

LILIAN BERNADETE NAMAZU

Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite

**São Paulo
2015**

LILIAN BERNADETE NAMAZU

Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Frederico Azevedo Costa Pinto

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3118
FMVZ

Namazu, Lilian Bernadete
Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite / Lilian Bernadete Namazu. -- 2015.
162 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Azevedo Costa Pinto.

1. Doença inflamatória intestinal. 2. Amitriptilina. 3. Neuroimunomodulação. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Papel da Amitriptilina em um modelo murino de colite", protocolado sob o nº 2999/2013, utilizando 120 (cento e vinte) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Frederico Azevedo Costa Pinto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Role of Amtriptyline in a murine model of colitis", protocol number 2999/2013, utilizing 120 (one hundred and twenty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Frederico Azevedo Costa Pinto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 18 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NAMAZU, Lilian Bernadete

Título: Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Aos meus pais, Yoshishisa e Setsuko, agradeço por cada momento passados juntos, cada ensinamento de vida pela pessoa que sou e pelo privilégio de ter sido sua filha.

Ao meu namorado, Alexandre (Bombom) agradeço pela motivação desta etapa concluída e por estar sempre ao meu lado. Te amo.

Ao meu orientador Fred, que soube com maestria, paciência e sabedoria me orientar nesta jornada intelectual.

Agradecimentos

A minha família do sul, pelo suporte e amor incondicional.

Ao meu tio Bonifácio Nakasu e família pelo carinho, ajuda e apoio nos primeiros passos do doutorado e sempre.

Aos meus anjos da guarda (Atílio e Adriana) pela amizade, apoio, motivação e confiança nesta etapa.

À Viviane Ferraz, Tiemi, Carol Relvas por todo apoio e incentivo quando mais precisei no início desta trajetória.

Ao Daniel Gimenez e Ana Paula Lima pela amizade, ajuda e força mesmo em altas horas no laboratório.

Ao Rafael Margatho e Julieta Ochoya pelo carinho, compreensão e amizade em todos os momentos.

Ao Daniel (Nato) pela amizade, ajuda e força.

Ao Prof. Dr. João Palermo-Neto por me receber de braços abertos no grupo de Neuroimunomodulação e por ser uma grande inspiração a todos que o cercam.

A Prof. Dr. Cristina Massoco que foi muito especial nesta fase toda e que me apoiou muito.

A Secretária Cris que sempre me ajudou e apoiou neste período.

A todos os professores do departamento de Patologia que sempre foram muito prestativos e amáveis.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia, Herculano e Vagner e à especialista Nicolle, pela ajuda constante diária e pela ótima amizade que formamos durante estes anos de convivência.

À médica veterinária responsável pelo biotério Cláudia Mori, por estar sempre de prontidão a ajudar e por sempre se desdobrar para me fornecer animais.

Aos técnicos do biotério Idalina, Luciana, Nelsinho, Aline e Mauro, pela amizade, contribuição no trabalho e pela agradável convivência.

Aos técnicos Marguiti, Lia, Buga, Claudio pela amizade e ajuda.

Aos funcionários da biblioteca (Neusa, Elza), que sempre me auxiliaram quando necessário.

Aos meus colegas de pós-graduação: Adriano Zager, Alison Ribeiro, André, Bruno Honda, Carolina Costola, Denise Kinoshita, Eduardo Kenji, Fernando Ponce, Fernando Pípole, Gabriela, Glauclie Alves, Guilherme, João Gimenes, Juliana, Laísa, Luciana Cunha, Milena Pinheiro, Nathalia Moreira, Poliana Gomes, Rodrigo Vieira, Thaisa, Thalita Machado, Thiago Aloia, Thiago Kirsten, Thiago Marinho, Vinicius Izidio, e Wanderley Quinteiro pelo auxílio quando necessário e pela agradável convivência.

A todos os membros do Grupo de Neuroimunomodulação.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, me fornecer todos os meios para execução deste trabalho.

À CAPES e à FAPESP pelo projeto temático (2009/ 51886-3) do qual este trabalho faz parte.

“Cem vezes todos os dias lembro a mim mesmo que minha vida interior e exterior depende dos trabalhos de outros homens, vivos ou mortos, e que devo esforçar-me a fim de devolver na mesma medida que recebi.”

Albert Einstein

RESUMO

NAMAZU, L. B. **Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite.** [Effect of amitriptyline in a murine model of colitis]. 2015. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Doenças inflamatórias intestinais (DII) em humanos são reações crônicas de etiologia complexa. Trata-se de uma reação imunológica exacerbada e depende da microbiota. O sistema nervoso interage com a imunidade do intestino de um modo bidirecional. Relatos clínicos e poucos achados experimentais apontam para uma ligação entre transtornos depressivos e doenças inflamatórias intestinais, sugerindo interação neuroimunológica na patogenia deste processo. Ainda, o tratamento de Doenças inflamatórias intestinais (DII-Doença de Crohn e Colite Ulcerativa) com antidepressivos em modelos murino de colite têm sugerido bons resultados na redução da inflamação. O mecanismo da inflamação na DII e a participação do sistema nervoso ou da modulação de tal processo pelo emprego de antidepressivos ainda não está totalmente elucidado. Este estudo teve como objetivo estudar o efeito do antidepressivo amitriptilina em um modelo murino de colite. A colite foi induzida em camundongos C57BL/6 por Dextrano Sulfato de Sódio (DSS) e a amitriptilina (AMT) foi administrada por via oral, em regime profilático ou terapêutico. Avaliamos a dose de AMT no teste de suspensão da cauda (TSC), o acúmulo de neutrófilos pela atividade de mieloperoxidase (MPO), burst oxidativo, curva de sobrevivência, histopatologia do intestino, atividade da doença por sintomas clínicos, a depleção de muco intestinal, citocinas inflamatórias no cólon e no soro, fenotipagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e monócitos CD14⁺. Resultados: A dose de AMT (200 µg/ml) e os regimes de tratamento utilizados aqui foram capazes de impedir ou diminuir a histopatologia da colite, os sinais clínicos (ganho de peso (%), comprimento e peso do cólon) e a mortalidade dos animais no modelo terapêutico do grupo inflamado e tratado com AMT. A atividade de MPO, níveis circulantes de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram reduzidas nos dois protocolos experimentais (profilático e terapêutico). Conclusões: Este estudo incluiu um período de tratamento prolongado, visto que os antidepressivos são conhecidos por serem eficazes em seres humanos depois de várias semanas a meses de prescrição, e confirmou a eficiência da via de administração oral, uma vez que os antidepressivos são geralmente administrados por via oral a seres humanos. Este

regime de tratamento melhorou o potencial anti-inflamatório de AMT na redução DSS-colite em camundongos, com base nos parâmetros estudados.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal. Amitriptilina. Neuroimunomodulação.

ABSTRACT

NAMAZU, L. B. **Effect of amitriptyline in a murine model of colitis.** [Efeito da amitriptilina em um modelo murino de colite]. 2015. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Inflammatory bowel disease (IBD) in humans is a complex etiology of chronic reactions. It is an exacerbated immune reaction and depends on the microflora. The nervous system interacts with the intestinal immunity of a bidirectional fashion. Clinical reports and few experimental findings point to a link between depressive disorders and inflammatory bowel disease, suggesting neuroimmunological interaction in the pathogenesis of this process. Also, treatment of inflammatory bowel diseases (Crohn's disease DII- and Ulcerative Colitis) with antidepressants in murine models of colitis have pointed to positive results in reducing inflammation. The mechanism of inflammation in IBD and the involvement of the nervous system or modulation of this process by the use of antidepressants is not yet fully elucidated. This study aimed to study the effect of amitriptyline in a murine model of colitis. Colitis was induced in C57BL / 6 mice by Dextran Sodium Sulfate (DSS) and amitriptyline (AMT) were orally administered in a prophylactic or therapeutic regimen. We evaluated the AMT dose in the tail suspension test (TST), the accumulation of neutrophils by myeloperoxidase activity (MPO), oxidative burst, survival curve, bowel histopathology, disease activity by clinical symptoms, depletion of intestinal mucus, colon and inflammatory cytokines in the serum phenotype of CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ and CD14⁺ monocytes. Results: The dose of AMT (200 µg / ml) and treatment regimens used herein are able to prevent or decrease the pathology of colitis, clinical signs (weight gain (%), colon weight and length) and mortality animals in the therapeutic model inflamed group and treated with AMT. MPO activity, circulating levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were reduced in both experimental protocols (prophylactic and therapeutic). Conclusions: This study included a prolonged period of treatment, as antidepressants are known to be effective in humans after several weeks or months of limitation, and confirmed the effectiveness of oral administration route, since antidepressants are generally administered orally to humans. This treatment scheme has improved potential anti-inflammatory AMT in reducing DSS colitis in mice based on the study parameters.

Keywords: Inflammatory bowel disease, Amitriptyline, Neuroimmunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

5- HT	serotonina
a.C.	antes de Cristo
AMPC	AMP cíclico
AMT	amitriptilina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BAL	Lavado bronco-alveolar
BASF	Badische Anilin und Sodafabriken
CONT	Controle
COX	Ciclo-oxigenase
CRH	Fator liberador de corticotropina
CU	Colite ulcerativa
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DC	Doença de Crohn
DSS	Dextran sulfato sodium
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente associado à enzima
GC	glicocorticóide
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular 1
IFN- γ	Interferon- gama
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
kDa	do inglês, kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos

mg	miligrama
mL	mililitro
MPO	mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear κB
NE	norepinefrina
NK	células Natural Killer
NON/LtJ	camundongo “Não-Obeso Não-diabético”
OVA	Ovalbumina
PBS	Solução tampão de fosfato
PG	prostaglandina
ph	pressão hidrostática
PM	peso molecular
PMN	leucócitos polimorfonucleares
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
SI	Sistema imune
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNAS	Sistema Nervoso Autonômico Simpático
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNS	Sistema nervoso simpático
SP	substância P
Th	células T helper
TNBS	ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF	fator de necrose tumoral
TSH	do inglês, thyroid-stimulating hormone
TSC	Teste suspensão da cauda
TLRs	do inglês, toll-like receptors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alvos terapêuticos para DII	34
Figura 2 - Fórmula estrutural da amitriptilina	45
Figura 3 - Esquema em dias do Modelo Profilático	59
Figura 4 - Esquema em dias do Modelo Terapêutico	60
Figura 5 - Avaliação da inflamação por escore clínico e macroscópico no cólon	62
Figura 6 - Representação esquemática da sequência de reagentes nas técnicas de burst oxidativo	63
Figura 7 - Ilustração das células totais do Burst Basal (A- B)	65
Figura 8 - Fluorescência basal dos granulócitos (A-B)	65
Figura 9 - Esquema demonstrando a seleção das populações por fenotipagem	68
Figura 10 - Dot plot e histograma representativo na análise do percentual de Monócitos CD14+	69
Figura 11 - Efeitos do tratamento oral de AMT sobre o tempo total de imobilidade no TSC .	71
Figura 12- Efeitos do tratamento oral de amitriptilina sobre o tempo total de latência no TSC	72
Figura 13 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no cólon proximal no modelo profilático.....	54
Figura 15 - Ganho de peso (%) dos animais no Modelo Profilático	74
Figura 16 - Comprimento do cólon no Modelo Profilático	75
Figura 17 - Peso do cólon no Modelo Profilático.....	75
Figura 18 - Escore clínico das fezes na avaliação macroscópica do cólon	76
Figura 19 - Avaliação do escore da presença de sangue nas fezes.....	76
Figura 20 - Quantificação do Burst oxidativo no modelo preventivo da AMT	77
Figura 21 - Quantificação do Burst oxidativo induzido por PMA em modelo preventivo da AMT.....	77
Figura 22 - Número total de leucócitos circulantes do sangue.....	78
Figura 23 - Contagem de neutrófilos (%) no sangue periférico do modelo preventivo	79
Figura 24 - Contagem de linfócitos no sangue periférico (%) do modelo profilático.....	79
Figura 25 - Contagem de monócitos no sangue periférico (%) do modelo profilático	80
Figura 26 - Fenotipagem dos linfócitos CD4 ⁺ no modelo profilático	80
Figura 27 - Fenotipagem dos linfócitos CD8 ⁺ no modelo profilático	81
Figura 28 - Fenotipagem dos monócitos CD14 ⁺ no modelo profilático.....	81

Figura 29 - Quantificação dos níveis de IL-1 β (Beta) no plasma sanguíneo	82
Figura 30 - Quantificação dos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo	82
Figura 31 - Quantificação dos níveis de TNF- α (alfa) no plasma sanguíneo.....	83
Figura 32 - Concentração de IL-1 β (beta) no cólon proximal modelo profilático	84
Figura 33 - Concentração de IL- 6 no cólon proximal do modelo profilático.....	84
Figura 34 - Concentração de TNF- ALFA na porção proximal do cólon no modelo profilático.....	85
Figura 35 - Concentração de IL-1 beta no cólon distal do modelo profilático de AMT	85
Figura 36 - Concentração de IL- 6 no cólon distal do modelo profilático da AMT.....	86
Figura 37 - Concentração de TNF- ALFA na porção distal do cólon no modelo profilático ..	86
Figura 38 - Escore histológico da inflamação do modelo profilático	87
Figura 39 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite DSS	88
Figura 40 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite - DSS.....	89
Figura 41 - Detalhes de cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite- DSS	90
Figura 42 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de DSS-colite	91
Figura 43 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite- DSS	91
Figura 44 - Curva de sobrevivência do modelo terapêutico.....	92
Figura 45- Modelo terapêutico da AMT na atividade da enzima MPO no cólon proximal.....	93
Figura 46 - Modelo terapêutico da AMT na atividade da enzima MPO no cólon distal.....	93
Figura 47 - Ganho de peso (%) dos animais no Modelo Terapêutico	94
Figura 48 - Comprimento do cólon no Modelo Terapêutico.....	95
Figura 49 - Peso do cólon no Modelo Terapêutico	95
Figura 50 - Escore clínico das fezes na avaliação macroscópica do cólon	96
Figura 51 - Avaliação do escore da presença de sangue nas fezes.....	96
Figura 52 - Quantificação do Burst oxidativo no modelo terapêutico da AMT.....	97
Figura 53 - Quantificação do Burst oxidativo induzido por PMA no modelo terapêutico	97
Figura 54 - Número total de leucócitos circulantes do sangue.....	98
Figura 55 - Contagem de neutrófilos no sangue periférico do modelo terapêutico	98
Figura 56 - Contagem de linfócitos no sangue periférico do modelo terapêutico.....	99

Figura 57 - Contagem de monócitos no sangue periférico do modelo terapêutico	99
Figura 58 - Fenotipagem dos linfócitos CD4+ no modelo terapêutico	100
Figura 59 - Fenotipagem dos linfócitos CD8+ no modelo terapêutico	100
Figura 60 - Fenotipagem dos monócitos CD14+ no modelo terapêutico.....	101
Figura 61 - Concentração de IL-1 Beta no cólon proximal no modelo terapêutico	101
Figura 62 - Concentração de IL- 6 no cólon proximal do modelo terapêutico	102
Figura 63 - Concentração de TNF- ALFA no cólon proximal do modelo terapêutico	102
Figura 64 - Concentração de IL-1 beta no cólon distal do modelo terapêutico.....	103
Figura 65 - Concentração de IL- 6 no cólon distal do modelo terapêutico	103
Figura 66 - Concentração de TNF- ALFA no cólon distal do modelo terapêutico.....	104
Figura 67 - Escore histológico da inflamação do modelo terapêutico	104
Figura 68 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS	105
Figura 69 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS	106
Figura 70 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Modelos de colite por DSS.....	39
Quadro 2 - Produção de ocitocinas estimuladas in vitro, com ou sem incubação de antidepressivos	49
Quadro 3 - A produção de citocinas antes e após o tratamento de pacientes deprimidos com antidepressivo	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO	25
2.2	DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)	31
2.3	MODELO DE COLITE	36
2.4	ANTIDEPRESSIVOS.....	41
2.5	AMITRIPTILINA (AMT)	44
2.6	CITOCINAS	47
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	ANIMAIS.....	56
4.2	CORANTES CELULARES	56
4.3	FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	57
4.4	TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA (TSC)	58
4.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DA COLITE E TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	58
4.5.1	Modelo Profilático	59
4.5.2	Modelo Terapêutico	60
4.6	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	61
4.7	DETERMINAÇÃO DO GANHO DE PESO DO ANIMAL (%).....	61
4.8	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO E PESO DO CÓLON.....	61
4.9	AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR ESCORE CLÍNICO E MACROSCÓPICO NO CÓLON	61
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	62

4.11 BURST OXIDATIVO DE POLIMORFONUCLEARES SANGUÍNEOS	63
4.12 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES DO SANGUE.....	65
4.13 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NO PLASMA	66
4.14 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NO CÓLON	66
4.15 FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ , LINFÓCITOS T CD8 ⁺ E MONÓCITOS CD14 ⁺	67
4.16 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO DO CÓLON	69
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5 RESULTADOS.....	71
5.1 TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA (TSC)	71
5.2 MODELO PROFILÁTICO.....	72
5.2.1 Curva de sobrevida	72
5.2.2 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase	72
5.2.3 Avaliação dos índices clínicos- modelo profilático	74
5.2.4 Burst oxidativo de neutrófilos- modelo profilático.....	77
5.2.5 Contagem do número total de leucócitos circulantes.....	78
5.2.6 Contagem diferencial de leucócitos (%) circulantes no sangue periférico	78
5.2.7 Fenotipagem dos linfócitos CD4 ⁺ / CD8 ⁺ e monócitos CD14 ⁺ circulantes.....	80
5.2.8 Quantificação dos níveis circulantes de citocinas	81
5.2.9 Quantificação de citocinas do cólon proximal - modelo profilático	83
5.2.10 Quantificação de citocinas do cólon distal - modelo profilático	85
5.2.11 Escore histológico - modelo profilático.....	87
5.2.12 Caracterização histopatológica do cólon- modelo profilático.....	87
5.3 MODELO TERAPÊUTICO	92
5.3.1 Curva de sobrevida	92
5.3.2 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase.....	92
5.3.3 Avaliação dos índices clínicos- modelo terapêutico.....	94

5.3.4	Burst oxidativo de neutrófilos- modelo terapêutico.....	97
5.3.5	Contagem do número total de leucócitos circulantes do sangue.....	97
5.3.6	Contagem da porcentagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos circulantes do sangue.....	98
5.3.7	Fenotipagem dos linfócitos CD4 ⁺ / CD8 ⁺ e monócitos CD14 ⁺	99
5.3.8	Quantificação dos níveis de citocinas no cólon proximal- modelo terapêutico	101
5.3.9	Quantificação dos níveis de citocinas no cólon distal- modelo terapêutico	102
5.3.10	Escore histológico - modelo terapêutico	104
5.3.11	Caracterização histopatológica do cólon	105
6	DISCUSSÃO.....	108
7	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	130

1 INTRODUÇÃO

As Doenças inflamatórias do intestino (DII) compreendem duas classes: Retocolite ulcerativa ou Colite Ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC). DII é uma doença inflamatória crônica recorrente, de etiologia sob investigação, mas envolve uma reação imune inadvertida para o intestino, desencadeada por fatores intrínsecos (SATSANGI et al., 1998; XAVIER; PODOLSKY, 2007; KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010) e fatores ambientais que incluem a microbiota (RAMPTON, 2000; PODOLSKY, 2002; NG et al., 2013). A prevalência de DII permanece em ascensão nos EUA, norte da Europa e começa a aumentar nos países do Oriente e do hemisfério sul e a maior parte do mundo em desenvolvimento (DE SCHEPPER et al., 2008; PERSE; CERAR, 2012). Registros emergentes da DII estão associados com o aumento de hábitos culturais das sociedades ocidentais em países como a China, Coreia do Sul, Índia, Líbano, Irã, Tailândia e norte da África, embora dados precisos destas áreas não estivessem disponíveis (NG et al., 2013).

Os modelos murino de colite intensificaram a identificação das funções do sistema imunitário da mucosa que cooperam para manter a homeostase intestinal, que incluem a presença de uma barreira epitelial intacta, o desenvolvimento de respostas imunes inatas eficientes, a manutenção de um equilíbrio delicado entre respostas das células T efetoras e reguladoras, bem como o estabelecimento de inflamação fisiológica (VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003; STURM; DE SOUZA; FIOCCHI, 2008). Apesar da variedade de modelos animais que imitam diferentes aspectos de DII humana, a probabilidade de tradução de estudos com animais de intervenção em uso clínico continua a ser bastante limitado (VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003).

A colite induzida em camundongos por Dextrano Sulfato de Sódio (DSS-colite) é um modelo experimental simples (PERSE; CERAR, 2012) que pode ser utilizado por reproduzir DII aguda, crônica recorrente dependente da frequência e número de ciclos de tratamento por DSS (OKAYASU et al., 1990). Várias características histopatológicas da DII, incluindo algumas de etiologia ainda desconhecida, como a displasia em CU, ocorre espontaneamente na fase crônica da colite- DSS (COOPER et al., 1993). Danos epiteliais do cólon (DIELEMAN et al., 1994) disbiose da microbiota luminal (YAMADA; OHKUSA; OKAYASU, 1992) e ativação de macrófagos residentes e infiltrados (OHKUSA et al., 1995)

são alguns mecanismos propostos subjacentes ao dano tecidual por colite- DSS que pode recapitular a doença que ocorre naturalmente (MAHLER et al., 1998). Dados de estudos por DSS empregam drogas potencialmente terapêuticas que demonstram que a colite-DSS pode ser reproduzida com sucesso por apresentar características discretas da doença humana, ajudando na conversão de dados de camundongos para doenças humanas (MELGAR et al., 2008).

Os estudos clínicos e experimentais indicam uma exacerbação da inflamação intestinal, por condições emocionais e psiquiátricas, como a depressão (GHIA; BLENNERHASSETT; COLLINS, 2008), o que pode contribuir para o desenvolvimento e recorrência da DII (GRAFF; WALKER; BERNSTEIN, 2009). Outros estudos afirmam que a depressão é um epifenômeno marginalmente associado à depressão e seu papel na recorrência é controverso (VARGHESE et al., 2006; GHIA; BLENNERHASSETT; COLLINS, 2008). Enquanto alguns estudos apontam para uma alta influência da depressão sobre o índice de atividade da doença (HELZER et al., 1984; KURINA et al., 2001; GRAFF; WALKER; BERNSTEIN, 2009), outros relatos apontam como sendo secundária a atividade da doença (KURINA et al., 2001; MARDINI; KIP; WILSON, 2004).

Na direção oposta, mas complementar, várias hipóteses implicam o sistema imunológico sobre a etiologia da depressão. Teorias como a imuno-inflamação, citocinérgica e macrofágica como um fenômeno psiconeuroimune (SMITH, 1991). A base para esta hipótese é consistente com um aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (LICINIO; WONG, 1999) que frequentemente levam a depressão, como alterações do comportamento (ANISMAN; MERALI, 2003; CAPURON; DANTZER, 2003). Portanto, a literatura aponta uma interferência entre a inflamação e as respostas imunes à emoção e depressão por meio de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ANISMAN; MERALI, 2003; CAPURON; DANTZER, 2003; DOWLATI et al., 2010). Na colite ulcerativa, o aumento da secreção de citocinas inflamatórias é considerado chave na progressão desta doença (SAILOR, 1997). A secreção de citocinas é ativamente modulada pelo sistema nervoso autônomo (SNA) (MATSUNAGA et al., 2001).

Os antidepressivos em pacientes com DII visam ajudá-los a lidar com os seus problemas emocionais e melhorar sua qualidade de vida, além de que a terapia antidepressiva pode influenciar o curso da DII. Os relatórios mostraram que estas drogas equilibraram a desregulação de respostas imunitárias em DII, levando a um prognóstico mais positivo da doença (MIKOCKA-WALUS et al., 2012). A amitriptilina (AMT) é um antidepressivo tricíclico amplamente utilizado como terapia de apoio para os pacientes que

sofrem de DII ou de outros distúrbios gastrointestinais (QUARTERO et al., 2005; AVILA; BOTTINO, 2006). Prescrever amitriptilina, nesses casos, é, supostamente, devido a sua eficácia nos tratamentos psicológicos (SUSSMAN; STAHL, 1996; RAJAGOPALAN; KURIAN; JOHN, 1998; GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2006) e sintomas somáticos associados à DII (MIKOCKA-WALUS et al., 2006).

Neuroimunomodulação é o estudo sobre interações bidirecionais entre os sistemas neuroendócrino e imunológico (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). A evidência clínica e de dados experimentais suportam que a depressão está associada à inflamação e antidepressivos são eficazes na modulação não só os aspectos emocionais de DII, mas também na própria inflamação. Vários modelos apontam para a relevância das interações neuroimunoendócrinas na doença. Neste estudo focamos em interações neuroimunes no intestino sobre o curso de uma doença inflamatória crônica possibilitando novas possibilidades para combinar a terapia focada no dano tecidual e bem-estar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação estudam as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas e os processos imunes (FELTEN; OLSCHOWKA, 1987; BLALOCK, 1989; JIANG; LU; LIU, 1998; ADER, 2000; DANTZER, 2004), ou seja, é o ramo da ciência que estuda o relacionamento direto e bidirecional do Sistema Nervoso com os vários componentes do Sistema Imunológico (SI) (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). A literatura evidenciou que a comunicação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune compartilha de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos comuns (BLALOCK, 1984; OVADIA; LUBETZKI-KORN; ABRAMSKY, 1987; LIGNON; BERNAD; MARTINEZ, 1991; CARR, 1992).

Na história antiga, o homem já estava condicionado a raciocinar como o estudo de neuroimunomodulação interagiria como a ciência, pois Aristóteles, já afirmava que a “psique” (alma) e o corpo reagiam complementando um com outro. Galeno, em 200 a.C., já descrevia serem mulheres “melancólicas” mais suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias mamárias que mulheres “sanguíneas” (DUNN; BROWN; LOVE, 1995).

Muitos grupos de pesquisa, nas últimas décadas, desenvolveram interesse para pesquisar essa interação entre o SI e o SNC, o que resultou na criação de uma grande área conhecida como Neuroimunomodulação (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Apesar dos inúmeros relatos da existência das relações entre o SNC e o SI, o entendimento das bases biológicas dessas interações está cada vez mais ciente nos dias de hoje. As relações neuroimunes não devem ser desprezadas ou subestimadas (MAESTRONI, 2004). De fato, veio à tona a percepção de que esses sistemas são partes de uma rede de controle muito mais ampla (ADER, 2000).

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imune foi explicada por Hans Seyle. Um artigo que se tornou um marco memorável no do estudo do

estresse. O trabalho de Selye construiu a base para o estudo dos efeitos do estresse e seus hormônios associados sobre a função do cérebro, comportamento e imunidade, crucial para a criação do estudo da neuroimunomodulação (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Devido à investigação de Selye et al. (1956), foi exposto que o hipotálamo e a glândula pituitária desempenham um papel crucial ao controlar a liberação de hormônios do estresse, especialmente os glicocorticóides, o que não só ajudam o organismo para se adaptar a estressores externos e internos, mas também para modular a função imune (LEONARD, 2001). Posteriormente, foi demonstrado que as citocinas e produtos de secreção relacionados de células do sistema imunológico, podem se comunicar com o endócrino e do sistema nervoso central, para modular as suas funções (BESEDOVSKY; DEL, 1996). Assim, os sistemas neuroimune são funcionalmente ligados para fornecer uma coordenada resposta a estressores externos e internos.

Nos mecanismos de interação neuroimune, destaca-se a ligação via sistema nervoso simpático periférico e central e, assim, fornecem um mecanismo pelo qual o sistema nervoso pode afetar diretamente a atividade imune por ativação de receptores adrenérgicos que se encontram em células do sistema imunológico. A ativação do SNS (Sistema Nervoso Simpático) pode ocorrer durante a clássica resposta “luta ou fuga” (STODDARD et al., 1986) e os resultados na liberação de catecolaminas da medula adrenal e terminais nervosos simpáticos. Wrona (2006) cita vários trabalhos em sua revisão que destaca que os efeitos das catecolaminas são mediados através de receptores adrenérgicos e resultado numa ampla gama de alterações fisiológicas que melhor servem a um animal em face do perigo iminente. No entanto, os linfócitos e outras células do sistema imune também expressam adrenoceptores (FUCHS; ALBRIGHT; ALBRIGHT, 1986; MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; TAYEBATI et al., 2000; DONG et al., 2003) e pode, portanto, ser influenciado por catecolaminas circulantes. A neuroimunomodulação surgiu para desvendar as interações entre esses sistemas (ADER; COHEN, 1991; SONG; LEONARD, 2000).

Os corticosteroides e as catecolaminas são capazes de alterar o padrão de citocinas Th1/Th2 com um direcionamento para o perfil de Th2, pois alguns estressores podem induzir uma supressão de citocinas de perfil Th1 ou aumento da síntese das citocinas de perfil Th2 (SALICRÚ; SAMS; MARSHALL, 2007). No trabalho de Portela et al. (2001), os ratos estressados por choque nas patas e imunizados com ovoalbumina (OVA) apresentaram edema pulmonar mais intenso e um aumento no número de leucócitos no lavado broncoalveolar quando comparados a animais não estressados. Neste sentido o SNC

regula a atividade do SI por: 1- Aumento da produção de glicocorticoides com direcionamento da resposta imune para Th2 com consequente aumento da resposta humoral e 2- resposta do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) com a liberação de catecolaminas (Adrenalina e Noradrenalina) (SANDERS, 2006).

As integrações de modelos biológicos e psicológicos vêm se tornando cada vez mais importante para a neurologia (BRASIL NETO, 2001; ALVES et al., 2006). Os interessados em exemplos de análises experimentais que abordam interação psiconeuroimunes, podem ser encontrados nos trabalhos de: Rettori (2007); Del Rey e Besedovsky (2008); Lucin e Wyss-Coray (2009); O'Connor, Johnson e Freund (2010); Costa- Pinto e Palermo-Neto (2010); Nasyrova et al. (2011) e Ellsworth-Bowers e Corwin (2012).

Mais especificamente, a interação ocorre através de hormônios hipotalâmicos e pituitários, como hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e glicocorticoide (GC); também, acontece através da inervação simpática e parassimpática dos órgãos linfoides e células imunes (WRONA, 2006). Assim, após um estímulo estressor como, choque nas patas (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002), animais submetidos a um estresse físico ou psicológico apresentavam elevados níveis de corticosterona, diminuição da atividade de macrófagos peritoneais e aumento do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (PALERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010), confronto sociais (SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006); ou psicofármacos capazes de alterar a função imune, tais como, anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004), picrotoxina (STANKEVICIUS et al., 2008) e benzodiazepínicos (DE PAULA et al., 2009; LAZZARINI et al., 2010; SAKAI et al., 2010; FERRAZ- DE- PAULA et al., 2014) os GC liberados do córtex da adrenal exercem potentes efeitos nas esferas imune/inflamatória. Calefi et al. (2014) estudaram o estresse térmico na inflamação intestinal de frangos através de uma redução na migração de heterófilos para a mucosa intestinal, o qual por sua vez teria reduzido a danos no tecido durante a inflamação, evitando assim o desenvolvimento de uma forma mais grave de Enterite necrótica.

Ribeiro et al. (2015) analisaram os efeitos do tratamento terapêutico com Canabidiol- *Cannabis sativa* (CBD) em camundongos submetidos ao modelo murino de injúria pulmonar aguda pela instilação intra- nasal de lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados mostraram que o CBD diminui a resistência pulmonar total, migração de leucócitos para os

pulmões, a atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar, a concentração de proteína e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e quimiocinas (MCP-1 e MIP- 2) no sobrenadante do lavado broncoalveolar.

Cada vez mais um crescente corpo de evidências tem acumulado sobre a natureza e funções de neurotransmissores centrais e o sistema imunitário. É também evidente que o sistema imune pode ser fundamentalmente alterado em pessoas que sofrem de transtornos psiquiátricos, como depressão, esquizofrenia e transtornos de ansiedade (LEONARD, 2001). Da mesma forma, anormalidades na função imunológica pode diretamente causar doenças autoimunes como a miastenia gravis e esclerose múltipla (HICKIE; LLOYD, 1995). Em nossos laboratórios, Zager et al. (2015) estudou o impacto da exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação tardia sobre a resposta neuroinflamatória em culturas mistas gliais primárias e na progressão da encefalomielite autoimune experimental na prole. Os resultados indicaram que a ativação imune materna durante a gestação tardia predispôs a prole ao aumento da neuroinflamação e potencializou a resposta autoimune exacerbando a manifestação clínica da encefalomielite autoimune experimental.

Está se tornando, assim, cada vez mais claro que as interações entre estes sistemas (sistema endócrino imunológico, nervoso central e periférico) são de vital importância para o entendimento da patogênese de muitos distúrbios psiquiátricos. Machado (2013) relata que neste contexto, sabe-se que o estresse gerado pelo ato de acompanhar pacientes com enfermidades crônicas tem sido associado em humanos a alterações de imunidade inata e humoral, queda de resistência orgânica a infecções e aparecimento de sintomas psiquiátricos, como ansiedade e depressão (ALVES et al., 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; ALVES; VISMARI; PALERMO-NETO, 2007; ALPI et al., 2008; FREDMAN et al., 2010; JIWA et al., 2010).

No início da década de 1990, Smith introduziu a teoria macrofágica da depressão, da qual postulava que a secreção excessiva da citocina IL-1 e IFN- γ (interferon gama) produziria a secreção desordenada de Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), prolactina e cortisol além de provocar um humor depressivo (SMITH, 1991).

Muller et al. (1993) descreveram pela primeira vez a relação celular de células CD4/CD8 na depressão. Marcadores quantitativos da função imune, tais como leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, basófilo, eosinófilos, granulócitos e células CD4/CD8, são frequentemente afetados na depressão, mas os resultados têm sido parcialmente inconsistentes (HERBERT; COHEN, 1993). A fagocitose aparece prejudicada

ou reduzida (SCHLATTER; ORTUÑO; CERVERA-ENGUIX, 2004), assim como a citotoxicidade de células natural killer (NK) (ZORRILLA et al., 2001). Marcadores imunes como a concentração plasmática de proteínas de fase aguda haptoglobina, α_1 -antitripsina e IgM, são todos consistentemente elevados em pacientes deprimidos, indicando que esta doença está associada com ativação inflamatória semelhante a uma resposta na fase aguda (ZORRILLA et al., 2001). As principais citocinas inflamatórias, IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α) estariam elevadas em estados depressivos ou em resposta ao estresse psicológico (O'BRIEN; SCOTT; DINAN, 2004). Além disso, há outros mecanismos pelos quais os antidepressivos podem, indiretamente, atenuar os efeitos de citocinas pró-inflamatórias que estariam com os níveis aumentados na depressão. Estes mecanismos incluem alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) estar relacionadas às mudanças na capacidade dos glicocorticoides circulantes em exercer seu feedback negativo (HOLSBOER; BARDEN, 1996), ou seja, estas citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) aumentariam as respostas inflamatórias ao interromper a função dos receptores de glicocorticóides (JANSSEN et al., 2010). Se esta também ocorre em células imunes, especula-se que a função imunológica seria suprimida por uma elevação na concentração de glucocorticóides. Além disso, tanto a noradrenalina e serotonina atuam como imunomoduladores, de modo que o aumento funcional nas atividades noradrenérgica e serotoninérgicas por tratamentos com antidepressivos poderiam contribuir para a normalização das funções imunológicas (DELEPLANQUE; NEVEU, 1995).

Em um estudo utilizando animais knockout IL-6, mostrou-se que a liberação, na periferia e/ou no SNC, de IL-1 e IL-6 induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) têm papel central no aparecimento do comportamento doentio (BLUTHE et al., 2000). Em nossos laboratórios, utilizando-se de modelos experimentais de reação alérgica intestinal foi demonstrado um aumento de ansiedade observada em análises de comportamento em camundongos (campo aberto e no labirinto em cruz elevado) e aumento na expressão de c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo central da amígdala (BASSO et al., 2003). Adicionalmente, em um modelo de alergia pulmonar mostrou-se que animais que haviam sido previamente imunizados com OVA, mostraram ainda um aumento da atividade de células do núcleo ventromedial do hipotálamo e da região basolateral da amígdala (COSTA-PINTO et al., 2005). Hamasato et al. (2014) analisaram os efeitos da convivência com um animal portador de tumor de Ehrlich em ovalbumina (OVA) induzida por resposta inflamatória do pulmão em camundongos que resultou em: (1) um aumento do número de neutrófilos e eosinófilos no lavado bronco-

alveolar (BAL); (2) uma diminuição na contagem de células de medula óssea, (3) aumento dos níveis de IL-4 e IL-5 e níveis diminuídos de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante do BAL, (5) um aumento dos níveis de IgG1-OVA, diminuição dos níveis de IgG2a-OVA e nenhuma alteração na IgE específica de OVA-no sangue periférico, (6) aumento da expressão de L-selectina nos granulócitos do BAL, (7) diminuição da reatividade de metacolina traqueal, in vitro (8), não há alterações nos níveis de corticosterona no plasma e (9) aumento dos níveis de noradrenalina plasmática. Estes resultados sugerem que exacerbação da resposta inflamatória alérgica pulmonar em camundongos companheiro do parceiro doente (CPD) é uma consequência do estresse psicológico induzido pela convivência forçada com o parceiro doente. Forte envolvimento do sistema nervoso simpático (SNS) através de adrenalina e a libertação de noradrenalina e uma mudança do perfil de citocinas Th1/ Th2 para uma resposta Th2 foram considerados os mecanismos subjacentes ao recrutamento celular para as vias aéreas do animal. De fato, veio à tona a percepção de que esses sistemas são partes de uma rede de controle muito mais ampla (ADER, 2000).

Resultados de nosso grupo parecem corroborar o caráter motivacional e adaptativo das alterações comportamentais em animais doentes através do trabalho de pesquisa de Cohn, Kinoshita e Palermo-Neto (2012) que investigaram as relações entre o comportamento doentio, tratamentos com antidepressivos, e comportamento de domínio social. Para isso foi disponibilizado indivíduos dominantes de duplas de camundongos Swiss machos com tratados com o lipopolissacarídeo (LPS) para induzir a desestabilização hierarquia social. Dois grupos foram tratados com antidepressivos imipramina e fluoxetina e antes da administração de LPS. Nesses grupos, o tratamento com antidepressivos impediu a ocorrência de desestabilização social (COHN; KINOSHITA; PALERMO-NETO, 2012).

Vismari et al. (2012) submeteu ratos à edema de pata por carragenina e peritonite aguda. Com o uso de um antidepressivo tricíclico, amitriptilina, teve efeito anti-inflamatório na diminuição da produção de óxido nítrico e na diminuição dos níveis séricos de IL-1 β / TNF- α , efetivando um efeito neuroimune positivo.

2.2 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)

Doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença multifatorial complexa, recidivante e de etiologia desconhecida (BOISMENU; CHEN, 2000; KARLSSON; MICHAËLSSON, 2005; MUDTER; NEURATH, 2007; MELGAR; LI et al., 2014). Duas desordens distintas, Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU) têm sido identificadas, sendo cada uma das quais sendo um grupo heterogêneo de doença (GEBOES; COLLINS, 1998; SOLOMON et al., 2010; GHIA et al., 2011; RAHIMI.; SHIRI; RAZMI, 2012; SCHOULTZ et al., 2013).

Atualmente, são consideradas três teorias da etiologia da DII, segundo Sartor (2006), as etiologias da DII são baseadas em:

- reação a uma infecção intestinal persistente;
- existência de um defeito na barreira da mucosa para antígenos luminais e;
- resposta imunitária desregulada do hospedeiro a antígenos ubíquos.

Em cada uma dessas teorias, seja por bactérias patogênicas ou residentes no lúmen, estimulariam constantemente a mucosa e sistema imune para perpetuar a cascata da inflamação, pois a cronicidade da inflamação resulta de uma interação do estímulo persistente de genes antimicrobiano com a suscetibilidade genética do hospedeiro a determinados fatores que determinam a resposta imune do indivíduo ou da função da barreira na mucosa (SARTOR, 2006). Quando ativado durante o processo inflamatório inicial, macrófagos e linfócitos T segregam uma série de citocinas, que recrutam outros tipos de células inflamatórias, para assim continuar o processo inflamatório (SARTOR, 2006).

Ainda na etiologia da DII têm sido propostas as infecções, os fatores ambientais (urbanização das sociedades, associada a mudanças na dieta, uso de antibióticos, o estado de higiene, exposições microbianas e poluição), a hereditariedade (aproximadamente 10- 20% dos pacientes com CU ou DC predispõe os membros da família, com maior risco entre os parentes de primeiro grau e entre gêmeos idênticos (GEBOES; COLLINS, 1998; SARTOR, 2006; SOLOMON et al., 2010). No entanto nenhum dos fatores foi estabelecido

como definitivo no desenvolvimento da DII (GEBUES; COLLINS, 1998; KURINA et al., 2001; SOLOMON et al., 2010; NG et al., 2013).

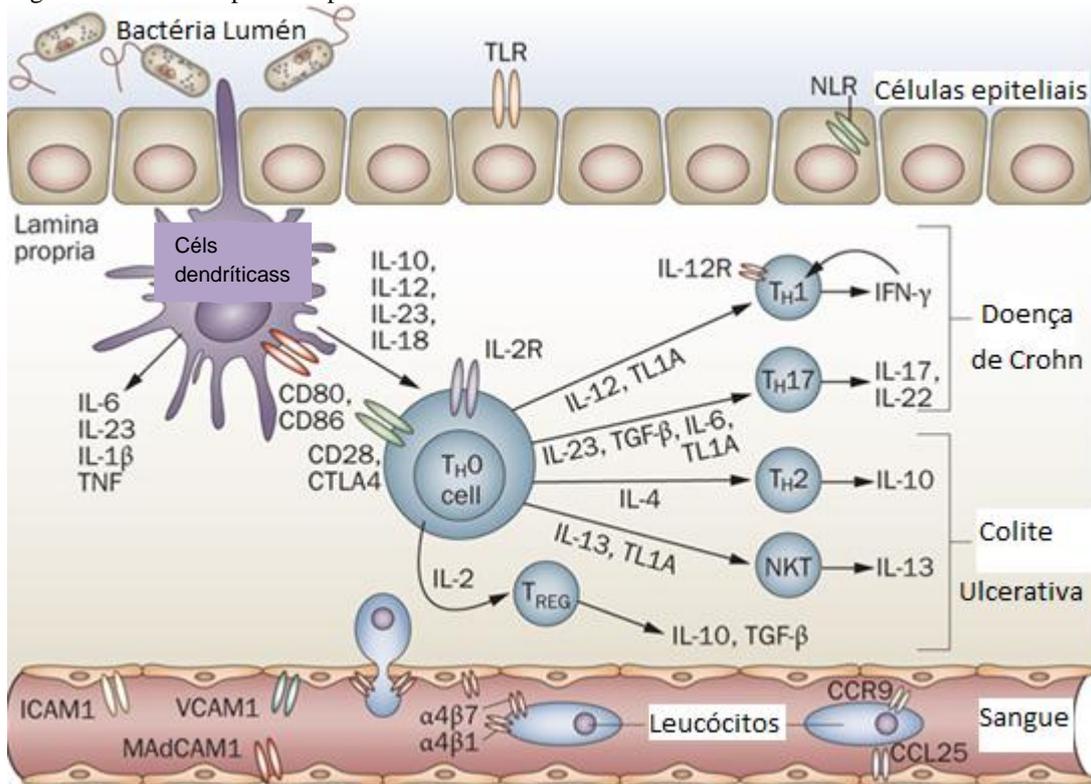
Os sinais clínicos dos pacientes com DII são muitas vezes acompanhados pela dor (por exemplo, em sintomas de artropatia periférica, sacroileíte, ou espondilite anquilosante). De Schepper et al. (2008) sugeriram que a diarreia na DII é causada principalmente por um aumento na secreção do cólon e/ ou uma diminuição da reabsorção, e que a diminuição da contratilidade permite a passagem acelerada do aumento dos conteúdos intraluminais. No entanto, tais sintomas não estão limitados a apenas ao trato gastrointestinal, ocorrem manifestações extra-intestinais relacionados com a gravidade da colite, incluindo artrite, espondilite anquilosante, colangite esclerosante, uveíte, irite, pioderma gangrenoso e eritema nodoso (PITHADIA; JAIN, 2011), sacroilite, espondilite anquilosante, e colangite esclerosante primária (GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000; CARTER; LOBO; TRAVIS, 2004). Tudo pode ocorrer de forma intermitente, com períodos de remissão e exacerbação sendo manifestado, por toda a vida do paciente. O impacto dos sintomas da DII pode afetar adversamente a qualidade de vida dos pacientes, afetando-lhes psicologicamente (depressão e ansiedade são significativamente mais comum em pessoas com afetadas pela DII (KURINA et al., 2001), socialmente (dificuldade com emprego, lazer, e relações conjugais), educacionalmente e vocacionalmente (FORTIN et al., 2007)). Assim, médicos não devem considerar apenas o impacto físico da DII, mas tratar as perturbações psicossociais nestes pacientes (GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000). O aumento da mortalidade associado a DII depende de comorbidades, tais como complicações cardiovasculares, renais e infecciosas (WINTHER et al., 2003).

DII tornou-se uma doença global. Estima-se que um a dois milhões de americanos sofrem de DII, esse número quase igualmente dividido entre os casos de CU e DC (BOISMENU; CHEN, 2000). Afeta até 500 pessoas por 100.000 em países ocidentais. Estudo clínico recente demonstrou taxas de remissão clínica para CU variando em torno de 11%- 90% (HOIE et al., 2007). A literatura nacional menciona aumento significativo da incidência de DII, porém o Brasil é considerado uma área de baixa prevalência de DII. Além disso, a DII não seria considerada de notificação compulsória, o que nos leva a pensar que as DII podem não estar sendo diagnosticadas (DE SOUZA; BELASCO; AGUILAR-NASCIMENTO 2008). O Ministério da Saúde brasileiro relatou sobre os estudos epidemiológicos no Brasil (maio/2014) confirmando a escassez de dados e, de modo geral, restritos a determinadas regiões do país: região Norte é a que apresenta menor taxa de

internações relacionadas à DII (1,16/100.000 habitantes), seguida pelas regiões Nordeste (2,17/100.000 habitantes), Sudeste (2,42/100.000 habitantes), Sul (3,07/100.000 habitantes) e Centro-Oeste (3,32/100.000 habitantes). Os tratamentos incluem fármacos anti-inflamatórios (mesalazina), imunossuppressores (prednisona), antibióticos, analgésicos, produtos biológicos (infliximabe, um anticorpo neutralizante anti-TNF- α), utilizados seletivamente dependendo da localização e da gravidade da doença e a tolerabilidade de efeito colaterais, tendo a cirurgia como uma última opção terapêutica (KOH et al., 2011; PITHADIA; JAIN, 2011). Em pacientes com CU cerca de 25 a 40% dos doentes irão eventualmente necessitar de colectomia (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002).

A inflamação intestinal (Figura1) é caracterizada por recrutamento de células ativadas da mucosa do sistema inato e adaptativo (KHAN et al., 2006). A DC e a CU possuem imunofenótipos distintos (BAMIAS; KAL TSA; LADAS, 2011). A DC é resposta do tipo T helper (Th) 1/Th17 e a CU é considerada resposta Th2 (BAMIAS; KAL TSA; LADAS, 2011; STROBER; FUSS, 2011). A figura 1 mostra as interações entre as células dendríticas (células apresentadoras de antígenos) e as células T naive (Th0). A ativação de células Th0 e sua subsequente diferenciação de Th1, Th2 ou Th17, e células NK (natural Killer), que é influenciada por citocinas pró-inflamatórias específicas. As interações entre leucócitos em circulação e receptores em células endoteliais vasculares, que leva ao recrutamento de linfócitos para o intestino delgado (MELMED; TARGAN, 2010).

Figura 1 - Alvos terapêuticos para DII



Fonte: (MELMED; TARGAN, 2010 adaptado por NAMAZU, 2015).

A RCU (Retocolite ulcerativa) ou Colite ulcerativa/ ulcerosa (CU) foi descrita pela primeira vez na Grécia durante o século IV A.C. quando Hipócrates, médico da cidade de Cos, descreveu em seu livro, *Corpus Hippocraticum Peri Syriggon*, um tipo de diarreia crônica associada a evacuações sanguinolentas e ulcerações no cólon com características diferentes de outros tipos de diarreias conhecidas na época, constituindo uma enfermidade clínica que se assemelhava à “retocolite ulcerativa” (QUILICI, 2002). Porém, foi descrita pela primeira vez como entidade nosológica em 1859 por Samuel Wilks (WILKS, 1859). A distinção entre a CU e DC foi claramente estabelecida em 1960 (LOCKHART-MUMMERY, 1975).

Jiang et al. (2009) relatam que a colite ulcerativa afeta 0,2% da população e é caracterizada por inflamação crônica da mucosa do cólon levando a uma depleção de células caliciformes, a interrupção da morfologia da cripta, ulceração, e um aumento do risco de carcinoma (pacientes com colite ulcerosa têm um maior risco de desenvolver câncer colorretal), que é a terceira doença maligna mais comum em seres humanos (SALEH; TRINCHIERI, 2011). A inflamação geralmente estende proximalmente de uma forma contínua a partir do reto, e uma extensa ulceração superficial é típica (COTRAN; KUMAR;

COLLINS, 1999; GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000), inflamação é normalmente confinada à mucosa (ABRAHAM; CHO, 2009). Os macrófagos contribuem para a patogênese da DII, com uma grande infiltração de células na mucosa e proporcionam uma fonte importante de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α e radicais de oxigênio (RUGTVEIT et al., 1995, 1997). A colite ulcerativa leva a uma elevação de vários marcadores inflamatórios como a interleucina-6 (IL-6), TNF- α , NF- κ B (fator nuclear kappa B) e Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (OKADA, et al, 2006).

As complicações da CU diferem da Doença de Crohn devido ao aumento do risco de peritonite, megacólon tóxico e uma maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasias intestinais (CUONG; KATSIKEROS; ABIMOSLEH, 2012). As características histopatológicas da CU incluem presença de infiltrados de neutrófilos que formam abscessos na cripta intestinal (XAVIER; PODOLSKY, 2007). Os pacientes de CU quase sempre apresentam sangramento retal acompanhado de fortes dores abdominais e febre. A queixa frequente envolve tenesmo devido ao envolvimento retal (GRIFFIN; MINER, 1996).

A apendicectomia parece ter um efeito protetor contra a colite, apesar de ainda não ser conhecido o mecanismo pelo qual ocorre tal efeito (PRAVDA, 2005) e o tabagismo tem resposta controversas nas duas doenças (a nicotina pode melhorar a colite apenas em pacientes de CU (COSNES, 2004)).

O primeiro caso documentado da DC foi descrito por Fenwick¹ (1889 apud KIRSNER; ELCHLEPP, 1957, p. 102-119). No entanto, em 1932, o conhecimento da DII ampliou-se através de detalhes eloquentes sobre os achados clínicos e patológicos desta doença inflamatória em adultos jovens (CROHN; GINZ-BURG; OPPENHEIMER, 1932).

A doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação segmentar transmural, geralmente atingindo o íleo terminal, mas ocorreram potencialmente em qualquer lugar ao longo do trato digestivo da boca ao ânus. As manifestações clínicas da DC também incluem fissuras perianais, abscessos, enteroentérica ou enterovesical fístulas, e hematoquezia se o envolvimento do cólon é presente (BROWN, 1999).

Os pacientes com DII apresentam clinicamente vários problemas desafiadores para os médicos. Apesar dos avanços recentes no tratamento, existe ainda uma

¹ FENWICK, S. **Clinical lectures on some obscure diseases of the abdomen**. London: Churchill, 1889.

necessidade para uma terapia segura e com um início rápido, e aumento da capacidade de manter a remissão em longo prazo (PERSE; CERAR, 2012).

2.3 MODELO DE COLITE

Boismenu e Chen (2000) relatam que o progresso na compreensão do(s) mecanismo(s) que conduz a DII foi dificultado pelo número limitado de modelos experimentais de colite disponíveis até a década de 1980. Contudo, nas últimas décadas, um aumento de modelos de colite desenvolvido, principalmente em camundongos, estaria disponível para testar as várias hipóteses relativas à etiopatogênese da DII (ELSON et al., 1995; PERSE; CERAR, 2012). Como poderiam ser esperados, estes sistemas de modelo levariam a uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na DII (BOISMERU; CHEN, 2000), embora não representa a complexidade da doença humana, eles são indispensáveis e valiosas ferramentas que proporcionam uma ampla gama de opções para investigar o envolvimento de vários fatores para a patogênese da DII, investigação da etiologia (fatores ambientais, do papel imune específico e fatores genéticos) e avaliar diferentes opções terapêuticas (o modelo de colite-DSS responde a norma médicas de medidas terapêuticas humanas da DII). Há também semelhanças patogênicas na resposta das citocinas deste modelo para DII humana, que é predominantemente tipo Th1 (SOLOMON et al., 2010; PERSE; CERAR, 2012). Cuong, Katsikeros e Abimosleh (2012) destacaram quatro tipos de modelos experimentais de colite; (1) modelos de colite espontâneos (camundongos SAMP1/Yit), modelos de colite induzidas com sistema imunológico normal (Dextran Sulfato Sodium (DSS), ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), carragenina e oxazolona), modelos de transferência adotiva (reconstituição de Células T CD41⁺ em camundongos imunodeficientes), e modelos geneticamente modificados (camundongos knockout IL-10 e IL-12).

O modelo experimental ideal da DII deve reproduzir a DII humana com características bem próximas à doença. Um bom modelo de colite experimental pode ser obtido através do uso do dextrano sulfato de sódio (DSS) que reproduz uma colite com semelhanças à DII humana na etiologia, patogenia e resposta terapêutica. O modelo de colite induzida por DSS é barato, de fácil indução, o DSS é uma molécula estável a temperatura

ambiente (o que facilita seu fornecimento por meio da água de beber), sendo possível de reproduzir dois tipos de colite: aguda ou crônica (SOLOMON et al., 2010).

O primeiro estudo do DSS como modelo experimental de colite data de 1985, quando Ohkusa relatou um modelo de colite aguda em hamsters a partir do uso laboratorial de DSS com um peso molecular de 54 kDa (OHKUSA, 1985). Eles relataram que as lesões mostraram erosão, ulceração, infiltração de células inflamatórias, abscessos das criptas e hiperplasia epitélio glandular. O modelo foi posteriormente adaptado para camundongos (OKAYASU et al. 1990) e um modelo crônico foi desenvolvido em hamsters (YAMADA; OHKUSA; OKAYASU, 1992). Koyama et al. (1992) administraram oralmente DSS a ratos, com um peso molecular de 5 kDa, induzindo erosão e ulceração no intestino grosso e reto, concluindo que esse modelo se assemelhava mais à CU.

O DSS é um derivado polianiónico do dextrano produzido por esterificação com Ácido clorossulfúrico (RICKETTS, 1952; ISHIOKA et al. 1987). O teor de enxofre é cerca de 17%, o que corresponde a cerca de dois grupos de sulfato por resíduo glicosil da molécula de dextrano. O dextrano é um polímero complexo de glicose sintetizado por certas bactérias, mais comumente *Leuconostoc spp.* e *Streptococcus spp.*, a partir da sacarose (BAILEY; BOURNE, 1961). É composto por cadeias lineares e ramificadas, com um peso molecular altamente variável, de 5.000 a 1,4 milhão Da (desvantagem potencial deste modelo uma vez que o PM do DSS é um fator importante que determina o local e a gravidade da inflamação (AXELSSON et al. 1996a)). É um pó branco, mantido em temperatura ambiente, e altamente solúvel em água (100 mg / mL) (SOLOMON et al., 2010). As principais vias de excreção de DSS são a urina e fezes (FOSTER et al., 1990). O DSS é resistente à degradação pela microbiota intestinal ou os efeitos de diferentes valores de pH (4,0-7,5) e incubação em anaerobiose (KITAJIMA; MORIMOTO; SAGARA, 2002).

Perse e Cerar (2012) relatam que o modelo de colite induzido por DSS é atualmente um dos mais utilizados em animais de laboratório (ratos, camundongos, cobaias e hamsters).

A susceptibilidade ao DSS varia com a espécie animal e linhagem. A cobaia é o mais suscetível à inflamação geralmente estabelecida em menos de 72 h (IWANAGA et al. 1994). Em camundongos, alguns modelos, tais como C3H/HeJ e C3H/HeJ Bir são altamente suscetíveis, enquanto o NON/LtJ ("Não-Obeso Não-diabético") mostrou-se bastante resistente ao DSS (SUNDBERG et al., 1994). Embora a inflamação aguda induzida

por DSS seja contínua, desde que persistido o estímulo, a sua gravidade varia, afetando mais o cólon direito e ceco em cobaias e hamsters (IWANAGA et al., 1994), enquanto que é mais grave no cólon esquerdo em camundongos BALB/c (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999), Sprague-Dawley (GAUDIO et al., 1999) e ratos Wistar (KULLMANN et al., 2001).

Segundo Solomon et al. (2010), a indução da colite-DSS é normalmente realizado pela sua adição na água de beber dos animais (ad libitum). Dependendo da concentração, duração e a frequência de administração de DSS, os animais podem desenvolver um modelo de colite aguda ou crônica (Quadro 1). A colite aguda é induzida usando concentrações relativamente elevadas de DSS administrados continuamente por períodos curtos, geralmente 4-14 dias. DSS é normalmente administrado numa gama de doses de 3-10% durante 7-10 dias para induzir uma inflamação aguda, dependendo a susceptibilidade da linhagem do camundongo ou o peso molecular de DSS (OKAYASU et al., 1990; MAHLER, et al., 1998; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000).

A colite crônica pode ser induzida pela administração contínua de uma baixa concentração de DSS, ou uma administração cíclica de doses relativamente altas de DSS. Okayasu et al. (1990), relataram que para induzir "cronicidade", DSS é normalmente administrada em três a cinco ciclos com um uma a duas semanas de descanso entre os ciclos do fornecimento do DSS. Melgar, Karlsson e Michaëlsson (2005) em seus estudos mostraram que um ciclo de DSS é suficiente para induzir a cronicidade em camundongos da linhagem C57BL/6. O mesmo ocorrendo em camundongos Swiss Webster (DIELEMAN et al., 1998). O modelo de colite crônica é caracterizado pela erosão e regeneração do epitélio intestinal, fibrose da mucosa e folículos linfoides proeminentes; displasia e adenocarcinoma também podem estar presentes (OKAYASU et al., 1990; BYLUND-FELLENIUS et al., 1994; COOPER et al., 2000). Modelos de adenocarcinoma podem ser induzidos pela coadministração de DSS e azoximetano (CLAPPER et al., 2007).

Quadro 1 -Modelos de colite por DSS

Animais	DSS	Período	Colite	Autores
BALB/ c	3- 10%	10 dias	Aguda	Okayasu et al. (1990)
Wistar	5%	6 dias	Aguda	Breider; Eppinger; Gough, 1997
Hamsters	1%	100 dias	Crônica	Yamada Ohkusa.; Okayasu (1992)
Wistar	1%	6 meses	Crônica	Chiba (1993)
Sprague- D	4%	6 dias/6 dias água	Crônica 3 ciclos	Gaudio et al. (1999)
BALB/ c	5%	1 sem/ 10 sem. água	Crônica 5 ciclos	Okayasu et al. (1990)
Swiss W	5%	1 sem/ 2 sem. água	Crônica 4 ciclos	Cooper et al. (2000)

Fonte: (SOLOMON et al., 2010, adaptado por NAMAZU, 2015).

Legenda: Ratos Sprague-Dawley: Sprague D.; semana: sem.; Swiss W: Swiss Wistar.

As manifestações clínicas de colite induzida por DSS nos animais são caracterizadas por diarreia aguada, melena, perda de peso, diminuição do apetite, diminuição dos movimentos, sangramento franco, piloereção, anemia e, eventualmente, óbito (GEIER et al., 2005). No modelo agudo de colite por DSS, o tratamento por dois dias resulta na presença de sangue e diarreia (KULLMANN et al.; 2001). Evidências de sinais de inflamação estabelecem-se entre 7-10 dias, e pode ocorrer uma colite recidivante quando o tratamento por DSS envolve ciclos e em um destes ciclos envolve sua retirada (MAHLER et al., 1998).

As alterações morfológicas da colite- DSS incluem processo inflamatório normalmente limitado ao cólon; as características macroscópicas incluem um cólon edematoso encurtado com áreas de hemorragia e ulceração. Histologicamente, a inflamação é

superficial, que afeta principalmente a mucosa, mas pode estender-se para a submucosa e camadas musculares. Caracteriza-se pelo aparecimento de úlceras superficiais, mucosa edematosa, perda de células caliciformes, distorção da cripta e abscessos. Ocorre infiltração maciça de células inflamatórias na mucosa e submucosa por neutrófilos, macrófagos e alguns linfócitos. A característica histológica primordial considerada é a perda de cripta seguida pelo seu encurtamento, ocorrendo em torno do dia 2 ou 3 de ingestão de DSS e de desenvolvimento anterior à inflamação (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999; COOPER et al., 2000).

O modelo colite- DSS fornece a característica marcante da inflamação ser no intestino grosso, enquanto o intestino delgado permanece sem alterações. Presumivelmente, a mucosa do cólon vai ser exposta a maior concentração de DSS, devido à reabsorção de água, que pode ser parte da explicação para este fenômeno. Um número de efeitos imunológicos do DSS e polissacarídeos similares foram relatados, como a ativação de linfócitos B que vão dar origem a uma diversidade de plasmócitos com consequente produção de anticorpos policlonais (BYLUND-FELLENIIUS et al., 1994).

O mecanismo exato da patogênese da colite- DSS não está elucidado. Um mecanismo possível poderia ser direcionado à alteração da permeabilidade intestinal e citotoxicidade direta. A alteração da permeabilidade intestinal ocorre por proteínas de oclusão, como zona ocludens-1 que foram diretamente reduzidas após o tratamento com DSS no primeiro dia, levando ao aumento da permeabilidade por 3 dias, precedendo a inflamação do cólon (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999; VENKATRAMAN et al., 2000; PORITZ et al., 2007), sugerindo que a injúria inicial é mais provável a nível de células epiteliais, com a inflamação desenvolvendo secundariamente (COOPER et al., 1993). Tem sido relatado que a colite induzida por DSS altera o complexo de junção, resultando na perda da função de barreira, facilitando assim o desenvolvimento do infiltrado inflamatório e desenvolvimento de inflamação intestinal induzida pela microbiota luminal (PORITZ, et al., 2007).

Outro mecanismo sugerido é uma citotoxicidade direta dependente da concentração de DSS na mucosa do cólon, (NI; CHEN; HOLLANDER, 1996). Isto resulta numa perda da função de barreira, que provavelmente resultaria em um aumento da captação de antígenos luminiais (bactérias e produtos bacterianos), bem como ativação das células do sistema imunológico da lâmina própria e a resposta inflamatória (SARTOR, 2008).

2.4 ANTIDEPRESSIVOS

A “Era da Psicofarmacologia” surgiu como uma ciência estabelecida produzindo importantes classes de agentes terapêuticos como os antidepressivos na década de 1950 (LIEBERMAN, 2003; LOPEZ-MUNOZ; ALAMO; CUENCA, 2009; BITTENCOURT; CAPONI; MALUF, 2013).

Os antidepressivos são altamente tolerados pelos pacientes com DII. Os relatórios mostram que estas drogas equilibram a desregulação das respostas imunitárias em DII, levando a um prognóstico mais positivo da doença (MIKOCKA-WALUS, et al., 2012).

Os medicamentos antidepressivos possuem diferente selectividade para o aumento da norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT) nas sinapses, diferindo uns dos outros no que diz respeito aos efeitos sedativos, propriedades anticolinérgicas e anti-histamínicas (potenciais bloqueadores do receptor histaminérgico H₂) (STAHL, 1997; NELSON, 1999; BALDESSARINI, 2006) e não está claro até que ponto estas diferenças farmacológicas afetam o seu potencial anti-inflamatório. O efeito anti-inflamatório de vários medicamentos antidepressivos permanece desconhecido e uma melhor compreensão do potencial anti-inflamatório destas drogas poderia fornecer orientações para a seleção destes medicamentos em situações tais como a associação de ansiedade ou distúrbios de depressão com processos inflamatórios (HAJHASHEMI et al., 2010). Além disso, a serotonina e noradrenalina liberadas a partir de linfócitos e monócitos (MARINO et al., 1999) exerceriam alguma propriedade imunomoduladora através da interação com receptores apresentadas em células do sistema imune (ELENKOV et al., 2000).

Desde a sua introdução há quase 20- 30 anos, o teste de suspensão da cauda (TSC) tornou-se um dos modelos mais utilizados para avaliar a atividade antidepressiva em roedores, da qual vários medicamentos antidepressivos ao reverter a imobilidade, promovem a ocorrência de comportamentos relacionados com a fuga (BORSINI; MELI, 1988; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). No TSC, a grande vantagem do seu uso, muitas vezes é que se pode complementar e convergir dados sobre o potencial antidepressivo de fármacos (PORSOLT, 2000; BAI et al., 2001; CONTI et al., 2002).

Cryan, Mombereau e Vassout (2005) consideraram o TSC como modelo de ação antidepressiva invés de modelo de depressão. No entanto, é difícil provocar a depressão aguda em animais e seres humanos, tornando-se claro que um número de intervenções estarem envolvidos na susceptibilidade ou indução de depressão em seres humanos induzem

um efeito de depressão semelhante (aumento de imobilidade) no TSC. Estas manipulações incluem uma predisposição genética (VAUGEOIS et al., 1996; EL YACOUBI et al., 2003), diabetes experimental (KAMEI et al, 2003; MIYATA; HIRANO; KAMEI, 2003) ou a ativação imunológica (YAMANO et al., 2000). Além disso, a retirada de psicoestimulantes, que é associada com o comportamento depressivo nos seres humanos, aumenta a imobilidade no TSC (CRYAN et al., 2003).

Os principais representantes do grupo dos (antidepressivos tricíclicos) ATCs são: a imipramina, a amitriptilina e a nortriptilina (RANG; DALE; RITTER, 1997; STAHL, 1998; MCKIM, 2003; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

A história dos ATCs data do ano de 1883, quando Heinrich August Bernthsen realizou no laboratório BASF (Badische Anilin und Sodafabriken)- Alemanha, modificações moleculares primordiais de fenotiazinas (substâncias com ação anti-histamínica, utilizadas inicialmente para tratar quadros alérgicos e que, entre outros efeitos, atuam no sistema nervoso central a partir do corante azul de metileno que serviria como base para a síntese do iminodibenzil pelos pesquisadores J. Thiele e O. Holzinger, em 1889, da qual esse produto seria inicialmente utilizado na indústria de roupas e “esquecido” nos “porões” da indústria química suíça JR Geigy G. (THIELE; HOLZINGER, 1889; BITTENCOURT; CAPONI; MALUF, 2013).

Meio século mais tarde, o diretor da seção farmacológica da empresa suíça Geigy, Robert Domenjoz, incentivou a empresa Paris Rhône- Poulenc, em estreita colaboração com o Institut Pasteur a pesquisar sobre os compostos fenotiazínicos na busca de medicamentos sedativos (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO; CUENCA, 2009). Em 1948, os químicos da Geigy, Haflinger e Schindler, utilizaram o composto fenotiazínico iminodibenzil para a síntese de 42 derivados (HEALY, 1997; SCHINDLER; HÄFLIGER, 1954).

A partir de 1956, trabalhos realizados pelo médico Roland Kuhn com variantes fenotiazínicos G- 22355 relata, pela primeira vez, a possibilidade de que esta substância poderia ter um efeito antidepressivo terapêutico (KUHN, 1988; FANGMANN et al., 2008).

Na década de 1960, a teorias monoaminérgicos de depressão postulavam uma deficiência funcional noradrenérgica ou na transmissão serotoninérgica em certas áreas do cérebro como causa da patogenia da depressão (COPPEN, 1967). Carlsson, Fuxe e Ungerstedt (1968) da Universidade de Gothen - Burg (Suécia) descreveram pela primeira vez como ATCs bloquearam a recaptção da serotonina cerebral, permitindo que os pesquisadores

Lapin e Oxenkrug (1969) postulassem a teoria serotoninérgica da depressão, em oposição à hipótese catecolaminérgica, com base em um déficit de serotonina a nível intersináptico em determinadas regiões do cérebro. Assim, as ações dos antidepressivos são muito mais complexas do que se presume pela teoria da monoamina de depressão, que especula que a depressão é uma doença principalmente de função noradrenérgica / serotoninérgica que é corrigido por um tratamento antidepressivo eficaz.

Os ATCs são antidepressivos heterocíclicos amplamente utilizados para tratar inúmeros de problemas de saúde, como depressão, fobia social, ansiedade generalizada, pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos alimentares, além de modular o sistema imunitário (SARCEDOTE; BIANCHI; PANERAI, 1994; LITTRELL et al., 2012). Em adição à sua ação farmacológica na inibição da recaptação da serotonina e noradrenalina, as interações com receptores, como os receptores H1 da histamina, os receptores muscarínicos, e receptores adrenérgicos, têm sido relatados (BRUNTON et al., 2008). Os ATCs de amina terciárias (amitriptilina) inibem a recaptura de serotonina (5-HT) e em menor proporção dopamina (DA). Outra ação importante dos ATCs é o antagonismo competitivo muscarínicos dos receptores da acetilcolina (resultam em sintomas como sedação, visão turva, boca seca, retenção urinária e hipotensão) (DANIELSON, 2004).

Kubera et al. (2000) propuseram possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos na imunoreatividade alterada após tratamento com ATCs:

1. Estudos in vitro mostram um efeito dependente da dose supressora de antidepressivos na proliferação linfocitária induzida por mitógeno, citotoxicidade de células natural killer e na produção de citocinas (EISEN et al., 1989; MILLER; LACKNER, 1989; KUBERA et al., 1995; XIA; DEPIERRE; NASSBERGER, 1996);
2. Alterações na atividade dos esplenócitos podem ser causadas por modulação de seu ambiente neuro-hormonal (THAKORE; DINAN, 1995; CONNOR; KELLY; LEONARD, 1997; DHABHAR, 1998; DHABHAR; MCEWEN, 1999);
3. Alterações induzidas pelo ATCs na neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica poderiam modular a função imunológica. Tanto a noradrenalina e serotonina utilizados na menor dose exercem efeitos imunopotenciador, enquanto doses mais elevadas mostram atividades imunossupressoras (DHABHAR; MCEWEN, 1999; KUBERA; MAES, 2000; KUBERA et al., 2000);

4. Outro possível mecanismo gira em torno de AMP cíclico (AMPC) . A ativação dos receptores β - adrenérgicos e um aumento no nível de AMPC em linfócitos T aumentam significativamente de IL – 10 intracelular e RNAm para IL- 10, bem como a liberação de IL - 10 a partir de células T (BENBERNOU et al., 1997). Sendo assim, pode-se supor que: i) a noradrenalina e/ ou serotonina do baço, induzida por ATCs nas primeiras semanas de administração, ativem células imunes mediada pela estimulação de receptores que afetam negativamente a expressão AMPC; ii) o tratamento contínuo com ATCs por quatro semanas significativamente aumentam a produção de IL - 10 e diminui a imunoreatividade inicial de esplenócitos via mecanismo β – adrenérgico;

5. Além disso, a administração em longo prazo de ATCs induz a certo número de mecanismos adaptativos, tais como a densidade e a afinidade dos receptores presentes na imunócitos, a função e expressão das proteínas G, a síntese de neurotransmissores secundários, a ativação e translocação de fatores de transcrição, e talvez mudanças no genoma de esplenócitos como é o caso no sistema nervoso central (NALEPA, 1994).

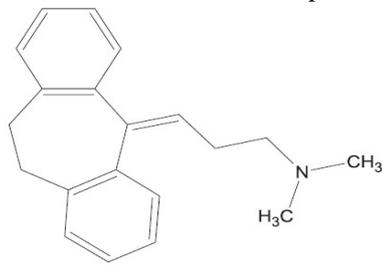
Apesar dos ATCs terem sido reduzidos à droga de segunda escolha na América do Norte e em boa parte da Europa, ainda há utilização considerável desses agentes, que estão entre os antidepressivos mais frequentemente prescritos em alguns países, como na Alemanha e em países da América Latina, inclusive no Brasil, onde o custo dos genéricos os tornam menos dispendiosos que os antidepressivos mais modernos, ainda sob proteção de patentes (STAHL, 2002) e, portanto, mais onerosos para os serviços de saúde.

2.5 AMITRIPTILINA (AMT)

A amitriptilina, 3- (10,11)- di- hidro-5H - dibenzo [a, d] ciclo -hepteno- 5-ilideno)-N, N-dimetil-1-propanamina (TOLEDO et al., 2005) representada pela Figura 2, é muito utilizado no tratamento da síndrome depressiva e de estados de ansiedade associados com depressão e transtornos gastrointestinais como a Doença inflamatória intestinal (QUARTERO et al., 2005; AVILA; BOTTINO, 2006). É um medicamento lipofílico (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009; KORNHUBER et al., 2010). A biotransformação ocorre por catálise principalmente pelas enzimas do citocromo P450 (PANKAJ; SANTOSH; RAJMANI, 2012). A eliminação é pela via renal, 35% pela urina, principalmente na forma dos

seus metabólitos ativos livres ou na forma conjugada e 8% é excretada pelas fezes. Possui meia-vida de 9 a 50 horas (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009) e seu pico plasmático é atingido mais rapidamente (1 a 3 horas) pelas aminas terciárias metabolizados em grande parte (55-80%) pelo efeito de primeira passagem como a Amitriptilina (DANIELSON, 2004). A amitriptilina é extensivamente metabolizada em uma série de compostos mais polares como a nortriptilina (parcialmente responsável pelos efeitos farmacológicos da sua precursora), dinortriptilina ou didesmetilamitriptilina e os metabólitos hidroxilados têm sido detectados na urina. Abaixo a estrutura representativa da AMT:

Figura 2 - Fórmula estrutural da amitriptilina



Fonte: (SILVA, 1998).

A amitriptilina (AMT) foi desenvolvida em 1958 pela equipe do pesquisador Frank J. Ayd Jr da companhia farmacêutica Merck. Era tido como um antipsicótico e após modificações no anel central da família thioxantheno, constitui o primeiro composto no grupo dibenzocicloheptadieno (LANGER; HEIMANN, 1983). Em 7 de abril de 1961, a AMT foi aprovada como um antidepressivo pela FDA (*Food and Drug Administration*).

A AMT além do seu efeito antidepressivo é considerada como tratamento de escolha para diferentes tipos de dor crônica, incluindo enxaqueca e dor crônica miofascial, neuropatia dolorosa (MAX et al., 1988; TORRENT; VÁZQUEZ; GAY, 2008; CHENG; WANG; CHANG, 2012), fibromialgia (PRADO et al., 2012). Este efeito analgésico, apesar de ser independente do efeito antidepressivo, parece envolver a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina (TORRENT; VÁZQUEZ; GAY, 2008; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008; CHENG; WANG; CHANG, 2012).

Embora a AMT não seja indicado em pacientes submetidos à obstrução da saída da bexiga, Achar et al. (2003) relataram efeitos anti-inflamatórios e relaxantes musculares da AMT. Foi clinicamente para aliviar distúrbios do sistema urinário, tais como enurese, cistite intersticial e a instabilidade do músculo detrusor, e para induzir a extrusão de cálculos urinários.

Trabalhos de pesquisadores (HALL; OGREN, 1981; FRYER; LUKAS, 1999) relatam que AMT é um antidepressivo tricíclico pleiotrópico que interage com receptores histamínicos, colinérgicos muscarínicos, e N-metil-D-aspartato (NMDA), aminas biogênicas e substância P, além da inibição da recaptção da serotonina e norepinefrina. Portanto, com base nesses fatos, há uma variedade de supostos locais em que a AMT poderia exercer a sua ação anti-inflamatória (HAJHASHEMI, 2010).

Fairweather et al. (1993) demonstraram que o uso da AMT pode ser limitado pelos seus efeitos sobre o funcionamento diurno, em aspectos particulares da memória funcional que são interrompidas, mesmo após a dosagem em longo prazo.

Por causa da capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e subsequente dano mitocondrial grave irreversível, assim como inibição antioxidante nas células tumorais, AMT pode ser usado como uma nova droga promissora para ser testado para terapia do câncer (CORDERO, et al., 2010). Este assunto também sugere outro efeito benéfico da AMT na supressão/ atenuação de risco dos cânceres gastrointestinais (RAHIMI; SHIRI; RAZMI, 2012).

A AMT em baixas doses é um antidepressivo tricíclico utilizado para tratar Distúrbios gastro-intestinal funcional durante muitos anos (RAHIMI, 2009); no entanto, o exato mecanismo de ação não é claro. Huang et al. (2013) em seu trabalho, constataram que a baixa dose AMT diminui o tempo de trânsito orocecal, diminui a sensibilidade gástrica e aumenta os níveis plasmáticos de grelina e neuropeptídeo Y em indivíduos saudáveis, que pode ser a causa dos efeitos benéficos da baixa dose AMT.

No caso da fluoxetina e amitriptilina, Yaron et al. (1999) mostraram que estes fármacos inibem a liberação de óxido nítrico e de prostaglandina E2 em células sinoviais. Além disso, vários estudos (XIA; DEPIERRE; NASSBERGER, 1996; YARON et al., 1999; ACHAR et al., 2003; TAI et al., 2006) observaram que a AMT inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias podendo atuar como antidepressivos tricíclicos anti-inflamatórios.

Abdel-Salam, Nofal e El- Shenawy (2003) descobriram que a AMT produz um efeito anti-inflamatório com redução do edema da pata em ratos induzido pela injeção de

carragenina. Sadeghi et al. (2011) mostraram, ainda, que tanto administração local e intracerebroventricular de AMT provocam uma marcada redução na infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) nas patas tratadas com carragenina. Vismari, Alves e Palermo-Neto (2010) corroboraram com estes achados através da microscopia intravital, mostrando ainda mais o envolvimento de $\alpha 1$ - adrenoceptores nos efeitos anti-inflamatórios de AMT. Os resultados destes estudos fornecem evidências do efeito modulador de antidepressivos heterocíclicos sobre a migração de neutrófilos e na estabilização de mastócitos, demonstrando implicação para o tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo doenças alérgicas.

Sanders, Hussell e Maze (2009) mencionam em seu trabalho que a sedação pode suprimir a função do sistema imunitário por várias vias. Portanto, o efeito sedativo de AMT pode contribuir para o seu efeito anti-inflamatório em modelos experimentais como o edema de pata por carragenina.

2.6 CITOCINAS

As citocinas, de um modo geral, são mediadores solúveis produzidos por células imunes ativadas que servem de comunicação célula a célula no sistema imune (DANTZER; KELLEY, 2007), os efeitos atribuídos às citocinas no SNC podem ser agrupados em três categorias: 1- interação das citocinas com o sistema nervoso periférico (SNP), 2- efeitos centrais mediados pelas citocinas, 3- efeitos diretos das citocinas no SNC (ROTHWELL; HOPKINS, 1995). Estas moléculas são secretadas por uma grande variedade de células no sistema imunitário. As citocinas são classificadas como linfocinas, interleucinas, quimiocinas e, dependendo da sua função, alvo, ou células de origem presumida e se ligam a receptores específicos, que são amplamente distribuídas em células do sistema imunitário. Atualmente são conhecidos cinco famílias de receptores de citocinas: (1) imunoglobulina, (2) hematopietina (classe I), (3) interferon (classe II), (4) o TNF, e (5) quimiocina (JANSSEN et al., 2010).

As células que mais comumente produzem citocinas são: monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, células B e T, células endoteliais, ceratinócitos, células

musculares lisas, células do parênquima gastrointestinal e do estroma endometrial, além de células de neoplasias (SOUBA, 1994; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1996).

Os fatores que afetam os níveis de citocinas estão a inflamação que está intimamente ligada com parâmetros comportamentais, tais como a falta de exercício ou sono, abuso de álcool e tabagismo, bem como com comorbidades médicas, incluindo doença arterial coronária, a obesidade e resistência à insulina, a osteoporose, e dor (McCARTY, 1999; GOLDSTEIN et al., 2009). Qualquer um desses fatores aumenta potencialmente os níveis de citocinas pró-inflamatória e pode alterar os efeitos que os antidepressivos têm em citocinas. O envelhecimento é caracterizado por um estado pró- inflamatória que pode contribuir para o aparecimento de doenças relacionadas com a idade. Alguns estudos sobre o efeitos do envelhecimento mostram resposta inflamatória de IL - 6, o TNF - α e IL - 1 β serem importantes para processos de envelhecimento (HUANG; PATEL; MANTON, 2005). Perda óssea relacionada à idade pode ser outra fonte relacionada com a expressão de citocinas, como mostrado no envelhecimento de camundongos C57BL/6 (GASPARRINI et al., 2009).

Postula-se que os antidepressivos podem prevenir o aparecimento de doenças comportamentais por meio da modulação de citocinas pró-inflamatórias (FLANIGAN; ACCONE; LABURN, 1992; YIRMIYA, 1996; SHEN et al., 1999; CONNOR et al, 2000; CASTANON; BLUTHÉ; DANTZER, 2001). Os pacientes deprimidos, que são saudáveis, têm aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α), proteínas de fase aguda, quimiocinas, e moléculas de adesão (JANSSEN et al., 2010).

Estudos in vitro (Quadro 2) têm mostrado que a maioria dos antidepressivos diminui a capacidade das células do sistema imunológico produzir citocinas pró-inflamatórias, reforçando simultaneamente a produção de citocinas anti-inflamatórias. A pesquisa também indica que os efeitos dos antidepressivos nas células imunes e produção de citocinas podem ser um pré-requisito para ocorrer a resposta ao tratamento (JANSSEN et al., 2010). Outro dado importante é que as alterações nos níveis de citocinas após o tratamento antidepressivo aparecem principalmente independentes do tipo de antidepressivo, embora possa haver algumas diferenças nas ações de como certos antidepressivos podem influenciar os níveis de citocinas (MAES et al., 2001).

Em estudos in vitro as drogas antidepressivas visivelmente inibiram a secreção estimulada de citocinas pró- inflamatórias, tais como IL - 2, IL - 1 β , e IFN - γ (CASTANON et al., 2002).

Quadro 2 - Produção de ocitocinas estimuladas in vitro, com ou sem incubação de antidepressivos

Antidepressivos	Tempo de incubação	citocinas	Autores
clomipramina e imipramina (ATCs)	24 h pré-incubação	↓IL-6	Xia; Depierre; Nassberger (1996)
citalopram (ISRS)			
	24-48 h incubação	↓IL- 1 β ; TNF- α ; IL- 2; IFN - γ	
clomipramina, sertralina (ISRS)	72 h	↑ IL-10; ↓ IFN- γ	Maes et al. (1999)
Imipramina, Venlafaxina,	24 h	↑ IL-10	Kubera et al. (2001)
fluoxetina			
Imipramina, venlafaxina,	Não incubado	IFN- γ +/-	
fluoxetina	Não incubado	↓ IFN- γ	
imipramina e mianserina	72 h	↓ (IL- 2; IL- 4; IFN- γ). ↑(IL- 10; TGF - β)	Szuster-Ciesielska et al. (2003)
Reboxetina, desipramina, fluoxetina,	1 h pré- incubação	↓IFN- γ	Diamond; Kelly; Connor (2006)
Desipramina	72 h	↓ IL-10	
Reboxetina, fluoxetina,	Não incubado	IL-10+/-	
Desipramina	Não incubado	↑ IL-1 β	
Clomipramina	Não incubado	↓ IL-1 β	

Fonte: (Janssen (2010) adaptado por NAMAZU, 2015).

Legenda: ↑aumento, ↓ redução, +/- sem mudanças nos níveis de citocinas.

Estudos in vivo (Quadro 3) demonstram consistentemente que medicamentos antidepressivos produzem um forte efeito imunossupressor no sangue total de dois pacientes deprimidos e em voluntários saudáveis.

Quadro 3 - A produção de citocinas antes e após o tratamento de pacientes deprimidos com antidepressivo

Antidepressivos	Incubação	Citocinas	Autores
Moclobemida (300–600 mg)	12 semanas	TNF- α +/-	Landmann et al. (1997)
Sertralina (50–200 mg)	12 semanas	IL-1 β +/-	Anisman et al. (1999)
Amitriptilina (150–250 mg), não responderam	6 semanas	IL-6 ↓	Lanquillon et al. (2000)
Amitriptilina (150–250 mg), responderam	6 semanas	IL-6↑; TNF- α ↓	Lanquillon et al. (2000)
Imipramina, sertralina (dose não especificada)	12–52 semanas	IL-1 β ↑; IL-6 ↑	Marques- Deak et al. (2007)

Legenda: ↑ aumento, ↓ redução, +/- sem mudanças nos níveis de citocinas.

Fonte: Janssen (2010), adaptado por NAMAZU (2015).

Janssen et al. (2010) destacaram mecanismos propostos para os efeitos de antidepressivos sobre as citocinas: (1) papel da Adenosina monofosfato cíclico (AMPC), (2) serotonina e (3) função do eixo HPA:

(1) papel dos AMPC:

Os antidepressivos parecem aumentar a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (por exemplo, células T, monócitos, macrófagos e células microgliais) levando à uma diminuição nos níveis de citocinas pró- inflamatórias (XIA; DEPIERRE; NASSBERGER, 1996; MAES et al., 2001; HASHIOKA et al., 2007); os níveis via β - adrenérgicos e/ ou ativação do receptor de dopamina. O aumento dos níveis de AMPC ativam proteínas quinase dependentes *de* AMPC (PKA), em última análise aumentando NF κ B (factor nuclear kappa B), um fator de transcrição que promove expressão de genes pró –inflamatórios

e inibe a via PI- 3 quinase/ AKT (fosfoinosítídeo 3-quinase ou fosfatidilinositol 3-quinases- (GOUGH et al., 2008) - importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina). Digno de nota é que as citocinas anti - inflamatórias parecem ser reguladas através deste mesmo mecanismo, pois o aumento da AMPc incrementa a expressão de IL - 10 e do RNAm intracelular de IL - 10 em monócitos (MAES et al., 2001).

(2) Serotonina:

A serotonina periférica é armazenada nas células imunológicas, incluindo os linfócitos T, monócitos, mastócitos e plaquetas. O Transporte de serotonina em células imunes é promovido por citocinas, tais como IL - 1 IFN - α , IFN - γ , e TNF- α . Sínteses do TNF- α , IL - 6, IFN - γ e IL - 10 dependerá dos níveis intracelulares de 5-HT. Várias citocinas pró-inflamatória, incluindo IL - 1, IFN - α , IFN - γ , e TNF- α , também são conhecidos pela up-regulate de transporte de 5-HT, aumentando assim a exaustão extracelular de 5-HT (WICHERS; MAES, 2002). In vitro, os antidepressivos serotoninérgicos aumentam a liberação de serotonina e inibem a sua recaptação, levando à depleção intracelular e aumento do nível extracelular. Os níveis de serotonina intracelulares reduzidos parecem reduzir os níveis de citocinas por meio da inibição de expressão de RNAm (MAES et al., 2001). O aumento de 5-HT extracelular parece exercer um efeito imunossupressor (KUBERA et al., 2000). Antidepressivos reduzem os níveis de transporte de serotonina, que têm se mostrado correlacionada com os níveis de citocinas pró - inflamatórias (TSAO et al., 2006). As citocinas inflamatórias ativam a IDO, uma enzima que converte triptofano (TRP) em quinurenina (KYN). Em última análise esta via conduz à depleção de triptofano e reduz a síntese de 5 - HT (CASTANON et al., 2002; KUBERA et al., 2004; PUCAK; KAPLIN, 2005). Redução da disponibilidade de triptofano pode modificar o funcionamento dos macrófagos e a resposta imunológica, como um todo. Baixos níveis de triptofano estão associados com o aumento da inflamação (RUSSO et al., 2007). Além disso, promovem indiretamente a síntese da prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO), que estimula receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato), levando a danos no hipocampo e perda de receptores de corticosteróides no loop feedback negativo do eixo HPA (CASTANON et al., 2002; OXENKRUG, 2007).

(3) função do eixo HPA

Normalmente glucocorticóides inibem a produção de citocinas inflamatórias, como parte do sistema de feedback do eixo HPA. Na depressão, tanto os níveis de cortisol e de citocinas pró - inflamatórias aumentam, o que sugere uma falha ou desregulação dos mecanismos de feedback do eixo HPA (PACE; HU; MILLER, 2007). As citocinas pró- inflamatórias inibem a função dos receptores glicocorticóides através da estimulação da via MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos). Himmerich et al. (2006) demonstraram uma associação entre o TNF- α nos níveis de plasma e atividade do eixo HPA em pacientes deprimidos, postularando ser um efeito direto dos antidepressivos nos receptores glicocorticóides.

Há dados tanto comportamentais e bioquímicos sobre o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias no mecanismo de ação de drogas antidepressivas. O tratamento crônico, mas não aguda com antidepressivos típicos (imipramina, desipramina) e atípicos (fluoxetina, tianeptine) antagonizaram tanto o sinais comportamentais de lipopolissacarídeo (LPS) e de IL -1 β no comportamento doente induzido e na atividade do eixo HPA (YIRMIYA, 1996; SHEN et al., 1999; CASTANON; BLUTHÉ; DANTZER, 2001; YIRMIYA et al., 2001).

Evidências sugerem que os antidepressivos são capazes de produzir efeitos imuno- negativos que participam os efeitos farmacológicos (CASTANON et al., 2002; BRUSTOLIM et al., 2006; JANSSEN et al., 2010). Neste contexto, um aspecto que tem sido investigada por alguns pesquisadores são as propriedades anti- inflamatórias de antidepressivos em vários modelos experimentais de inflamação (BIANCHI et al., 1995; MAES et al., 1999; ABDEL-SALAM; NOFAL; EL-SHENAWY, 2003; HAJHASHEMI et al., 2010).

Os antidepressivos tricíclicos (ATCs) mostraram suprimir a síntese de citocinas pró-inflamatória e os sintomas depressivos (SHEN et al., 1999).

Tai et al. (2006) demonstraram que a coadministração intrarretal de amitriptilina (em concentrações picomolares (15 μ g/h) com morfina (15 μ g/h) por 5 dias atenuou a tolerância a esta, mantendo o seu efeito antinociceptivo. Estes efeitos de amitriptilina foram mediados através da inibição da expressão citocinas pró-inflamatórias como TNF -alfa, IL - 1 β , e IL - 6 em células da glia e pela prevenção da regulação negativa de transportadores de glutamato (mesmo aumentando a expressão GLAST e GLT -1), melhorando assim a recaptação dos níveis dos aminoácidos excitatórios sinápticos no líquido cefalorraquidiano dialisado.

Além disso, Bluthe et al. (1999) mostraram que a IL- 10 seria capaz de antagonizar os defeitos de comportamento, tais como o comportamento social deprimido, induzidas por citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados podem sugerir que a eficácia clínica de antidepressivos seria relacionada aos seus efeitos imuno- negativos através do aumento da produção de IL - 10 (MAES et al., 1999). Por exemplo, os efeitos supressores de desipramina sobre a produção de IL- 4 são encontrados sete e 14, mas não 28 dias, após o tratamento, enquanto que o tratamento prolongado com desipramina e amitriptilina durante 28 dias aumenta a produção de IL- 10.

Ao melhor de nosso conhecimento, existem evidências limitadas sobre os mecanismos pelos quais os efeitos anti- inflamatórios de amitriptilina pode ser mediada (MARTELLI ET al., 1967; HAJHASHEMI ET al., 2010). Resultados demonstraram que aplicação ip (intraperitoneal) e icv (intracerebroventricular) de amitriptilina reduziu consideravelmente os níveis de IL - 1 β nos tecidos na pata de ratos injetados com carragenina, mas apenas a aplicação ip reduziu os níveis de TNF- α . É mencionar que existe uma ligação forte entre o desenvolvimento inflamatória e a geração de dor (MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005). Estudos experimentais têm demonstrado que a inibição de PMN migração de células e citocinas pró- inflamatórias, diminui a hiperalgesia evocada por diferentes estímulos inflamatórios (ABBADIE, 2005; REN; DUBNER, 2010). Portanto, parece ser possível que o efeito inibitório de amitriptilina na migração de leucócitos e as concentrações de IL - 1 β TNF - α e, pelo menos em parte, participam na sua atividade analgésica.

Os estudos sobre os efeitos de citocinas na regulação de respostas no SNC do SI para o SNC, e o estudo das alterações comportamentais no contexto passaram, então, a compreender dois enfoques diferentes e complementares: a tentativa de isolamento de moléculas e das vias essenciais para a sinalização em que se inserem. Por isso, evidencia-se que as alterações de comportamento decorrentes de uma infecção não são consequências de uma depressão inespecífica do SNC, mas sim, de um conjunto de adaptações específicas e muito bem organizadas nesse sistema (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da amitriptilina (AMT) na colite induzida por DSS em camundongos através de dois modelos experimentais: profilático e terapêutico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação da dose do antidepressivo amitriptilina (200 µg/ml) no Teste de Suspensão da Cauda;
- b) Avaliação dos protocolos experimentais profilático e terapêutico;
- c) Avaliação da atividade da mieloperoxidase no cólon de todos os tratamentos;
- d) Avaliação dos Índices Clínicos (ganho de peso dos animais, peso e comprimento do cólon) dos animais tratados ou não com amitriptilina no modelo profilático e terapêutico;
- e) Avaliação do Burst oxidativo basal e induzido de polimorfonucleares circulantes;
- f) Contagem do número total e diferencial de leucócitos circulantes do sangue;
- g) Fenotipagem dos linfócitos CD4⁺/ CD8⁺ e monócitos CD14⁺;
- h) Avaliar a influência do tratamento com amitriptilina sobre as concentrações das citocinas IL-1beta (IL-1β), IL-6 e TNF- alfa (TNF- α) no plasma por ELISA;
- i) Avaliar a influência do tratamento com amitriptilina sobre as concentrações das citocinas IL-1beta (IL-1β), IL-6 e TNF- alfa (TNF- α) no cólon por ELISA;

j) Avaliação da inflamação por escore clínico e macroscópico no cólon;

k) Avaliação histológica do cólon de todos os grupos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1 ANIMAIS

Camundongos adultos do sexo masculino C57/BL6 (8 a 10 semanas de idade) com peso entre 20- 30 gramas foram providenciados de proles obtidas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em temperatura controlada (22-24°C) e iluminados artificialmente em um ciclo de escuridão de 12 h (luzes acesas às 06:00) com livre acesso à ração e água. Maravalha esterilizada e livre de resíduos foram usados como cama dos animais. Os camundongos foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, as quais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (Protocolo# 2999/2013).

4.2 CORANTES CELULARES

- Líquido de Turk - Utilizado para corar as células do sangue periférico para contagem total de leucócitos.
- ROSENFELD (Merck®) - Utilizado para corar as células coletadas do sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos.

4.3 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- Alcian Blue: corante para análise de muco nas lâminas histológicas;
- amitriptilina (Cristália Produtos químicos e farmacêuticos): fármaco objeto deste estudo;
- Bradford Reagent (Sigma Aldrich®) – quantificação de proteína no cólon;
- Dextran Sulfate Sodium (DSS - TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden): indução de colite experimental;
- Diacetato 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR) - empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20°C) e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- EDTA 10% (Sigma®) - anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue;
- Hematoxilina- eosina (H. E.)- corante para a avaliação histológica;
- HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia– Sigma (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) – tampão utilizado na mieloperoxidase;
- Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®) - utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro;
- NaCl a 0,2% e 1,6%. - Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras analisadas no citômetro de fluxo;
- PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2- 7,4) - Solução utilizada nas técnicas de burst oxidativo;
- PMA - Miristato-acetato de forbol- (Calbiochem®) - utilizado como estímulo para desencadear o burst oxidativo de neutrófilos;
- Sacarose- SYNTH (PM= 342.30)- melhorar a palatabilidade;
- Solução tampão para homogeneização do cólon contendo: 500 µL de PBS Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) PBS-T adicionado de inibidores de protease (1,6 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 100 µg/mL de hemissulfato de leupeptina, 10 µg/mL de 1mM hidrato de hidróclorido de benzamidina, 10 mM de EDTA) µg/mL de solução) e PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 ul/mL de solução);
- Reagentes utilizados no ELISA (Biolegend- USA) para determinação de citocinas (IL-1 β, IL-6 e TNF- α) do cólon e do sangue (plasma) de camundongos;

4.4 TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA (TSC)

O TSC é um modelo clássico para a avaliação de sintomas depressivos no comportamento de roedores (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Ele tem sido extensivamente validado para a avaliação de antidepressivos visando o tratamento da depressão humana.

Os grupos CONT e AMT eram compostos por 9 animais.

- Grupo CONT (Controle): água filtrada +glicose;
- Grupo AMT (amitriptilina): água filtrada +AMT +glicose;

Os animais foram tratados ou não com a dose por via oral, de AMT, 200 µg/ml- acrescentado sacarose (6%) para melhorar a palatabilidade (CALDARONE et al., 2003) e ração à vontade durante catorze dias consecutivos e submetidos ao TSC no décimo quinto dia, de acordo com Steru et al. (1985). Os camundongos são suspensos em um suporte de madeira 50 cm acima da sua base do suporte. Os animais são fixados através da extremidade distal da cauda (1 cm de distância da sua extremidade), e são avaliados por 6 minutos. O teste propõe que os camundongos gastem um tempo considerável engajados em movimentos laterais vigorosos, a fim de tentarem libertar-se do apego. Esta tentativa inicial é seguida por um período de imobilidade. A latência para o estabelecimento da imobilidade reflete um consumo interno para lutar contra o contexto aversivo e pode ser aumentada por várias classes de antidepressivos. Inversamente, a duração total da imobilidade é reduzida pela administração de tais fármacos (STERU et al., 1985).

4.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DA COLITE E TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Dois tratamentos diferentes foram empregados. Eles são referidos como profilático ou terapêutico.

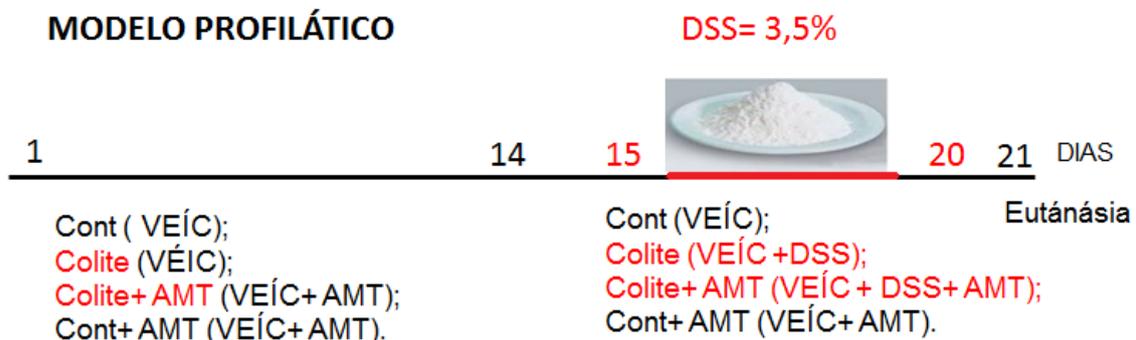
4.5.1 Modelo profilático

O modelo profilático está esquematizado na Figura 3 e possui os seguintes grupos:

- Controle (VEÍC): somente água filtrada e ração à vontade durante todo o experimento. n=7 animais;
- Colite (VEÍC+DSS): Nos catorze dias iniciais recebiam somente água filtrada e ração à vontade. No 15^a dia ao 20^a dia foi acrescentado DSS-3,5% na água de beber ad libitum. n=11 animais;
- Colite+ amitriptilina (VEÍC+DSS+AMT): Nos catorze dias iniciais recebiam somente água filtrada+ AMT (200 µg/mL) e ração à vontade. No 15^a dia ao 20^a dia foi acrescentado DSS-3,5% na água de beber ad libitum. n=11 animais;
- Controle amitriptilina (VEÍC+AMT-200 µg/ml): somente água filtrada+ AMT e ração à vontade durante todo o experimento. n=7 animais.

No 21^a dia todos os animais foram submetidos à eutanásia para posterior coleta de material. Todos os grupos receberam sacarose (6%) em sua água de beber para aumentar a palatabilidade (CALDARONE et al., 2003).

Figura 3 - Esquema em dias do Modelo Profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Grupo Cont (VEÍC) = grupo controle- veículo que recebeu apenas água filtrada; grupo Colite (VEÍC) = grupo veículo que ainda não recebeu DSS na água filtrada; grupo: Colite+ AMT (VEÍC+ AMT) = grupo veículo+ AMT que ainda não recebeu DSS na água filtrada; grupo Cont+ AMT= grupo controle que recebe apenas água filtrada + AMT; Grupo colite (VEÍC+DSS) = grupo colite que recebeu DSS na água filtrada; grupo colite+ AMT= grupo veículo+ AMT que recebeu DSS na água filtrada.

4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram eutanasiados após anestesia profunda, via intraperitoneal (i.p.) com cetamina e xilazina (100 e 10 mg/kg).

4.7 DETERMINAÇÃO DO GANHO DE PESO DO ANIMAL (%)

Avaliação da porcentagem do ganho de peso (%) dos grupos foi realizada pela fórmula:

$$\text{GP (\%)} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

4.8 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO E PESO DO CÓLON

O comprimento do cólon foi constatado após medi-lo com o uso de régua com escalas.

A determinação do peso do cólon foi através da retirada do conteúdo intestinal com swab estéril e pesando o tecido.

4.9 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR ESCORE CLÍNICO E MACROSCÓPICO NO CÓLON

A Avaliação da inflamação por escore clínico e macroscópico no cólon foi realizado através da observação das características das fezes, presença de sangue e a inflamação do cólon baseando-se no artigo de Melgar, Karlsson e Michaëlsson (2005) com adaptações na figura 5.

Figura 5 - Avaliação da inflamação por escore clínico e macroscópico no cólon

Escore	Fezes	Sangue
0	Normal	Ausente
1	Bolos fecais úmidos e frouxos	Oculto
2	Amorfo, úmido e pegajoso	Sangue
3	Diarreia	Sangue em todo o cólon

Fonte: (Melgar, Karlsson e Michaëlsson (2005), adaptado por NAMAZU (2015)).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

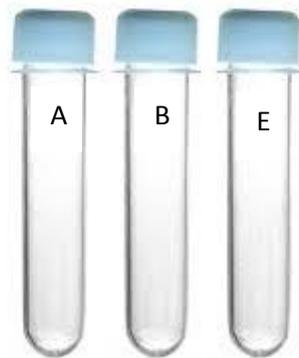
O cólon durante a coleta foi dividido em duas partes: proximal e distal. Sendo que ambas as partes eram novamente divididas em duas partes para análise de citocinas e mieloperoxidase. As amostras foram congeladas, pesadas e homogeneizadas com tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia– Sigma (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) e centrifugados (10 minutos, 12000 rpm na centrífuga refrigerada)). Coletou-se o sobrenadante, pipetou 10 µl da amostra em duplicata diretamente em uma placa de 96 wells. Logo após foi adicionado 200 µl de tampão substrato. Esperou 5 min para a reação agir e foi adicionado 50 µl de azida diluída para bloquear a reação. Utilizou como branco 200 µl de tampão substrato. A leitura foi feita em espectrofotômetro (450 nm) e corrigido pelo peso do tecido: (Absorbância/peso em mg).

A atividade de MPO é descrita em unidades mg de tecido úmido, onde 1 unidade de MPO é definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água por 1 minuto em temperatura ambiente. A metodologia baseou-se na descrita por Bradley et al. (1982) com modificações.

4.11 BURST OXIDATIVO DE POLIMORFONUCLEARES SANGUÍNEOS

O método proposto por Hasui et al. (1989) foi utilizado para a análise do burst oxidativo, utilizando um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado com um computador (Machintosh Apple, CA, USA). Foram adquiridos 30000 eventos por amostra utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). No dia da coleta, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em microtubos de 1,5 ml com 10 μ l de EDTA-10%. Foram usadas amostras sanguíneas de 50 μ l para a análise do burst oxidativo. Uma bateria de 3 tubos de polipropileno foi, então, montada e numerada de “A” “A”, “B” e “E” para cada animal. Cada tubo (de acordo com a letra) recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem como ilustra a figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática da sequência de reagentes nas técnicas de burst oxidativo



Fonte: Costa (2004) adaptado por NAMAZU (2015).

Legenda: Tubo A= células (sangue); Tubo B= células +DCFH e Tubo C= células+ DCFG+PMA.

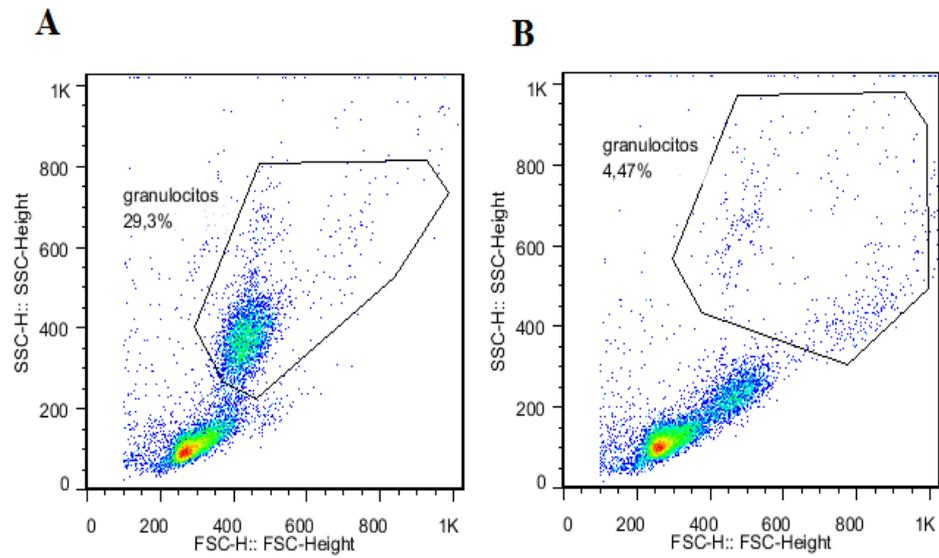
Desta forma, todos os tubos de “A”, “B” e “E” receberam alíquotas, que corresponderam a 2×10^5 leucócitos. Os tubos com as letras “B” e “E” receberam 200 μ l da solução de 2,7, diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) 3mM cada. O tubo de letra “E” recebeu 100 μ l de miristato-acetato de forbol (PMA) (100ng). Como as amostras devem

apresentar um volume final de 1100µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000µl de PBS, os tubos “B” 800µl, e, finalmente “E” receberam 700µl. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C, por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2mL de EDTA 3mM para interromper a reação, sendo os tubos centrifugados posteriormente a 1200rpm, por 10 minutos.

No experimento para a análise de atividade de neutrófilos, o sangue, após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 mL de NaCl a 0,2%, durante 20 segundos. Imediatamente após este período, colocaram-se mais 2 mL de NaCl a 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Em sequência, os tubos foram centrifugados novamente, sendo desprezados os sobrenadantes obtidos. Foi, então, realizada uma nova lise hipotônica (pela segunda vez), seguindo todo o procedimento citado acima. Após a segunda lise, os tubos foram centrifugados pela última vez, sendo os sobrenadantes desprezados. As células resultantes foram ressuspensas em 200µl de PBS gelado.

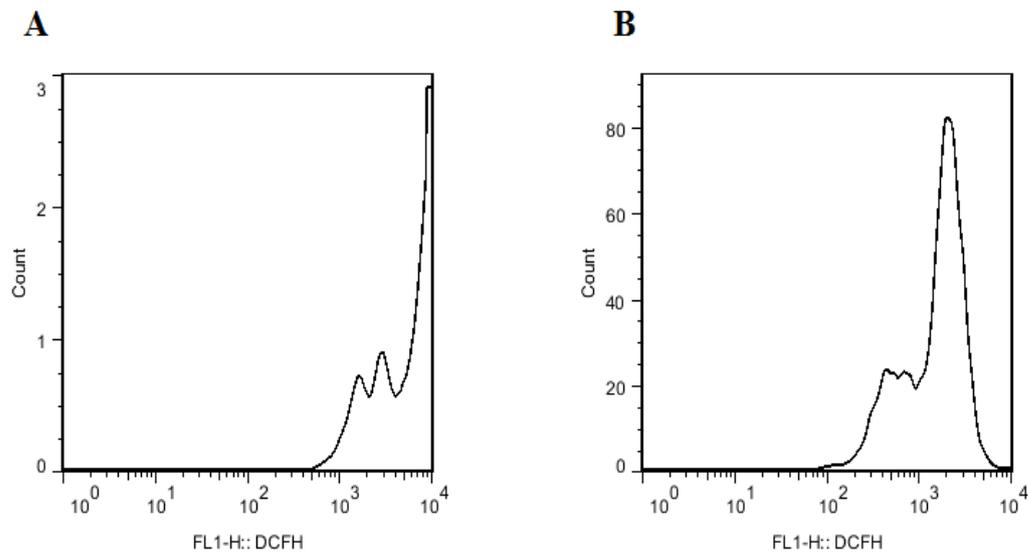
Após todo este procedimento, efetuou-se a leitura das amostras no citômetro de fluxo, sendo que o tubo “A” foi utilizado para a calibração do aparelho (fluorescência basal das células), os tubos “B” e “E” foram utilizados para a avaliação do burst oxidativo. Cada amostra passou pelo citômetro apenas uma vez e, de cada uma, foram adquiridos 10000 eventos (células). Os valores referentes ao burst oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de células (Figuras 7 e 8). Este valor, ou seja, a média geométrica (geo mean) é dada pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

Figura 7 - Ilustração das células totais do Burst Basal (A- B)



Fonte: (NAMAZU, 2015).

Figura 8 - Fluorescência basal dos granulócitos (A-B)



Fonte: NAMAZU (2015).

4.12 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES DO SANGUE

Após a homogeneização de cada amostra de sangue com EDTA, foi feita a diluição a 01h20min, em pipeta hematimétrica, com líquido de Turk e a contagem feita em câmara hematimétrica de Neubauer modificada, conforme descrito por Birgel (1982) e o resultado apresentado em milhares de células por mm^3 .

Os esfregaços sanguíneos que foram confeccionados logo após a coleta das amostras de sangue, foram submetidos à coloração de Rosenfeld (1947). Em cada esfregaço foram contados 100 leucócitos, identificando-se as células polimorfonucleares granulócitos (neutrófilos) e os mononucleares agranulócitos (linfócitos e monócitos).

4.13 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NO PLASMA

A análise de citocinas foi realizada pelo Teste de ELISA de acordo com o fabricante (Biolegend, USA) no plasma (IL-1 beta, IL-6 e TNF- α). Após anestésiar o animal e com o uso de uma seringa 1 mL e agulha, o sangue foi extraído da veia cava inferior e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e guardado em eppendorffs e congelados à -80°C para posterior análise de citocinas seguindo instruções do fabricante (Biolegend).

4.14 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS NO CÓLON

No dia da coleta, os camundongos foram anestesiados por uma overdose de cetamina e xilazina. Na sequência foram coletados: uma de amostra de sangue e o cólon para que fosse dividido em dois fragmentos de igual comprimento (proximal e distal) e subdivididos novamente em duas partes, uma para mieloperoxidase e outra para citocinas. Para realização da dosagem de citocinas (IL-1 BETA, IL-6 e TNF- ALFA), 100 mg do intestino delgado de cada camundongo foram colocados em eppendorffs e homogeneizados utilizando-se homogeneizador de tecidos (Omnith International, EUA) e solução tampão contendo 500 μL de PBS Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) PBS-T adicionado de inibidores de protease (1,6 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemissulfato de leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 1mM

hidrato de hidróclorido de benzamidina, 10 mM de EDTA) ug/mL de solução) e PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 ul/mL de solução). Após a homogeneização a amostra foi centrifugada em 14.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante separado para a quantificação de citocinas e armazenado a -80° C, para posterior dosagem de citocinas. A quantificação de proteína total foi realizada utilizando-se o Bradford Reagent (Sigma Aldrich®), segundo o fabricante, e a leitura das amostras foi realizada em espectofotômetro (562 nm). A quantidade de citocina em cada amostra foi determinada pela relação do valor de citocina encontrado pelo ensaio enzimático (ELISA de acordo com o fabricant Biolegend) sobre o valor total de proteína no tecido (pg de citocina/ mg de proteína).

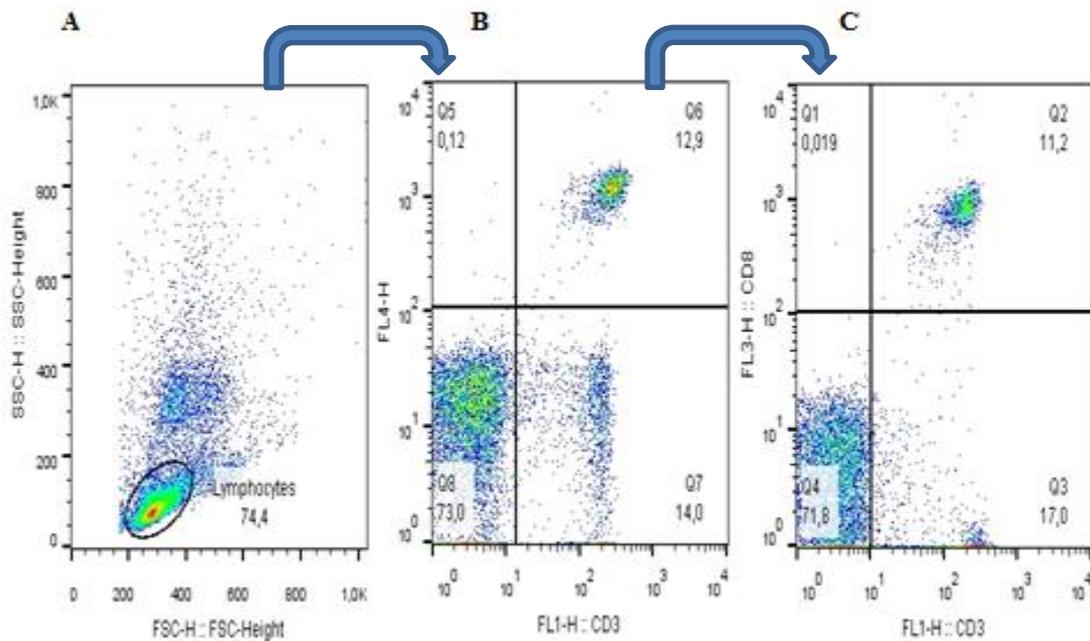
4.15 FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T CD4⁺, LINFÓCITOS T CD8⁺ E MONÓCITOS CD14⁺

A suspensão das células do sangue foi submetida à lise com tampão de lise ACK. Foi utilizado 50 µl do sangue total para análise. Os leucócitos foram marcadas em sua superfície com anticorpo anti-CD3 conjugado a PE (phycoerythrin), anti-CD8 conjugado a PerCP (peridinin chlorophyll), anti-CD4 conjugado com APC (allophycocyanin) e CD14 conjugado a FITC (fluorescein isothiocyanate). A fluorescência do FITC foi mensurada a 530/30 nm (detector FL1), a fluorescência da PE foi mensurada a 585/42 nm (detector FL2), a fluorescência da PerCP foi mensurada a 670/LP (detector FL3) e a fluorescência da APC foi mensurada a 661/16 (detector FL4). A análise de fenotipagem exigiu o uso de um citômetro de fluxo, da qual o utilizado foi o da Becton Dickinson Immunocytometry System (San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 10000 eventos por meio do programa denominado Cell Quest Pro® (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). A análise da aquisição dos eventos foi realizada por meio do programa FlowJo® versão X.

As subpopulações celulares dos linfócitos foram reconhecidas por meio das propriedades FSC - Forward Scatter e SSC - Side Scatter que avaliam o tamanho e a complexidade das células, respectivamente. As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para avaliação das moléculas de superfície celular

Foram analisadas através do *software* FlowJo[®] as populações de interesse (linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺, e monócitos CD14⁺ - Figuras 9 e 10) por meio de *gates*, excluindo-se assim outros tipos celulares das amostras. Além disso, para os experimentos, as fluorescências do citômetro foram compensadas com um tubo de células não marcadas e tubos marcados com fluorescências individuais.

Figura 9 - Esquema demonstrando a seleção das populações por fenotipagem



Fonte: NAMAZU (2015).

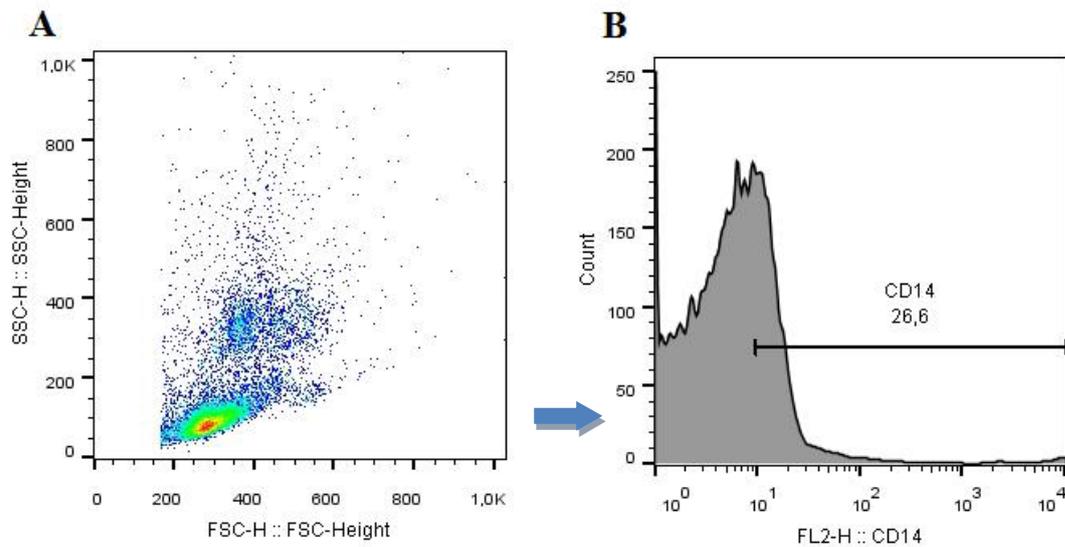
Legenda: A. Citograma da população de células encontradas no sangue;

B. Citograma correspondente a células marcadas com anti-CD3 e anti-CD4 (linfócitos T CD4);

C. Citograma correspondente marcadas com anti-CD3 e anti-CD8 (linfócitos TCD8).

As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

Figura 10 - Dot plot e histograma representativo na análise do percentual de Monócitos CD14+



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: (A) Dot Plot das células utilizadas para a análise do CD14⁺; (B) Fluorescência das células marcadas com anti- CD14⁺. As setas indicam o fluxo de análise dos dados obtidos.

4.16 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO DO CÓLON

Foram coletados dois pequenos fragmentos, um da porção proximal e outro da distal do cólon, que foram processados para análise histopatológica. O tecido foi fixado em solução de formol a 10% por 48 h e posterior processamento padrão para inclusão do tecido em parafina. Seções de cinco micrômetros foram utilizadas para coloração com H & E (Hematoxilina Eosina). A avaliação histológica foi executada por um observador que desconhecia o código de identificação (cego) usando uma escala tal como descrito anteriormente (CHEN et al., 2008). Resumidamente, uma escala de 3-4 pontos foi utilizada para designar a gravidade da inflamação (0= nenhuma, 1= ligeira, 2= moderado e 3 = grave), o grau de envolvimento (0= nenhuma, 1= mucosa, 2= mucosa e submucosa, e 3= transmural) e extensão do dano epitelial / cripta (0= nenhuma 1= um terço basal 2= dois terços basais, 3 = perda de cripta, e 4 = cripta e destruição da superfície epitelial). Parâmetros foram adicionados para obter a pontuação geral.

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

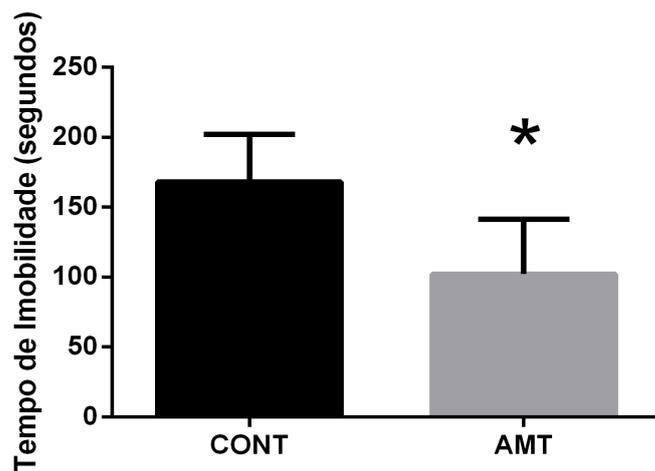
Os resultados obtidos foram avaliados por Análise de variância (ANOVA) de uma via com nível de confiança de 95%. Foram considerados significantes os valores de $P < 0,05$. Os dados paramétricos foram analisados através do teste “t” de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com sua resolução própria. Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 6.0 (San Diego Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA (TSC)

O tempo de imobilidade/ latência (Figuras 11 e 12) dos animais tratados com AMT mostraram o efeito estatístico do antidepressivo quando comparado ao grupo controle. Nas análises do tempo de imobilidade e latência, o grupo AMT que recebeu via oral o antidepressivo mostrou uma diferença significativa em relação ao grupo controle (CONT), evidenciando assim o efeito antidepressivo no TSC.

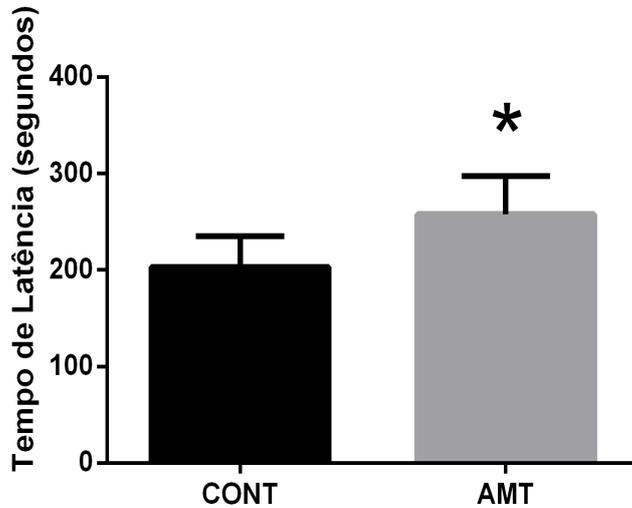
Figura 11 - Efeitos do tratamento oral de AMT sobre o tempo total de imobilidade no TSC



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo tratado com AMT (168,1±34,1) foi significativo em comparação ao grupo CONT (102,1±39,3). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via. Baseado no Test t* (p< 0,05).

Figura 12 - Efeitos do tratamento oral de amitriptilina sobre o tempo total de latência no TSC



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Efeitos do tratamento oral de amitriptilina sobre o tempo total de latência no TSC. O grupo tratado com AMT ($258 \pm 39,3$) foi significativo em comparação ao grupo CONT ($203 \pm 32,1$). Os dados mostram a concentração média \pm S.D. Anova uma via. Baseado no Test t * ($p < 0,05$).

5.2 MODELO PROFILÁTICO

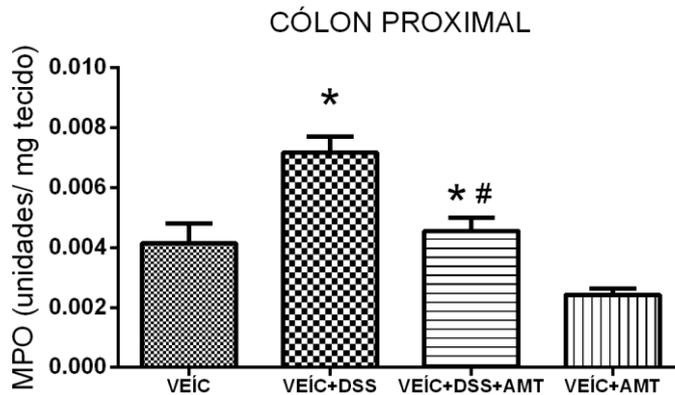
5.2.1 Curva de sobrevida

Na curva de sobrevida dos animais no modelo profilático não houve perda de animais durante todo o tratamento.

5.2.2 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

A administração profilática de AMT antes do tratamento DSS na porção proximal parcialmente impediu o infiltrado neutrofílico encontrado no grupo colite-VEÍC+DSS (Figura 13). A AMT reverteu a infiltração de neutrófilos, na porção distal do cólon no modelo preventivo (Figura 14). Estes resultados sugerem que AMT impede a infiltração de neutrófilos no cólon (porção proximal e distal), característica da inflamação aguda (colite- DSS), portanto, reduzindo sua gravidade.

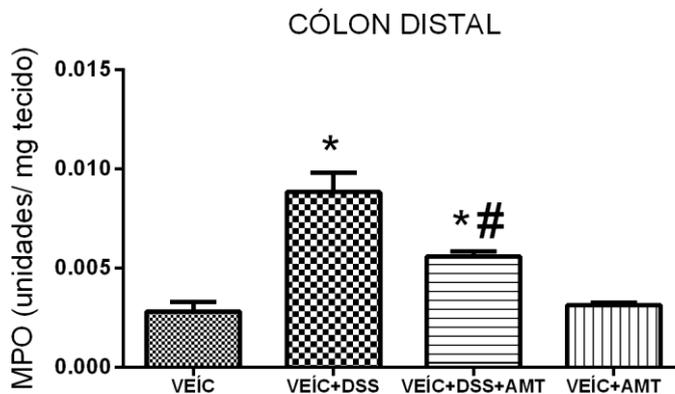
Figura 13 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no cólon proximal no modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Prevenção parcial da infiltração de neutrófilos pela AMT. Enquanto o grupo VEÍC+DSS ($0,007 \pm 0,0016$) mostrou um aumento da MPO no tecido do cólon em comparação com amostras não inflamadas (VEÍC ou VEÍC+AMT) (* $p < 0,05$). A administração prévia de AMT (VEÍC+DSS+AMT= $0,005 \pm 0,0014$) previne parcialmente o aumento da atividade da MPO (# $p < 0,05$) comparado com o grupo (VEÍC+DSS) quando comparado ao grupo VEÍC+DSS. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT) diferiu do grupo VEÍC+AMT ($0,003 \pm 0,0006$). Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 14 - Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no cólon distal no modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

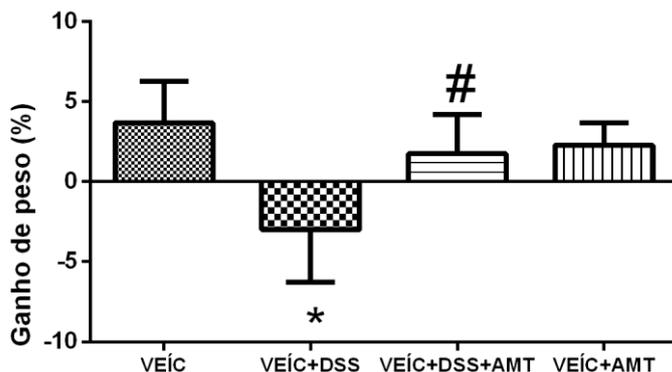
Legenda: os grupos VEÍC+DSS ($0,008 \pm 0,0024$) e VEÍC+DSS+AMT ($0,005 \pm 0,0005$) ocorreram uma maior infiltração de neutrófilos no cólon em relação aos grupos controles (VEÍC e VEÍC+AMT) (* $p < 0,05$). A administração prévia de AMT (VEÍC+DSS+ AMT= $0,005 \pm 0,0014$) previne parcialmente o aumento da atividade da MPO (# $p < 0,05$) comparado com o grupo (VEÍC+DSS). Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.3 Avaliação dos índices clínicos- modelo profilático

A administração profilática de AMT antes do tratamento DSS parcialmente impediu a redução do ganho de peso (%) quando comparado ao grupo colite-VEÍC+DSS (Figura 15). Este resultado sugere que AMT impediu um dos principais sintomas característicos de colite-DSS, reduzindo sua gravidade.

Após a coleta do cólon do animal, este foi medido com uma régua para ser avaliado comprimento do cólon (Figura 16). O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT) reduziu o comprimento do cólon quando comparado com os grupos controles (VEÍC e VEÍC+AMT), no entanto, seu comprimento não foi menor quando comparado ao grupo colite- DSS, mostrando assim o efeito benéfico da AMT.

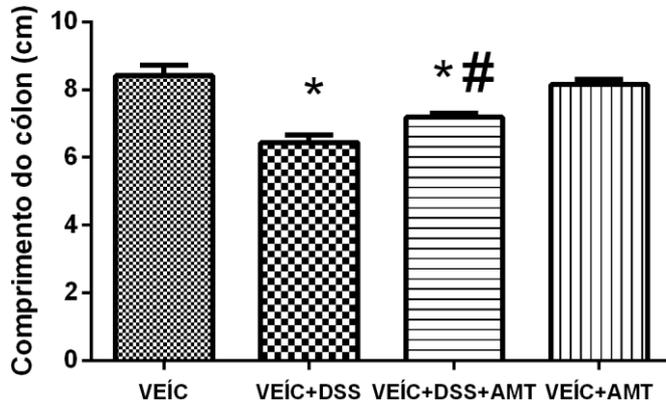
Figura 15 - Ganho de peso (%) dos animais no Modelo Profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+DSS (-3 ± 3,27) diferiu dos grupos controle VEÍC (3,7 ± 0,61) e VEÍC+AMT (2,3 ± 1,63) (*p < 0,05). A administração prévia de AMT (VEÍC+DSS + AMT = 1,76 ± 2,44) previne parcialmente a redução do ganho de peso (%) (# p < 0,05) comparado com o grupo (VEÍC+DSS). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p < 0,05).

Figura 16 - Comprimento do cólon no Modelo Profilático

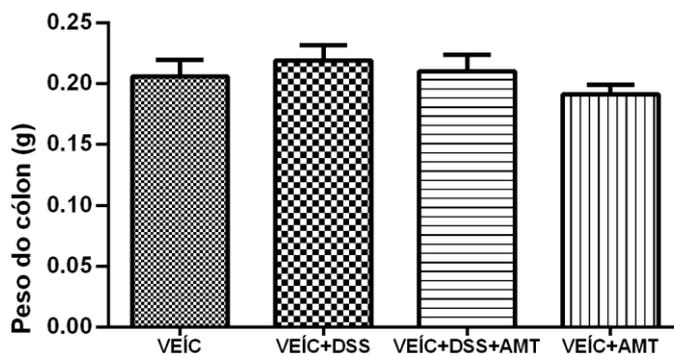


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os grupos VEÍC+DSS ($6,6 \pm 1,02$) e VEÍC+DSS+AMT ($7,2 \pm 0,54$) mostraram diferença estatística quando comparados aos grupos controle (VEÍC ($8,4 \pm 0,58$) e VEÍC+AMT ($8,3 \pm 0,58$)) (* $p < 0,05$). O grupo VEÍC+DSS foi diferente estatisticamente em relação ao grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT), (# $p < 0,05$). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O peso do cólon (Figura 17) foi avaliado após retirada do seu conteúdo e pesado em uma balança de precisão. A análise estatística mostrou que o peso do cólon não foi influenciado pelos tratamentos estudados.

Figura 17 - Peso do cólon no Modelo Profilático

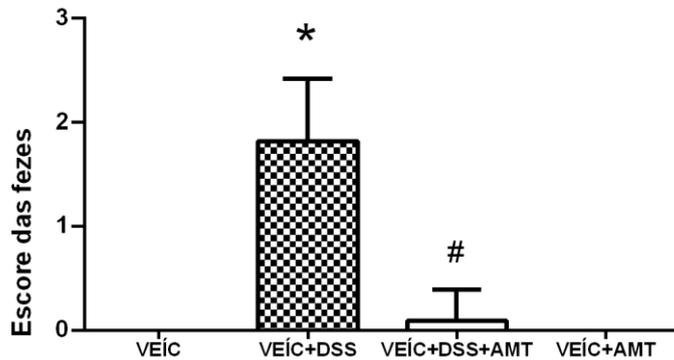


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística em relação aos grupos estudados. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

O escore realizado do conteúdo do cólon foi realizado para avaliar a consistência das fezes (Figura 18) e presença de sangue nas fezes (Figura 19). Em todos os escores, o tratamento profilático amenizou a gravidade do modelo e colite.

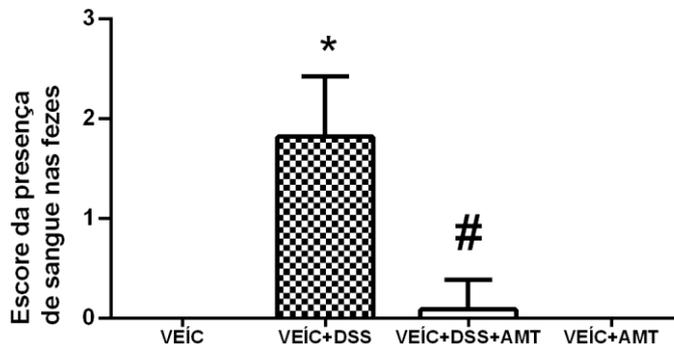
Figura 18 - Escore clínico das fezes na avaliação macroscópica do cólon



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os animais do grupo VEÍC+DSS ($1,81 \pm 0,60$) apresentaram maior escore estatístico clínico das fezes em relação aos grupos controle (VEÍC e VEÍC+AMT), (* $p < 0,05$). O tratamento com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $0,09 \pm 0,30$) melhorou os sintomas da colite reduzindo a diarreia, # $p < 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

Figura 19 - Avaliação do escore da presença de sangue nas fezes



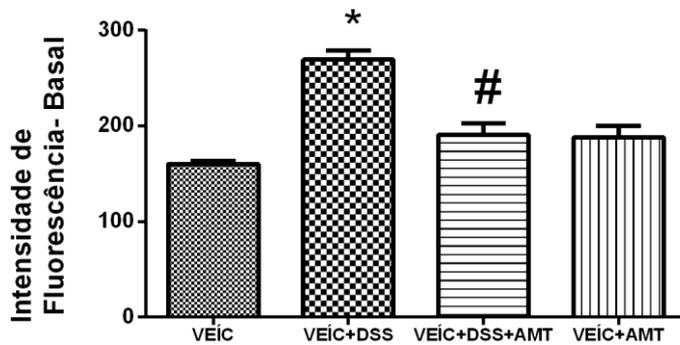
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os animais do grupo VEÍC+DSS ($1,81 \pm 0,60$) apresentaram maior escore de inflamação em relação aos grupos controle (VEÍC=0 e VEÍC+AMT=0). O tratamento com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $0,01 \pm 0,30$) melhorou os sintomas da colite reduzindo a inflamação. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

5.2.4 Burst oxidativo de neutrófilos- modelo profilático

A análise estatística mostrou que há diferenças significantes entre os grupos controles e inflamado e este com o grupo inflamado tratado com AMT, com aumento do burst basal (Figura 20) e o burst induzido por PMA (Figura 21).

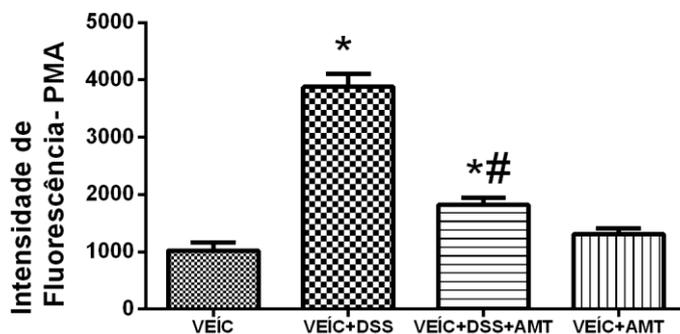
Figura 20 - Quantificação do Burst oxidativo no modelo preventivo da AMT



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEIC+DSS (269,4± 13,7) aumentou significativamente o burst basal em relação aos grupos controle: VEIC (160± 7) e VEIC+AMT (188± 34,5). O grupo VEIC+DSS+AMT (190,7 ± 36,8) reduziu a atividade de neutrófilos sanguíneos em relação ao grupo inflamado (VEIC+DSS). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p< 0,05).

Figura 21 - Quantificação do Burst oxidativo induzido por PMA em modelo preventivo da AMT



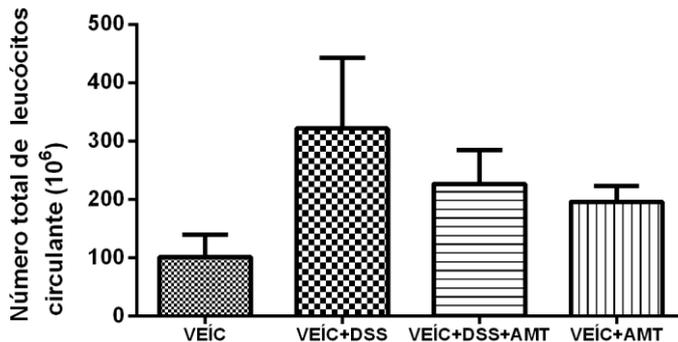
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEIC+DSS (3881±588) aumentou significativamente o Burt basal em relação aos grupos controle: VEIC (1023± 304) e VEIC+AMT (1308± 274). O grupo VEIC+DSS+AMT (1820 ± 354) reduziu a atividade de neutrófilos sanguíneos em relação ao grupo inflamado (VEIC+DSS) e ao grupo controle (VEIC). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p< 0,05).

5.2.5 Contagem do número total de leucócitos circulantes

Não houve diferença estatística entre os grupos na contagem do número total de leucócitos circulantes (Figura 22) no modelo profilático.

Figura 22 - Número total de leucócitos circulantes do sangue



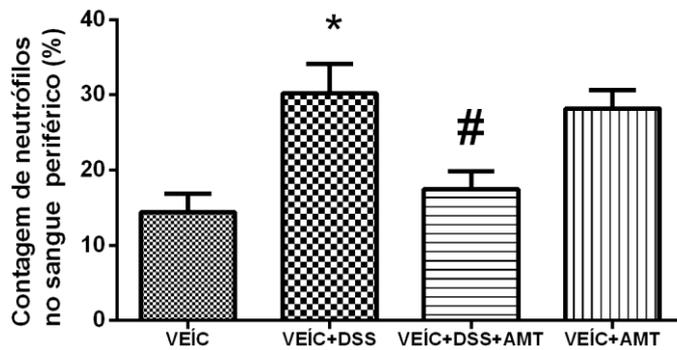
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.2.6 Contagem diferencial de leucócitos (%) circulantes no sangue periférico

A Figura 23 mostra que o grupo inflamado colite- DSS mostrou maior contagem de neutrófilos (%) em relação aos outros grupos controle. O grupo tratado com AMT reverteu a contagem de neutrófilos (%) em relação ao grupo colite- DSS atenuando a gravidade da colite. A Figura 24 o grupo colite- DSS apresentou maior contagem de linfócitos (%) e na contagem de monócitos (%) (Figura 25) não houve diferença estatística.

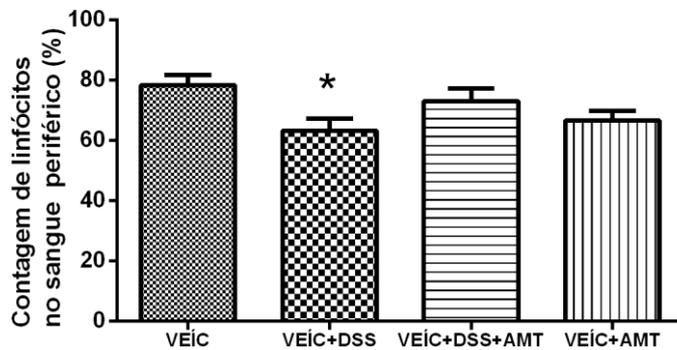
Figura 23 - Contagem de neutrófilos (%) no sangue periférico do modelo preventivo



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS= 30,22± 11,8) diferenciou estatisticamente grupos controle: VEÍC= 14,4± 6,4 e VEÍC+AMT= 28,20± 5,6), * (p <0,05). O grupo inflamado e tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 17,4± 7,2) diferiu do grupo inflamado, reduzindo assim a gravidade da colite, # p>0,05. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p <0,05).

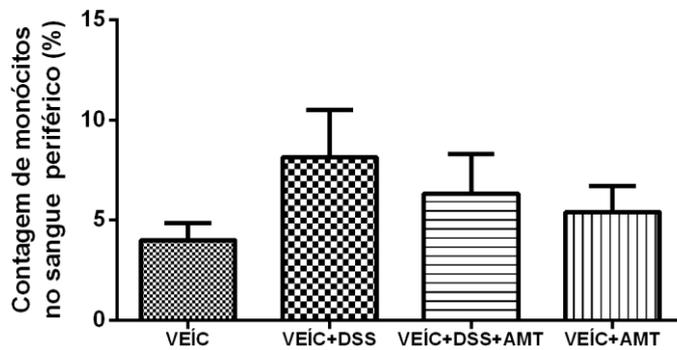
Figura 24 - Contagem de linfócitos no sangue periférico (%) do modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS= 63,14± 10,7) diferenciou estatisticamente dos grupos controle: VEÍC (78,29± 9,1), * (p <0,05). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p <0,05).

Figura 25 - Contagem de monócitos no sangue periférico (%) do modelo profilático



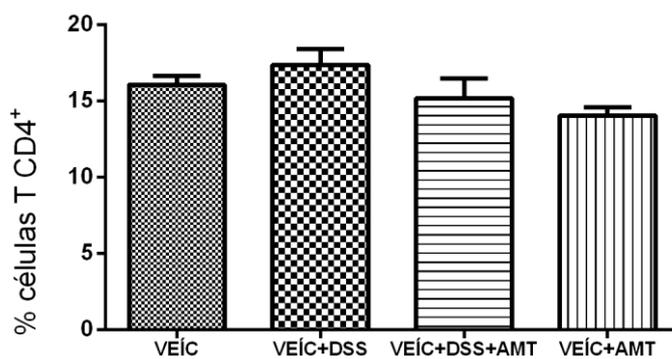
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.2.7 Fenotipagem dos linfócitos $CD4^+$ / $CD8^+$ e monócitos $CD14^+$ circulantes

A fenotipagem dos linfócitos $CD4^+$ / $CD8^+$ e monócitos $CD14^+$ (figuras 26, 27 e 28) não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

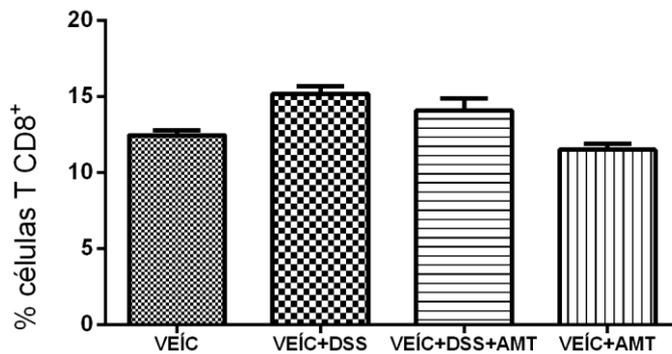
Figura 26 - Fenotipagem dos linfócitos $CD4^+$ no modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

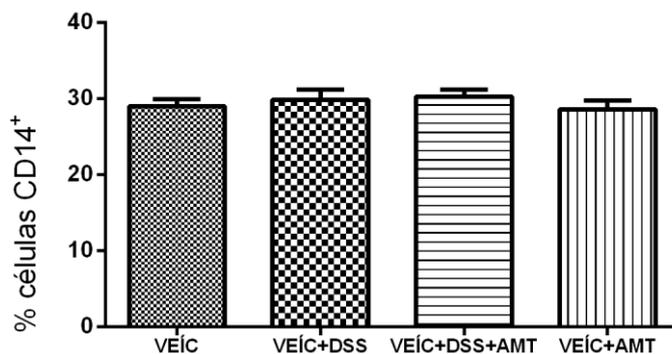
Figura 27 - Fenotipagem dos linfócitos CD8+ no modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 28 - Fenotipagem dos monócitos CD14+ no modelo profilático



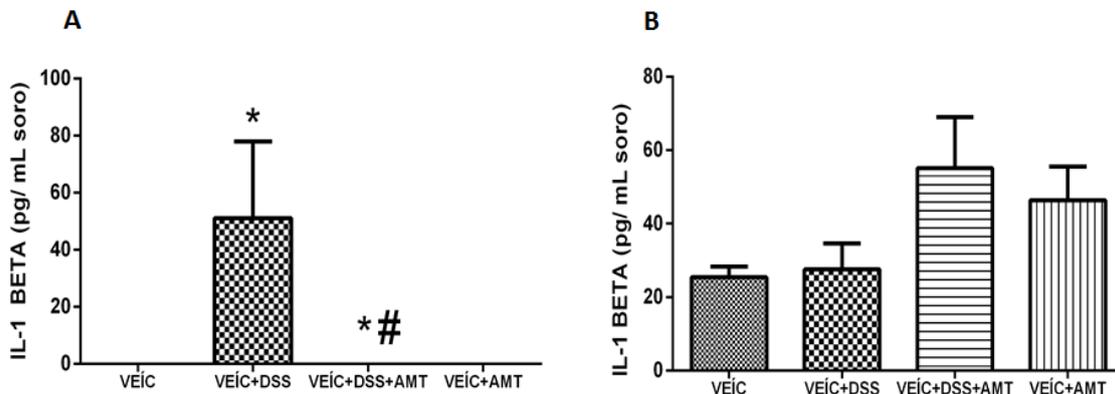
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p>0,05$).

5.2.8 Quantificação dos níveis circulantes de citocinas

A figura 29 ilustra os níveis séricos de IL-1 β dos tratamentos estudados (profilático e terapêutico). O grupo inflamado apresentou maior nível sérico quando comparados com os outros grupos experimentais no modelo profilático, porém no modelo terapêutico não houve diferença estatística.

Figura 29 - Quantificação dos níveis de IL-1 β (Beta) no plasma sanguíneo

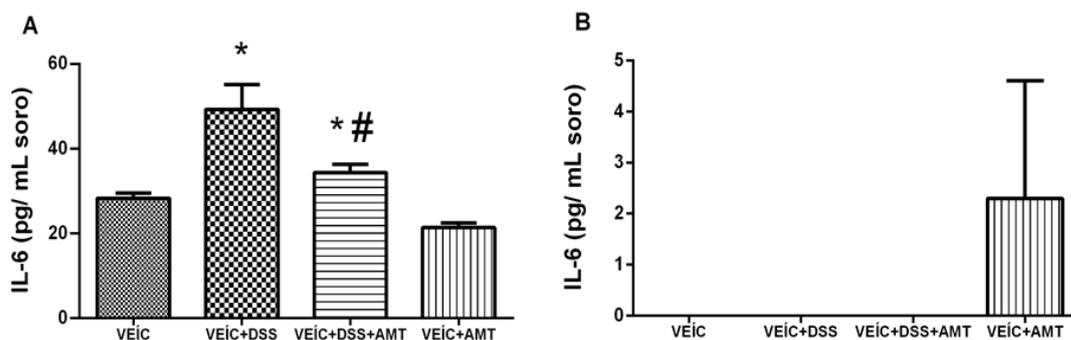


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: (A) Modelo Profilático: O grupo VEÍC+DSS ($51,12 \pm 60$) aumentou significativamente os níveis de IL-1 β em relação aos grupos controle (VEÍC=0 e VEÍC+AMT=0), * $p < 0,05$ e ao grupo tratado VEÍC+DSS+AMT=0), # $p < 0,05$. Os dados mostraram a concentração média \pm S.D. Anova uma via- Teste Newman-Keuls ($p < 0,1$). (B) Modelo Terapêutico: Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os níveis séricos de IL-6 (Figura 30), no modelo profilático aumentaram nos grupos: inflamado e inflamado tratado com AMT. Porém, o modelo profilático reduziu esse aumento quando comparado com o grupo colite- DSS. Enquanto que no modelo terapêutico não mostrou diferença estatística.

Figura 30 - Quantificação dos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo

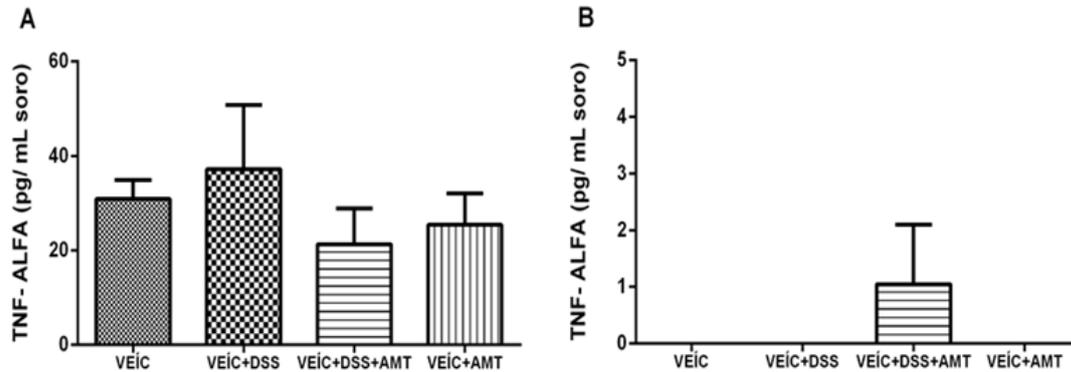


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: (A) Modelo Profilático: Houve aumento estatisticamente significativo de IL-6 no grupo VEÍC+DSS ($49,27 \pm 17$) e do grupo tratado, (VEÍC+DSS+AMT= $34,32 \pm 6$) em relação aos grupos controle (VEÍC= $28,34 \pm 3,24$ e VEÍC+AMT= $21,4 \pm 3$) (* $p < 0,05$). Ainda, (VEÍC+DSS+AMT= $34,32 \pm 6$) foi capaz de prevenir este aumento (# $p < 0,05$) comparado com o grupo VEÍC+DSS nos níveis circulantes desta citocina IL-6 (pg/ mL) no soro dos animais. Os dados mostraram a concentração média \pm S.D. Anova uma via seguida pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$). (B) Modelo Terapêutico: Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Anova uma via- Teste Newman-Keuls ($p > 0,05$).

O modelo profilático não mostrou diferença nos níveis séricos de TNF- α em ambos os modelos experimentais (Figura 31).

Figura 31 - Quantificação dos níveis de TNF- α (alfa) no plasma sanguíneo

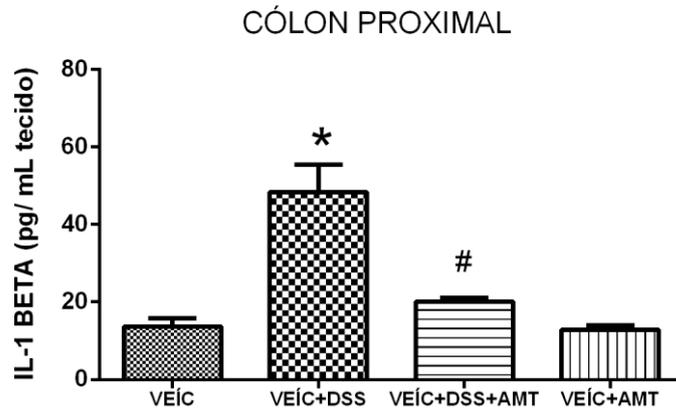


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: (A) Modelo profilático: Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis circulantes de TNF- ALFA (pg / mL) no plasma dos animais. ANOVA uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$). (B) Modelo Terapêutico: Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Anova uma via- Teste Newman- Keuls ($p > 0,05$).

5.2.9 Quantificação de citocinas do cólon proximal - modelo profilático

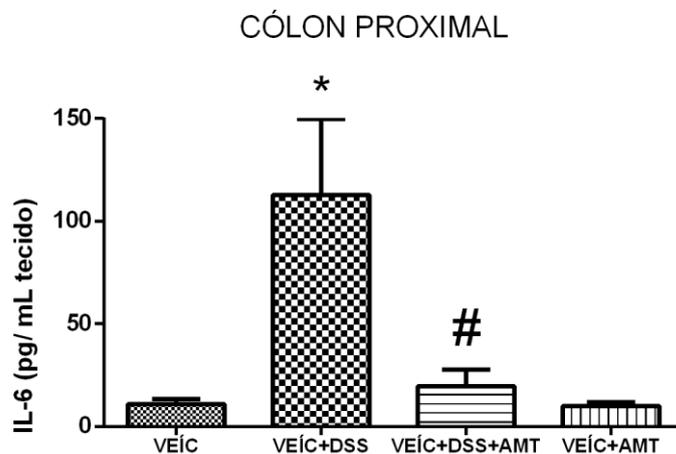
A concentração de IL-1 β (Figura 32), IL-6 (Figura 33) e TNF- α (Figura 34) no cólon proximal e distal aumentaram no grupo inflamado- DSS quando comparado com os grupos controles. Em relação ao grupo inflamado e tratado com AMT, o antidepressivo foi capaz de reverter o aumento dos níveis de destas citocinas no cólon (proximal).

Figura 32 - Concentração de IL-1 β (beta) no cólon proximal modelo profilático

Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: No grupo VEÍC+DSS ($48,3 \pm 17,2$) ocorreu uma maior infiltração de IL-1 beta no cólon em relação aos grupos VEÍC ($16,4 \pm 6,3$) e VEÍC+AMT ($18 \pm 5,7$), $p^* < 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $30,16$) reduziu a concentração de IL-1 β comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p > 0,05$. Os dados mostraram a concentração média \pm S.D., Anova uma via- Test Tukey ($p < 0,05$).

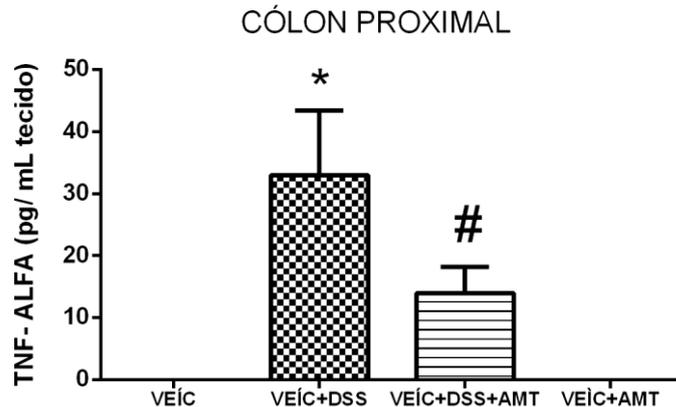
Figura 33 - Concentração de IL- 6 no cólon proximal do modelo profilático



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: A concentração de IL-6 no cólon distal do grupo VEÍC+DSS ($112,8 \pm 90,1$) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = $11 \pm 5,15$ e VEÍC+AMT = $9,1 \pm 4,31$), $p^* < 0,05$. O grupo inflamado tratado (VEÍC+DSS+AMT = $19,9 \pm 20,1$) reduziu a concentração de IL-6 comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p > 0,05$. Os dados mostram a concentração da média \pm S.D. Anova uma via-Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 34 - Concentração de TNF- ALFA na porção proximal do cólon no modelo profilático



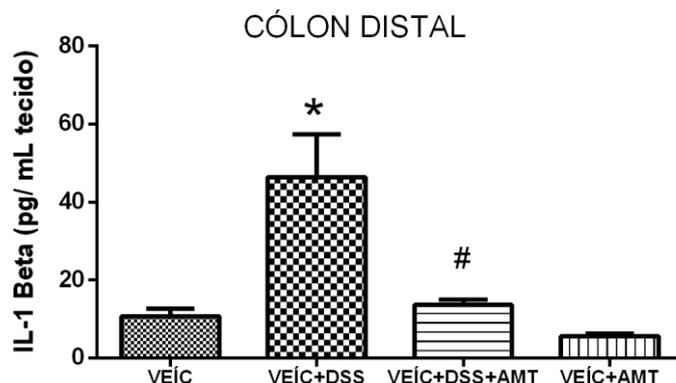
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+ DSS (33± 34,5) foi significativo em relação aos grupos controles (VEÍC=0 e VEÍC+AMT=0), $p^* < 0,05$. O tratamento prévio de AMT (VEÍC+DSS+AMT= 14±14,1) impediu o aumento de TNF-alfa no tecido), # $p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.2.10 Quantificação de citocinas do cólon distal - modelo profilático

A concentração de IL-1 β (Figura 35), IL-6 (Figura 36) e TNF- α (Figura 37) no cólon distal aumentaram no grupo inflamado- DSS quando comparado com os grupos controles. Em relação ao grupo inflamado e tratado com AMT, o antidepressivo foi capaz de reverter o aumento dos níveis de destas citocinas no cólon (distal).

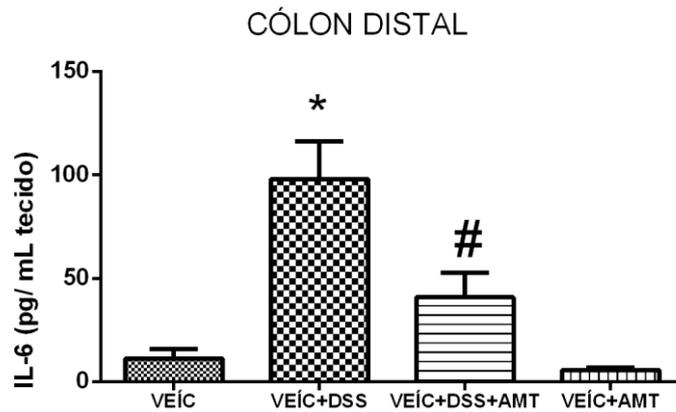
Figura 35 - Concentração de IL-1 beta no cólon distal do modelo profilático de AMT



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo tratado com DSS (VEÍC+DSS= 46±4) resultou em aumento da citocina IL- 1 Beta em relação ao grupo controle VEÍC+AMT (8±4,2), $*p < 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT VEÍC+DSS+AMT=13,7±3) reduziu a concentração de IL-1 Beta comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

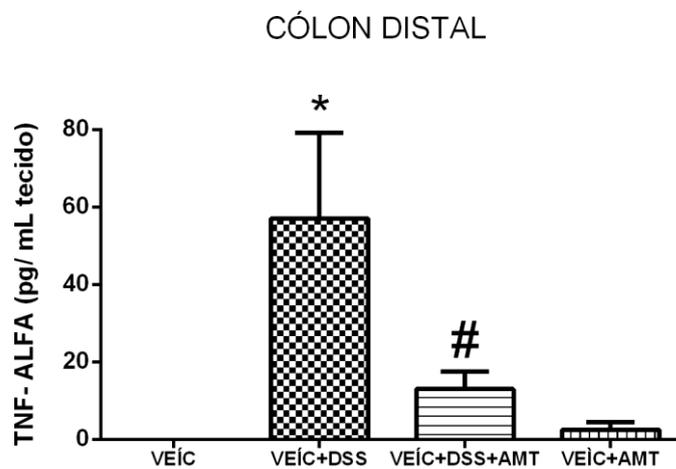
Figura 36 - Concentração de IL- 6 no cólon distal do modelo profilático da AMT



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: A concentração de IL-6 no cólon distal do grupo VEÍC+DSS ($98 \pm 29,3$) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = $9,4 \pm 3$) e VEÍC+AMT = $5,6 \pm 4,11$), $p^* < 0,05$. O grupo (VEÍC+DSS+AMT = $40,9 \pm 49,6$) reduziu a concentração de IL-6 comparado ao grupo colite (VEÍC+ DSS), $\#p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S. D. Anova uma via- Teste deTukey ($p < 0,05$).

Figura 37 - Concentração de TNF- ALFA na porção distal do cólon no modelo profilático



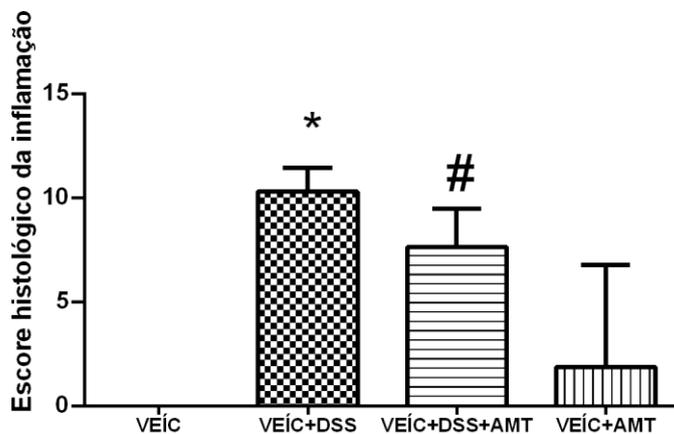
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+ DSS ($57 \pm 60,8$) foi significativo em relação aos grupos controles (VEÍC=0 e VEÍC+AMT= $2,52$), $p^* < 0,05$. O tratamento prévio de AMT (VEÍC+DSS+AMT = $12,9$) impediu o aumento de TNF-alfa no tecido), $\#p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.2.11 Escore histológico - modelo profilático

O escore histológico baseado em CHEN et al., (2008) mostrou a presença do processo inflamatório evidente no grupo colite- DSS. Esse estudo utilizou a AMT que atenuou a inflamação do cólon (Figura 38).

Figura 38 - Escore histológico da inflamação do modelo profilático



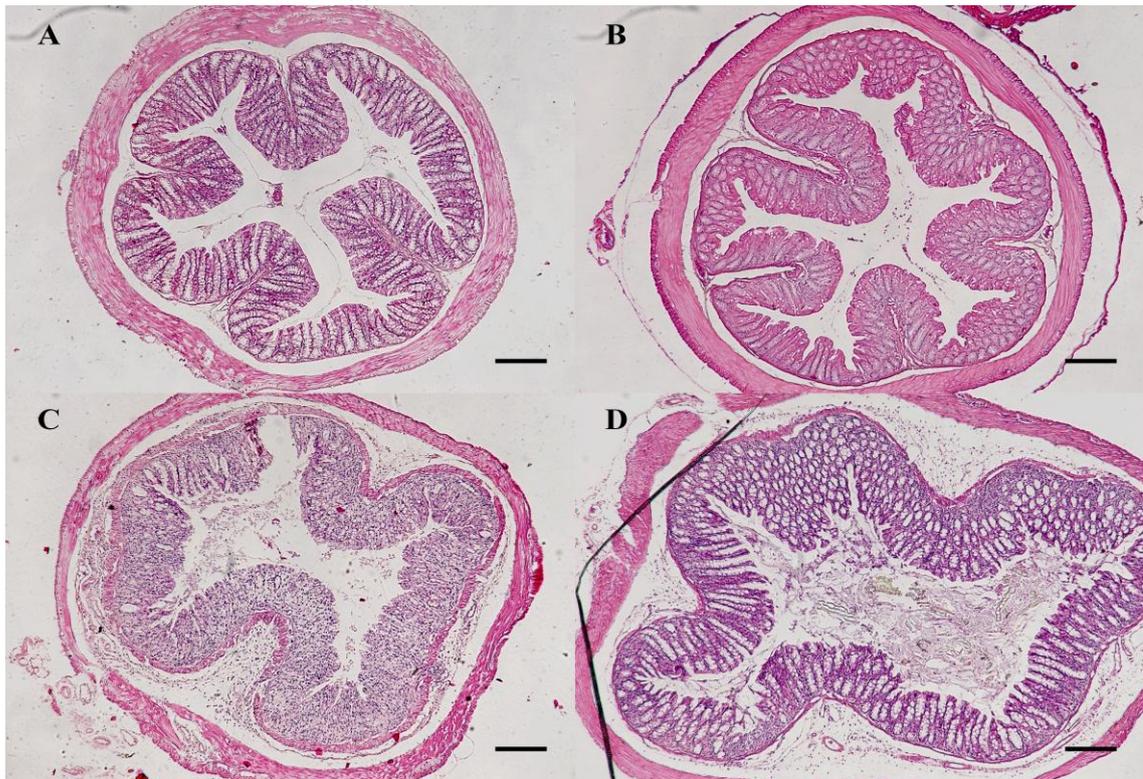
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS= 10,3± 1,1) diferiu estatisticamente dos grupos controle (VEÍC= 0 e VEÍC+AMT= 1,85± 5). O grupo tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 7,62± 1,9) reverteu ao aumento da inflamação atenuando a colite. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Test de Tukey (p< 0,05).

5.2.12 Caracterização histopatológica do cólon- modelo profilático

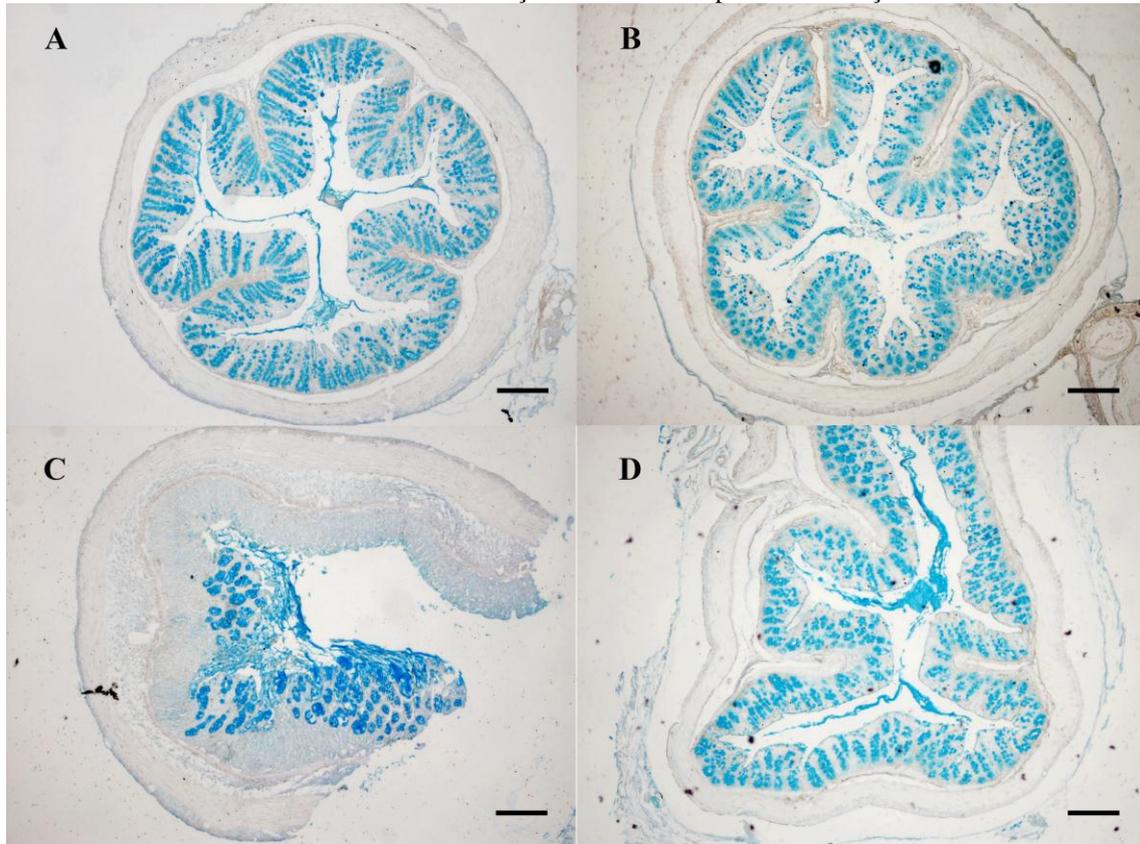
O corte histológico de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite- DSS, na coloração por H&E. evidencia bem o efeito anti- inflamatório da AMT em relação ao grupo colite- DSS (Figuras 39, 41 e 42). A coloração de alcian blue para evidenciação de muco destaca a sua redução no grupo inflamado e que o tratamento com AMT conseguiu uma perda mais branda (Figuras 40 e 43).

Figura 39 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite DSS



Fonte: NAMAZU (2015). Legenda: Coloração de H&E. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal; (B) Animal do grupo tratado com AMT, não inflamado, com morfologia inalterada; (C) Animal do grupo DSS que recebeu veículo da AMT, apresentando perda da arquitetura normal e infiltrado inflamatório marcante; (D) Animal do grupo DSS+AMT no qual houve redução da gravidade do quadro de colite. Barra de escala = 200 micrometros.

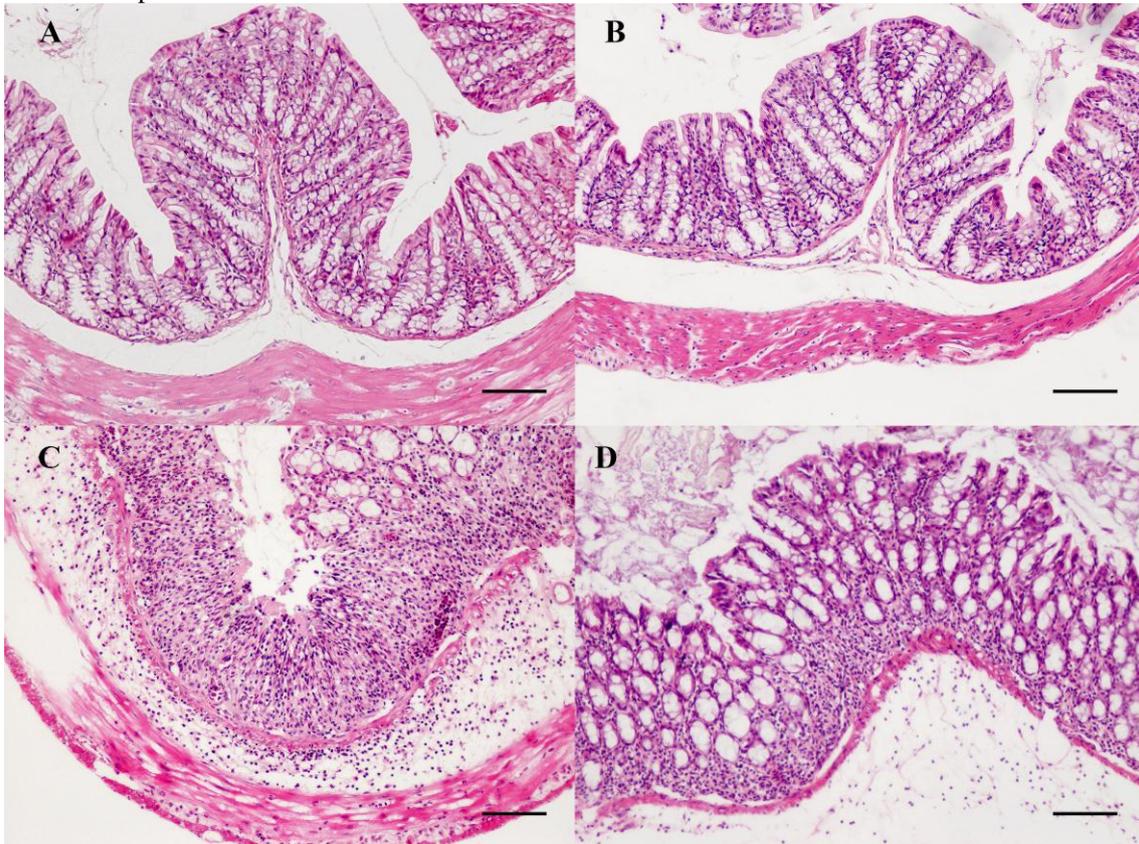
Figura 40 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite - DSS. Coloração de alcian blue para evidenciação de muco



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de alcian blue para evidenciação de muco. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal; (B) Animal do grupo tratado com AMT, não inflamado, com morfologia inalterada; (C) Animal do grupo DSS que recebeu veículo da AMT, apresentando redução da marcação de muco em toda a extensão, particularmente na porção mais inflamada; (D) Animal do grupo DSS+AMT no qual houve perda mais branda de muco. Barra de escala = 200 micrometros.

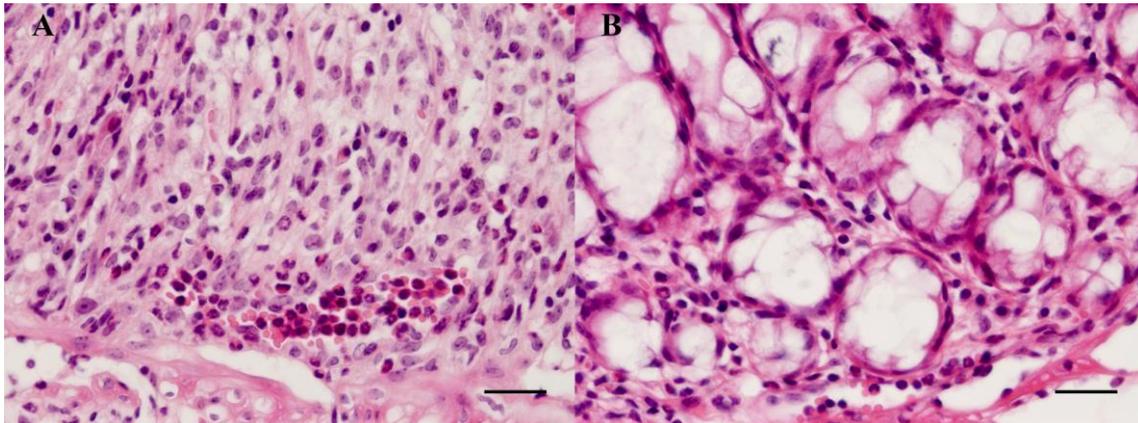
Figura 41- Detalhes de cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite- DSS



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de H&E. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal, com mucosa repleta de células produtoras de muco, submucosa delicada, circunscrita por camada muscular; (B) Animal do grupo AMT apresentando morfologia semelhante; (C) Animal do grupo DSS apresentando inflamação grave, transmural, tomando toda a extensão da mucosa, submucosa e infiltrando a camada muscular, distorcendo por completo sua arquitetura; (D) Animal do grupo DSS tratado com AMT apresentando infiltrado inflamatório moderado na camada basal da mucosa, com discreto infiltrado na submucosa e sem comprometimento da camada muscular; a arquitetura da mucosa está relativamente preservada. Barra de escala = 100 micrometros.

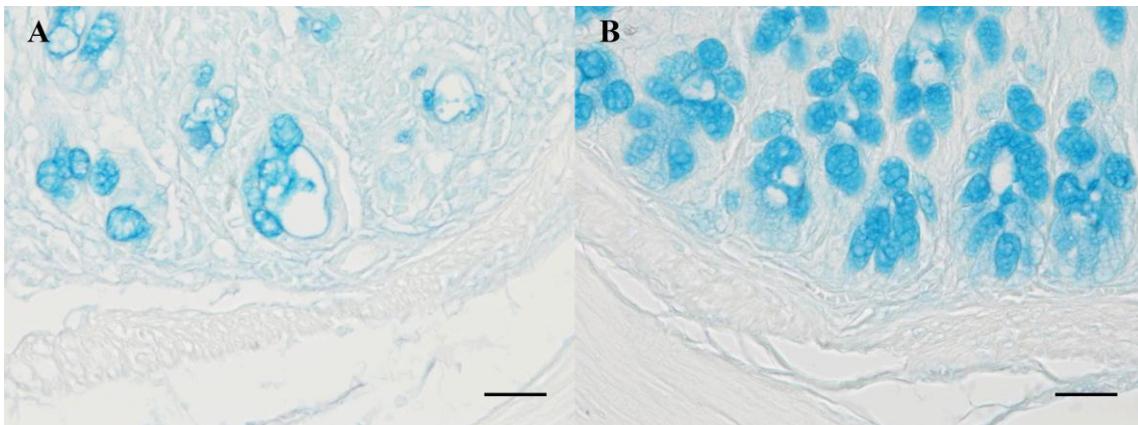
Figura 42- Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de DSS-colite



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de H&E. (A) Animal do grupo DSS mostrando severa perda da arquitetura de toda a extensão da camada mucosa, com marcante infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos, culminando com a perda total da organização do epitélio e células produtoras de muco; (B) Animal do grupo DSS tratado com AMT em que se nota infiltrado discreto de neutrófilos na camada basal do epitélio em que não se nota alteração importante da arquitetura e organização teciduais. Barra de escala = 20 micrometros.

Figura 43- Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento profilático com AMT em modelo de colite- DSS



Fonte: NAMAZU (2015).

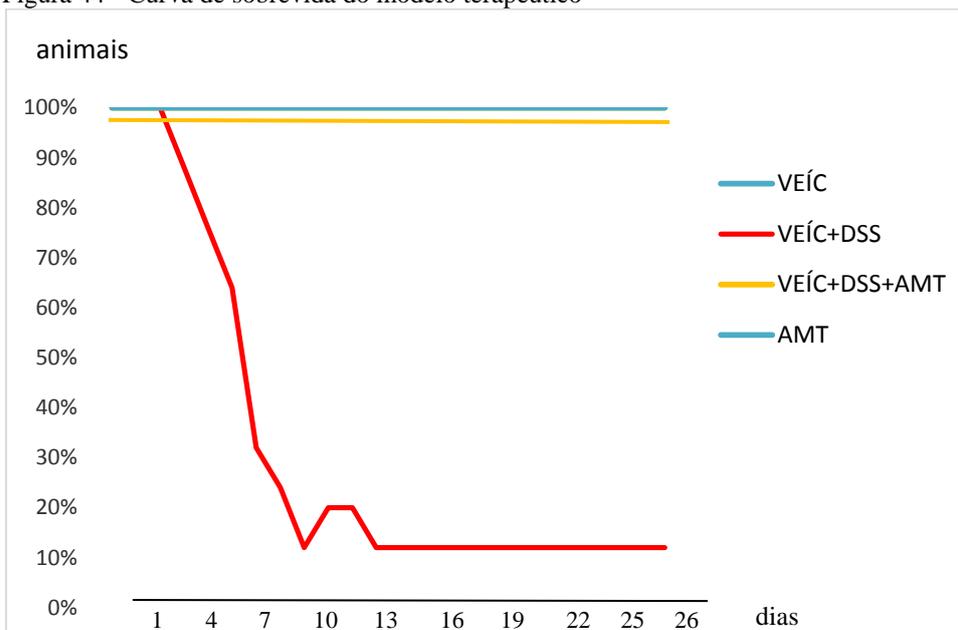
Legenda: Coloração de alcian blue para evidenciação de muco. (A) Animal do grupo controle exemplificando perda da produção de muco característica da colite; (B) Animal do grupo tratado com AMT, não inflamado, com produção semelhante a de animal controle; Barra de escala = 20 micrometros.

5.3 MODELO TERAPÊUTICO

5.3.1 Curva de sobrevivência

No modelo terapêutico, a curva de sobrevivência mostrou que houve perda considerável dos animais do grupo inflamado (VEÍC+DSS) e os grupos controle e tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT) não sofreu nenhuma perda de animal. Este gráfico (Figura 44) mostra que houve perda de 88% dos animais do grupo inflamado tratado com DSS.

Figura 44 - Curva de sobrevivência do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

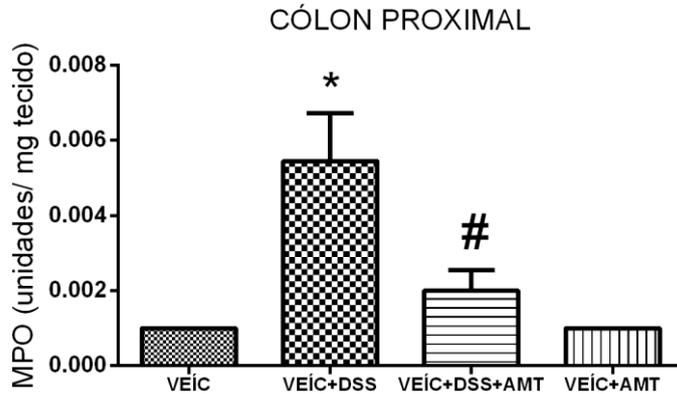
Legenda: VEÍC: animais controle; VEÍC+DSS: animais do grupo inflamado; VEÍC+DSS+AMT: animais do grupo inflamado tratados com AMT e; AMT: grupo controle AMT.

5.3.2 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase

A administração terapêutica de AMT após tratamento DSS mostrou que na porção proximal impediu o infiltrado neutrofílico encontrado no grupo colite-DSS (Figura 45). A AMT reverteu a infiltração de neutrófilos, na porção distal do cólon no modelo

terapêutico (Figura 46). Estes resultados sugerem que AMT impediu a infiltração de neutrófilos no cólon (porção proximal e distal), característica da inflamação aguda (colite-DSS).

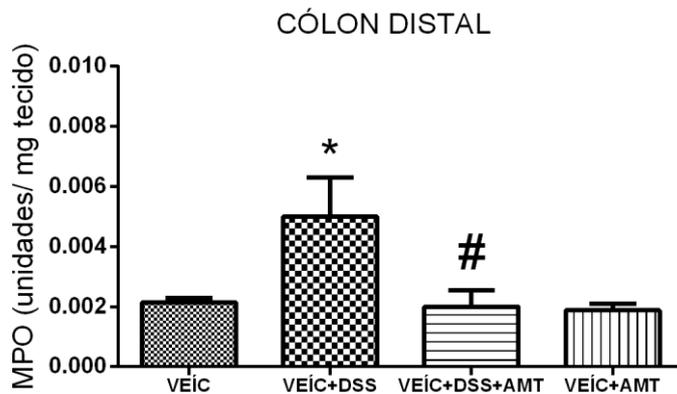
Figura 45 - Modelo terapêutico da AMT na atividade da enzima MPO no cólon proximal



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Enquanto o grupo VEÍC+DSS ($0,005 \pm 0,002$) mostrou um aumento da MPO no tecido do cólon em comparação com amostras não inflamadas (VEÍC= 0,001 ou VEÍC +AMT= 0,001) (* $p < 0,05$). A administração de AMT (VEÍC+DSS + AMT= $0,002 \pm 0,001$) reduziu parcialmente o aumento da atividade da MPO (# $p < 0,05$) comparado com o grupo (VEÍC+DSS). Os dados mostram a concentração média \pm S.D., Anova uma via- Teste Tukey ($p < 0,05$).

Figura 46 - Modelo terapêutico da AMT na atividade da enzima MPO no cólon distal



Fonte: NAMAZU (2015).

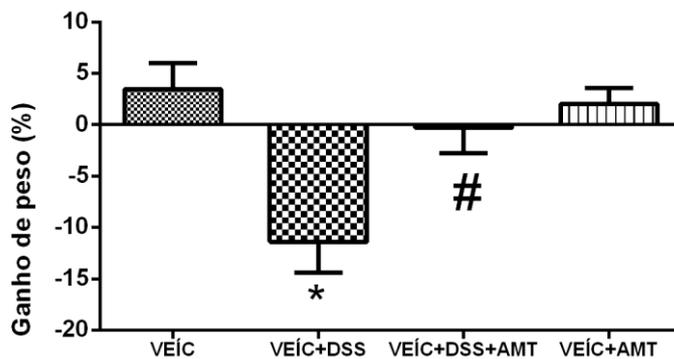
Legenda: Enquanto o grupo VEÍC+DSS ($0,005 \pm 0,003$) mostrou um aumento da MPO no tecido do cólon em comparação com amostras não inflamadas (VEÍC= 0,002 ou VEÍC +AMT= 0,0018) (* $p < 0,05$). A administração de AMT (VEÍC+DSS + AMT= $0,002 \pm 0,0012$) reduziu parcialmente o aumento da atividade da MPO (# $p < 0,05$) comparado com o grupo (VEÍC+DSS). Os dados mostram a concentração média \pm S.D Anova uma via- Teste Tukey ($p < 0,05$).

5.3.3 Avaliação dos índices clínicos- modelo terapêutico

A administração terapêutica de AMT após o tratamento DSS parcialmente impediu a redução do ganho de peso (%) quando comparado ao grupo colite-DSS (Figura 47). Este resultado sugere que AMT impediu um dos principais sintomas característicos de colite-DSS, reduzindo sua gravidade.

Após a coleta do cólon do animal, este foi medido com uma régua para ser avaliado comprimento do cólon (Figura 48). O grupo inflamado e o grupo tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT) reduziram o comprimento do cólon quando comparado com os grupos controles (VEÍC e VEÍC+AMT).

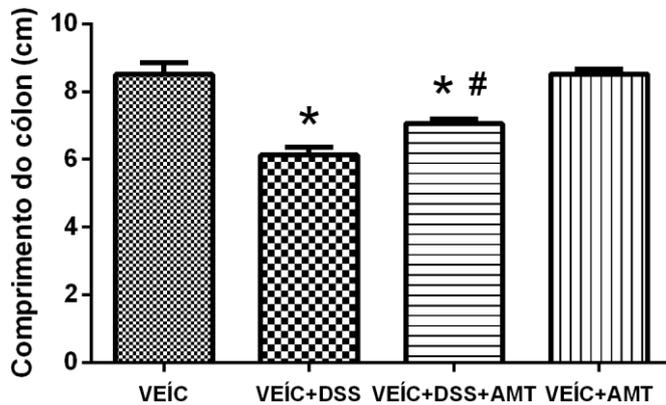
Figura 47 - Ganho de peso (%) dos animais no Modelo Terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+DSS (-11,4 ± 6,77) diminuiu o seu ganho de peso (%) em relação aos grupos controle (VEÍC = 3,47 ± 6,69 e VEÍC+AMT = 2 ± 4,50). O grupo VEÍC+DSS+AMT (-0,3 ± 5,416) diferenciou do grupo inflamado VEÍC+DSS. Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste Tukey, (p < 0,05).

Figura 48 - Comprimento do cólon no Modelo Terapêutico

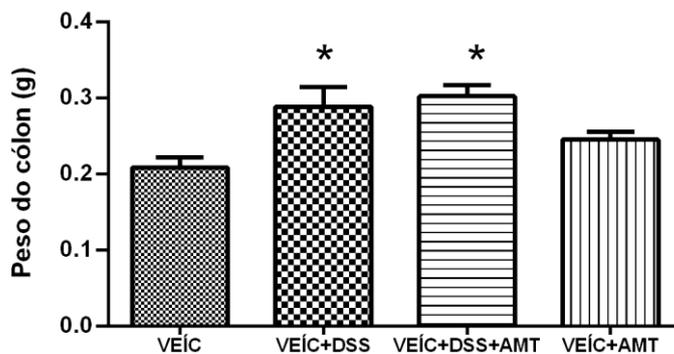


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os grupos VEÍC+DSS ($6,1 \pm 0,25$) e +DSS+AMT ($7,06 \pm 0,45$) diferiram estatisticamente quando comparados aos grupos controle (VEÍC = $8,5 \pm 0,75$ e VEÍC+AMT = $8,5 \pm 0,57$) (* $p < 0,05$). Ainda o grupo VEÍC+DSS foi diferente estatisticamente em relação ao grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT) (# $p < 0,05$). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste Tukey, ($p < 0,05$).

A análise estatística mostrou que o peso do cólon (figura 49) dos animais do grupo colite (VEÍC+DSS) aumentou em relação aos dos animais do grupo controle VEÍC e VEÍC+AMT, porém o grupo tratado com AMT atenuou esse parâmetro em relação ao grupo inflamado.

Figura 49 - Peso do cólon no Modelo Terapêutico

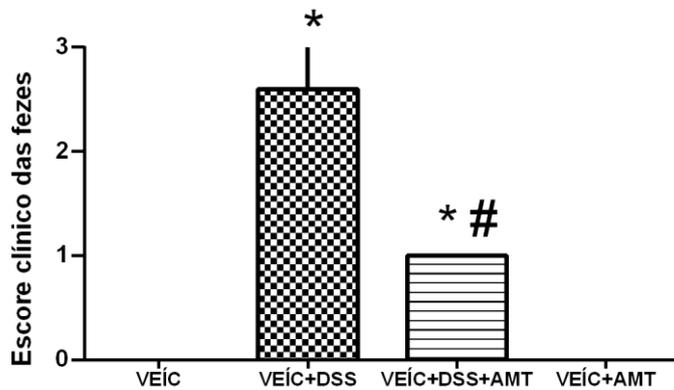


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os grupos VEÍC+DSS ($0,29 \pm 0,06$) e VEÍC+DSS +AMT ($0,30 \pm 0,03$) diferiram apenas do grupo controle VEÍC ($0,22 \pm 0,04$). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O escore realizado do conteúdo do cólon foi realizado para avaliar a consistência das fezes (Figura 50) e presença de sangue nas fezes (Figura 51) Em todos os escores, o tratamento terapêutico amenizou a gravidade do modelo de colite.

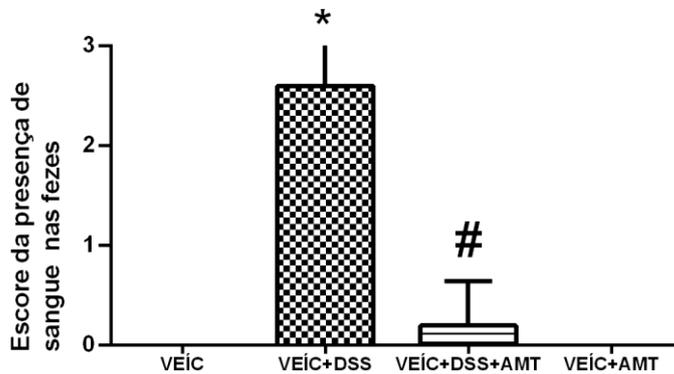
Figura 50 - Escore clínico das fezes na avaliação macroscópica do cólon



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os animais do grupo VEÍC+DSS ($2,6 \pm 0,9$) e (VEÍC+DSS+AMT= 1 ± 1) apresentaram maior escore estatístico clínico das fezes em relação aos grupos controle (VEÍC=0 e VEÍC+AMT=0), (* $p < 0,05$). O tratamento com AMT (VEÍC+DSS+AMT) melhorou os sintomas da colite reduzindo a diarreia, # $p < 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Newman- Keuls ($p < 0,05$).

Figura 51 - Avaliação do escore da presença de sangue nas fezes



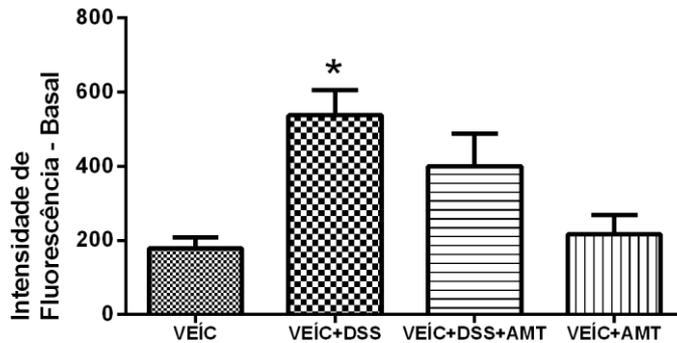
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Os animais do grupo VEÍC+DSS ($2,6 \pm 0,9$) apresentaram maior escore da presença de sangue nas fezes em relação aos grupos controle (VEÍC=0 e VEÍC+AMT=0). O tratamento com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 1 ± 1) melhorou os sintomas da colite reduzindo a inflamação. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Newman- Keuls, ($p < 0,05$).

A análise estatística mostrou que há diferenças significantes entre os grupos controles e inflamado e este com o grupo inflamado tratado com AMT, com aumento do Burst basal (Figura 52) e o Burst induzido por PMA, porém o grupo tratado com AMT reduziu o Burst- PMA (Figura 53).

5.3.4 Burst oxidativo de neutrófilos- modelo terapêutico

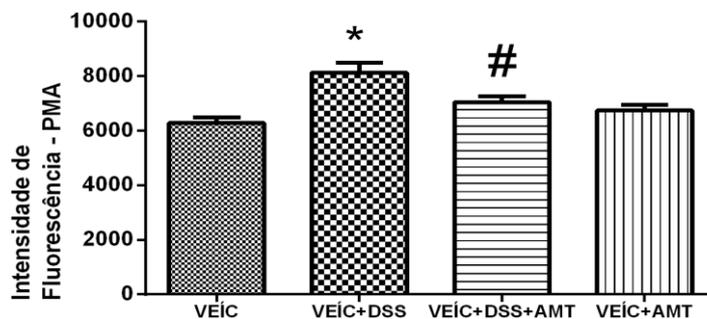
Figura 52 - Quantificação do Burst oxidativo no modelo terapêutico da AMT



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+DSS (537,74±116,3) aumentou significativamente o burst basal em relação aos grupos controle: VEÍC (178,4±57,2) e VEÍC+AMT (216±149). Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p< 0,05).

Figura 53 - Quantificação do Burst oxidativo induzido por PMA no modelo terapêutico



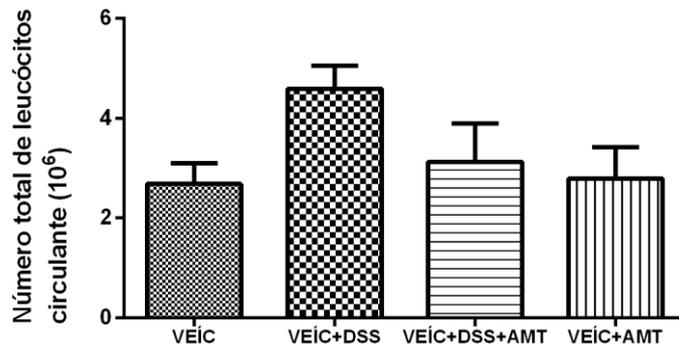
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo VEÍC+DSS (8129±639,6) aumentou significativamente o burst induzido por PMA em relação aos grupos controle: VEÍC (6273±263) e VEÍC+AMT (6732,2±331,2). O grupo VEÍC+DSS+AMT (7048± 283) reduziu a atividade de neutrófilos sanguíneos em relação ao grupo inflamado (VEÍC+DSS). Os dados mostram a concentração média +/- S.D Anova uma via- Teste Tukey (p< 0,05).

5.3.5 Contagem do número total de leucócitos circulantes do sangue

Não houve diferença estatística significativa na contagem total do número total de leucócitos (Figura 54) entre os grupos estudados.

Figura 54 - Número total de leucócitos circulantes do sangue



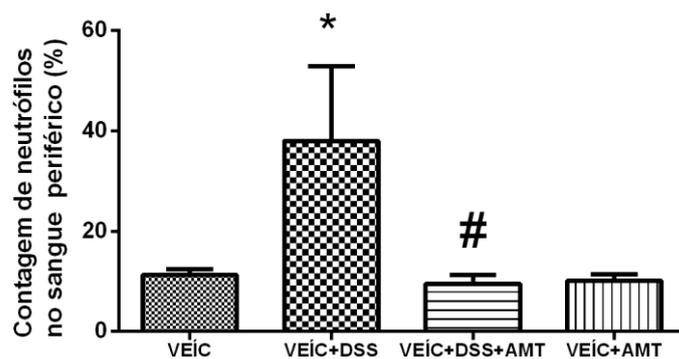
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.6 Contagem da porcentagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos circulantes do sangue

Na contagem de (%) neutrófilos e linfócitos circulantes (Figura 55 e 56), a AMT atenuou esse parâmetro, apesar de que o número de monócitos (Figura 57) não mostrou diferença estatística entre os grupos estudados.

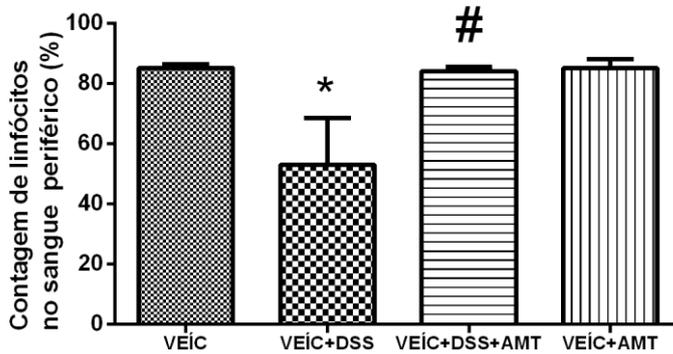
Figura 55 - Contagem de neutrófilos no sangue periférico do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS= 38± 26) diferenciou estatisticamente dos grupos controle: VEÍC= 11,3± 3,1 e VEÍC+AMT= 9,5± 3,2), * ($p < 0,05$). O grupo inflamado e tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 9,5± 4,3) diferiu do grupo inflamado, reduzindo assim a gravidade da colite, # $p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

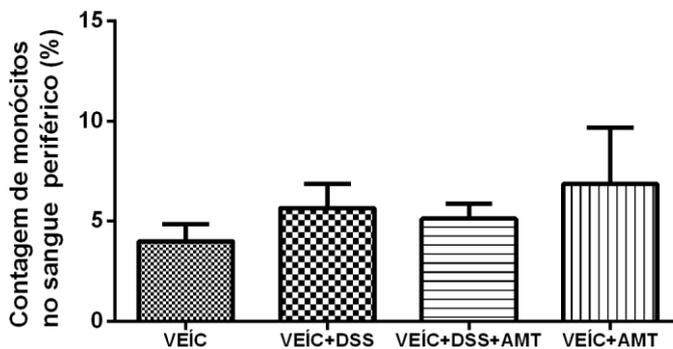
Figura 56 - Contagem de linfócitos no sangue periférico do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS= 53± 27) diferenciou estatisticamente dos grupos controle: VEÍC= 85,3± 3,25 e VEÍC+AMT= 85,1± 7,4), * (p <0,05). O grupo inflamado e tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 84,1± 2) diferiu do grupo inflamado, reduzindo assim a gravidade da colite, # p>0,05. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p <0,05).

Figura 57 - Contagem de monócitos no sangue periférico do modelo terapêutico



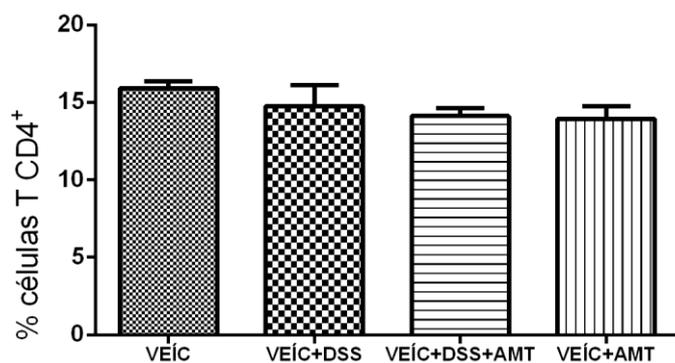
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey (p > 0,05).

5.3.7 Fenotipagem dos linfócitos CD4⁺/ CD8⁺ e monócitos CD14⁺

A fenotipagem dos linfócitos CD4⁺/ CD8⁺ e monócitos CD14⁺ (Figuras 58, 59 e 60) não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

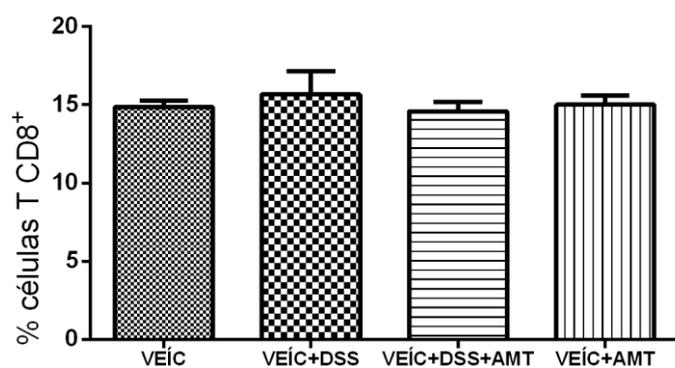
Figura 58 - Fenotipagem dos linfócitos CD4+ no modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

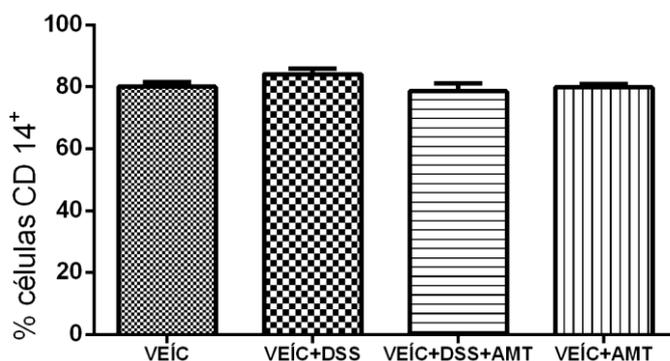
Figura 59 - Fenotipagem dos linfócitos CD8+ no modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 60 - Fenotipagem dos monócitos CD14+ no modelo terapêutico



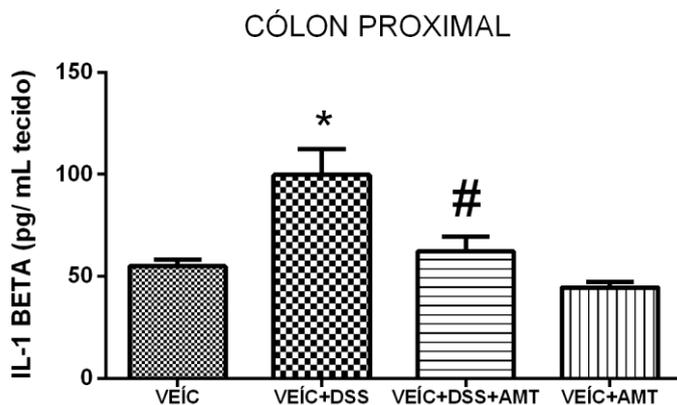
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Não houve diferença estatística entre os grupos. Anova uma via- Teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.3.8 Quantificação dos níveis de citocinas no cólon proximal- modelo terapêutico

A concentração de IL-1 β (Figura 61), IL-6 (Figura 62) e TNF- α (Figura 63) no cólon proximal aumentaram no grupo inflamado-DSS quando comparado com os grupos controles. Em relação ao grupo inflamado e tratado com AMT, o antidepressivo foi capaz de reverter o aumento dos níveis destas citocinas no cólon (proximal).

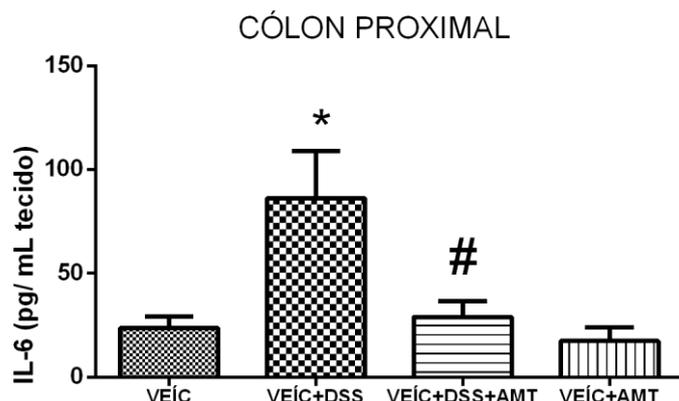
Figura 61 - Concentração de IL-1 Beta no cólon proximal no modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: No grupo (VEÍC+DSS (100 \pm 13) ocorreu uma maior infiltração de IL-1 beta no cólon em relação aos grupos VEÍC (55 \pm 10) e VEÍC+AMT (44,5 \pm 9,7), $p^* < 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 62,3 \pm 22,5) reduziu a concentração de IL-1 β comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p > 0,05$. Os dados mostram a concentração média \pm S.D. Anova uma via- Teste de Tukey ($p < 0,05$).

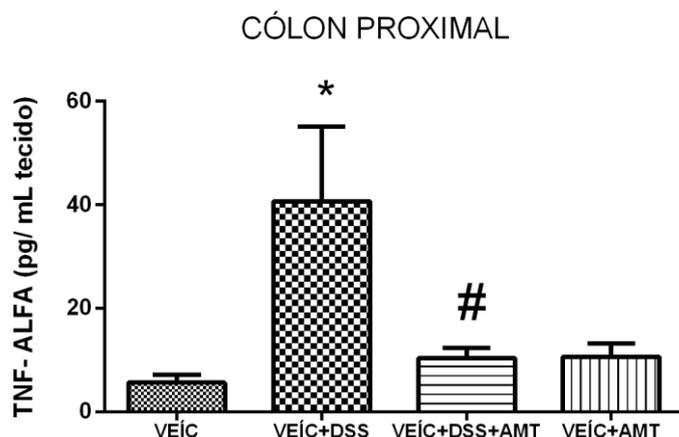
Figura 62 - Concentração de IL- 6 no cólon proximal do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: A concentração de IL-6 no cólon distal do grupo VEÍC+DSS ($86,4 \pm 40$) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = $23,7 \pm 9,7$ e VEÍC+AMT = $17,6 \pm 11,4$), $p^* > 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $29,1 \pm 17,1$) reduziu a concentração de IL-6 comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p < 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Figura 63 - Concentração de TNF- ALFA no cólon proximal do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

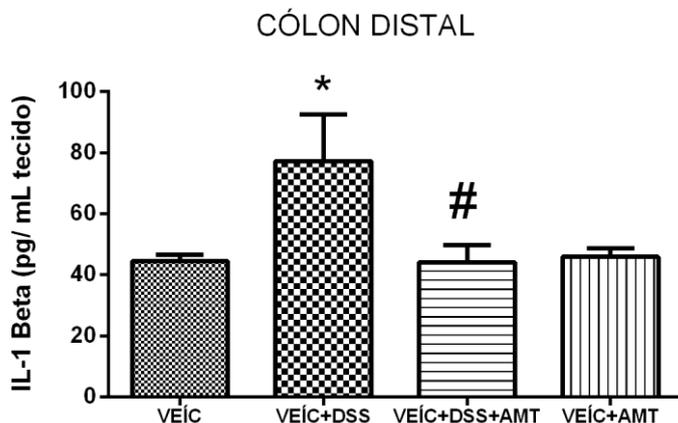
Legenda: A concentração de TNF-ALFA no cólon distal do grupo VEÍC+DSS ($40,67 \pm 25,1$) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = $5,7 \pm 2,3$) e VEÍC+AMT = $10,64 \pm 6,06$), $p^* < 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $10,42 \pm 3,5$) reduziu a concentração de TNF- ALFA comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p < 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Test Tukey ($p < 0,05$).

5.3.9 Quantificação dos níveis de citocinas no cólon distal- modelo terapêutico

A concentração de IL-1 β (Figura 64), IL-6 (Figura 65) e TNF- α (Figura 66) no cólon distal aumentaram no grupo inflamado-DSS quando comparado com os grupos controles. Em relação ao grupo inflamado e tratado com AMT, o antidepressivo foi capaz de

reverter o aumento dos níveis destas citocinas no cólon (distal).

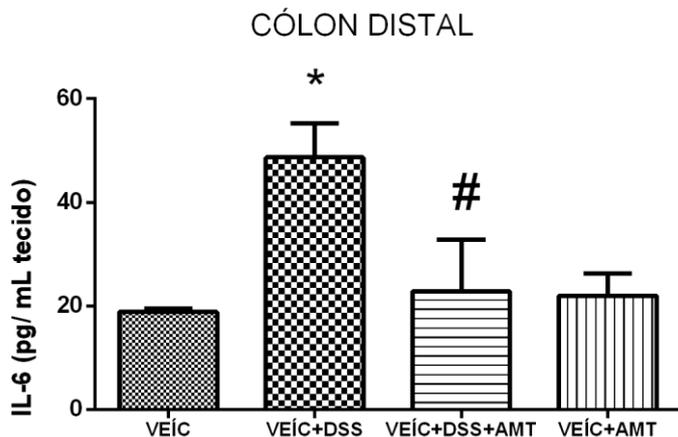
Figura 64 - Concentração de IL-1 beta no cólon distal do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo tratado com DSS (VEÍC+DSS= 77,3±26,5) resultou em aumento da citocina IL-1 beta em relação aos grupos controle VEÍC (44,5±4,8) e VEÍC+AMT (42,8±7,4) *p<0,05. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT=44,1± 12,6) reduziu a concentração de IL-1 β comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # p<0,05. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Teste de Tukey (p 0,05).

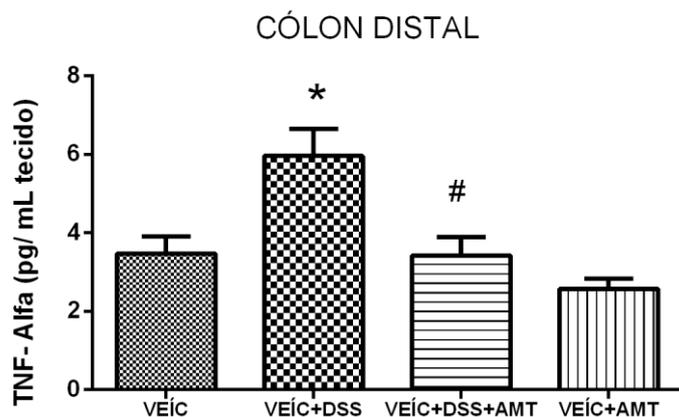
Figura 65- Concentração de IL- 6 no cólon distal do modelo terapêutico



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: A concentração de IL-6 no cólon distal do grupo VEÍC+DSS (48,7±16) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = 19± 0,5) e (VEÍC+AMT= 22± 4,6), p*<0,05. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT= 22,3± 22,7) reduziu a concentração de TNF- ALFA comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # p<0,05. Os dados mostram a concentração média +/- S. D. Anova uma via- Test Tukey (p <0,05).

Figura 66 - Concentração de TNF- Alfa no cólon distal do modelo terapêutico

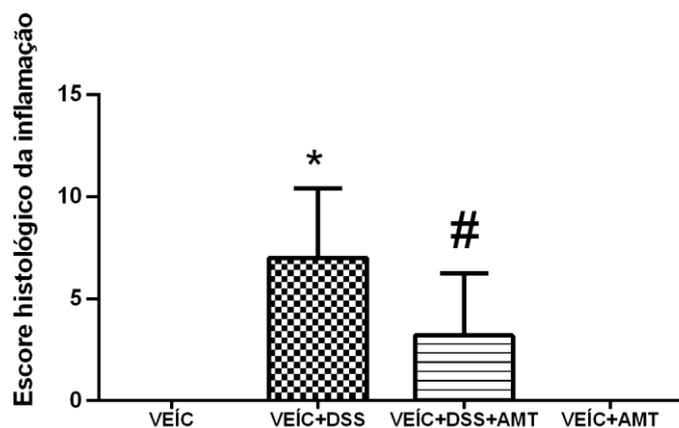


Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: A concentração de TNF-ALFA no cólon distal do grupo VEÍC+DSS ($6 \pm 1,55$) aumentou em relação aos grupos controle (VEÍC = $3,5 \pm 1,0$) e VEÍC+AMT = $2,56 \pm 0,56$), $p < 0,05$. O grupo inflamado tratado com AMT (VEÍC+DSS+AMT = $3,4 \pm 1,1$) reduziu a concentração de TNF- ALFA comparado ao grupo colite (VEÍC+DSS), # $p < 0,05$. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Test de Tukey ($p < 0,05$).

5. 3.10 Escore histológico - modelo terapêutico

Figura 67 - Escore histológico da inflamação do modelo terapêutico



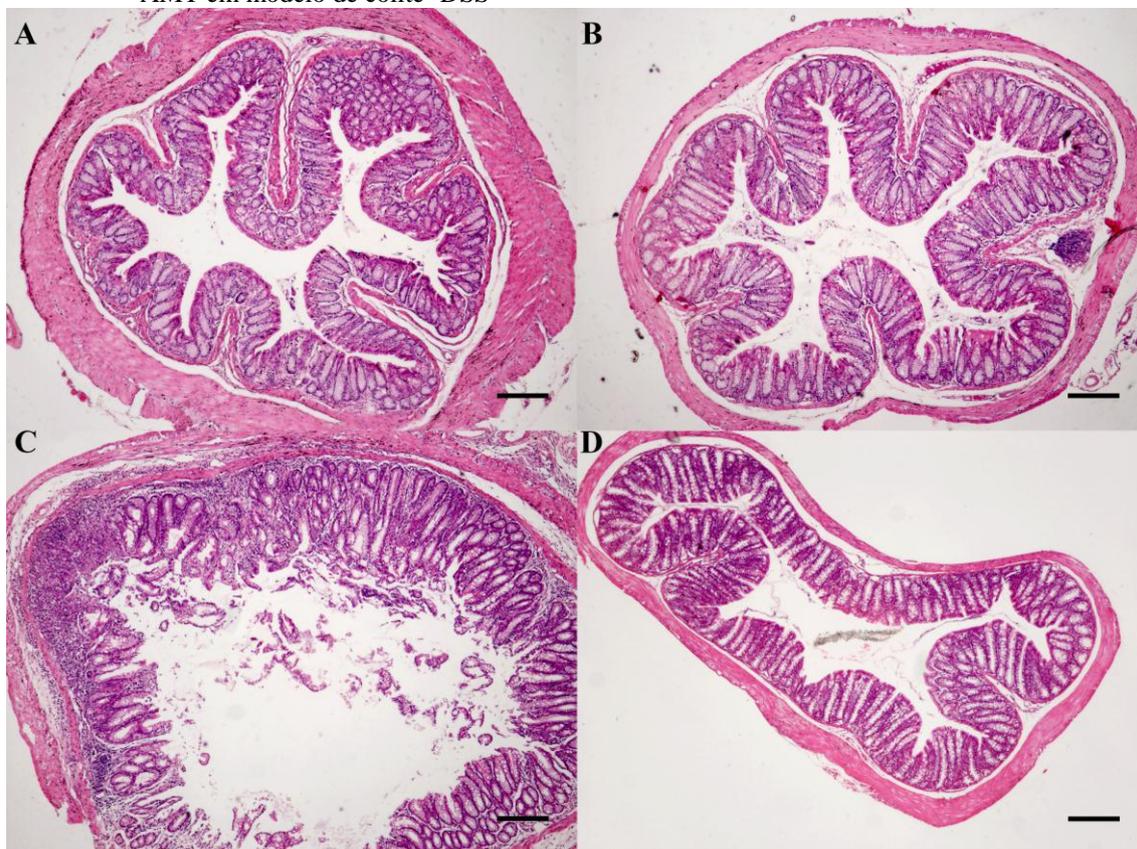
Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: O grupo inflamado (VEÍC+DSS = $7 \pm 3,4$) diferiu estatisticamente dos grupos controle VEÍC = 0 e VEÍC+AMT = 0). O grupo tratado com AMT (VEÍC+DSS+ AMT = $3,2 \pm 3,03$) reduziu o escore da inflamação atenuando a colite. Os dados mostram a concentração média +/- S.D. Anova uma via- Test de Tukey ($p < 0,05$).

5.3.11 Caracterização histopatológica do cólon

O corte histológico de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS, na coloração por H&E, mostra o efeito anti- inflamatório da AMT em relação ao grupo colite- DSS (Figuras 68 e 70). A coloração de alcian blue para evidenciação de muco destaca a sua redução no grupo inflamado e que o tratamento com AMT conseguiu uma perda mais branda (Figuras 69).

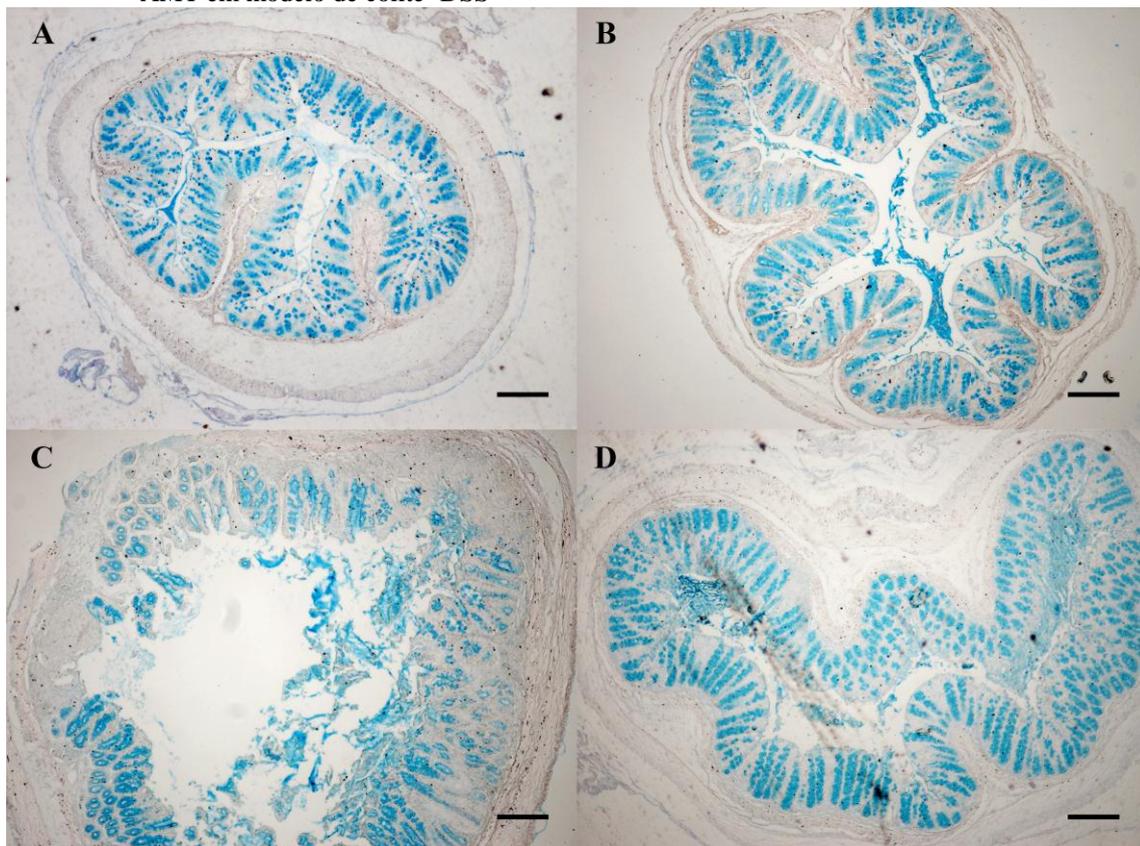
Figura 68 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de H&E. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal; (B) Animal do grupo tratado com AMT, não inflamado, com morfologia inalterada; (C) Animal do grupo DSS que recebeu veículo da AMT, apresentando perda da arquitetura normal e infiltrado inflamatório marcante; (D) Animal do grupo DSS+AMT no qual houve redução da gravidade do quadro de colite. Barra de escala = 200 micrometros.

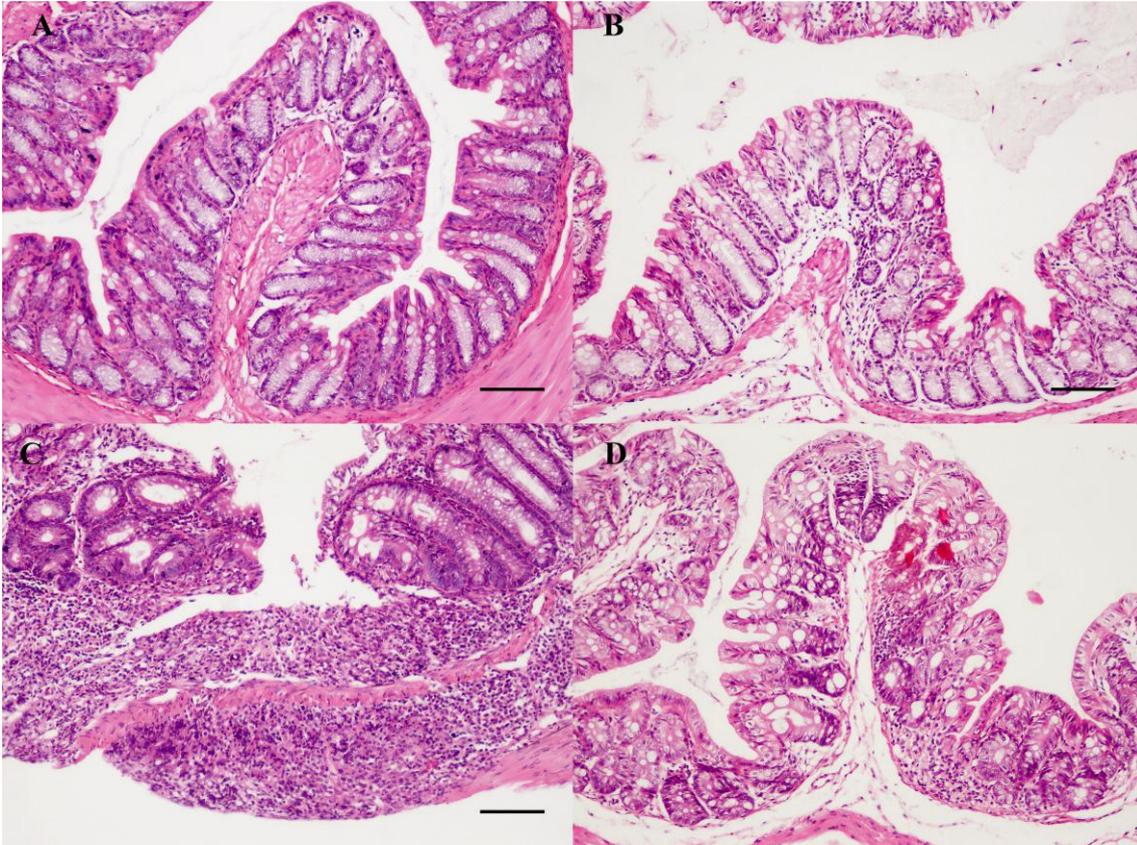
Figura 69 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de Alcian blue para evidenciação de muco. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal; (B) Animal do grupo tratado com AMT, não inflamado, com morfologia inalterada; (C) Animal do grupo DSS que recebeu veículo da AMT, apresentando redução da marcação de muco em toda a extensão, particularmente na porção mais inflamada; (D) Animal do grupo DSS+AMT no qual houve perda mais branda de muco. Barra de escala = 200 micrometros.

Figura 70 - Cortes histológicos de cólon de camundongos submetidos ou não a tratamento terapêutico com AMT em modelo de colite- DSS



Fonte: NAMAZU (2015).

Legenda: Coloração de H&E. (A) Animal do grupo controle exemplificando arquitetura normal do cólon distal, com mucosa repleta de células produtoras de muco, submucosa delicada, circunscrita por camada muscular; (B) Animal do grupo AMT apresentando morfologia semelhante; (C) Animal do grupo DSS apresentando inflamação grave, transmural, tomando toda a extensão da mucosa, submucosa e infiltrando a camada muscular, distorcendo por completo sua arquitetura; note área ulcerada no centro da imagem com perda total da mucosa e submucosa; (D) Animal do grupo DSS tratado com AMT apresentando infiltrado inflamatório moderado na camada basal da mucosa, com discreto infiltrado submucosa e sem comprometimento da camada muscular; a arquitetura da mucosa está relativamente preservada. Barra de escala = 100 micrometros.

6 DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais- DII (Doença de Crohn e Colite Ulcerativa) são doenças crônicas e recidivantes de difícil tratamento na clínica médica devido sua complexa patogenia (LAKHAN; KIRCHGESSNER, 2010). As semelhanças fenotípicas da DC na DII humana são estabelecidas pela presença de algumas características clinicopatológicas tais como: inflamação transmural da parede intestinal com um padrão descontínuo, acometimento do intestino delgado, desenvolvimento de estenose da luz intestinal, formação de granulomas e doença perianal com fístulas, por outro lado, a similaridade fenotípica com a CU refere-se ao envolvimento retal, formação de abscesso da cripta, e envolvimento superficial da parede intestinal (MAXWELL; VINEY, 2009; FUNDERBURG et al., 2013). Neste contexto, os modelos de colite em camundongos exibem algumas, mas não todas as características fenotípicas e fisiológicas da DC e CU humana, ou seja, as semelhanças fisiológicas dos vários modelos experimentais de DII para DC e CU humana referem-se à predominância de respostas imunes Th1 ou Th2 durante as fases ativas da inflamação intestinal (VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003; PERSE; CERAR, 2012).

Os modelos experimentais de DII são amplamente utilizados devido à sua facilidade de reprodução, reprodutibilidade, flexibilidade de uso (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002; MAXWELL; VINEY, 2009) e a sua capacidade de avaliar os potenciais mecanismos anti-inflamatórios e possíveis mediadores constituintes da patogênese (BOISMENU; CHEN, 2000; CUONG; KATSIKEROS; ABIMOSLEH, 2012).

Em estudos experimentais da patogênese da DII, se o pesquisador deve levar em conta ao fazer do uso de animais consanguíneos ou animais knockout (supressão seletiva de um gene) que podem ser produzidos resultados homogêneos reprodutíveis, além da capacidade de acompanhar de perto o desenvolvimento da doença, desde os estágios iniciais assintomáticos até sua evolução clínica, portanto, eles dão a oportunidade de separar os eventos iniciais dos eventos tardios no curso da doença, para distinguir as verdadeiras vias moleculares e inflamatórias do epifenômenos, bem como desvendar as vias relacionadas com a progressão da doença daquelas relacionadas com a resolução da inflamação (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002; VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003; OH et al., 2014). Essa homogeneidade que caracteriza a DII experimental, resultante da dependência de vias específicas de funcionamento e a escassez relativa de cofactores ambientais e imunes, permite a análise e, por conseguinte, é vantajoso para o estudo da patogênese da DII (VALATAS;

VAKAS; KOLIOS, 2003). No entanto, pode ser considerada uma desvantagem quando os modelos de camundongos são usados para a avaliação pré-clínica da eficácia de novos medicamentos, pois nesses ambientes cada modelo animal individual deveria ser considerado equivalente a um único paciente (HALL; COOKE, 2011). Outro fator importante na genética, curiosamente, algumas cepas de camundongos são capazes de limitar e eliminar a resposta inflamatória induzida por DSS no cólon, ao passo que o processo inflamatório em camundongos C57BL/6 não pode ser reparado e acaba progredindo para a forma crônica da colite (MELGAR; KARLSSON; MICHAELSSON, 2005).

Neste estudo utilizamos animais C57BL/6 machos, pela facilidade do uso dos animais, não ter a necessidade de controlar as etapas do cio (como ocorre em fêmeas) e, portanto, existe a percepção de menos variabilidade na resposta experimental (BLANCHARD; GLICK, 1995; PALANZA, 2001), além disso, a progressão para a cronicidade observada em camundongos C57BL/6 oferece um modelo promissor para alterações inflamatórias observadas na patogênese da CU, enquanto que em camundongos BALB/c disponibilizam um modelo de colite aguda e por isso que o modelo de colite crônica é uma ferramenta poderosa e conveniente que pode ser utilizado para validar possíveis tratamentos para a DII (MELGAR; KARLSSON; MICHAELSSON, 2005).

Outra limitação na extrapolação dos resultados de animais para humanos são os diferentes resultados medidos para avaliar a eficácia do tratamento. A atividade da doença em ensaios clínicos em humanos é medida por vários índices que quantificam os sintomas relacionados com a doença ativa. Mais amplamente utilizado é o Índice de atividade de doença de Crohn- CDAI (cálculo numérico derivado da soma dos produtos de uma lista de oito itens e representa uma avaliação numérica de uma interpretação do médico dos sintomas do paciente) para pacientes com DC e a pontuação Mayo Clinic (combinação de uma estimativa numérica da gravidade dos sintomas do paciente, combinados com uma pontuação endoscópica inflamação do cólon) para CU (BEST et al., 1976; SCHROEDER et al., 1987). Em contraste, os efeitos de intervenções terapêuticas nos modelos da DII são estimadas usando histopatologia "semi quantitativa" da inflamação no tecido do cólon e diferenças na taxa de perda de peso dos animais tratados durante evolução da doença (SCHOEB; BULLARD, 2012). No entanto, um tratamento capaz de gerar melhora clínica significativa em grupos homogêneos de animais doentes pode não ser suficientemente potente para induzir remissão clínica em grupos heterogêneos de pacientes (VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003; MELGAR et al., 2008).

O DSS é um composto polianiônico que induz diarreia, perda de peso em roedores e inflamação intestinal com a liberação de citocinas, semelhante a DII humana (KURTOVIC; SEGAL, 2004), sendo considerado confiáveis para estudar a patogênese da CU (MURTHY et al., 1993). Kullmann et al. (2001), relatam que a colite crônica por DSS representou melhor a CU do que a colite aguda- DSS. Esse tipo de modelo de colite tem contribuído enormemente para a compreensão imunológica atual, características patológicas e fisiológicas da inflamação intestinal crônica (CUONG; KATSIKOS; ABIMOSLEH, 2012), além disso, estudos que validaram o modelo de colite- DSS por meio de diferentes agentes terapêuticos para DII humana mostram que esse modelo possui potencial translacional do animal para o humano (PERSE; CERAR, 2012; OH et al., 2014). O presente estudo demonstrou que os modelos (tanto terapêutico quanto preventivo) de colite por DSS levaram aos sintomas da DII (perda de peso, diarreia e presença de sangue nas fezes).

O modelo de colite- DSS deve ser rigorosamente validado antes da utilização em estudos experimentais, pois os diferentes pesos moleculares de DSS podem induzir diferentes alterações clínicas nos animais (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000), contribuindo assim para uma potencial desvantagem deste modelo de colite- DSS, pois o peso molecular que determina o local e a gravidade da inflamação (AXELSSON et al., 1996), ou seja, a variação da gravidade da inflamação do cólon pode variar desde nenhuma à leve ou lesão tecidual grave; e o outro ponto fraco deste modelo seria um envolvimento menos definido da microbiota entérica normal (YAMADA; OHKUSA; OKAYASU, 1992; KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000) e que a colite induzida por DSS possui baixa participação das respostas de células T ou B (DIELEMAN et al., 1994). Perse e Cerar (2012) destacam ainda: duração da exposição dos animais ao DSS, fabricante e lote, espécie animal, sexo e flora intestinal microbiana do animal que poderiam diferenciar a resposta do modelo de colite ao DSS.

Tratamentos convencionais para a DII incluem corticosteroides e imunossupressores, porém esses tratamentos em muitos pacientes não são totalmente eficazes, com muitas terapias associadas com efeitos adversos significativos. Por exemplo, a sulfasalazina, um aminossalicilato utilizado para tratar a colite, induz náuseas, anorexia, dores de cabeça e fadiga em até 45% dos pacientes; pacientes que recebem opióides podem experimentar efeitos adversos incluindo constipação, náuseas e comprometimento cognitivo e; pacientes constipados, em particular aqueles com DC, deve-se evitar a terapia de fibra já que a presença de estenose intestinal é comum (GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000).

Assim, os tratamentos que sejam eficazes e têm pouco ou nenhum efeito continua a ser uma necessidade não atendida (GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000; CUONG; KATSIKEROS; ABIMOSLEH, 2012), ou seja, sem iminentes perspectivas de cura para a DII, e torna-se necessária uma gestão terapêutica premente e eficaz (CUONG; KATSIKEROS; ABIMOSLEH, 2012; SCHOULTZ et al., 2013). Parte do desenvolvimento de tais intervenções para aliviar os sintomas requer uma melhor compreensão quanto ao que realmente desencadeia esses sintomas (SCHOULTZ et al., 2013).

Os modelos animais de doenças humanas são frequentemente utilizados como modelos preditivos para a descoberta e quantificação do impacto de um tratamento em humanos (VAN DER WORP et al., 2010). No entanto, uma avaliação (HACKAM; REDELMEIER, 2006) sobre estudos da intervenção animal mais citados e publicados entre 1980 e 2000, informou que apenas 10% destas intervenções foram subsequentemente aprovadas para uso em pacientes, com um tempo médio de replicação de 7 anos.

O papel dos antidepressivos na DII ainda não está elucidado (MIKOCKA-WALUS et al., 2012). É importante avaliar abordagens eficazes para o tratamento da ansiedade e depressão na DII e o impacto do tratamento sobre o curso da doença (GRAFF; WALKER; BERNSTEIN, 2009), pois o estudo do efeito anti-inflamatório dos antidepressivos permanece em investigação e poderia proporcionar uma melhor orientação destes fármacos em sintomas de ansiedade ou depressão na DII (HAJHASHEMI et al., 2010). Quando a ansiedade ou a depressão se torna crônica ou interfere com as atividades diárias, muitos pacientes serão receptivos à terapia médica. Estudos mostram que a taxa de depressão é de 30% durante remissão da DII (MITTERMAIER et al., 2004), com 80% e 55% dos pacientes que relatam a ansiedade e a depressão, respectivamente, durante a recaída (ADDOLORATO et al., 1997). Se a depressão está presente, um antidepressivo tricíclico, particularmente a amitriptilina, poderia ser utilizado (GERSON; TRIADAFILOPOULOS, 2000; RAHIMI et al., 2012). A amitriptilina (AMT) apresenta efeitos anti-inflamatórios podendo ajudar pacientes com distúrbios psicológicos e inflamatórios (KUBERA et al., 2000). Além disso, a AMT é um antidepressivo tricíclico pleiotrópico que interage com vias histamínicas, colinérgicas, a serotonina, N-metil-D-aspartato (NMDA), aminas biogênicas e substância P em atuação na inibição da norepinefrina e serotonina (HALL; OGREN, 1981; FRYER; LUCCAS, 1999; CASTANON et al., 2002). Portanto, com base nestes fatos, existe uma variedade de locais putativos na qual a amitriptilina poderia exercer a sua atividade anti-inflamatória (HAJHASHEMI et al., 2010) e por isso este estudo objetivou estudar o efeito da AMT em um

modelo murino de colite. Em humanos a dose de amitriptilina pode ser iniciada com uma dose de 25-50 mg, tomado ao deitar, e titulado a 200 mg, conforme necessário. Além de ajudar a dormir (CASPER et al., 1994), amitriptilina pode causar prisão de ventre (e, portanto, alívio de diarreia) (MONANE et al., 1993), e ajuda com a dor neuropática (WATSON et al., 1998).

Um fato importante a ser considerado em experimentos com fármacos é saber interpretar os resultados no contexto psicofarmacológico humano, porque os experimentos com antidepressivos em animais muitas vezes são por via IP (KOH et al., 2011) enquanto que em humanos, os pacientes são tratados por via oral (KUBERA et al., 2000; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; CALDARONE et al., 2013). Sadeghi et al. (2011) relataram que tanto administração intraperitoneal e intracerebroventricular de AMT induziram uma redução acentuada da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no edema de patas induzido por carragenina em ratos, de acordo com o exame patológico e da atividade da mieloperoxidase nos tecidos da pata inflamada. No entanto, a via oral normalmente requer doses mais altas de drogas devido a várias razões, incluindo a baixa biodisponibilidade e absorção errática (GURGEL et al., 2013).

Trabalhos preliminares em estudos com camundongos como modelo murino de colite, sugeriram um papel protetor dos antidepressivos na inflamação intestinal, possibilitando que os antidepressivos afetariam diretamente o processo da doença. Nos estudos de Koh et al. (2011), indicaram que a fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptção da serotonina) inibiu a ativação do NF- κ B em células epiteliais do intestino melhorando a colite em um modelo murino de colite associada à tumorigênese, sugerindo que a fluoxetina é um potencial agente terapêutico para o tratamento de DII. Em outro estudo, Guemei et al. (2008), mostraram que a desipramina (antidepressivo tricíclico) e a fluoxetina têm propriedades anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes na colite induzida experimentalmente em ratos, levando a possibilidade do possível papel protetor em pacientes com DII. Nos resultados de Kubera et al. (2000), confirmaram em parte a hipótese de que os antidepressivos têm atividade imunossupressora. Em experimentos com camundongos C57Bl/6, a amitriptilina teve efeito imunossupressor na dose de 10 mg/Kg, via IP (intraperitoneal) aos 28 dias de tratamento, enquanto que aos 14 dias de tratamento o efeito imunossupressor foi considerado baixo. Na dose de 20mg/Kg em camundongos B10. A (CBA \times C57BL) o efeito imunossupressor esteve presente.

As doses e esquemas de administração em ensaios clínicos são definidos a partir de testes de segurança/ fase ou testes clínicos antes em outras doenças, e a eficácia é

estabelecida somente se o resultado pré-definido são cumpridas as medidas de remissão e resposta clínica (VALATAS; VAKAS; KOLIOS, 2003). No modelo terapêutico utilizou-se uma dose mais baixa de DSS (2,5%) para evitar o aumento da mortalidade de camundongos C57BL/6, observado em experiências preliminares e constatado na curva de sobrevivência.

Koboziev et al. (2011) e Valatas et al. (2013), destacaram que uma das decisões farmacológicas mais importantes que podem ser feitas quando se tenta mimetizar a situação clínica utilizando modelos animais da doença, é o momento de administração do agente terapêutico, pois a literatura está repleta de exemplos relatando os efeitos benéficos de diferentes agentes terapêuticos quando administrados antes do início da inflamação intestinal. Estudos experimentais na DII não são projetados para avaliar a eficácia da intervenção terapêutica por si, e esta é uma limitação quando se tenta comparar resultados de ensaios clínicos com dados de modelos animais experimentais. A intervenção em estudos com animais é muitas vezes usada como a prova final da existência de um novo fator. Nestes casos, as vias inflamatórias são frequentemente alvos antes do desenvolvimento da inflamação para evitar complicações epifenomenais ou alterações nos processos imunológicos que ocorrem durante a evolução da doença (BAMIAS et al., 2005), ou seja, os tratamentos para a DII avaliados em modelos de colite em camundongos são geralmente empregados de forma preventivas (ou seja, administrado antes da indução da colite), enquanto que a eficácia terapêutica destas drogas (isto é, administrados após o aparecimento da colite) não é examinado profundamente, especialmente no que diz respeito às análises histopatológicas (SHA et al., 2013). Neste contexto foram propostos dois protocolos experimentais: modelo profilático (preventivo) e o modelo terapêutico. A dose de escolha da AMT (200 µl/ml) foi determinada através dos estudos de Sherman et al. (1979) e Caldarone et al. (2013), em um modelo de via oral para camundongos. A administração de antidepressivos na água potável em camundongos tem várias vantagens sobre a injeção como, por exemplo, a via oral estar mais próximo ao modelo metabólico usado em humanos (WONG; LICINIO 2001; CALDARONE et al., 2013) e o estresse associado com a manipulação de injeções crônicas é reduzido (CALDARONE et al., 2013).

Neste estudo foi utilizado o TSC constituído de um número de 9 animais por grupo (controle e AMT), demonstrando que a dose AMT (200 µl/ml) foi efetiva nos parâmetros de imobilidade e latência dos animais no TSC sob efeito do antidepressivo em um período de 14 dias, o que contrasta positivamente com o mesmo teste realizado por Caldarone et al. (2013), mas em períodos diferentes (4 e 28 dias). Estudos relatam que dois

antidepressivos tricíclicos imipramina e desipramina dose-dependente reduziram o tempo de imobilidade, enquanto a amitriptilina não alterou significativamente o tempo de imobilidade em qualquer dose testada. Os efeitos positivos da imipramina e desipramina (ambos ATCs) estão de acordo com os dados publicados (STERU et al., 1985). No entanto, em contraste com os resultados de Cryan, Mombereau e Vassout (2005), estes autores relataram também um efeito positivo para a amitriptilina no TSC enquanto que Van der Heyden et al. (1987), relataram um efeito positivo ou nenhum efeito dependendo da linhagem de camundongo utilizada. A eficácia do TSC depende da linhagem utilizada, pois algumas são mais ou menos sensíveis a alguns antidepressivos (VAUGEOIS et al, 1996; VAN DER HEYDEN et al., 1987; LIU; GERSHENFELD, 2001; CALDARONE et al., 2013). Dois estudos recentes independentes usando o TSC não demonstraram diferença de comportamento da linha de base entre os machos e fêmeas (DAVID et al., 2001; CALDARONE et al., 2003).

O TSC é um teste rápido e é sensível ao efeito de antidepressivo em curto prazo, sendo esta uma das principais críticas associadas ao seu uso (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002), uma vez que a observação de tratamentos crônicos com antidepressivos é geralmente exigida como pré-requisito para a recuperação clínica completa em seres humanos. Dito isto, há evidências de que algumas mudanças comportamentais ocorrem cedo com tratamentos antidepressivos em seres humanos, que podem prever ou pelo menos ser relevantes para o resultado terapêutico positivo mais tarde (KATZ et al., 1987; HARMER et al., 2003a,b). Avaliamos a dose da AMT no TSC, porém o TSC não é um teste indicado para camundongos isogênicos como C57Bl/6 (camundongos usados neste experimento) porque são animais cuja genética tem mais facilidade de escalar a cauda (DALVI; LUCKI, 1999; MAYORGA; LUCKY, 2001; CRYAN et al., 2003), e por isso é recomendado que se usasse um número maior quando realizar o teste (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). O parâmetro de latência para os camundongos no TSC é relativamente curto, o que sugere que simplesmente diminuindo a duração da sessão de teste não eliminaria o problema. Além disso, o comportamento da escalada se repete em exposição subsequente ao teste, sugerindo que é um fenômeno comportamental confiável (DALVI; LUCKI, 1999).

Os nossos resultados mostraram que o tratamento com a AMT na colite-DSS clinicamente reverteu a perda de peso corporal e hemorragia no cólon em relação ao dos animais no grupo não tratado (colite-DSS). No modelo preventivo, a partir do terceiro dia, os sintomas da DII ficaram mais proeminentes no grupo colite- DSS, não sendo notado o ânus com sangue e diarreia no grupo inflamado tratado com AMT. O mesmo ocorreu com o outro

protocolo experimental, modelo terapêutico, cujos sintomas da colite- DSS foi presenciada também nos dois ciclos da indução da doença, a partir do terceiro dia e salvo o grupo inflamado- AMT que não apresentou esses sinais clínicos típicos da doença tão acentuados. Nossos resultados mostram que a análise macroscópica dano reduzido com menor encurtamento da medida do comprimento do cólon. Trabalhos anteriores mostraram que os sinais clínicos da colite- DSS começam a se estabelecer já no primeiro dia de ingestão deste composto culminando por volta do quinto dia de ingestão de DSS, quando a perda de peso e as alterações do comprimento do cólon podem ser notadas (OKAYASU et al., 1990; MELGAR et al., 2007; YAN et al., 2009).

Ressaltamos a importância da curva de sobrevivência que nos dois modelos experimentais não houve perda de animal do grupo controle e do grupo tratado inflamado tratado com AMT em relação ao grupo inflamado, cuja perda de animais foi considerável. A perda dos animais no grupo inflamado (DSS) pode ser explicada pela linhagem usada, pois em certas linhagens de camundongos (incluindo C57BL/6) o desenvolvimento em longo prazo da inflamação crônica é caracterizado por substancial infiltração de neutrófilos, que não desaparece (MELGAR; KARLSSON; MICHAËLSSON, 2005). O efeito da AMT foi a redução da inflamação nos animais tratados e evitou a perda dos animais.

Johansson et al. (2010), demonstraram 53% de redução da espessura da camada de muco após 15 minutos de exposição a 3% DSS. A camada interna de muco, que forma uma barreira de proteção contra bactérias seria desprovida e prejudicada pelo DSS (MORGAN et al., 2013). Já 12 horas após exposição ao DSS, um grande número de bactérias penetraria na camada . Finalmente, ocorre a penetração bacteriana na submucosa, acompanhado por infiltração de leucócitos, da qual foi observada após 5 dias de DSS administração. Neste estudo, a colite- DSS, no grupo inflamado mostrou que a camada de muco foi visivelmente reduzida em comparação aos grupos controle e ao tratado com AMT (modelo profilático: Figuras 40 e 43; modelo terapêutico: Figura 69).

Experiências preliminares mostraram níveis maiores de mediadores pró-inflamatórios no cólon distal do que aqueles nas outras partes do cólon e com base neste parâmetro, o cólon distal seria a melhor porção selecionada para a avaliação da eficácia de tratamentos terapêuticos (SHA et al., 2013), Okayasu et al. (1990), relata que o modelo colite- DSS as lesões estão distribuídas predominantemente no cólon distal, embora possam ocorrer lesões na porção do cólon medial, baseando nestes parâmetros Mähler (1998), menciona que fatores poderiam contribuir com a lesão da colite-DSS como a microbiota endógena

(SCHUH; VINEY, 1996), o peso molecular do DSS (AXELSSON et al., 1996) ou até mesmo o protocolo experimental.

A administração oral de DSS em roedores resulta em inflamação evidente na porção média- distal do cólon que lembra um pouco a DII humana (DIAZ-GRANADOS, et al., 2000). Neste estudo a porção proximal não apresentou alterações pela gravidade da colite- DSS, porém a porção distal mostrou-se bem alterada (modelo profilático: Figuras 39, 40 e 42; modelo terapêutico: Figuras 68 e 70). Os achados histológicos do modelo profilático e terapêuticos evidenciaram no grupo colite- DSS, na porção distal, uma inflamação crônica característica deste modelo de colite: pela perda da arquitetura epitelial, aumento de infiltrado inflamatório na parede intestinal, ramificação, encurtamento e diminuição da densidade da cripta, condizendo com os achados de outros pesquisadores (GEBBOES; DALLE, 2002; MELGAR; KARLSSON; MICHAËLSSON, 2005; GHIA et al., 2008; KOH et al., 2011; PERSE; CERAR, 2012).

O tratamento oral com AMT atenuou a colite- DSS nos dois modelos estudados, atenuando assim a severidade da colite no cólon distal (modelo profilático: Figuras 39, 41; modelo terapêutico: Figuras 68 e 70) e coincidindo com os estudos de Koh et al. (2011), que através da fluoxetina (20mg/ Kg- via gavagem) reduziu a severidade da colite no cólon distal. A fluoxetina também não mostrou mudanças histológicas no cólon normal, o mesmo ocorreu neste estudo com AMT.

O infiltrado inflamatório por neutrófilos entre as células epiteliais foi a principal característica da atividade da doença (GEBBOES; DALLE, 2002; LARMONIER et al., 2011). Outros estudos demonstraram que a inflamação ativa na CU é caracterizada predominantemente por infiltrado neutrofílico (WELDON, 1995; STAHLBERG, 1997; NAITO et al., 2007; SPENCER et al., 2007; LAMPINEN, et al., 2008).

A sobrevivência de neutrófilos no tecido, fora dos vasos sanguíneos, é limitada no tempo, devido sua meia-vida curta. A sua presença no tecido indica, portanto, recrutamento recente e, portanto, a agressão persistente (GEBBOES; DALLE, 2002). Naito, Takagi e Yoshikawa (2007), destacaram que os neutrófilos são constituídos de duas grandes populações de grânulo: primário (azurófilos) e grânulos secundários (específicos), que são formados em diferentes estágios de maturação dos neutrófilos. Os grânulos primários contêm, como os seus principais constituintes, várias enzimas proteolíticas e uma ampla gama de proteínas bactericidas incluindo a catepsina G, a elastase, mieloperoxidase (MPO), e lisozima.

Os grânulos secundários contêm uma grande variedade de componentes diferentes, incluindo lactoferrina, lisozima, colagenase, e lipocalinas. e aumento da taxa de mieloperoxidase. Segundo Bradley et al. (1982) a capacidade para estimar a quantidade de neutrófilos no tecido inflamado pode ser útil para avaliar a intensidade da inflamação, ou o efeito de protocolos experimentais ou terapêutico que poderiam alterar a resposta inflamatória. De fato, a atividade da MPO foi reduzida nas porções intestinais (proximal/ distal) e nos dois modelos (terapêutico e preventivo) pelo grupo tratado com a AMT, indicando a reversão da inflamação. A atividade da CU está ligada a um influxo de neutrófilos na mucosa e, subsequentemente, para o lúmen intestinal, resultando na formação dos chamados abscessos de cripta. Além disso, os neutrófilos circulantes ativados, uma fonte principal de citocinas inflamatórias, é elevada com aumento do tempo de sobrevivência em CU ativa (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007).

Antidepressivos possuem propriedades anti-inflamatórias (TALER et al, 2007; HILES et al., 2012). A AMT interage com receptores opióides para gerar alguns de seus efeitos terapêuticos, especialmente suas atividades analgésicas (MARCHAND et al., 2003; ONALI; DEDONI; OLIANAS, 2010) da qual foi avaliado o papel de receptores de opióides na atividade anti-inflamatória da AMT. A este respeito, o seu efeito inibitório no edema de pata não foi influenciada pela a co-administração de naloxona, o que indica que os receptores opióides não estão envolvidos neste efeito da AMT (HAJHASHEMI et al., 2010). Martelli et al. (1967) em seus estudos relatam evidências de que o efeito anti- inflamatório de fármacos ATCs pode ser atribuído à sua capacidade para potencializam a transmissão adrenérgica, porém Hajhashemi et al. (2010), relataram que em suas condições experimentais, o pré-tratamento de animais com alguns antagonistas do receptor adrenérgico, incluindo o propanolol, ioimbina e prazosina, não alteraram o efeito anti- inflamatório da amitriptilina. Assim, estas observações não foneceram uma relação entre a ação anti-inflamatória da amitriptilina e alguns receptores adrenérgicos importantes. Os mecanismos subjacentes pelos quais antidepressivos reduzem a inflamação permanecem desconhecidos, neste contexto relatou- se que a clomipramina e fluoxetina teriam efeitos de supressão de alguns mediadores inflamatórios, tais como a substância P (SP) e prostaglandina E2 ou a fluoxetina e amitriptilina inibem a liberação de óxido nítrico (BIANCHI et al., 1995; YARON et al., 1999).

Gurgel et al. (2013), relataram que alguns aspectos moleculares da atividade anti-inflamatória dos antidepressivos não foram ainda elucidados. Estes aspectos

incluem os seus efeitos sobre a libertação de citocinas, a modulação de vias inflamatórias reguladas por estes mediadores, e, ainda, como o tráfico de leucócitos é afetada tanto na inflamação aguda e crônica.

As citocinas constituem um grupo de moléculas de sinalização, principalmente proteínas ou glicoproteínas, utilizados extensivamente na modulação imunitária (DUNN; BROWN; LOVE, 1995; JANSSEN et al., 2010, VENKATESHA et al., 2015). Estas moléculas são secretadas por uma grande variedade de células no sistema imunitário (JANSSEN et al., 2010). As citocinas desempenham um papel vital na geração e/ou manutenção de diversos tipos de doenças, incluindo esclerose múltipla, asma, artrite e doença inflamatória do intestino (PAPADAKIS; TARGAN, 2000; ICHINOSE; BARNES, 2004; FELDMANN; MAINI, 2008; CODARRI; FONTANA; BECHER, 2010; VENKATESHA et al., 2015).

Venkatesha et al. (2015), postularam que as citocinas são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora bem regulada. A superprodução de citocinas pró-inflamatórias e/ou a deficiência de citocinas anti-inflamatórias resultam em desequilíbrio do sistema imune (ASTRY; HARBERTS; MOUDGIL, 2011; GAFFEN, 2014). O TNF- α , IL-1 β e IL-6 são produzidos principalmente pelas células de origem mielóide, tais como macrófagos e células dendríticas, ao passo que, IFN- γ e IL-17 são as citocinas definidores de auxiliar Th1 e células Th17, respectivamente (VENKATESHA et al., 2015) .

O desbalanço das citocinas pró- inflamatórias e anti- inflamatórias estaria ligado ao desenvolvimento da DII (FORT et al., 2001; TSUKADA et al., 2002; ALEX et al., 2009). Postula-se que os antidepressivos podem prevenir o aparecimento de doenças comportamentais por meio da modulação de citocinas pró-inflamatórias (FLANIGAN; ACCONE; LABURN, 1992; YIRMIYA, 1996; SHEN et al., 1999; CONNOR et al., 2000; CASTANON; BLUTHÉ; DANTZER, 2001). Os pacientes deprimidos, que são saudáveis, têm aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α), proteínas de fase aguda, quimiocinas, e moléculas de adesão (JANSSEN et al., 2010).

Janssen et al. (2010), postularam que medicamentos antidepressivos não afetam apenas a regulação de catecolaminas, mas também têm ações significativa direta e indireta sobre o sistema imunitário e sobre as citocinas em particular. A pesquisa sugere que a resposta farmacológica está de fato associada com normalização de funcionamento citocinas. Embora antidepressivos apareçam para normalizar a função das células imunes, incluindo respostas de citocinas, os mecanismos precisos que permanecem ser clarificados (LEONARD,

2001, JANSSEN et al., 2010). Além disso, a análise sugere que citocinas, como proteínas e variantes genéticas, podem servir como preditores úteis de tratamento na resposta aos antidepressivos (JANSSEN et al., 2010).

Os estudos *in vivo*, sobre os efeitos de antidepressivos, sobre as concentrações de citocinas são contraditórios. Hinze-Selch et al. (2000) avaliaram os níveis séricos de citocinas de pacientes deprimidos antes e durante seis semanas de tratamento com os antidepressivos amitriptilina, nortriptilina ou paroxetina e no grupo sem tratamento, na qual ativou o sistema TNF- α . Alguns estudos mostraram que o tratamento com antidepressivos não alterou a produção de citocinas (KAGAYA et al., 2001; YIRMIYA et al., 2001; KUBERA et al., 2004). Logo, tem-se sugerido que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e um desbalanço na resposta Th1/Th2 poderiam desempenhar um papel relevante na fisiopatologia da depressão, implicando diversas teorias da depressão como um fenômeno psiconeuroimunológico (VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

No estudo de Obuchowicz et al. (2006), foi demonstrado pela primeira vez que amitriptilina e nortriptilina administrados em concentrações que podem ser obtidas no plasma e estruturas cerebrais (células microgliais) de ratos durante o tratamento, inibiram a secreção de IL-1 β e TNF- α . Os resultados obtidos coincidem com as observações anteriores de que os antidepressivos são capazes de reduzir a liberação periférica de citocinas pró-inflamatórias e sugerem que a rede de citocinas pode estar envolvida no mecanismo central da ação da amitriptilina e nortriptilina. Além disso, Tai et al. (2009) observaram que a amitriptilina inibe a expressão de citoquinas pró-inflamatórias através do aumento da IL-10, corroborando o conceito de que estes ATCs podem atuar como supressores inflamatórias (XIA; DEPIERRE; NASSBERGER 1996; YARON et al. 1999; ACHAR et al. 2003; TAI et al. 2009). No entanto, no estudo de Prado et al. (2012), ao investigarem os efeitos da amitriptilina sobre o processo de fibrose em um modelo de obstrução da saída da bexiga em ratos, que a amitriptilina não afetou ao processo de infiltração inflamatória, o que foi interessante para estes autores porque mencionaram que estudos mostraram que os antidepressivos tricíclicos (ATCs) inibem a libertação de mediadores inflamatórios, tais como IL-6, IL-1b e TNF-a (XIA et al., 1996; YARON et al., 1999; TAI et al., 2009).

Os níveis séricos de TGF-b1 aumentado após o tratamento com antidepressivos, indicando uma possível interação entre o Th1 (IL-12) e Th3 (TGF-b1) da rede de citocina (SUTCIGIL et al., 2007). Sutcgil et al. (2007) também descobriram que

níveis elevados de IL-2 e TNF- α diminuíram, enquanto rebaixados níveis IL-4 aumentaram com o tratamento com antidepressivos.

Szuster-Ciesielska et al. (2003), compararam antidepressivos tricíclicos (imipramina), heterocíclicos (mianserina) e do lítio na produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de voluntários sadios. Os resultados mostraram que todos os antidepressivos aumentaram a produção de citocinas anti-inflamatórias, inibindo aquela das pró-inflamatórias. Altas concentrações de imipramina e mianserina também inibiram o burst oxidativo de neutrófilos, sugerindo tais fatos um efeito imunorregulatório dos antidepressivos na função de leucócitos humanos (VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

A investigação sobre as citocinas é complicada por uma série de fatores, que devem ser considerados quando ambos interpretar os resultados de estudos anteriores e na concepção futuros estudos clínicos. Há uma ampla gama de limitações metodológicas da pesquisa revisada, especificamente no que diz respeito à composição da amostra, procedimentos de avaliação, e os regimes de tratamento (GOLDSTEIN et al., 2009). Além disso, e Kennis e Maes (2002), apontaram a dificuldade técnica na detecção dos níveis de citocinas circulantes no soro e plasma são muito baixos em seres humanos. Portanto, estudos iniciais sobre as concentrações de citocina antes e depois tratamento com antidepressivos frequentemente utilizados métodos *ex vivo*. Poucos estudos, no entanto, têm examinado a desregulação das citocinas na periferia na DII (FUNDERBURG et al., 2013).

A administração intraventricular de IL-1 em animais de experimentação provocou secreção de IL-6, com detecção de níveis elevados desta citocina no plasma, indicando que o cérebro pode eficientemente induzir a síntese de IL-6, mostrando a existência de uma via de ligação entre o encéfalo e a periferia, explicando como doenças confinadas ao sistema nervoso central provocam resposta imunológica sistêmica (BERTOLUCCI; PEREGO; DE SIMONI, 1997). Kwon et al. (2005) mostraram resultados que apoiam de que a IL-1 β está envolvido no desenvolvimento de colite experimental induzida por DSS em camundongos, e sugerem fortemente que as citocinas IL-1 β e IL-6 são importantes para alavancar a inflamação do cólon.

No grupo experimental colite- DSS houve aumento dos níveis circulantes de IL-1 β no plasma, quando comparado com o grupo controle. Em pacientes com DC, as células mononucleares do sangue periférico *in vitro* mostraram aumento de IL-1 β comparada aos pacientes–controle (SATSANGI et al., 1987). No modelo profilático houve diferença

estatística entre o grupo inflamado com os grupos controle e a AMT reverteu esse aumento dos níveis plasmáticos de IL-1 β . Não foi encontrada diferença estatística dos níveis circulante de IL-1 β no plasma entre os grupos experimentais do modelo terapêutico, devido que a maior produção da IL-1 β foi mostrado em células mononucleares isoladas do cólon a partir de pacientes com DII (MAHIDA; WU; JEWELL, 1989). No entanto, a célula produtora de IL-1 β , a forma predominante, e a regulação da expressão do seu gene no intestino humano, em condições fisiológicas e patológicas ainda estão mal compreendidas (YOUNGMAN et al., 1993). Aumento da produção de IL-1 tem sido relatado na mucosa de pacientes com DII ativa (MAHIDA; WU; JEWELL, 1989; LIGUMSKY et al., 1990; GROSS et al., 1991) e no tecido do intestino de modelos animais de colites (RACHMILEWITZ; SIMON; SCHWARTZ, 1989; COMINELLI et al., 1990). Nossos modelos experimentais (profilático e terapêutico) mostraram redução dos níveis de IL-1 β nas duas porções do intestino (proximal/ distal). Esta diminuição pode estar relacionada com a diminuição de diarreia encontrada nos animais tratados com AMT, corroborando com os dados de Kreydiyyeh e Al- Sadi (2002) que constataram que a IL-1 β reduziu significativamente a absorção de fluídos (a camada superficial do intestino grosso é responsável pela troca de fluidos entre as fezes e o organismo), deixando as fezes com excesso de líquido a partir do cólon de ratos demonstrando, assim, um envolvimento da citocina na diarreia observado na DII. Este efeito de IL-1 β pode ser devido a uma diminuição na absorção de água ou em um aumento da secreção de água, ou ambos.

Estudos reforçam que a IL-1 β desempenha um papel central na patogênese da colite- DSS ao induzir a colite experimental e também na DII humana (GROSS et al., 1991; LUDWICZEK et al., 2004; KWON et al., 2005). A principal fonte de IL-1 β no intestino grosso poderia ser por macrófagos ativando as camadas de mucosa e submucosa no local da colite in vivo (YOUNGMAN et al., 1993; MCALINDON; HAWKEY; MAHIDA et al., 1998). Na colite aguda induzida por DSS, a IL-1 β concentra-se no intestino, em vez de inflamação sistêmica nos camundongos (LI et al., 2013).

A IL-6 tem sido implicada na patogênese de DII (GROSS et al., 1991; ATREYA et al., 2000; MUDTER et al., 2002; KWON et al., 2005; LEE et al., 2012). A produção alterada de IL-6 foi encontrada em estados inflamatórios, tais como doença de Crohn e colite ulcerosa (ATREYA et al., 2000; PODOLSKY, 2002). Dados sugerem que a IL-6 contribui para a diferenciação de células Th17. Contudo, para esclarecer a importância das células Th17 em são necessários mais dados sobre esse evento na DII. Até agora, a DC

tem sido atribuída a uma doença mediada por Th1, enquanto que a CU apresenta uma resposta Th2 (MUDTER; NEURATH, 2007; LEE et al., 2012). Pode-se afirmar que níveis séricos de IL-6 estão fortemente correlacionados positivamente com a gravidade clínica, endoscópica e histopatológica da atividade da doença, pois a produção de IL-6 foi detectada no soro de pacientes com DII na fase aguda e inflamação crônica (GROSS et al., 1991; MUDTER; NEURATH, 2007). Nos nossos modelos de colite experimental (profilático e terapêutico), os níveis circulantes de IL-6 plasmática no grupo experimental colite- DSS em relação ao grupo controle aumentou, no entanto o modelo terapêutico não mostrou diferença significativa nos níveis plasmáticos. Gross et al. (1992), avaliaram os níveis de IL-6 em pacientes com DC e estes apresentaram um aumento séricos de IL-6 em comparação com pacientes de CU ou controle. No entanto, nenhuma correlação significativa entre IL-6 níveis séricos de IL-6 e atividade da doença foram encontrados. Em contraste, no modelo profilático o tratamento com AMT reverteu o aumento da IL-6 plasmática, atenuando a severidade da colite. Hyams et al. (1993), encontraram uma forte correlação entre a fase aguda das proteínas (C-reativa e alfa-1 antitripsina) e de níveis de IL-6 no soro, tanto em CU e DC em crianças. O aumento da severidade da doença foi refletido pelo aumento dos níveis de IL-6 na DII. No que diz respeito ao valor preditivo de IL-6, um estudo relatou que pacientes com um nível de IL-6 no soro superior a 20 pg/ml tiveram um aumento de 17 vezes o risco de recidiva ao longo de um período de 1 ano comparados com pacientes com um nível mais baixo. Os autores (LOUIS et al., 1997) concluíram que a IL-6 por si só ou em associação com outros marcadores séricos, tais como alfa-1 glicoproteína pode ser útil para o controle da remissão dos pacientes com DII. Umehara et al. (2006), relataram que os níveis séricos de IL-6 estariam correlacionados com atividade clínica da CU, pois após a terapia anti-inflamatória, níveis IL-6 no soro diminuíram em correlação direta com a melhoria da atividade da doença. Tratamentos com antidepressivos reduzem os níveis de IL-6 no plasma, que são elevados tanto na depressão aguda e crônica, na maioria dos estudos revisados (JANSSEN et al., 2010).

Os níveis de IL-6 no cólon (proximal/ distal) foram reduzidos com o tratamento da amitriptilina nos dois modelos experimentais deste estudo, reduzindo a gravidade da colite- DSS. Níveis de IL-6 foram mais elevados no cólon do que na inflamação limitada ao duodeno em pacientes com DC (MUDTER; NEURATH, 2007). IL-6 aumentou significativamente nos tecidos do cólon de camundongos tratados com DSS (LEE et al., 2012). Em experimento com camundongos knockout IL-6 (IL-6^{-/-}), os animais mostraram significativamente reduzida a atividade da colite- DSS em comparação com ratinhos de tipo

selvagem tratados com DSS (NAITO et al., 2004), sugerindo que um bloqueio persistente e marcado da bioatividade IL-6 proporciona efeitos benéficos para inflamação intestinal.

TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória por estar envolvida na patogênese da DII (GROSS et al., 1991; NAITO et al., 2003). É uma citocina multifuncional produzida essencialmente por monócitos / macrófagos ativados, que desempenha um papel crucial na iniciação e na manutenção da inflamação e imunidade (TRACEY, 1994).

Nossos resultados mostram que tanto no modelo profilático, quanto no modelo terapêutico, não mostraram diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos de TNF- α , coincidindo com as observações de Alex et al. (2009), que relataram que os perfis de citocinas no soro de ambas as modelos de colite- DSS (aguda e crônica) foram prontamente distintas daquelas dos controles não afetados. Nos estudos de Sha et al. (2013), houve aumento dos níveis de TNF- α no soro por colite- DSS em camundongos.

No presente estudo, os níveis de TNF- α aumentaram no cólon proximal e distal nos dois protocolos experimentais (profilático e terapêutico) e coincidem com Alex et al. (2009) e outros estudos que constataram que na comparação com a colite- DSS aguda, a colite- DSS crônica apresentavam níveis significativamente mais baixos de TNF- α , sugerindo que esta citocina pró-inflamatória é responsável pela indução e ativação da DII (BRAEGGER et al., 1992; KATAYAMA et al., 2003). O tratamento com o antidepressivo AMT reverteu o quadro, reduzindo os níveis de TNF- α . No experimento de colite- DSS em ratos, não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α (HIRATA et al., 2001). A explicação seria pela função anormal de macrófagos ou a presença de subtipos de macrófagos produzindo diferentes citocinas. No cólon distal aumentaram os níveis de TNF- α e os níveis de transcrição de TNF- α e IL- 1 β em camundongos por colite- DSS (AZUMA et al., 2008; YAN et al., 2009; SHA et al., 2013).

O TNF- α também ativa os neutrófilos e macrófagos (PLEVY et al., 1997). No entanto, o mecanismo de ação pelo qual o TNF- α poderá estar envolvido na inflamação do cólon e imunossupressão não foi estabelecido. Assim, o papel exato do TNF- α na patogênese da DII permanece obscuro e necessita de mais estudos.

Os estudos in vivo, sobre os efeitos de antidepressivos, sobre as concentrações de citocinas são contraditórios. Mikocka et al. (2001), descobriram que, embora os níveis séricos de IL- 8 e TNF- α aumentaram em pacientes deprimidos, o tratamento com clomipramina, paroxetina, ou amitriptilina não modificou as concentrações

dessas citocinas. Pelo contrário, Sutçigil et al. (2007), relataram que os níveis de IL - 2 e de TNF - α em pacientes deprimidos diminuíram após tratamento com antidepressivos. Tuglu et al. (2003), também encontraram um declínio no aumento dos níveis de TNF - α em pacientes deprimidos, após o tratamento com Recaptação da serotonina. Curiosamente, Hinze- Selch et al. (2000), mostraram que o tratamento com antidepressivos tricíclicos, mas não recaptação da serotonina, ativou o sistema TNF- α . Assim, o efeito dos antidepressivos sobre os níveis de citocinas permanece como uma questão em aberto.

Outro dado importante é que as alterações nos níveis de citocinas após o tratamento antidepressivo aparecem principalmente independentes do tipo de antidepressivo, embora possa haver algumas diferenças nas ações de como certos antidepressivos podem influenciar os níveis de citocinas (MAES et al., 2001), pois Cattaneo et al. (2013), relataram que os níveis de TNF- α , os quais são elevados em pacientes não respondedores à terapia de antidepressivos, não seriam modificados por um tratamento antidepressivo; e os níveis de IL-6 com base em terapia antidepressiva apenas reduzem em pacientes respondedores. Enquanto que Yoshimura et al. (2009) mostraram que os níveis de IL-6 no plasma após 8 semanas de tratamento de antidepressivo foram reduzidos em apenas respondedores. Kast (2003) destacou os efeitos de antidepressivos atípicos como a bupropiona e a mirtazapina. A bupropiona ao diminuir a inflamação por redução dos níveis TNF- α , e no caminho inverso a mirtazapina aumentaria os níveis de TNF- α predominantemente sintetizado por linfócitos e monócitos, aumentando assim o processo inflamatório. Uma vez que o TNF- α é uma citocina central na patofisiológica de várias doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide e doença de Crohn, poderia ter implicações nas decisões do tratamento (HAJHASHEMIA; MINAIYANA; EFTEKHARIB, 2008).

Ghia et al. (2009), realizaram um estudo que fornecem substrato para o conceito de que depressão por si só pode reativar a inflamação intestinal em camundongos nas quais a inflamação crônica tinha sido induzido e permitido tornar-se clinicamente quiescente. Os resultados mostram que a indução de depressão reativa a inflamação intestinal em dois modelos experimentais de colite (DSS e DNBS) por atenuação do receptor nicotínico da acetilcolina do tipo alfa-7 ($\alpha 7nAChR$) mediada por supressão vagal de citocina pró-inflamatória liberadas por macrófagos. Além disso, mostrou-se que o tratamento com um antidepressivo tricíclico (Desmetilimipramina- DMI) atenuou esta depressão induzida pela reativação da inflamação do intestino. Uma observação importante realizada pelos autores é a constatação de que a DMI inibiu a reativação da colite pela depressão, porém, observaram que

a DMI não influenciou a inflamação na ausência de depressão. Neste contexto, os autores admitem estarem cientes da possibilidade que o ATC pode ter efeitos anti-inflamatórios diretos (SACERDOTE; BIANCHI; PANERAI, 1997), mas estes não foram evidentes em seus experimentos. DMI teve nenhum efeito em qualquer parâmetro de inflamação em camundongos tratados com DSS sem depressão.

As primeiras alterações na secreção do cólon podem ser pelo menos em parte atribuíveis às células enterocromafins. Há evidências que a disponibilidade de serotonina aumenta na colite experimental no cólon distal (BERTRAND et al. 2010). Foi demonstrado um importante papel da serotonina por fluoxetina, um inibidor da reabsorção de serotonina que atenuado a gravidade da colite aguda induzida por DSS em camundongos (KOH et al., 2011).

Os estudos sobre o papel das citocinas na DII (em ambos modelos humanos e animais) tem sido largamente limitada às análises de conjuntos individuais ou de citocinas (ALEX et al., 2009). No entanto, é evidente que a redundância funcional, sinergia, pleiotropia, e resultado da regulação concomitante de uma rede de dinâmica de citocinas dependente do complexo de interação de múltiplos fatores, ao invés de efeitos isolados de moléculas simples de sinalização ou vias (O'SHEA; MURRAY²², 2008 apud ALEX et al., 2009, p. 341-352).

Colite- DSS é comumente utilizada para estudar a DII, no entanto, não se considera o melhor modelo para estudar o envolvimento de células T ou B na DII (DIELEMAN et al., 1994; MORGAN et al., 2013), sugerindo que a imunidade adaptativa não é envolvida na colite aguda. O modelo de colite- DSS promove a perda de muco e a eventual penetração bacteriana encontrada durante o trauma intestinal (MORGAN et al., 2013). O fato de que a colite DSS aguda pode ser induzida sem a ajuda das células T, usando meramente o sistema imune inato (DIELEMAN et al., 1994), tornou uma metodologia inoportuna para pesquisas com células-T. No entanto, é conhecido que uma resposta imune adaptativa se desenvolve, e células T se acumulam no local da inflamação (VAN DOP et al., 2010).

Tem sido proposto, mas não provado, que muitos das manifestações extra-intestinais em ambas as formas de DII podem ser atribuída à ativação ou regulação aberrante

²² O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, v. 28, p. 477-487, 2008.

dos leucócitos circulantes (WITTIG et al., 1999). Funderburg et al. (2013), relatam que trabalhos anteriores o aumento níveis circulantes de proteínas de fase aguda (PCR) e citocinas pró-inflamatória (IL-6, IFN- γ) na população da DII global, e em DC e CU individualmente. Além disso, os autores demonstraram que a elevada inflamação crônica na DII está associada com aumento da ativação das células T do sangue periférico, sugerindo que a inflamação intestinal localizada pode estimular a resposta imune adaptativa de todo o sistema.

As subpopulações de células T CD4⁺ são extremamente importantes na DII através da regulação da produção de citocinas pró/ anti-inflamatórias (MAYNARD; WEAVER, 2009; STROBER; FUSS, 2011). Se as células T CD4⁺ desempenham um papel crítico na patogênese imune na mucosa intestinal, tanto em CD e CU (ZENEWICZ; ANTOV; FLAVELL, 2009), sua ativação na periferia seria antecipada. As células T CD4⁺ CD25⁺ T (reg) são aumentados durante a remissão, mas diminuem durante a doença ativa. Isto contrasta com o seu forte aumento no sangue periférico de pacientes com diverticulite aguda (MAUL et al., 2005). Além disso, os estudos sobre o sangue periférico de pacientes CU encontrada uma diminuição nos números relativos e absolutos de células T reguladoras CD4⁺ (TAKAHASHI et al., 2006; LI et al., 2010). No entanto, a função relativa de células T reguladoras durante a remissão não é totalmente clara (LANGHORS et al., 2014).

Neste estudo, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre o percentual de células T CD4⁺; CD8⁺. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ não aparentam ser importantes na indução da colite- DSS aguda. As células CD8⁺ diminuiram enquanto que as células CD4⁺ permaneceram inalteradas na colite DSS aguda em BALB/ c e camundongos C57BL/ 6 (STEVCEVA et al., 2001). Os pesquisadores Lee et al. (2011) e Funderburg et al. (2013), concordaram que um perfil de transcrição ativado das células T CD8⁺ na DII em circulação serviria como um curso da doença ativa, ao passo que nenhuma correlação equivalente foi observada com a expressão de genes de células T CD4⁺, porém o assunto necessita de mais estudos. Curiosamente, células T CD4⁺, mas não CD8⁺, foram aumentadas em CD, mas não em CU (FUNDERBURG et al., 2013).

Curiosamente, Sankaran-Walters et al. (2013), concluíram em seus estudos que as mulheres possuíam níveis mais altos de ativação imune e expressão gênica associada à inflamação em amostras de mucosa do intestino do que homens. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ resultaram em um nível significativamente mais elevado da ativação imune associada à fenótipo no sangue periférico bem como no tecido linfóide associado ao intestino em conjunto

com níveis mais elevados de proliferação das células T. As células T CD4⁺ que mostraram regulação positiva de IL1 β bem como os genes associados via-TH17 contribuíram grande parte do perfil inflamatório.

As moléculas CD14⁺ são expressas em monócitos e macrófagos (SIMMONS et al., 1989) e menos fortemente em neutrófilos (WRIGHT et al., 1991). Não encontramos diferença estatística entre os grupos estudados nas células CD14⁺. Estudos de Grimm et al. (1995), mostraram que os monócitos do sangue recentemente recrutados na DII são CD14⁺ e seus altos níveis em monócitos do sangue não foram afetados pela presença da DII. Embora a ausência de CD14⁺ na maioria dos macrófagos intestinais sugere que o receptor é regulado neste ambiente, a sua presença numa subpopulação de células da mucosa afetada pela DII suporta a hipótese de que estas células representam monócitos recentemente recrutados a partir da circulação e este recrutamento também é sugerido pela concentração de células CD14⁺ em torno de vasos sanguíneos (GRIMM, et al., 1995). De fato, os monócitos marcados com radioisótopos ligados a anticorpos anti-CD14 a partir do sangue ao intestino inflamado na DII (GRIMM et al., 1995). Os pesquisadores Mahida et al. (1989) e Allison e Poulter (1991) demonstraram anteriormente que há significativa heterogeneidade de macrófagos na DII mucosa, e atribuíram a esta o recente recrutamento de monócitos do sangue periférico para o intestino inflamado. No intestino inflamado, o influxo rápido e contínuo de monócitos do sangue resulta na presença de uma segunda população substancial de macrófagos que é fortemente CD14⁺ (GRIMM et al., 1995). A expressão de superfície de CD14⁺ pode ser ainda mais aumentada pela presença de CD14⁺ solúvel no soro secundária à inflamação. Juntas, estas podem resultar em produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras tais como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 (DENTENER et al., 1993).

Maes et al. (1997), relataram que o tratamento subcrônico com antidepressivos reduziram significativamente o número de leucócitos e neutrófilos, mas não teve nenhum efeito quer sobre o número absoluto dos outros de células mononucleares do sangue periférico, ou a relação de células T CD4⁺/CD8⁺. Os resultados sugerem que (i) o elevado de células T CD4⁺/CD8⁺ em relação à depressão maior é um marcador de traço de doença e da resistência ao tratamento; (ii) o aumento do número de leucócitos e neutrófilos são marcadores do estado de depressão e são reduzidos pela terapia subcrônica com antidepressivos; (iii) o número e percentagem de monócitos diminuem com relação à duração da doença e da incidência do episódio depressivo.

Estudo com o uso da desipramina (ATC) demonstrou que a atenuação da severidade da colite em modelo de colite experimental (VARGHESE et al., 2006; GHIA et al., 2009) ou com o uso da fluoxetina (ISRS) (KOH et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a amitriptilina mostrou efeitos benéficos na colite- DSS em camundongos pelos resultados obtidos como redução da perda de peso, mieloperoxidase, burst oxidativo e análise de citocinas (plasma e cólon).

7 CONCLUSÃO

O tratamento com amitriptilina é capaz de atenuar diversos parâmetros analisados em um modelo murinho de colite por DSS. A via de administração oral e o regime de tratamento longo se mostraram eficientes em reduzir a gravidade da colite em camundongos. Enquanto mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos para a atenuação da doença observada aqui, podemos concluir que antidepressivos como a amitriptilina, além de prescritos com o intuito de melhorar aspectos psicológicos e emocionais associados a colite em humanos, podem de fato melhorar o curso da doença, tornando-os medicamentos com potencial terapêutico relevante na doença humana.

REFERÊNCIAS

- ABBADIE, C. Chemokines, chemokine receptors and pain. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 529- 534, 2005.
- ABDEL-SALAM, O. M.; NOFAL, S. M.; EL-SHENAWY, S. M. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 2, p. 157-165, 2003.
- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 21, p. 2066- 2078, 2009.
- ACHAR, E.; ACHAR, R. A.; PAIVA, T. B.; Campos, A. H.; Schor, N. Amitriptyline Eliminates Calculi through Urinary Tract. **Kidney International**, v. 64, n. 4, p. 1356- 1364, 2003.
- ADER, R.; COHEN, N. Conditioning of the immune response. **Netherland Journal of Medicine**, v. 39, n. 3-4, p. 263- 273, 1991.
- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 167- 176, 2000.
- ADDOLORATO, G.; CAPRISTO, E.; STEFANINI, G. F.; GASBARRINI, G. Inflammatory bowel disease: a study of the association between anxiety and depression, physical morbidity, and nutritional status. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. 10, p. 1013- 1021, 1997.
- ALEX, P.; ZACHOS, N. C.; NGUYEN, T.; GONZALES, L. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 15, n. 3, p. 341- 352, 2009.
- ALLISON, M. C.; POULTER, L. W. Changes in phenotypically distinct mucosal macrophage populations may be a prerequisite for the development of inflammatory bowel disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 85, p. 504- 509, 1991.
- ALPI, A.; COCCHI, A.; MENEGHELLI, A.; PAFUMI, N.; PATELLI, G. Working with families in the early stages of psychosis: a structured intervention for caregivers. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia**, v. 30, n. 3, p. B62-70, 2008. Supplement, 1 B.
- ALVES, G. J.; VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p. 172-179, 2006.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.

ALVES, G. J.; VISMARI, L.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 6, p. 297-303, 2007.

ANISMAN, H.; RAVINDRAN, A. V.; GRIFFITHS, J. MERALI, Z. Interleukin-1 beta production in dysthymia before and after pharmacotherapy. **Biology Psychiatry**, v. 46, p. 1649-1655, 1999.

ANISMAN, H.; MERALI, Z. Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. **Annals of Medicine**, v. 35, n. 1, p. 2-11, 2003.

ASTRY, B.; HARBERTS, E.; MOUDGIL, K.D. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis. **Journal of Interferon & Cytokine**, v. 31, p. 927-940, 2011.

ATREYA, R.; MUDTER, J.; FINOTTO, S.; MÜLLBERG, J.; JOSTOCK, T.; WIRTZ, S.; SCHÜTZ, M.; BARTSCH, B.; HOLTMANN, M.; BECKER, C.; STRAND, D.; CZAJA, J.; SCHLAAK, J. F.; LEHR, H. A.; AUTSCHBACH, F.; SCHÜRMAN, G.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; ITO, H.; KISHIMOTO, T.; GALLE, P. R.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M. F. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. **Nature Medicine**, v. 6, p. 583- 588, 2000.

AVILA, R.; BOTTINO, C. Cognitive changes update among elderly with depressive syndrome. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 4, p. 316-20, 2006.

AXELSSON, L. G.; LUNDBERG, C.; LANDSTRÖM, E.; BYLUND-FELLENIS, A. C. The degree of sulfate content and the molecular weight of dextran sulfate and carrageenan are important for the induction of colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 110, p. A858, 1996a. Supplement, 4.

AXELSSON, L. E.; LANDSTROM, T.; GOLDSCHMIDT, A.; GRONBERG, A.; BYLUND-FELLENIS, A. C. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. **Inflammation Research**, v. 45, p. 181- 191, 1996b.

AZUMA, Y. T.; HAGI, K.; SHINTANI, N.; KUWAMURA, M.; NAKAJIMA, H.; HASHIMOTO, H.; BABA, A.; TAKEUCHI, T. Pacap provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. **Journal Cell Physiology**, v. 216, p. 111-119, 2008.

BAI, F.; LI, X.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Intra- and interstrain differences in models of 'behavioral despair'. **Pharmacology Biochemical Behavior**, v. 70, p. 187-192, 2001.

BAILEY, R. W.; BOURNE, E. J. Intracellular glycosidases of dextran-producing bacteria. **Nature**, v. 15, n. 191, p. 277-8, 1961.

BALDESSARINI, R. J. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw- Hill., 2006. p. 429-459.

BAMIAS, G.; KAL TSA, G.; LADAS, S. D. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Discovery Medicine**, v. 11, p. 459- 467, 2011.

BAMIAS, G.; MARTIN, C.; MISHINA, M.; ROSS, W. G.; RIVERA-NIEVES, J.; MARINI, M.; COMINELLI, F. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 128, p. 654- 666, 2005.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BENBERNOU, N.; ESNAULT, S.; SHIN, H. C. K.; FEKKAR, H.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of IFN- γ , IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. **Immunology**, v. 91, p. 361-368, 1997.

BERTOLUCCI, M.; PEREGO, C.; DE SIMONI, M. G. Interleukin-6 is differently modulated by central opioid receptor subtypes. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. R956-R959, 1997.

BERTRAND, P. P.; BARAJAS-ESPINOSA, A.; NESHAT, S.; BERTRAND, R. L.; LOMAX, A. E. Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, p. G446-G455, 2010.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrinology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996

BEST, W. R.; BECKTEL, J. M.; SINGLETON, J. W.; KERN, JR. F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's disease study. **Gastroenterology**, v. 70, p. 439-444, 1976.

BIANCHI, M.; ROSSONI, G.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; BERTI, F. Effects of chlomipramine and fluoxetine on subcutaneous carrageenin-induced inflammation in the rat. **Inflammation Research**, v. 44, p. 466-469, 1995.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M.H.M.A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELOS, S. A.; LARSSON, C. E.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2- 49.

BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S; MALUF, S. Medicamentos antidepressivos: inserção na prática biomédica (1941 a 2006) a partir da divulgação em um livro-texto de farmacologia. **Mana**, v. 19, n. 2, p. 219-247, 2013.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067-70, 1984.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiological Reviews**, v. 69, p. 1- 27, 1989.

BLANCHARD, B. A.; GLICK, S. D. Sex differences in mesolimbic dopamine responses to ethanol and relationship to ethanol intake in rats. **Recent Developments in Alcoholism**, v. 12, p. 231- 241, 1995.

BLUTHE, R. M.; MICHAUD, B.; POLI, V.; DANTZER, R. Role of IL-6 in cytokine induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. **Physiology and Behavior**, v. 70, n. 3-4, p. 367-373, 2000.

BOISMENU, R.; CHEN, Y. Insights from mouse models of colitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 267- 278, 2000.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 94, p. 147- 160, 1988.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206- 209, 1982.

BRAEGGER, C. P.; NICHOLLS, S.; MURCH, S. H.; STEPHENS, S.; MACDONAL, T. T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, v. 339, p. 89-91, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças inflamatórias intestinais surgem da interação de quatro fatores fundamentais; entenda**. Disponível em: <http://sites.uai.com.br/app/noticia/saudeplena/noticias/2014/05/19/noticia_saudeplena,148675/doencas-inflamatorias-intestinais-surgem-da-interacao-de-quatro-fatore.shtml>. Acesso em: 21 Jan. 2015.

BREIDER, M. A.; EPPINGER, M.; GOUGH, A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 598- 604, 1997.

BROWN M. O. Inflammatory bowel disease. **Primary Care**, v. 26, p. 141- 170, 1999.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. **Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2008.

BRUSTOLIM, D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; KAST, R. E.; ALTSCHULER, E. L.; SOARES, M. B. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor- alpha and interferon-gamma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 903-907, 2006.

- BYLUND-FELLENIS, A.C.; LANDSTROMI, E.; AXELSSONT, L. G.; MIDTVEDT, T. Experimental colitis induced by dextran sulphate. **Microbial ecology in health and disease**, v. 7, p. 207-215, 1994.
- CALDARONE, B. J.; KARTHIGEYAN, K.; HARRIST, A.; HUNSBERGER, J. G.; WITTMACK, E.; KING, S. L.; JATLOW, P.; PICCIOTTO, M. R. Sex differences in response to oral amitriptyline in three animal models of depression in C57BL/6J mice. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 170, p. 94-101, 2003.
- CALEFI, A. S.; HONDA, B.T.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; DE SIQUEIRA, A.; NAMAZU, L. B.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; FONSECA, J. G.; ALOIA, T. P.; PIANTINO-FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 93, n. 6, p. 1344- 1353, 2014.
- CAPURON, L.; DANTZER, R. Cytokines and depression: the need for a new paradigm. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 119-124, 2003.
- CARLSSON, A.; FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 150- 151, 1968.
- CARR, D. J. Neuroendocrine peptide receptors on cells of the immune system. **Chemistry Immunology**, v. 52, p. 84-105, 1992.
- CARTER, M. J.; LOBO, A. J.; TRAVIS, S. P. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53, n. 5, p. V1- V16, 2004.
- CASPER, R. C.; KATZ, M. M.; BOWDEN, C. L.; DAVIS, J. M.; KOSLOW, S. H.; HANIN, I. The pattern of physical symptom changes in major depressive disorder following treatment with amitriptyline or imipramine. **Journal of Affective Disorders**, v. 31, p. 151-64. 1994.
- CASTANON, N.; BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R. Chronic treatment with the atypical antidepressant tianeptine attenuates sickness behavior induced by peripheral but not central lipopolysaccharide and interleukin-1beta in the rat. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 154, n. 1, p. 50- 60, 2001.
- CASTANON, N.; LEONARD, B. E.; NEVEU, P. J.; YIRMIYA, R. Effects of antidepressants on cytokine production and actions. **Brain Behavior Immunology**, v. 16, n. 5, p. 569-74, 2002.
- CATTANEO, A.; GENNARELLI, M.; UHER, R.; BREEN, G.; FARMER, A.; AITCHISON, K. J.; CRAIG, I. W.; ANACKER, C.; ZUNSZTAIN, P. A.; MCGUFFIN, P.; PARIANTE, C. M. Candidate Genes Expression Profile Associated with Antidepressants Response in the Gendep Study: Differentiating between Baseline 'Predictors' and Longitudinal 'Targets'. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 3, p. 377-385, 2013.
- CHEN, G. Y.; SHAW, M. H.; REDONDO, G; NÚÑEZ, G. The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 68, p. 10060- 10067, 2008.

CHENG, K. I.; WANG, H. C.; CHANG, L. L. Pretreatment with intrathecal amitriptyline potentiates anti-hyperalgesic effects of post-injury intra-peritoneal amitriptyline following spinal nerve ligation. **Biomed Central Neurology**, v. 12, n. 44, 2012.

CHIBA, T. Cell kinetics of carcinoma originating from rat colitis induced by dextran sulphate sodium. **Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi**, v. 90, p. 774-781, 1993.

CLAPPER, M. L.; COOPER, H. S.; CHANG, W. C. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemo preventive interventions. **Acta Pharmacology Sinica**, v. 28, n. 9, p. 1450-1459, 2007.

CODARRI, L.; FONTANA, A.; BECHER, B. Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. **Current Opinion Neurology**, v. 23, p. 205- 211, 2010.

COHN, D. W.; KINOSHITA, D.; PALERMO-NETO, J. Antidepressants prevent hierarchy destabilization induced by lipopolysaccharide administration in mice: a neurobiological approach to depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1262, p. 67-73, 2012.

COMINELLI, F.; NAST, C. C.; CLARK, B. D.; SCHINDLER, R.; LIERENA, R.; EYSSELEIN, V. E.; THOMPSON, R. C.; DINARELLO, C. A. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 3, p. 972- 980, 1990.

CONNOR, T. J.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. The effect of acute desipramine treatment on immunological parameters in the rat. **Medicine Science Research**, v. 25, p. 209-211, 1997.

CONNOR, T. J.; HARKIN, A.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. Olfactory bulbectomy provokes a suppression of interleukin-1 β and tumour necrosis factor α production in response to an in vivo challenge with lipopolysaccharide: effect of chronic desipramine treatment. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, p. 27-35, 2000.

CONTI, A. C.; CRYAN, J. F.; DALVI, A.; LUCKI, I.; BLENDY, J. A. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. **Journal Neuroscience**, v. 22, p. 3262- 3268, 2002.

COOPER, H. S.; MURTHY, S. N.; SHAH, R. S.; SEDERGRAN, D. J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Laboratory Investigation**, v. 69, n. 2, p. 238- 249, 1993.

COOPER, H. S.; MURTHY, S.; KIDO, K.; YOSHITAKE, H.; FLANIGAN, A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 757- 768, 2000.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **British Journal of Psychiatry**, v. 113, p. 1237- 1264, 1967.

CORDERO, M. D.; SÁNCHEZ-ALCÁZAR, J. A.; BAUTISTA-FERRUFINO, M. R.; CARMONA-LÓPEZ, M. I.; ILLANES, M.; RÍOS, M. J.; GARRIDO-MARAVAR, J.; ALCUDIA, A.; NAVAS, P.; DE MIGUEL, M. Acute oxidant damage promoted on cancer cells by amitriptyline in comparison with some common chemo therapeutic drugs. **Anticancer Drugs**, v. 21, p. 932- 944, 2010.

COSNES, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 3, p. 481-96, 2004.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behavior Immunogy**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196- 199, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic basis of disease**. 6. ed. USA: W. B. Saunders Company: 1999.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacology Science**, v. 23, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J. F.; KELLY, P. H.; NEIJT, H. C.; SANSIG, G.; FLOR, P. J.; VAN DER PUTTEN, H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2409- 2417, 2003.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 571- 625, 2005.

CROHN, B. B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. **JAMA**, v. 99, p. 1323- 1329, 1932.

CUONG, D. T.; KATSIKEROS, R.; ABIMOSLEH, S. M. Current and novel treatments. In: SHENNAK, M. M. **Ulcerative colitis from genetics to complications**, 2012. Cap. 12, p. 189-223, 2012.

DALVI, A.; LUCKI, I. Murine models of depression. **Psychopharmacology**, v. 147, p. 14-16, 1999.

DANIELSON, T. J. Monoamine oxidase inhibitors and tricyclic antidepressants. In: MOZAYANI, A.; RAYMON, L. P. **Handbook of drug interactions-** a clinical and forensic guide. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. Cap. 4, p. 149-173.

DANTZER, R. Innate immunity at the forefront of psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, p. 1 –6, 2004.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behavior Immunology**, v. 21, n. 2, p.153- 60, 2007.

DAVID, D. J.; NIC DHONNCHADHA, B. A.; JOLLIET, P.; HASCOET, M.; BOURIN, M. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression? **Behavioural Brain Research**, v. 119, p. 203–211, 2001.

DELEPLANQUE, B.; NEVEU P. J. Immunological effects of neuropsychiatric substances. In: GUENOUNOU, M. (Ed.). **Forum on immunomodulators**. Paris: John Libbey Eurotext, 1995. p. 287-302.

DENTENER, M. A.; BAZIL, V.; VON ASMUTH, E. J.; CESKA, M.; BUURMAN, W. A. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 2885- 2891, 1993.

DE PAULA, V. F.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; LACAVA, M. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. Methylendioxyamphetamine (Ecstasy) decreases neutrophil activity and alters leukocyte distribution in bone marrow, spleen and blood. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 191-200, 2009.

DE SCHEPPER, H. U.; DE MAN, J. G.; MOREELS, T. G.; PELCKMANS, P. A.; DE WINTER, B. Y. Functional gut disorders and inflammatory bowel disease : comorbidity and clinical challenges. **Practical Gastroenterology**, v. 32, n. 1, p. 10- 17 2008.

DE SOUZA, M. M.; BELASCO, A. G. S.; AGUILAR- NASCIMENTO, J. E. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 324- 328, 2008.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 29-36, 2008.

DHABHAR, F. S. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Annals New York Academic Science**, v. 840, p. 359-372, 1998.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 1059-1064, 1999.

DIAMOND, M.; KELLY, J. P.; CONNOR, T. J. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 481- 490, 2006.

DIAZ-GRANADOS, N.; HOWE, K.; LU, J.; MCKAY, D. M. Dextran sulfate sodium-induced colonic histopathology, but not altered epithelial ion transport, is reduced by

inhibition of phosphodiesterase activity. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 6, p. 2169- 2177, 2000.

DIELEMAN, L. A.; RIDWAN, B. U.; TENNYSON, G. S.; BEAGLEY, K. W.; BUCY, R. P.; ELSON, C. O. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1643-1652, 1994.

DIELEMAN, L. A.; PALMEN, M. J.; AKOL, H.; BLOEMENA, E.; PEÑA, A. S.; MEUWISSEN, S. G.; VAN REES, E. P. Chronic experimental colitis induced by dextran FELTEN, S. Y.; OLSCHOWKA, J. A. Noradrenergic sympathetic innervations of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminal form synaptic-like contact on lymphocytes in the splenic white pulp. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, p. 37–48, 1987.

DUNN, E.; BROWN, C.; LOVE, B. Decreasing anxiety. **Journal Health Care Mark**, v. 15, n. 1, p. 21-23, 1995.

EISEN, J., IRWIN, J., QUAY, J., LIVNAT, S. The effect of antidepressants on immune function in mice. **Biology Psychiatry**, v. 26, p. 805- 817, 1989.

EL YACOUBI, M.; BOUALI, S.; POPA, D.; NAUDON, L.; LEROUX-NICOLLET, I.; HAMON, M.; COSTENTIN, J.; ADRIEN, J.; VAUGEUIS, J. M. Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 6227–6232, 2003.

ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve: an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacology Review**, v. 52, p. 595- 638, 2000.

ELLSWORTH- BOWERS, E. R.; CORWIN, E. J. Nutrition and the psychoneuroimmunology of postpartum depression. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 180- 192, 2012.

ELSON, C. O.; SARTOR, R. B.; TENNYSON, G. S.; RIDDELL, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1344-1367, 1995.

FERRAZ-DE-PAULA, V.; RIBEIRO, A.; SOUZA-QUEIROZ, J.; PINHEIRO, M. L.; VECINA, J. F.; SOUZA, D. P.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; MOREAU, R. L.; QUEIROZ, M. L.; PALERMO-NETO, J. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA--Ecstasy) decreases neutrophil activity through the glucocorticoid pathway and impairs host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Journal Neuroimmune Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 690-702, 2014.

FLANIGAN, M. J.; ACCONE, Q.; LABURN, H. P. Amitriptyline attenuates the febrile response to a pyrogen in rabbits. **Journal Basic Clinical Physiology Pharmacology**, v. 3, p. 19–32, 1992.

FONSECA, E. S.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 205-215, 2002.

FORTIN, M.; DUBOIS, M. F.; HUDON, C.; SOUBHI, H.; ALMIRALL, J. Multimorbidity and quality of life: a closer look. **Health Quality Life Outcomes**, v. 5, n. 52, p. 1- 8, 2007.

FORT, M.; LESLEY, R.; DAVIDSON, N.; MENON, S.; BROMBACHER, F.; LEACH, M.; RENNICK, D. L-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 2793–2800, 2001.

FOSTER, B. C.; GALLICANO, K. D.; WHITEHOUSE, L. W.; MCGILVERAY, I. J.; KHAN, S. R. Dextran sulfate disposition in the rat. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 11, n. 7, p. 595-606, 1990.

FREDMAN, L.; CAULEY, J. A.; HOCHBERG, M.; ENSRUD, K. E.; DOROS, G. Mortality associated with caregiving, general stress, and caregiving-related stress in elderly women: results of caregiver-study of osteoporotic fractures. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 58, n. 5, p. 937- 943, 2010.

FRYER, J. D.; LUKAS, R. J. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. **Journal of Neurochemistry**, v.72, n. 3, p. 1117- 1124, 1999.

FUCHS, B. A.; ALBRIGHT, J. W.; ALBRIGHT, J. F. Adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. **Cellular Immunology**, v. 243, p. 495–508, 1986.

FUNDERBURG, N. T.; STUBBLEFIELD PARK, S. R.; SUNG, H. C.; HARDY, G.; CLAGETT, B.; IGNATZ-HOOVER, J.; HARDING, C. V.; FU, P.; KATZ, J. A.; LEDERMAN, M. M.; LEVINE, A. D. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 87- 97, 2013.

GAFFEN, S. L.; JAIN, R.; GARG, A.V.; CUA, D. J. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 585-600, 2014.

GASPARRINI, M.; RIVAS, D.; ELBAZ, A.; DUQUE, G. Differential expression of cytokines in subcutaneous and marrow fat of aging C57BL/6J mice. **Experimental Gerontology**, v. 44, p. 613-618, 2009.

GAUDIO, E.; TADDEI, G.; VETUSCHI, A.; SFERRA, R.; FRIERI, G.; RICCIARDI, G.; CAPRILLI, R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural and ultra structural aspects. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 44, p. 1458- 1475, 1999.

GEBOES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 10, n. 3, p. 189-202, 1998.

GEBBOES, K.; DALLE, I. Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation. **Gut**, v. 50, p. iii37- iii42, 2002, Supplement, III.

GEIER, M. S.; TENIKOFF, D.; YAZBECK, R.; MCCAUGHAN, G. W.; ABBOTT, C. A.; HOWARTH, G. S. Development and resolution of experimental colitis in mice with targeted deletion of dipeptidyl peptidase IV. **Journal of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 687-692, 2005.

GERSON, L. B.; TRIADAFILOPOULOS, G. Palliative care in inflammatory bowel disease: an evidence-based approach. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 6, n. 3, p. 228- 243, 2000.

GHIA, J. E.; GALEAZZI, F.; FORD, D. C.; HOGABOAM, C. M.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2209-2218, 2008.

GHIA, J. E.; GALEAZZI, F.; FORD, D. C. et al. Role of M-Csf-dependent macrophages in colitis is driven by the nature of the inflammatory stimulus. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. G770–G777, 2008.

GHIA, J. E.; BLENNERHASSETT, P.; DENG, Y.; VERDU, E. F.; KHAN, W. I.; COLLINS, S. M. Reactivation of inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. **Gastroenterology**, v. 136, n. 7, p. 2280- 2288, 2009.

GHIA, J. E.; PARK, A. J.; BLENNERHASSETT, P.; KHAN, W. I.; COLLINS, S. M. Adoptive transfer of macrophage from mice with depression-like behavior enhances susceptibility to colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 7, p. 1474- 1489, 2011.

GOLDSTEIN, B. I.; KEMP, D. E.; SOCZYNSKA, J. K.; MCINTYRE, R. S. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 70, p. 1078-1090, 2009.

GOUGH, D. J.; LEVY, D. E.; JOHNSTONE, R. W.; CLARKE, C. J. IFN gamma signaling- does it mean JAK-STAT? **Cytokine Growth Factor Review**, v. 19, p. 383–394, 2008.

GRAFF, L. A.; WALKER, J. R.; BERNSTEIN, C. N. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 15, n. 7, p. 1105- 1118, 2009.

GRIFFIN, M. G; MINER, P. B. Review article: refractory distal colitis explanations and options. **Aliment Pharmacology and Therapeutics**, v. 10, p. 39- 48, 1996.

GRIMM, M. C.; PULLMAN, W. E.; BENNETT, G. M.; SULLIVAN, P. J.; PAVLI, P.; DOE, W. F. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 387- 395, 1995.

GROSS, V.; ANDUS, T.; LESER, H. G.; ROTH, M.; SCHÖLMERICH, J. Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. **Journal klinische Wochenschrift**, v. 15, n. 69, p. 981- 987, 1991. Supplement, 21-23.

_____. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 102, p. 514–519, 1992.

GUEMEI, A. A.; EL DIN, N. M.; BARAKA, A. M.; EL SAID DARWISH, I. Do desipramine [10,11-dihydro-5-[3-(methylamino) propyl]-5H-dibenz[b,f]azepine monohydrochloride] and fluoxetine [N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]-propan-1-amine] ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 846-850, 2008.

GURGEL, J. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; RABELO, C. O.; PESSOA, B. B.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Amitriptyline, Clomipramine, and Maprotiline Attenuate the Inflammatory Response by Inhibiting Neutrophil Migration and Mast Cell Degranulation. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. 4, p. 387- 392, 2013.

HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; EFTHEKHARI, M. Anti-Inflammatory activity of a selection of antidepressant drugs. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 225-300, 2008.

HAJHASHEMI, V.; SADEGHI, H.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. The Role of central mechanisms in the anti-inflammatory effect of amitriptyline on carrageenan-induced paw edema in rats. **Clinics**, v. 65, n. 11, p. 1183-1187, 2010.

HALL, H.; OGREN, S. Effects of antidepressant drugs on different receptors in the brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 70, p. 393-407, 1981.

HALL, S. W.; COOKE, A. Autoimmunity and inflammation: murine models and translational studies. **Mammalian Genome**, v. 22, p. 377–389, 2011.

HAMASATO, E. K.; DE LIMA, A. P.; DE OLIVEIRA, A. P.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick partner increases allergic lung inflammatory response in mice. **Brain Behavior Immunology**, v. 42, p. 109-117, 2014.

HACKAM, D. G.; REDELMEIER, D. A. Translation of research evidence from animals to humans. **JAMA**, v. 296, p. 1731-1732, 2006.

HARMER, C. J.; BHAGWAGAR, Z.; PERRETT, D. I.; VÖLLM, B. A.; COWEN, P. J.; GOODWIN, G. M. Acute SSRI administration affects the processing of social cues in healthy volunteers. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 148–152, 2003a.

HARMER, C. J.; HILL, S. A.; TAYLOR, M. J.; COWEN, P. J.; GOODWIN, G. M. Toward a neuropsychological theory of antidepressant drug action: increase in positive emotional bias after potentiation of norepinephrine activity. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, p. 990–992, 2003b.

HASHIOKA, S.; KLEGERIS, A.; MONJI, A.; KATO, T.; SAWADA, M.; MCGEER, P. L.; KANBA, S. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. **Experimental Neurology**, n. 1, p. 33-42, 2007.

HEALY, D. **The antidepressant era**. Cambridge: Harvard University Press, 1997.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical Aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 79-94, 2002.

HERBERT, T. B.; COHEN, S. Depression and immunity: a meta-analytic review. **Psychological Bulletin**, v. 113, p. 472- 486, 1993.

HERBERTH, G.; WEBER, A.; RÖDER, S.; ELVERS, H. D.; KRÄMER, U.; SCHINS, R. P.; DIEZ, U.; BORTE, M.; HEINRICH, J.; SCHÄFER, T.; HERBARTH, O.; LEHMANN, I.; LISAPLUS STUDY GROUP. Relation between stressful life events, neuropeptides and cytokines: results from the LISA birth cohort study. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 19, n. 8, p. 722-729, 2008.

HELZER, J. E.; CHAMMAS, S.; NORLAND, C. C.; STILLINGS, W. A.; ALPERS, D. H. A study of the association between Crohn's disease and psychiatric illness. **Gastroenterology**, v. 86, n. 2, p. 324-330, 1984.

HICKIE, L.; LLOYD, A. Are cytokines associated with neuropsychiatric syndromes in humans? **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 677- 683, 1995.

HILES, S. A.; BAKER, A. L.; DE MALMANCHE T, ATTIA, J. Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. **Psychology Medicine**, v. 16, p. 1-12, 2012.

HIMMERICH, H.; BINDER, E. B.; KÜNZEL, H. E.; SCHULD, A.; LUCAE, S.; UHR, M.; POLLMÄCHER, T.; HOLSBOER, F.; ISING, M. Successful antidepressant therapy restores the disturbed interplay between TNF-alpha system and HPA axis. **Biology Psychiatry**, v. 60, p. 882-888, 2006.

HINZE-SELCH, D.; SCHULD, A.; KRAUS, T.; KÜHN, M.; UHR, M.; HAACK, M.; POLLMÄCHER, T. Effects of antidepressants on weight and on the plasma levels of leptin, TNF-alpha and soluble TNF receptors: a longitudinal study in patients treated with amitriptyline or paroxetine. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 13-19, 2000.

HIRATA, I.; MURANO, M.; NITTA, M.; SASAKI, S.; TOSHINA, K.; MAEMURA, K.; KATSU, K. Estimation of mucosal inflammatory mediators in rat DSS-induced colitis. Possible role of PGE(2) in protection against mucosal damage. **Digestion**, v. 63, n. 1, p. 73-80, 2001.

HOIE, O.; WOLTERS, F. L.; RIIS, L.; BERNKLEV, T.; AAMODT, G.; CLOFENT, J.; TSIANOS, E.; BELTRAMI, M.; ODES, S.; MUNKHOLM, P.; VATN, M.; STOCKBRÜGGER, R. W.; MOUM, B. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected european cohort followed for 10 years. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 507-515, 2007.

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocrinology Reviews**, v. 17, p. 187-205, 1996.

HUANG, H.; PATEL, D. D.; MANTON, K. G. The immune system in aging: roles of

cytokines, T cells and NK cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 192- 215, 2005.

HUANG, W.; JIANG, S. M.; JIA, L.; You, L. Q.; Huang, Y. X.; Gong, Y. M.; Wang, G. Q. Effect of amitriptyline on gastrointestinal function and brain-gut peptides: a double-blind trial. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 26, p. 4214- 4220, 2013.

HYAMS, J. S.; FITZGERALD, J. E.; TREEM, W. R.; WYZGA, N.; KREUTZER, D. L. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 104, p. 1285- 1292, 1993.

ISHIOKA, T.; KUWABARA, N.; OOHASHI, Y.; WAKABAYASHI, K. Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 215- 244, 1987.

ICHINOSE, M.; BARNES, P. J. Cytokine-directed therapy in asthma. **Current Drug Targets Inflammatory Allergy**, v. 3, p. 263–269, 2004.

IWANAGA, T.; HOSHI, O.; HAN, H.; FUJITA, T. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: Some possible mechanisms of cecal ulceration. **Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 4, p. 430-438, 1994.

JANSSEN, D. G.; CANIATO, R. N.; VERSTER, J. C.; BAUNE T. A. A Psychoneuroimmunological Review on Cytokines Involved in Antidepressant Treatment Response. **Human Psychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 201- 215, 2010.

JIANG, C. L.; LU, C. L.; LIU, X. Y. The molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 363–369, 1998.

JIANG, H. R.; GILCHRIST, D. S.; POPOFF, J. F.; JAMIESON, S. E.; TRUSCOTT, M.; WHITE, J. K.; BLACKWELL, J. M. Influence of Slc11a1 (Formerly Nramp1) on Dss-induced colitis in mice. **Journal of Leukocytes Biology**, v. 85, n. 4, p. 703- 10, 2009.

JIWA, M.; MITCHELL, G.; SIBBRIT, D.; GIRGIS, A.; BURRIDGE, L. Addressing the needs of caregivers of cancer patients in general practice: a complex intervention. **Quality in Primary Care**, v. 18, n. 1, p. 9-16, 2010.

JOHANSSON, M. E.; GUSTAFSSON, J. K.; SJÖBERG, K. E. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. **PLoS One**, v. 5, n. 8, e. 12238, p. 1-9; 2010.

KAGAYA, A.; KUGAYA, A.; TAKEBAYASHI, M.; FUKUE-SAEKI, M.; SAEKI, T.; YAMAWAKI, S.; UCHITOMI, Y. Plasma concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor alpha of depressed patients in Japan. **Neuropsychobiology**, v. 43, p. 59- 62, 2001.

KAMEI, J.; MIYATA, S.; MORITA, K.; SAITOH, A.; TAKEDA, H. Effects of selective

serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 247-254, 2003.

KATZ, M. M.; KOSLOW, S. H.; MAAS, J. W.; FRAZER, A.; BOWDEN, C. L.; CASPER, R.; CROUGHAN, J.; KOCSIS, J.; REDMOND, JR. E. The timing, specificity and clinical prediction of tricyclic drug effects in depression. **Psychological Medicine**, v. 17, p. 297- 309, 1987.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 573-621, 2010.

KAST, R. E. Anti- and pro-inflammatory considerations in antidepressant use during medical illness: bupropion lowers and mirtazapine increases circulating tumor necrosis factor-alpha levels. **General Hospital Psychiatry**, v. 25, p. 495- 496, 2003.

KATAYAMA, K.; WADA, K.; NAKAJIMA, A.; MIZUGUCHI, H.; HAYAKAWA, T.; NAKAGAWA, S.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R.; KAMISAKI, Y.; BLUMBERG, R. S.; MAYUMI, T. A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1315-1324, 2003.

KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 401- 412, 2002.

KHAN, W. I.; MOTOMURA, Y.; WANG, H.; EL-SHARKAWY, R. T.; VERDU, E. F.; VERMA-GANDHU, M.; ROLLINS, B. J.; COLLINS, S. M. Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, n. 5, p. G803-G811, 2006.

KIRSNER, J. B.; ELCHLEPP, J. The production of an experimental ulcerative colitis in rabbits. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 70, p. 102- 119, 1957.

KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; SAGARA, E. A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents. **Experimental Animals**, v. 51, n. 2, p. 203- 206, 2002.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (dss) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 61, n.1, p. 67-70, 1999.

_____. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. **Experimental Animals**, v. 49, n. 1, p. 9-15, 2000.

KOBOZIEV, I.; KARLSSON, F.; ZHANG S.; GRISHAM, M. B. Pharmacological Intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 5, p. 1229-1245, 2011.

KOH, S. J.; KIM, J. M.; KIM, I. K.; KIM, N.; JUNG, H. C.; SONG, I. S.; KIM, J. S. Fluoxetine inhibits NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 1, p. G9- G19, 2011.

KORNHUBER, J.; HENKEL, A. W.; GROEMER, T. W.; STÄDTLER, S.; WELZEL, O.; TRIPAL, P.; ROTTER, A.; BLEICH, S.; TRAPP, S. Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n.1, p. 152-164, 2010.

KOYAMA, H.; IWAI, A.; IWASHITA, E.; TOKUNAGA, T.; SASAKI, J.; MASTUDA, K.; SHITAYA, M.; KAWAGUCHI, A.; NAGAO, S.; MIYAHARA, T.; HINO, K.; NIWA, H. Experimental colitis in rats resembling human ulcerative colitis (in Japanese). **Gastroenterology Endoscopy**, v. 37, p. 1584-1593, 1992.

KREYDIYYEH, S. I.; AL-SADI, R. The mechanism by which interleukin-1 beta reduces net fluid absorption from the rat colon. **European Cytokine Network**, v. 13, n. 3, p. 358- 363, 2002.

KUBERA, M.; BASTA-KAIM, A.; SKOWRON-CENDRZAK, A.; MAZUR-KOLECKA, B.; ROMAN, A.; BORYCZ, J. Effect of repeated amitriptyline administration to mice on the T lymphocyte proliferative activity and natural killer cell cytotoxicity. **Polish Journal Pharmacology**, v. 47, p. 321- 326, 1995.

KUBERA, M.; MAES, M. Serotonin-immune interactions in major depression. In: PETERSON, P.; KORDON, C.; CHRISTEN, Y. (Ed.). **Neuro-immune interactions in neurologic and psychiatric disorders**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. p. 79- 87.

KUBERA, M.; HOLAN, V.; MATHISON, R.; MAES, M. The effect of repeated amitriptyline and desipramine administration on cytokine release in C57BL/6 Mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 8, p. 785– 797, 2000.

KUBERA, M.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; KAJTA, M.; BASTA-KAIM, A.; SCHARPE, S.; BUDZISZEWSKA, B.; MAES, M. Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 185- 192, 2004.

KUBERA, M.; LIN, A. H.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; VAN BOCKSTAELE, D.; MAES, M. Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. **Journal Clinical Psychopharmacology**, v. 21, p. 199- 206, 2001.

KUHN R. Geschichte der medikamentösen depression sbehandlung. In: LINDE, O. K. (Ed.). **Pharmakopsychiatrie im Wandel der Zeit**. Klingenmünster: Tilia-Verlag, 1988. p. 10-27.

KULLMANN, F.; MESSMANN, H.; ALT, M.; GROSS, V.; BOCKER, T.; SCHÖLMERICH, J.; RÜSCHOFF, J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 16, p. 238- 246, 2001.

KURINA, L. M.; GOLDACRE, M. J.; YEATES, D.; GILL, L. E. Depression and anxiety in people with inflammatory bowel disease. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 55, n. 10, p. 716- 720, 2001.

KURTOVIC, J.; SEGAL, I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. **Tropical gastroenterology**, v. 25, p. 9-14, 2004.

KWON, K. H.; MURAKAMI, A.; HAYASHI, R.; OHIGASHI, H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing Dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 647- 654, 2005.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 37, p. 1- 12, 2010.

LAMPINEN, M.; SANGFELT, P.; TAHA, Y.; CARLSON, M. Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 23, p. 939–946, 2008.

LANDMANN, R.; SCHAUB, B.; LINK, S.; WACKER, H. R. Unaltered monocyte function in patients with major depression before and after three months of antidepressive therapy. **Biological Psychiatry**, v. 41, n. 6, p. 675- 81, 1997.

LANGER, G.; HEIMANN, H. E. **Psychopharmaka, grundlagen und therapie**. Viena-Nueva York: Springer-Verlag, 1983. p. 59-65.

LANQUILLON, S.; KRIEG, J. C.; BENING-ABU-SHACH, U.; VEDDER, H. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 370- 379, 2000.

LAPIN, J. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **The Lancet**, p. 132- 136, 1969.

LARMONIER, C. B.; MIDURA-KIELA, M. T.; RAMALINGAM, R.; LAUBITZ, D.; JANIKASHVILI, N.; LARMONIER, N.; GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Modulation of neutrophil motility by curcumin: implications for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 2, p. 503- 515, 2011.

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 32, n. 3, p. 402- 409, 2010.

LEE, J. C.; LYONS, P. A.; MCKINNEY, E. F.; SOWERBY, J. M.; CARR, E. J.; BREDIN, F.; RICKMAN, H. M.; RATLAMWALA, H.; HATTON, A.; RAYNER, T. F.; PARKES, M.; SMITH, K. G. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 4170-4179, 2011.

LEE, M. J.; LEE, J. K.; CHOI, J. W.; LEE, C. S.; SIM, J. H. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e38801, 2012.

LEONARD, B. E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Program Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 767- 780, 2001.

LI, Z.; ARIJS, I.; DE HERTOOGH, G.; VERMEIRE, S.; NOMAN, M.; BULLENS, D.; COOREVITS, L.; SAGAERT, X.; SCHUIT, F.; RUTGEERTS, P.; CEUPPENS, J. L.; VAN ASSCHE, G. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, n. 8, p. 1299- 1310, 2010.

LI, L.; LIU, Z.; YANG, X.; YAN, H.; BAO, S.; FEI, J. Bioluminescence Imaging for Il-1 β Expression in Experimental Colitis. **Journal of Inflammation**, v. 10, n. 1, p. 16, 2013.

LI, L.; GONG, C.; ZHAO, M.; FENG, B. Role of Interleukin-22 in Inflammatory Bowel Disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 8177- 8188, 2014.

LICINIO, J.; WONG, M. L. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 317- 327, 1999.

LIEBERMAN III, J. A. History of the use of antidepressants in primary care. **Primary Care Companion Journal of Clinical Psychiatry**, v. 5, n. 7, p. 6-10, 2003.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.

LIGNON, M. F.; BERNAD, N.; MARTINEZ, J. Pharmacological characterization of type B cholecystokinin binding sites on the human JURKAT T lymphocyte cell line. **Molecular Pharmacology**, v. 39, n. 5, p. 615-620, 1991.

LIGUMSKY, M.; SIMON, P. L.; KARMELI, F.; RACHMILEWITZ, D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, v. 31, n. 6, p. 686- 689, 1990.

LITTRELL, J. L. Taking the perspective that a depressive state reflects inflammation: implications for the use of antidepressants. **Frontiers in Psychology**, v. 3, p. 297, 2012.

LIU, X.; GERSHENFELD, H. K. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 575- 581, 2001.

LOCKART-MUMMERY, H. E. Crohn's disease: anal lesions. **Disease Colon Rectum**, v. 18, n. 200, p. 282-293, 1975.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; Historical evolution of the neurotransmission concept. **Journal Neural Transmission**, v. 116, n. 5, p. 515- 533, 2009.

LOUIS, E.; BELAICHE, J.; VAN KEMSEKE, C.; FRANCHIMONT, D.; DE GROOTE, D.; GUEENEN, V.; MARY, J. Y. A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 939- 944, 1997.

LUCIN, K. M.; WYSS-CORAY, T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? **Neuron**, v. 64, n. 1, p.110-122, 2009.

LUDWICZEK, O.; VANNIER, E.; BORGGRAEFE, I.; KASER, A.; SIEGMUND, B.; DINARELLO, C. A.; TILG, H. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 138, p. 323- 329, 2004.

MACHADO, T. R. M. **Alterações neuroimunes induzidas em camundongos machos pela convivência com um companheiro doente**. 2013. 147 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 417- 448, 1995.

MAES, M.; SONG, C.; LIN, A-H.; KUBERA, M. In Vitro Immunoregulatory Effects of Lithium in Healthy Volunteers. **Psychopharmacology**, v. 143, p. 401- 407, 1999.

MAES, M.; VANDOOOLAEGHE E.; VAN HUNSEL, F; BRIL, T.; DEMEDTS, P.; MAES, M. The immunoregulatory effects of antidepressants. **Human Psychopharmacology**, v. 16, p. 95-103, 2001.

MAESTRONI, G. Immunology needs the mind. **Nature Immunology**, v. 5, n. 8, p. 763, 2004.

MAHIDA, Y. R.; PATEL, S.; GIONCHETTI, P.; VAUX, D.; JEWELL, D. P. Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. **Gut**, v. 30, p. 826- 834, 1989.

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**, v. 30, n. 6, p. 835- 838, 1989.

MAHLER, M.; BRISTOL, I. J.; LEITER, E. H.; WORKMAN, A. E.; BIRKENMEIER, E. H.; ELSON, C. O.; SUNDBERG, J. P. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 3, p. 544-551, 1998.

- MARCHAND, F.; ARDID, D.; CHAPUY, E.; ALLOUI, A.; JOURDAN, D.; ESCHALIER, A. Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 1, p. 268- 274, 2003.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Review Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521-532, 2005.
- MARDINI, H. E.; KIP, K. E.; WILSON, J. W. Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 3, p. 492- 497, 2004.
- MARQUES-DEAK, A. H.; NETO, F. L.; DOMINGUEZ, W. V.; SOLIS, A. C.; KURCGANT, D.; SATO, F.; ROSS, J. M.; PRADO, E. B. Cytokine profiles in women with different subtypes of major depressive disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, p. 152–159, 2007.
- MARINO, F.; COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; FERRARI, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 489- 495, 1999.
- MARTELLI, E. A.; TOTH, E.; SEGRE, A. D.; CORSICO, N. Mechanism of inhibition of experimental inflammation by antidepressant drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 2, p. 229- 233, 1967.
- MATSUNAGA, K.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H.; YAMAMOTO, Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to Legionella pneumophila infection by nicotine. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6518- 6524, 2001.
- MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P.; BERG, E.; GIESE, T.; STALLMACH, A.; ZEITZ, M.; DUCHMANN, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25 high T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1868- 1878, 2005.
- MAX, M. B.; SCHAFER, S. C.; CULNANE, M.; SMOLLER, B.; DUBNER, R.; GRACELY, R. H. Amitriptyline, but not lorazepam, relieves postherpetic neuralgia. **Neurology**, v. 9, p. 1427- 1432, 1988.
- MAXWELL, JR.; VINEY, J. L. Overview of mouse models of inflammatory bowel disease and their use in drug discovery. **Current protocols in pharmacology**, v. 47, cap. 5, p. 5. 57.1-5.57.19, 2009.
- MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Intestinal effector T cells in health and disease. **Immunity**, v. 31, p. 389- 400, 2009.
- MAYORGA, A. J.; LUCKI, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 110-112, 2001.

MCALINDON, M. E.; HAWKEY, C. J.; MAHIDA, Y. R. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 214- 219, 1998.

MCCARTY, M. F. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. **Medicine Hypotheses**, v. 52, p. 465-477, 1999.

McKIM, W. A. **Research design and the behavioral analysis of drug effects**. In: McKIM, W. A. (Ed.) *Drugs and behavior: an introduction to behavioral pharmacology*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2003, p. 24- 38.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAËLSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **American Journal of Physiology: gastrointestinal and liver physiology**, v. 288, p. 1328- 1338, 2005.

MELGAR, S.; BJURSELL, M.; GERDIN, A. K.; SVENSSON, L.; MICHAËLSSON, E.; BOHLOOLY-Y, M. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G165- G172, 2007.

MELGAR, S.; KARLSSON, L.; REHNSTRÖM, E.; KARLSSON, A.; UTKOVIC, H.; JANSSON, L.; MICHAËLSSON, E. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 6, p. 836- 844, 2008.

MELMED, G. Y.; TARGAN, S. R. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 2, p. 110- 117, 2010.

MIKOVA, O.; YAKIMOVA, R.; BOSMANS, E.; KENIS, G.; MAES, M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. **European Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 203- 208, 2001.

MIKOCKA-WALUS, A. A.; TURNBULL, D. A.; MOULDING, N. T.; WILSON, I. G.; ANDREWS, J. M.; HOLTSMANN, G. J. Antidepressants and inflammatory bowel disease: a systematic review. **Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health**, v. 2, n. 24, p. 1- 9, 2006.

MIKOCKA-WALUS, A. A.; BENJAMIN A. L.; STEWART, J.; ANDREWS, J. A magic pill? A qualitative analysis of patients' views on the role of antidepressant therapy in inflammatory bowel disease (IBD). **Gastroenterology**, v. 12, n. 93, p. 2- 9, 2012.

MILLER, A. H.; LACKNER, C. Tricyclic antidepressants and immunity. In: MILLER, A. H. (Ed.). **Depressive disorders and immunity**. Washington (DC): American Psychiatry Press, 1989. p. 85-104.

MITTERMAIER, C.; DEJACO, C.; WALDHOER, T.; OEFFERLBAUER-ERNST, A.; MIEHSLER, W.; BEIER, M.; TILLINGER, W.; GANGL, A.; MOSER, G. Impact of

depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. **Psychosomatic Medicine**, v. 66, n. 1, p. 79–84, 2004.

MIYATA, S.; HIRANO, S.; KAMEI, J. Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT(1A) receptor in the mouse tail suspension test. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 461- 469, 2003.

MONANE, M.; AVORN, J.; BEERS, M. H.; EVERITT, D. E. Anticholinergic drug use and bowel function in nursing home patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 5, p. 633-638, 1993.

MORGAN, M. E.; ZHENG, B.; KOELINK, P. J.; VAN DE KANT, H. J.; HAAZEN, L. C.; VAN ROEST, M.; GARSSSEN, J.; FOLKERTS, G.; KRANEVELD, A. D. New perspective on Dextran sodium sulfate colitis: antigen-specific T cell development during intestinal inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1- 12, 2013.

MUDTER, J.; WIRTZ, S.; GALLE, P. R.; NEURATH, M. F. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L CD4 T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. **Pathobiology**, v. 70, p. 170- 176, 2002.

MUDTER, J.; NEURATH, M. F. Il-6 Signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 13, n. 8, p. 1016- 1023, 2007.

MURTHY, S. N.; COOPER, H. S.; SHIM, H.; SHAH, R. S.; IBRAHIM, S. A.; SEDERGRAN, D. J. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporine. **Digestive diseases and sciences**, v. 37, p. 1722-1734, 1993.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; HANDA, O.; ISHIKAWA, T.; NAKAGAWA, S.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIDA, N.; MINAMI, M.; KITA, M.; IMANISHI, J.; YOSHIKAWA, T. Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 18, n. 5, p. 560- 569, 2003.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; UCHIYAMA, K. KURODA, M.; KOKURA, S.; ICHIKAWA, H.; YANAGISAWA, R.; INOUE, K.; TAKANO, H.; SATOH, M.; YOSHIDA, N.; OKANOUE, T.; YOSHIKAWA, T. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, p.191-196, 2004.

NAITO Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-dependent oxidative. **Clinic Biochememical Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 18–26, 2007.

NALEPA, I. The effect of psychotropic drugs on the interaction of protein kinase C with second messenger system in the rat cerebral cortex. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 1-14, 1994.

NASYROVA, R. F.; SOTNIKOVA, L. S.; BAYSTRUKOVA, N. V.; KRIVOSCHCHEKOVA, G. V.; NOVITSKY, V. V.; KUPRIYANOVA, I. E.; SEMKE, V. Y.; NASLEDNIKOVA, I. O.; BAYKOV, A. N. Psychoimmune interactions in women of

reproductive age with endometriosis. **Bull Experimental Medicine and Biology**, v. 152, n. 1, p. 93-97, 2011.

NELSON, J. C. A review of the efficacy of serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors for treatment of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1301- 1308, 1999.

NG, S. C.; BERNSTEIN, C. N.; VATN, M. H.; LAKATOS, P. L.; LOFTUS, E. V. JR.; TYSK, C.; O'MORAIN, C.; MOUM, B.; COLOMBEL, J. F. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 62, n. 4; p. 630- 649, 2013.

NI, J.; CHEN, S-F.; HOLLANDER, D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes, **Gut**, v. 39, p. 234- 241, 1996.

O'BRIEN, S. M.; SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. **Human Psychopharmacology**, v. 19, p. 397-403, 2004.

OBUCHOWICZ, E.; KOWALSKI, J.; LABUZEK, K.; KRYSIAK, R.; PENDZICH, J.; HERMAN, Z. S. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. **International Journal Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 1, p. 27- 35, 2006.

O'CONNOR, J. C.; JOHNSON, D. R.; FREUND, G. G. Psychoneuroimmune implications of type 2 diabetes: redux. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 339-58, 2009.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, p. 477- 487, 2008.

OH, S. Y.; CHO, K. A.; KANG, J. L.; KIM, K. H.; WOO, S. Y. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. **International Journal Molecular Medicine**, v. 33, n. 2, p. 333- 340, 2014.

OHKUSA, T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and change in intestinal microflora (in Japanese). **Japan Journal of Gastroenterology**, v. 82, p. 1327- 1336, 1985.

OHKUSA, T.; OKAYASU, I.; TOKOI, S.; ARAKI, A.; OZAKI, Y. Changes in bacterial phagocytosis of macrophages in experimental ulcerative colitis. **Digestion**, v. 56, n. 2, p. 159-164, 1995.

OKADA, Y.; TSUZUKI, Y.; MIYAZAKI, J.; MATSUZAKI, K.; HOKARI, R.; KOMOTO, S.; KATO, S.; KAWAGUCHI, A.; NAGAO, S.; ITOH, K.; WATANABE, T.; MIURA, S. Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (dhna) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. **Gut**, v. 55, n. 5, p. 681- 688, 2006.

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**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.

ONALI, P.; DEDONI, S.; OLIANAS, M. C. Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 1, p. 255- 265, 2010.

OXENKRUG, G. F. Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. **Annals New York Academic Science**, v. 1122, p. 35- 49, 2007.

OVADIA, H.; LUBETZKI-KORN, I.; ABRAMSKY, O. Dopamine receptors on isolated membranes of rat thymocytes. **Annals of New York Academy of Science**, v. 496, p. 211- 216, 1987.

PACE, T. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain Behavior Immunology**, v. 21, p. 9- 19, 2007.

PANKAJ, S.; SANTOSH, K. S.; RAJMANI, P. New approach for the determination of tricyclic antidepressant amitriptyline using β -cyclodextrin-peg system via spectrophotometry. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, v. 2, n. 2, p. 103- 107, 2012.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 219–233, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, R. W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior Immunology**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annual Review Medicine**, v. 51, p. 289–298, 2000.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1- 13, 2012.

PITHADIA, A. B.; JAIN, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 629- 642, 2011.

PLEVY, S. E.; LANDERS, C. J.; PREHN, J.; CARRAMANZANA, N. M.; DEEM, R. L.; SHEALY, D.; TARGAN, S. R. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. **Journal of Immunology**, v. 159; p. 6276- 6282, 1997.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 417–429, 2002.

PORITZ, L. S.; GARVER, K. I.; GREEN, C.; FITZPATRICK, L.; RUGGIERO, F.; KOLTUN, W. A. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. **Journal of Surgical Research**, v. 140, n. 1, p. 12-19, 2007.

PORSOLT, R. D., Animal models of depression: utility for transgenic research. **Review Neuroscience**, v. 11, p. 53- 58, 2000.

PORTELA, C. P.; MASSOCO, C. O.; DE LIMA W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in ova-sensitized rats. **Physiology Behavior**, v. 72, p. 415- 420, 2001.

PRADO, P. S. A.; SOARES, M. F.; LIMA, F.O.; SCHOR,N.; TEIXEIRA, V. P. Amitriptyline aggravates the fibrosis process in a rat model of infravesical obstruction. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 3, p. 218- 224, 2012.

PRAVDA, J. Radical Induction Theory of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 2371- 2384, 2005.

PUCAK, M. L.; KAPLIN, A. I. Unkind cytokines: current evidence for the potential role of cytokines in immune-mediated depression. **International Review Psychiatry**, v. 17, p. 477- 483, 2005.

QUARTERO, A.; MEINECHE-SCHMIDT, V.; MURIS, J.; RUBIN, G.; DE WIT, N. Bulking agents, antispasmodic and antidepressant medication for the treatment of irritable bowel syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1- 120, 2005.

QUILICI, F.A. **Retocolite Ulcerativa**. São Paulo: Lemos editorial, 2002, p. 5- 95.

RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P. L.; SCHWARTZ, L. W. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 97, n. 2, p. 326- 337, 1989.

RAHIMI, R. Efficacy of tricyclic antidepressants in irritable bowel syndrome: a meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 13, p. 1548, 2009.

RAHIMI, H. R.; SHIRI, M.; RAZMI, A. Antidepressants can treat inflammatory bowel disease through regulation of the nuclear factor-kappaB/nitric oxide pathway and inhibition of cytokine production: a hypothesis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, n. 6, p. 83- 85, 2012.

RAJAGOPALAN, M.; KURIAN, G.; JOHN, J. Symptom relief with amitriptyline in the irritable bowel syndrome. **Journal Gastroenterology Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 738- 741, 1998.

RAMPTON, D. Management of difficult inflammatory bowel disease: where are we now? **World Journal of Gastroenterology**, v. 6, n. 3, p. 315- 323, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, v. 16, p. 1267-1276, 2010.

RETTORI, V. Neuroimmune interactions. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 5, p. 799-800, 2007.

RIBEIRO, A.; ALMEIDA, V.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; VITORETTI, L. B.; GIMENES-JUNIOR, J. A.; AKAMINE, A. T.; CRIPPA, J. A.; TAVARES-DE-LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS- induced acute lung injury. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 37, n. 1, p. 35- 41, 2015.

RICKETTS, C. R. Dextran sulphate-a synthetic analogue of heparin. **Biochemical**, v. 51, n. 1, p. 129- 33, 1952.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. London: Mosby, 1996, v. 4, p. 420.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system: actions and mechanisms. **Trends Neuroscience**, v. 18, p. 130-136, 1995.

RUGTVEIT, J.; HARALDSEN, G.; HØGÅSEN, A. K.; BAKKA, A.; BRANDTZAEG, P.; SCOTT, H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. **Gut**, v. 37, p. 367- 373, 1995.

_____. et al. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1493-1505, 1997.

RUSSO, S.; KEMA, I. P.; BOSKER, F.; HAAVIK, J.; KORF, J. Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications. **World Journal Biology Psychiatry**, v. 13, p. 1- 11, 2007.

SACERDOTE, P.; BIANCHI, M.; PANERAI, A. E. In vivo and in vitro clomipramine treatment decreases the migration of macrophages in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 319, p. 287- 290, 1997.

SADEGHI, H.; HAJHASHEMI, V.; MINAIYAN, M.; MOVAHEDIAN, A.; TALEBI, A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 30, n. 667, p. 396-401, 2011.

SAILOR, R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 5S- 11S, 1997. Supplement, 12.

SAKAI, M.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RONE, M. B.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; DAGLI, M. L.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, n. 2-3, p. 131-138, 2010.

SANDERS, V. M. Interdisciplinary research: noradrenergic regulation of adaptive immunity. **Brain Behavior Immunology**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2006.

SANDERS, R. D.; HUSSELL, T.; MAZE, M. Sedation & immunomodulation. **Critical Care Clinic**, v. 25, p. 3, p. 551-570, 2009.

SANKARAN-WALTERS, S.; MACAL, M.; GRISHINA, I.; NAGY, L.; GOULART, L.; COOLIDGE, K.; LI, J.; FENTON, A.; WILLIAMS, T.; MILLER, M. K.; FLAMM, J.; PRINDIVILLE, T.; GEORGE, M.; DANDEKAR, S. Sex differences matter in the gut: effect on mucosal immune activation and inflammation. **Biology of Sex Differences**, v. 4, n. 1, p. 10, 2013.

SALEH, M.; TRINCHIERI, G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 1, p. 9-20, 2011.

SALICRÚ, A. N.; SAMS, C. F.; MARSHALL, G. D. Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Brain Behavior Immunology**, v. 21, n. 7, p. 913- 920, 2007.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Nature clinical practice. **Gastroenterology & hepatology**, v. 3, n. 7, p. 390- 407, 2006.

_____. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577- 94, 2008.

SATSANGI, J.; WOLSTENCROFT, R. A.; CASON, J.; AINLEY, C. C.; DUMONDE, C. C.; THOMPSON, R. P. H. Interleukin 1 in Crohn's disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 67, p. 594- 605, 1987.

SATSANGI, J.; VERMEIRE, S.; PARKES, M.; PEETERS, M.; VYAS, P.; RUTGEERTS, P.; JEWELL, D. Genetics of inflammatory bowel disease. **Clinical science**, v. 94, v. 5, p. 473- 478, 1998.

SA- ROCHA, V. M.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108-115, 2006.

SCHLATTER, J.; ORTUÑO, F.; CERVERA-ENGUIX, S. Lymphocyte subsets and lymphokine production in patients with melancholic versus nonmelancholic depression. **Psychiatry Research**, v. 128, n. 3, p. 259-265, 2004.

SCHINDLER, W.; HÄFLIGER, F. Derivate desiminodibenzyl. **Helvetica Chimica Acta**, v. 37, p. 427, 1954.

SCHOEB, T. R.; BULLARD, D. C. Microbial and histopathologic considerations in the use of mouse models of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 18, p. 1558-1565, 2012.

SCHOULTZ, M.; ATHERTON, I.; HUBBARD, G.; WATSON, A. J. Assessment of causal link between psychological factors and symptom exacerbation in inflammatory bowel disease: a protocol for systematic review of prospective cohort studies. **Systematic Reviews**, v. 2, p. 2- 8, 2013.

SCHROEDER, K.W.; TREMAINE, W. J.; ILSTRUP, D. M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. **New England Journal of Medicine**, v. 317, p.1625–1629, 1987.

SCHUH, J. C. L.; VINEY, J. L. Endogenous bacterial flora modulate experimentally-induced colitis in mice. **Veterinary Pathology**, v. 33, p.1-12, 1996.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism**, v. 5, p. 525-530, 1956.

SHA, T.; IGAKI, K.; YAMASAKI, M.; WATANABE, T.; TSUCHIMORI, N. Establishment and Validation of a New Semi-Chronic Dextran Sulfate Sodium-Induced Model of Colitis in Mice. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 23- 9, 2013.

SHEN, Y.; CONNOR, T. J.; NOLAN, Y.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. Differential effect of chronic antidepressant treatment on lypopolysaccharide-induced depressive like behavioural symptoms in the rat. **Life Science**, v. 65, p. 1773- 1786, 1999.

SHERMAN, A. D.; ALLERS, G. L.; PETTY, F.; HENN, F. A. A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 18, p. 891- 893, 1979.

SILVA, P. **Farmacologia**, 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998, cap. 32.

SILVEIRA, G.; TARLEY, R. T. Determinação turbidimétrica do antidepressivo amitriptilina em sistema fia explorando a formação do par iônico com lauril sulfato de sódio. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1653-1659, 2008.

SIMMONS, D. L.; TAN, S.; TENEN, D. G.; NICHOLSON-WELLER, A.; SEED, B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. **Blood**, v. 73, p. 284-289, 1989.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medicine Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298-306, 1991.

SOLOMON, L.; MANSOR, S.; MALLON, P.; DONNELLY, E.; HOPER, M.; LOUGHREY, M.; KIRK, S.; GARDINER, K. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 235- 239, 2010.

SONG, C.; LEONARD B. E. **Fundamentals of psychoneuroimmunology**. Chichester, U.K.: Wiley, J. and Sons, 2000.

SOUBA, W. W. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. **Current Problems in Surgery**, v. 31, p. 577- 643, 1994.

SPENCER, A. U.; YANG, H.; HAXHIJA, E. Q.; WILDHABER, B. E.; GREENSON, J. K.; TEITELBAUM, D. H. Reduced severity of a mouse colitis model with angiotensin converting enzyme inhibition. **Digestive Disease Science**, v. 52, p. 1060-1070, 2007.

STAHL, S. M. **Psychopharmacology of antidepressants**. London: Martin Dunitz, 1997. 114 p.

_____. Basic psychopharmacology of antidepressants. Part 1. Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. **Journal Clinic Psychiatry**, v. 59, p. 5- 14, 1998.

_____. **Psicofarmacologia: base neurocientífica e aplicações práticas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2002. p. 359- 445.

STÅHLBERG, D.; VERESS, B.; MÅRE, K.; GRANQVIST, S.; AGREN, B.; RICHTER, S.; LÖFBERG, R. Leucocyte migration in acute chronic inflammatory bowel disease: comparison of histological assessment and TC-99m-HMPAO labeled leucocyte scan. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, p. 283–288, 1997.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2008.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STEVCEVA, L.; PAVLI, P.; HUSBAND, A. J.; DOE, W. F. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of dss used to induce it. **Biomed Central Clinical Pathology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2001.

STODDARD, S. L.; BERGDALL, V. K.; TOWNSEND, D. W.; LEVIN, B. E. Plasma catecholamines associated with hypothalamically-elicited defense behavior. **Physiology Behavior**, v. 36, n. 5, p. 867-873, 1986.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 495- 549, 2002.

STROBER, W.; FUSS, I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1756- 1767, 2011.

STURM, A.; DE SOUZA, H. S.; FIOCCHI, C. Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 381-387, 2008.

SUNDBERG, J. P.; ELSON, C.O.; BEDIGIAN, H.; BIRKENMEIER, E. H. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. **Gastroenterology**, v. 107, n. 6, p. 1726-1735, 1994.

SUSSMAN, N.; STAHL, S. Update in the pharmacotherapy of depression. **American Journal of Medicine**, v. 101, n. 6A, p. 265-365, 1996.

SUTCIGIL, L.; OKTENLI, C.; MUSABAK, U.; BOZKURT, A.; CANSEVER, A.; UZUN, O.; SANISOGLU, S. Y.; YESILOVA, Z.; OZMENLER, N.; OZSAHIN, A.; SENGUL, A. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2007, p. 1- 6, 2007.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; TUSTANOWSKA-STACHURA, A.; SLOTWINSKA, M.; MARMUROWSKA-MICHAŁOWSKA, H.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. In vitro immunoregulatory effects of antidepressants in healthy volunteers. **Polish journal of pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 353- 362, 2003.

TAI, Y. H.; WANG, Y. H.; WANG, J. J.; TAO, P. L.; TUNG, C. S.; WONG, C. S. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. **Pain**, v. 124, n. 1-2, p. 77- 86, 2006.

TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, K.; HONDA, K.; KITAMURA, Y.; MIZUTANI, T.; ARAKI, Y.; KABEMURA, T.; CHIJIWA, Y.; HARADA, N.; NAWATA, H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 4, p. 677- 686, 2006.

TALER, M.; GIL-AD, I.; LOMNITSKI, L.; KOROV, I.; BAHARAV, E.; BAR, M.; ZOLOKOV, A.; WEIZMAN, A. Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, p. 774- 780, 2007.

TAYEBATI, S. K.; BRONZETTI, E.; MORRA DI CELLA, S.; MULATERO, P.; RICCI, A.; ROSSODIVITA, I.; SCHENA, M.; SCHIAVONE, D.; VEGLIO, F.; AMENTA, F. In situ hybridization and immunocytochemistry of alpha- adrenoceptors in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 305-312, 2000.

THAKORE, J. H.; DINAN, T. G. Effect of fluoxetine on dexamethasone-induced growth hormone release in depression: a double-blind, placebo-controlled study. **American Journal Psychiatry**, v. 152, p. 616- 618, 1995.

THIELE, J.; HOLZINGER, O. Properties of o-diaminodibenzyl. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 305, p. 96-102, 1899.

TOLEDO, R. A.; MAZO, L. H.; SANTOS, M. C.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 456-461, São Paulo, 2005.

TORRENTE, C. E.; VÁZQUEZ, D. E.; GAY, E. C. Use of amitriptyline for the treatment of chronic tension- type headache. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 13, n. 9, p. E567-572, 2008.

TRACEY, K. J. Tumor necrosis factor: a pleiotrophic cytokine and therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 491–503, 1994.

TSAO, C. W., LIN, Y. S., CHEN, C. C., BAI, C. H., WU, S. R. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. **Program Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry**, v. 30, p. 899- 905, 2006.

TSUKADA, Y.; NAKAMURA, T.; IIMURA, M.; IIZUKA, B.E.; HAYASHI, N. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, p. 820–2828, 2002.

TUGLU, C.; KARA, S. H.; CALIYURT, O.; VARDAR, E.; ABAY, E. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. **Psychopharmacology**, v. 170, p. 429- 433, 2003.

UMEHARA, Y.; KUDO, M.; NAKAOKA, R.; KAWASAKI, T.; SHIOMI, M. Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis. **Hepatogastroenterology**, v. 53, p. 879-882, 2006.

VALATAS, V.; VAKAS, M.; KOLIOS, G. The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, p. G763–G785, 2013.

VAN DER HEYDEN, J. A.; MOLEWIJK, E.; OLIVIER, B. Strain differences in response to drugs in the tail suspension test for antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 127- 130, 1987.

VAN DER WORP, H. B.; HOWELLS, D. W.; SENA, E. S.; PORRITT, M. J.; REWELL, S.; O'COLLINS, V.; MACLEOD, M. R. Can animal models of disease reliably inform human studies? **PLoS Medicine**, v. 7, p. 1-8, 2010. e1000245.

VAN DOP, W. A.; MARENCO, I.; TE VELDE, A. A.; CIRAOLO, E.; FRANCO, I.; TEN KATE, F. J.; BOECKXSTAENS, G. E.,C.; HOMMES, D. W.; HIRSCH, E.; VAN DEN BRINK, G. R. The absence of functional PI3Kgamma prevents leukocyte recruitment and ameliorates DSS-induced colitis in mice. **Immunology Letters**, v. 131, p. 33-39, 2010.

VARGHESE, A. K.; VERDÚ, 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**, v. 130, n. 6, p. 1743- 1753, 2006.

VAUGEOIS, J. M.; ODIEVRE, C.; LOISEL, L.; COSTENTIN, J. A genetic mouse model of helplessness sensitive to imipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, p. R1–R2, 1996.

VENKATESHA, S. H.; DUDICS, S.; ACHARYA, B.; MOUDGIL, K. D. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 887- 906, 2015.

VENKATRAMAN, A.; RAMAKRISHNA, B. S.; PULIMOOD, A. B.; PATRA, S.; MURTHY, S. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 35, p. 1053- 1059, 2000.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista Psiquiátrica Clínica**, v. 35, n. 5, p. 196- 204, 2008.

_____. Amitriptyline and acute inflammation: a study using intravitalmicroscopy and the carrageenan- induced paw edema model. **Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 231- 239, 2010.

_____. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 34, n. 4, p. 578- 585, 2012.

WATSON, C. P.; VERNICH, L.; CHIPMAN, M.; REED, K. Nortriptyline versus amitriptyline in postherpetic neuralgia: a randomized trial. **Neurology**, v. 51, p. 1166-1171, 1998.

WELDON, M. J.; MASOOMI, A. M.; BRITTEN, A. J.; GANE, J.; FINLAYSON, C. J.; JOSEPH, A. E.; MAXWELL, J. D. Quantification of inflammatory bowel disease activity using technetium-99m HMPAO labeled leucocyte single photon emission computerized tomography (SPECT). **Gut**, v. 3, p. 243–50, 1995.

WILKS S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. **London Medical Gazette**, v. 2, p. 264, 1859.

WINTHER, K. V.; JESS, T.; LANGHOLZ, E.; MUNKHOLM, P.; BINDER, V. Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen county. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1576–1582, 2003.

WITTIG, B.; SEITER, S.; SCHMIDT, D. S.; ZUBER, M.; NEURATH, M.; ZOLLER, M. CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. **Laboratory Investigation**, v. 79, p. 747- 59, 1999.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; HERMANOWSKI-VOSATKA, A.; ROCKWELL, P.; DETMERS, P. A. Activation of adhesive capacity of (QR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 1281- 1286, 1991.

WRONA, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. **Journal of Neuroimmunology**, v. 172, n. 1-2, p. 38- 58, 2006.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel

disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427- 434, 2007.

YAMADA, Z.; DEPIERRE, J.; NASSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1b, and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. **Immunopharmacology**, v. 34, p. 27- 37, 1996.

YAMADA, M.; OHKUSA, T.; OKAYASU, I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. **Gut**, v. 33, p. 1521- 1527, 1992.

YAMANO, M.; YUKI, H.; YASUDA, S.; MIYATA, K. Corticotropin releasing hormone receptors mediate consensus interferon-alpha YM643-induced depression-like behavior in mice. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 292, p. 181- 187, 2000.

YAN, Y.; KOLACHALA, V.; DALMASSO, G.; NGUYEN, H.; Laroui, H.; Sitaraman, S. V.; Merlin, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. 1-8, 2009.

YARON, I.; SHIRAZI, I.; JUDOVICH, R.; LEVARTOVSKY, D.; CASPI, D.; YARON, M. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. **Arthritis Rheumatology**, v. 42, p. 2561- 2568, 1999.

YOSHIMURA, R., HORI, H., IKENOUCI-SUGITA, A., UMENE-NAKANO, W., UEDA, N., NAKAMURA, J. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. **Program Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry**, v. 33, p. 722-726, 2009.

YOUNGMAN, K. R.; SIMON, P. L.; WEST, G. A.; COMINELLI, F.; RACHMILEWITZ, D.; KLEIN, J. S.; FIOCCHI, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, v. 104, p. 749-758, 1993.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, p. 163-174, 1996.

YIRMIYA, R.; POLLAK, Y.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; OVADIA, H.; BETTE, M.; WEIHE, E.; WEIDENFELD, J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 531- 544, 2001.

ZAGER, A.; PERON, J. P.; MENNECIER, G.; RODRIGUES, S. C.; ALOIA, T. P.; PALERMO-NETO, J. Maternal immune activation in late gestation increases neuroinflammation and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in the offspring. **Brain Behavior Immunology**, v. 43, p. 159-171, 2015.

ZENEWICZ, L. A.; ANTOV, A.; FLAVELL, R. A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, p. 199- 207, 2009.