

Proposta de um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal¹

Proposal of a new experimental model of inflammatory bowel disease induction

João Carlos Domingues Repka², Pedro Ernesto Caron³, Rodrigo Theodoro Belila⁴, Michel Wentz Antunes⁴, José Tárccio de Campos Filho⁴, Juliano Valério Bortolletto⁴

1. Trabalho premiado no XVIII Fórum de Pesquisa em Cirurgia do Colégio Brasileiro de Cirurgiões/2003 – Prêmio Alfredo Monteiro. Realizado na Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron – Campina Grande do Sul – Paraná.
 2. Coordenador de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Professor NRD6 do Programa de Pós-Graduação em Medicina, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Doutor em Imunologia – Universidade de Paris VI.
 3. Médico Cirurgião do Aparelho Digestivo, Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Mestre em Clínica Cirúrgica - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- Alunos do curso de Medicina, estagiários do Hospital e Maternidade Angelina Caron.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar as lesões intestinais em ratos imunizados com proteínas intestinais murinas.

MÉTODOS: Preparou-se suspensão a 40% de cólon de ratos normais em PBS pH7,4, seguida de maceração, purificação, inativação e eletrofocalização de proteínas. Com esta suspensão 20 ratos Wistar foram imunizados conforme as seguintes fases: sensibilização via SC e IM com antígeno emulsificado em adjuvante completo de Freund. Reforços via IM com suspensão antigênica pura. Nesta fase foram pesquisados anticorpos séricos anti-tecido colônico por imunodifusão e face à positividade, dez ratos foram submetidos à avaliação histológica do cólon e em outros dez, inoculação via IP com suspensão antigênica pura. Após seis dias apresentaram: blefarite, diarreia, apatia, hematoquesia e então submetidos à coleta de amostras do cólon para avaliação histológica.

RESULTADOS: A suspensão antigênica apresentou oito bandas de proteínas, entre 100 a 420 kD. Nas amostras de cólon observaram-se histologicamente perda de criptas, edema da camada sub-mucosa e inflamação aguda.

CONCLUSÃO: Foi possível reproduzir doença inflamatória intestinal em ratos a partir de imunização com antígenos protéicos intestinais da própria espécie. A presença de anticorpos séricos anti-intestino foi relacionada com as alterações histológicas encontradas no cólon de ratos imunizados.

DESCRITORES: Doença inflamatória intestinal. Antígeno colônico. Anticorpos anti-tecido colônico. Ratos. Eletrofocalização.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the bowel lesions of rats after immunization against self intestinal proteins.

METHODS: A 40% colonic solution was made in pH 7,4 PBS, followed by maceration, purification, inactivation and SDS-PAGE electrophoresis. Twenty Wistar rats were submitted to the following immunization schedule: Subcutaneous and intramuscular sensibilization with antigen solution emulsified in Freund's complete adjuvant. Intramuscular booster with pure antigen suspension. In this phase, were investigated anti-intestinal antibodies by single radial immunodiffusion and histologic evaluation of colon samples. Challenge by intraperitoneal route with antigenic solution and clinical observation. The animals were sacrificed and had collected colon samples for histologic evaluation.

RESULTS: The antigenic suspension presented eight protein with molecular weight between 80 and 420 kD. After six days of the intraperitoneal challenge they had presented: blepharitis, diarrhea, alopecia, apathy and hematochezia. Histological evaluation of this immunological IBD animal model showed ulceration of distal colon, mucosa leucocyte infiltration, edema in submucosa layer and significant crypts degeneration. Anti-intestinal antibodies were present in all of animals.

CONCLUSION: It was concluded that was possible to reproduce IBD in rats, as well as the presence of anti-intestinal antibodies was related to histologic features of colon in immunized rats.

KEY WORDS: Experimental inflammatory bowel disease. intestinal antigens. Anti-intestinal antibodies. Rats. Electrofocusing.

Introdução

Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma terminologia aplicada para um grupo de doenças inflamatórias crônicas de causa desconhecida, envolvendo a formação de complexos imunes no trato gastrintestinal^{1,2}. Diversos mecanismos têm sido descritos como causadores destas doenças, desde fatores psicogênicos até os imunológicos, sem ainda haver consenso entre os autores. Neste contexto, os modelos experimentais contribuem para a avaliação dos fatores imunológicos envolvidos e tentativa de elucidação dos possíveis mecanismos farmacológicos bloqueadores³. Os modelos animais freqüentemente utilizados para estes propósitos, são induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas diluídas e durante a sua evolução, por um período de tempo determinado, apresentam-se histologicamente similares às DII humanas, sendo estas lesões posteriormente auto-reparadas⁴. A indução de resposta imunológica tanto humoral como celular contra constituintes do próprio organismo é um atributo inerente às doenças auto-imunes, contudo, a sua indução experimental é pouco relatada. Assim sendo, este estudo propõem um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal em ratos, que tem exclusivamente a intervenção imunológica, sem o uso de agentes químicos diretamente na luz intestinal. Constitui objeto deste estudo avaliar as lesões intestinais em ratos imunizados com proteínas intestinais murinas.

Métodos

Delineamento e organização do estudo

Utilizaram-se 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), com pesos entre 234,7g e 253,5g. Os animais foram mantidos em ambiente específico, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura ambiental controlada (média de 21,6°C ± 1,06) recebendo atendimento conforme o protocolo vigente para manutenção de animais em experimentação, da

Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron, adotadas as normatizações previstas pela Lei Federal 6.638 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Preparação e controle do antígeno colônico de ratos

Para a preparação do antígeno colônico, foi modificada a técnica descrita por GISPEN⁵. Coletaram-se segmentos intestinais colônicos de ratos Wistar normais, que eram macerados manualmente em solução tampão-fosfatos pH 7,4, na concentração de 40% (p/v). O macerado obtido era passado em filtro com poros de 20 micra de diâmetro, para a retenção das partículas maiores. Em seguida, o filtrado era centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos entre 4 e 8°C em centrífuga refrigerada (BIO-RESEARCH®) e o sedimento resultante era desprezado. Ao sobrenadante era adicionado Betapropiolactona (SIGMA®), na concentração de 1:4000, em temperatura entre 4° a 8°C para a inativação de bactérias, fungos e vírus, por 24 horas. Posteriormente o pH era corrigido novamente para 7,4 com solução tampão glicocola. Amostras do antígeno colônico preparado foram submetidas aos controles por eletrofocalização de proteínas em gel de poliacrilamida SDS, com a finalidade de determinar seus pesos moleculares e teste de esterilidade bacteriana e fúngica.

Imunização de ratos Wistar com antígeno colônico

O processo de imunização dos ratos foi organizado em três fases⁶:

Fase I

Fase de sensibilização imunológica, na qual o sistema imunológico deverá desenvolver imunidade de base, através da inoculação de antígeno colônico emulsificado com adjuvante completo de Freund, que é constituído pela mistura de óleo mineral com micobactérias mortas pelo calor. Nesta fase as vias sub-cutanea e

intramuscular foram utilizadas para a inoculação da suspensão antigênica emulsificada. Por ambas foram inoculadas 1ml a cada cinco dias, totalizando dez doses, com duração total de 100 dias.

Fase 2

Fase de reforços, procedeu-se a imunização somente pela via intramuscular com antígeno puro sem adjuvante completo de Freund. Foram inoculados 1ml a cada cinco dias, totalizando dez doses, com duração de cinquenta dias. Ao término desta fase, os animais foram submetidos à coleta de sangue para dosagem de anticorpos anti-tecido colônico. Frente à positividade dos resultados, os animais foram divididos em dois grupos com 10 animais cada. Um dos grupos foi submetido à eutanásia, por inalação letal de éter sulfúrico, com posterior ressecção de segmentos intestinais, para análise histopatológica. Outros dez ratos passaram para a fase 3.

Fase 3

Nesta fase, identificada como desafio, os animais foram inoculados com uma dose de 1ml de suspensão antigênica, sem o adjuvante, por via intraperitoneal. A seguir, todos os animais foram mantidos em observação diária até o aparecimento de sinais clínicos, como piloereção, perda de fêneros, hiporexia, apatia e hematoquesia, quando foram submetidos à eutanásia, por inalação letal de éter sulfúrico, para coleta de segmentos intestinais e posterior análise histopatológica.

Pesquisa de anticorpos anti-tecido colônico

Utilizou-se o método descrito por Ouchterliny⁸, empregando a suspensão de tecido colônico como antígeno em gel de agarose a 0,4%.

Eletrofocalização dos antígenos colônicos

Empregou-se o método descrito por Laemmli⁹ em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS), nas concentrações de 5% para o gel de concentração e 11% para o gel de corrida, por 18 horas. Simultaneamente utilizaram-se controles de pesos moleculares (PHARMACIA-BIOCHEM[®]). Após o período de corrida eletroforética, o gel foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 2% e em seguida corado com Azul

de Comassie (MERCK[®]), para evidenciar as bandas de precipitação das proteínas da amostra e dos controles de baixos e altos pesos moleculares.

Avaliação morfológicas

Adotaram-se os critérios anteriormente descritos^{1,10,11} para avaliar as alterações morfológicas intestinais e histologicamente as reações inflamatórias e alterações vasculares.

Resultados

Pesquisa de anticorpos anti-tecido colônico

Observou-se positividade pela técnica de imunodifusão radial para anticorpos anti-tecido colônico no soro de todos os animais estudados, após a fase de reforços.

Eletrofocalização das proteínas constitutivas da suspensão antigênica por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS

Pela eletroforese do antígeno colônico, observaram-se bandas de proteínas com pesos moleculares compreendidos entre 100 e 420 K daltons (Figura 1).

Os resultados da eletroforese acima são interpretados da seguinte forma:

Separação completa das bandas dos controles de pesos moleculares e da amostra.

Comparação entre as bandas das amostras e as bandas do controle, sendo a comparação entre as posições de ambas é que determina o peso molecular das proteínas contidas na amostra.

Neste experimento foram observadas duas situações: a eletroforese (A), referente ao antígeno bruto, antes da purificação por centrifugação, o qual demonstra baixa resolução pelo arrastamento das proteínas, sem definir padrão de separação. Esta corrida eletroforética foi feita com o intuito de comparar a suspensão antigênica antes e após a purificação. Na corrida (B), referente ao antígeno purificado e utilizado nos animais, observaram-se oito bandas de proteínas, com pesos moleculares entre 100 e 420 kD (Figura 1).

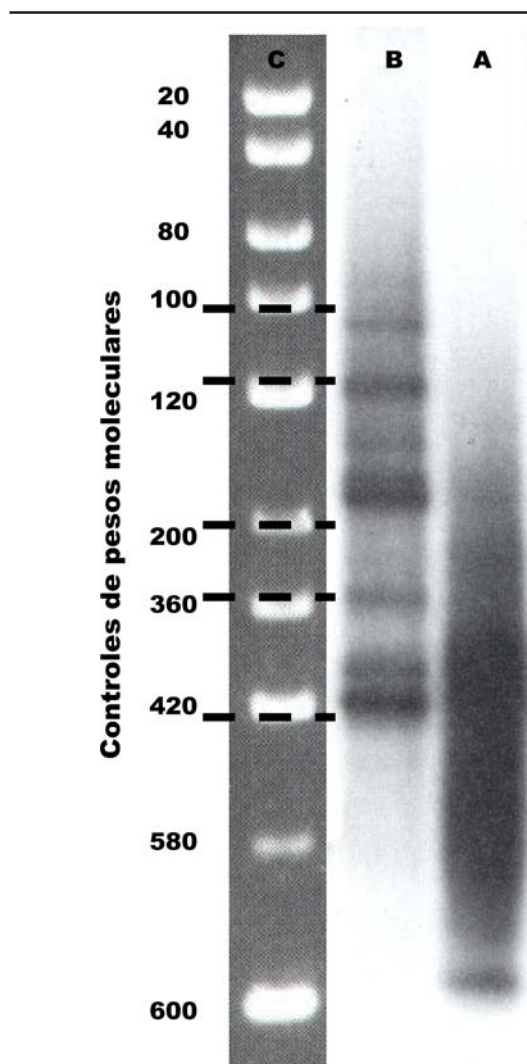


FIGURA 1 - Eletrofocalização de proteínas da suspensão antigênica (A) antes da purificação (B) pós purificação, (C) controles de pesos moleculares após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e coloração com Azul de Comassie.

Observações

No sexto dia de evolução após a fase de desafio com a suspensão antigênica, os animais apresentaram os seguintes sinais: perda de peso, perda de fâneros, pilo-ereção, blefarite, diarreia e hematoquesia (Figura 3).

Alterações macroscópicas

Nas amostras de segmentos colônicos dos animais submetidos ao desafio intraperitoneal, foram encontrados os seguintes achados macroscópicos: áreas de ulceração e hemorragia, áreas de depósito de fibrina, áreas de edema, diminuição do número de vilosidades. Os achados macroscópicos não ultrapassaram, em nenhum

animal, a flexura transversa e se estendiam até o canal anal.

Avaliação histológica

Grupo pré-desafio

Nos animais avaliados antes da fase de desafio não foram encontradas anormalidades histológicas.

Grupo pós-desafio

Nos animais sacrificados após o desafio intraperitoneal foram encontrados os seguintes achados histológicos (Figura 2): diminuição do número de criptas e microvilosidades (a), áreas de ulceração (b), presença de infiltrado inflamatório intenso (c), marginação perivascular de células inflamatórias (d), evidenciando possível vasculite.

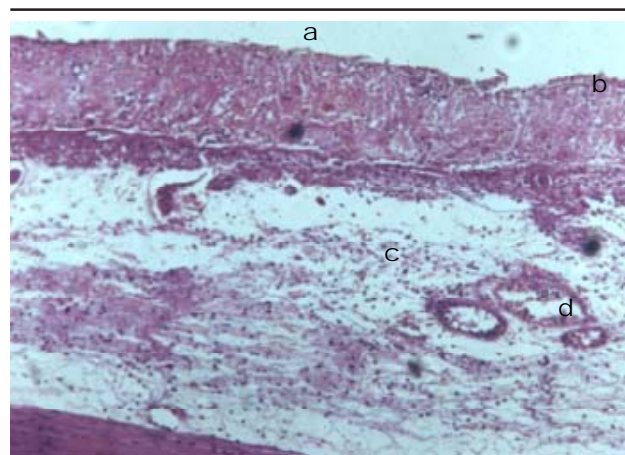


FIGURA 2 - Aspectos histológicos (100x) observados em amostras de cólon de ratos submetidos ao desafio intraperitoneal com suspensão antigênica intestinal.



FIGURA 3 - Aspecto ilustrativo da ocorrência de hematoquesia nos animais após a inoculação da suspensão antigênica intestinal por via intra-peritoneal (fase 3).

Discussão

As doenças inflamatórias intestinais são distúrbios crônicos cuja origem tende a ser multifatorial. A exposição a determinados agentes, provavelmente precede o aparecimento dos sintomas por muitos anos, a incidência anual, em todo o mundo é de 3 a 20 casos por 100.000 pessoas na maioria dos países em que ela é medida¹³.

As comorbidades apresentadas variam muito e em geral, alteram negativamente a rotina de vida destes pacientes, privando horas de salas de aula e recreação quando incide em jovens ou incapacitando adultos para o trabalho.

As medidas terapêuticas são diversas, contudo, apresentam como ponto comum a interferência no processo inflamatório intestinal³ através de drogas anti-inflamatórias e imunossupressivas como o FK506, anticorpos monoclonais anti-TNF α , com resultados satisfatórios. Os estudos experimentais de DII têm sido rotineiramente executados sobre modelos animais que não são efetivamente induzidos por mecanismo imunológico² mas sim, por irritação química da mucosa intestinal^{4,12,14}, embora apresentem padrão histológico similar aos achados em humanos. No presente estudo experimental, as avaliações histológicas das amostras de intestino dos ratos antes da fase de desafio intraperitoneal não demonstraram alterações, porém, após esta etapa e durante o período de observação de seis dias, os animais evoluíram com sinais clínicos compatíveis com DII. Neste período desenvolveram hematoquesia e diarreia e as avaliações histológicas demonstraram achados evidentes de reação inflamatória intestinal, compatíveis com outros estudos^{1,4,11}.

Avaliações sorológicas em humanos portadores de DII apontam para a existência de auto-anticorpos pela técnica de imunofluorescência, definiram prevalência de anticorpos contra um extrato bruto de cólon humano, sem apontar qual proteína estaria efetivamente envolvida. Entretanto, deixam claro o envolvimento de auto-anticorpos, pois estes foram observados em todas as amostras submetidas à pesquisa *in situ*^{11,14,15}. No presente estudo, não se definiu uma única proteína como imunogênica para os ratos desenvolverem lesões colônicas, mas sim oito e com pesos moleculares compreendidos entre 100 e 420 kD

(figura 1). Estes resultados evocam a necessidade de estudo imunológico complementar visando a definição de qual destas proteínas seria alvo dos anticorpos detectados nos soros dos ratos, pois pela técnica empregada neste estudo, não se pode definir esta questão.

O processo de indução de resposta imunológica contra tecidos próprios têm sido alvo de especulações e modelos animais são empregados para diversas finalidades⁸. Neste estudo adaptou-se uma metodologia descrita para avaliar neuroalergenicidade de vacinas antirrábicas, elaboradas em cérebro de animais⁶, para a indução de resposta imunológica contra tecido colônico. A estratégia para adotada para apresentar o antígeno colônico ao sistema imunológico dos ratos, fundamentou-se na capacidade de que o adjuvante completo de Freund induz em potencializar a imunogenicidade de suspensões antigênicas¹², permitindo um efeito prolongado de depósito do antígeno no sítio da inoculação, induzindo reação inflamatória local e ampliação da apresentação às células apresentadoras de antígeno e estimulando a produção de citocinas.

Em humanos foi demonstrada a presença de anticorpos contra uma proteína intestinal de 40kD e foram demonstrados por IDRS, em pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Chron, sendo este teste indicado para a confirmação diagnóstica não invasiva nestes casos¹².

A formação de complexos imunes em tecidos alvo é efetivamente a causa de lesões por mediação do sistema complemento *in situ*. A primeira demonstração experimental de que lesões inflamatórias intestinais eram causadas por indução imunológica, foi feita em coelhos, a partir de imunização com albumina de ovo, por via intramuscular. Na seqüência, foi procedido enema com formalina e em seguida outro enema com albumina de ovo. Os autores discutiram a formação de complexos imunes no tecido intestinal, uma vez que os coelhos desenvolveram anticorpos circulantes contra a albumina, foi procedida uma lesão intestinal pela formalina e o antígeno foi disponibilizado sobre esta lesão, criando assim, a possibilidade de formação de complexos imunes. Os animais que receberam apenas a formalina apresentaram reparo das lesões intestinais no quinto dia de evolução e aqueles que sofreram o enema

de albumina além da formalina apresentaram lesões evolutivas com hematoquesia e diarreia até o óbito em 43 dias⁶.

Neste estudo, a demonstração de anticorpos contra a suspensão antigênica colônica, associada aos achados microscópicos e à evolução clínica dos animais após o desafio intraperitoneal, demonstraram um novo método de indução de DII em ratos, não se referindo exatamente à colite ulcerativa ou doença de Chron, mas com características efetivas de intermediação inflamatória, demonstrada pelo infiltrado leucocitário e edema. Traz perspectivas futuras de estudos que possam efetivamente caracterizar uma única proteína exclusivamente, entre as oito encontradas, como responsável pela exata eclosão do processo inflamatório. Como limitante, este modelo apresenta o tempo de indução da DII, mais longo e a metodologia de preparação da suspensão antigênica, quando comparado a outros modelos que se servem de instilação retal de substâncias químicas indutoras de inflamação^{1,10,17,18,19}.

Conclusão

Foi possível reproduzir doença inflamatória intestinal em ratos a partir de imunização com antígenos proteicos intestinais da própria espécie. A presença de anticorpos séricos anti-intestino foi relacionada com as alterações histológicas encontradas no cólon de ratos imunizados.

Referências

- Macpherson B, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats *Digestion* 1978;17:135-50.
- Takahashi F, Das KM. Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1985;76:311-8.
- Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992;102:1524-34.
- Moraes RS. Aspectos morfológicos da colite induzida por ácido acético a 10% e tratada com enemas de ácido 5-amino-2-hidroxibenzóico Estudo experimental em ratos Sprague-Dawley [Tese-Doutorado] Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1989.
- Gispén R. Épreuve d'activité neuroallergène. In: KAPLAN MM, KOPROWSKI H. *La rage techniques de laboratoire*. Troisième Édition. Genève: Organization Mondiale de la Santé;1974. Chapitre 36 p.303-4.
- Ford H, Kirsner Jb. "Auer colitis" in rabbits induced by intrarectal antigen. *N Engl J Med* 1952;12:745-8.
- Klareskog L, Olsson T. Autoimmunity to collagen II and myelin basic protein: comparative studies in human and rodents. *Immunol Rev* 1990;118:285-310.
- Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis *Prog Allergy* 1958;5:1.
- Laemmli Uk. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-5.
- Campos FG, Waitzberg DL, Logulo AF. Padronização técnica e histológica de colite experimental com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1997;52:180-6.
- Hajar N, Repka JCD, Canan Junior LW. Ação do pneumoperitônio com dióxido de carbono na translocação bacteriana em ratos. *Acta Cir. Bras* 2002;17(3):181-8.
- Lin R, Jones TC Vaccines adjuvants a new hope for effective immunizations. *Braz J Infect Dis* 1997;1:106-22.
- Griffiths AM. Inflammatory bowel disease. *Nutrition* 1998;14:788-91.
- Thomas TK, Will PC, Srivastava A, Wilson CL, Harbison M, Little J, Chesonis RS, Pignatello M, Schmolze D, Symington J. Evaluation of an interleukin-1 receptor antagonist in the rat acetic acid-induced colitis model. *Agents Act* 1991;34:187-90.
- Carlsson HE, Lagercrantz R, Perlmann P. Immunological studies in ulcerative colitis VIII Antibodies to colon antigen in patients with ulcerative colitis Crohn's disease and others disease. *Scand J Gastroenterol* 1977;12:707-14.
- Stewart Thm, Hetenyl C, Rowsell H, Orizaga M. Ulcerative enterocolitis in dog induced by drugs. *J Pathol* 1980;131:363-78.
- Hibi T, Aiso S, Ishikawa M, Watanabe M, Yoshida T, Kobaisahi K, Asakura H, Tsuru S, Tsuchiya M. Circulating antibodies to the surface antigens on colon epithelial cells in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1983;54:163-8.
- Dieleman LA, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Role of animal models for the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1997;223:99-104.
- Psaila JV, Myers B, Jones IR, Rhodes J. Effects of prostaglandin PGE-2 on alcohol-induced ulceration in the rat colon. *Digestion* 1986;35:224-8.
- Wojcysz R. Liver involvement in its course in experimental colitis in rats. *Hepato-Gastroenterol* 1997;44:1193-5.

Repka LCD e col

Correspondência :

João Carlos Domingues Repka
Rua Guilherme Pugsley, 2604/11
80610-300 Curitiba – PR
repka@hospitalcaron.com.br

Recebimento: 25/05/2004

Revisão: 02/07/2004

Aprovação: 19/08/2004

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Repka JCD, Caron PE, Belila RT, Antunes MW, Campos Filho JT, Bortolotto JV. Proposta de um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal. Acta Cir Bras [serial online] 2004 Set-Out;19(5). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> [também em CD-ROM].

*Figuras coloridas disponíveis em www.scielo.br/acb