DII, há diversos casos com pacientes não responsivos ou que apresentam efeitos colaterais significativos(8-10). Nesse cenário, tendo em vista que a inflamação crônica pode resultar tanto de uma resposta inflamatória exacerbada quanto de uma não resolvida, novos recursos terapêuticos estão sendo estudados, a fim de encontrar mecanismos endógenos de promoção da resolução da inflamação crônica, característica das DII.

A resolução da inflamação é reconhecida como um processo ativo, marcado pela troca temporal e espacial dos mediadores lipídicos presentes nos exsudatos inflamatórios(11). Dentre os mediadores que promovem a resolução da inflamação, destacam-se os derivados dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, como as

resolvinas da série E que são geradas a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA), e as resolvinas da série D, maresinas e protectinas que são biossintetizadas a partir do ácido docosahexaenóico (DHA)(12). O mecanismo de ação dos SPMs, que leva a restauração da homeostase tecidual, baseia-se genericamente na limitação do recrutamento e interrupção da diapedese de polimorfonucleares, na modulação da transcrição de genes inflamatórios, e na ativação e aprimoramento da atividade fagocítica de macrófagos, favorecendo a eferocitose(13, 14).

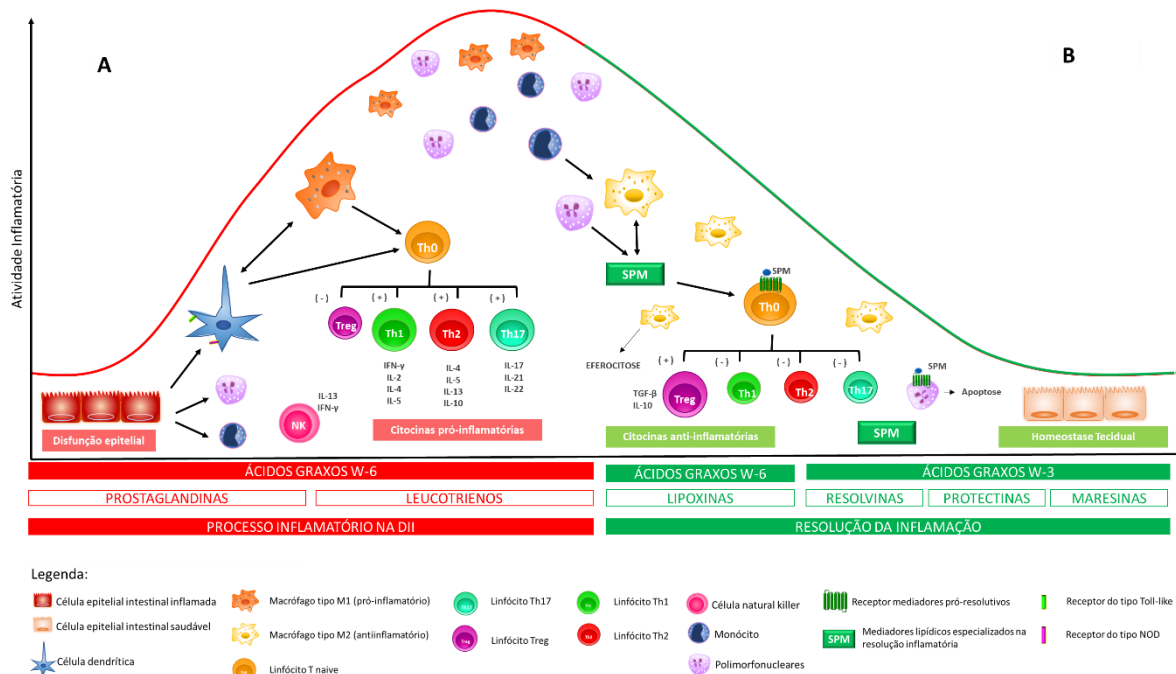


Figura 1 - A. Representação da resposta inflamatória na Doença Inflamatória Intestinal. B. Representação da resolução do processo inflamatório. O epitélio entérico lesionado passa a ter a exposição de diferentes antígenos que ativam a resposta imune inata, a partir da ação de células dendríticas e da liberação de mediadores lipídicos, como prostaglandinas e leucotrienos, que atuam no recrutamento de neutrófilos, na ativação de linfócitos T e na sinalização para início da resposta imune adquirida. Em seguida, ocorre a diferenciação das células T, a liberação de quimiocinas e citocinas, instaurando um processo crônico nos portadores de DII. Em uma condição normal, a homeostase tecidual é restaurada com a atuação dos mediadores lipídicos, principalmente aqueles derivados dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, como as resolvinas, maresinas e protectinas. Essas substâncias favorecem a eliminação de debris celulares, estimulam a apoptose de PMN e a cessação do seu recrutamento; além de reduzir a transcrição de fatores pró-inflamatórios.

Falhas neste processo têm sido recentemente associadas ao desenvolvimento e perpetuação de doenças inflamatórias crônicas e ao dano tecidual(10). Logo, eventuais disfunções na via de mediadores de pró-resolução podem sustentar o processo inflamatório e provocar alteração na homeostase da mucosa intestinal, sugerindo um importante papel dessas substâncias imunomoduladoras na patogênese da DII. Conseqüentemente, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo pode representar uma nova abordagem terapêutica para as DII, visto que atualmente os medicamentos utilizados atuam a partir de vias anti-inflamatórias, inibindo fatores que medeiam a instauração ou manutenção da inflamação, não havendo ainda medicamentos que atuem sobre a via de resolução da inflamação(15). Assim, o modelo animal de inflamação intestinal propiciará um melhor entendimento das alterações encontradas no perfil inflamatório e resolutivo durante a inflamação da mucosa intestinal, sendo possível avaliar o efeito terapêutico do mediador lipídico de pró-resolução, resolvina D2 (RvD2).

METODOLOGIA:

1. Animais experimentais:

Neste estudo foram utilizados camundongos C57/BL6, machos, com quatro semanas de vida, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram aclimatados por duas semanas e então submetidos aos protocolos experimentais. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA, 4919-1/2018).

2. Protocolos experimentais:

Camundongos, com seis semanas de vida, foram randomizados e distribuídos em dois grupos (n=6/grupo). O grupo controle (grupo CTR) recebeu somente água potável, enquanto o outro grupo (grupo DSS) teve adicionado sulfato de sódio de dextrano (DSS) 3% à água para consumo para indução da colite experimental, por 7 dias. Após, camundongos com colite experimental foram tratados com duas diferentes concentrações de RvD2 durante 4 dias, Anti-TNF α , uma única dose, ou solução salina, por via intraperitoneal. Durante os períodos citados avaliou-se os grupos experimentais quanto a ingestão de alimento, variação de peso, presença de sangue oculto/visível nas fezes e consistência das fezes (tabela 1). Com base nas alterações verificadas nas categorias citadas, foi estimado o desenvolvimento da colite experimental, a partir da determinação diária do índice de atividade da doença (IAD). Considerou-se que havia inflamação estabelecida quando IAD \geq 2,0. Após o período experimental, os cólons foram extraídos para avaliação do comprimento e para a análise da expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias, e de enzimas envolvidas na síntese de RvD2, bem como de seu receptor o GPR 18, através de PCR em tempo real, na mucosa intestinal dos camundongos. Ainda, foi avaliado a inflamação colônica através do escore de inflamação histológico e as repercussões inflamatórias a partir da coloração de Hematoxilina & Eosina e Tricrômio de Masson.

Tabela 1 - Sistema de Pontuação para calcular o IAD

Escala	Perda de Peso	Consistência das Fezes	Presença de Sangue nas Fezes
0	Não	Normal	Não
1	1-5%	Normal	Não
2	6-10%	Amolecidas	Sangramento leve
3	11-20%	Amolecidas	Sangramento leve
4	>20%	Diarreia	Sangramento intenso

O valor do IAD será calculado através da soma da pontuação para perda de peso, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes. IAD= Índice de Atividade da Doença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Caracterização da colite experimental:

O DSS induziu uma colite importante expressa clinicamente pela redução da ingesta alimentar (p<0,05), pela perda de peso (p<0,01) e pela ocorrência de sangue nas fezes e diarreia. Esses sinais foram agravados a partir do 5º dia de exposição ao agente químico, resultando em uma consistente elevação do índice de atividade da doença (IAD), quando comparados o grupo DSS e o grupo CTR. Ainda, de forma clara,

os animais com colite experimental exibiram menor comprimento de cólon, quando comparado ao grupo CTR ($p < 0,05$).

A partir da análise histológica qualitativa da mucosa intestinal dos animais, foi confirmado um amplo acometimento do tecido, com alterações na sua arquitetura determinadas pela presença de infiltrado inflamatório, perda de criptas e de células caliciformes, aparecimento de segmentos ulcerados, além de áreas com intensificação de deposição de fibras colágenas.

Em continuidade à avaliação dos danos associados à colite experimental, avaliou-se o perfil inflamatório da mucosa intestinal dos camundongos, através da expressão transcricional de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-22 e anti-inflamatórios, como IL-10, após o 7º dia de exposição ao DSS, por PCR em tempo real. Os valores obtidos atestam que o grupo DSS teve uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, com elevação significativa nos níveis de TNF- α e IL-22 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), respectivamente (figura 3A). Em contrapartida, as enzimas atuantes na biossíntese da RvD2 – como PLA2, 15-LOX e 5-LOX – e o seu receptor de membrana, o GPR18, foram negativamente regulados, com significativa redução da expressão dessas enzimas ($p < 0,01$) e do receptor ($p < 0,05$), quando comparado o grupo DSS ao grupo CTR.

Os resultados apresentados confirmam que o DSS 3% foi eficaz em induzir uma colite experimental, evidenciada pela instituição do processo inflamatório com repercussão metabólico-clínica e histopatológica, e pela modulação positiva de citocinas que participam da sustentação da resposta inflamatória patológica. Em paralelo, foi observada uma supressão da via endógena de formação da RvD2, associada à manifestação da inflamação presente na colite induzida pelo DSS.

2. Tratamento da RvD2:

O tratamento com RvD2 em ambas as doses, bem como com o anti-TNF α , exerceram efeito protetor na colite experimental induzida por DSS. Com o início da administração das substâncias referidas, os camundongos apresentaram o restabelecimento de parte do peso corpóreo, com atenuação do seu ritmo de perda quando comparados ao grupo controle, que não foi tratado e prosseguiu com a redução de peso, alcançando valor final inferior aos demais grupos. Dessa forma, a média de variação de peso dos três grupos terapêuticos mostrou-se significativamente menor do que no grupo CTR, o qual apresentou menor resistência a perda de peso ($p < 0,01$). Em relação ao IAD, o mesmo comportamento foi notado, com o abrandamento dos sintomas que culminaram com uma importante redução do IAD, demonstrando a eficácia dos tratamentos em lentificar a progressão da inflamação colônica.

Ainda, os animais tratados com anti-TNF α e com a RvD2 na sua maior concentração (RvD2 C2) exibiram um comprimento de cólon significativamente maior do que aqueles com colite experimental induzida sem tratamento ($p = 0,03$ e $p = 0,01$, respectivamente). Já a RvD2 em menor concentração (RvD2 C1) apesar de também predispor a uma redução do encurtamento do cólon, não demonstrou valores estaticamente significativos.

A ação desses agentes terapêuticos sob a atenuação da inflamação ainda pode ser observada a partir da avaliação histológica da mucosa intestinal dos animais com colite experimental. O grupo CTR exibiu inflamação colônica consistentemente mais

grave do que os grupos tratados, com maior extensão das lesões, comprometimento epitelial, ulcerações, perda de células caliciformes e presença de filtrado inflamatório. Por sua vez, nos camundongos em uso de RvD2 e anti-TNF α houve maior manutenção da histoarquitetura normal, com redução dos sinais microscópicos associados a inflamação colônica. Essa diferença entre os danos teciduais evidenciados, é mensurada pelo cálculo do escore histológico de inflamação, que engloba diversos parâmetros que traduzem a gravidade e dimensão do acometimento colonico pelo processo inflamatório, exibindo diferença significativa entre o grupo CTR e os demais grupos ($p < 0,01$).

Os resultados deste estudo sugerem a participação da RvD2 na modulação da inflamação do cólon associada à colite experimental e sugere ainda sua capacidade em atenuar os danos associados a colite em um modelo in vivo. O efeito protetor assemelha-se ao descrito anteriormente na literatura sobre a ação dos mediadores lipídicos de pró-resolução em outras doenças inflamatórias crônicas(16). O desempenho terapêutico foi evidenciado pela redução do IAD, do encurtamento do cólon e do escore histopatológico, com redução do infiltrado inflamatório, característicos da lesão colônica associada à inflamação. Ainda, pode ser verificado, que a atuação da RvD2 como citoprotetora foi compatível ao anti-TNF α , que é um imunomodulador frequentemente empregado no manejo das DII(8). Nesse contexto, vale ressaltar que a RvD2 demonstrou efetividade anti-inflamatória e pró-resolutiva em distintas e baixas concentrações, quando comparada as terapias tipicamente adotadas.

CONCLUSÕES:

O efeito benéfico da RvD2 em relação à gravidade da colite experimental sugere o potencial terapêutico desse mediador lipídico, o colocando como uma alternativa promissora para o tratamento das DII.

BIBLIOGRAFIA

1. S F, S E. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *The Surgical clinics of North America*. 2019;99(6).
2. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care*. 2017;44(4):673-92.
3. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13(1):3-10.
4. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol*. 2006;12(38):6102-8.
5. M'koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. <https://doi.org/104137/CGastS12731>. 2013.
6. TA M. Inflammatory Bowel Disease: Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. *The Surgical clinics of North America*. 2015;95(6).
7. AS A, RF L, CSR C, CC D, MLS A. RELATIONSHIP AMONG PSYCHOLOGICAL WELL-BEING, RESILIENCE AND COPING WITH SOCIAL AND CLINICAL FEATURES IN CROHN'S DISEASE PATIENTS. *Arquivos de gastroenterologia*. 2019;56(2).
8. Mazal J. Crohn disease: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Radiol Technol*. 2014;85(3):297-316; quiz 7-20.
9. Schwanke RC, Marcon R, Bento AF, Calixto JB. EPA- and DHA-derived resolvins' actions in inflammatory bowel disease. *Eur J Pharmacol*. 2016;785:156-64.
10. Lee Y, Choo J, Kim SJ, Heo G, Pothoulakis C, Kim YH, et al. Analysis of endogenous lipids during intestinal wound healing. *PLoS One*. 122017.
11. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61.
12. Lopez-Vicario C, Rius B, Alcaraz-Quiles J, Garcia-Alonso V, Lopategi A, Titos E, et al. Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases. *Eur J Pharmacol*. 2016;785:133-43.
13. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin Treatment that Counter Proinflammation Signals. *J Exp Med*. 1962002. p. 1025-37.
14. Serhan CN, Chiang N, Dall' J. The Resolution Code of Acute Inflammation: Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Resolution. *Semin Immunol*. 2015;27(3):200-15.
15. Ungaro F, Rubbino F, Danese S, D'Alessio S. Actors and Factors in the Resolution of Intestinal Inflammation: Lipid Mediators As a New Approach to Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*. 2017;8.
16. Chiurchiù V, Leuti A, Maccarrone M. Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front Immunol*. 2018;9.