Fernanda Serafim Nakutis

Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental da doença de Crohn
submetido ao tratamento de oxigênio hiperbárico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Aytan Miranda Sipahi

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nakutis, Fernanda Serafim

Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental da doença de Crohn submetido ao tratamento de oxigênio hiperbárico / Fernanda Serafim Nakutis -- São Paulo, 2015.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Aytan Miranda Sipahi.

Descritores: 1.Modelos animais 2.Doença de Crohn 3.Colite ulcerativa 4.Estresse oxidativo 5.Citocinas 6.Inflamação 7.Oxigenação hiperbárica

USP/FM/DBD-175/15

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Dedicatória

*À minha Mãe, que mesmo não entendendo minhas escolhas,
sempre esteve ao meu lado, agradeço a você por ser quem sou!*

*Dedico este trabalho à memória de meu Pai que me ensinou mais com sua ausência
que as palavras poderiam ensinar.*

*Ao meu Marido e companheiro que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais
difíceis e por acreditar em mim quando nem eu mesma eu fui capaz.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a resistência e a capacidade de chegar tão longe, o caminho não foi fácil e sozinha eu não teria sido capaz!

Agradeço ao meu Mestre e Orientador Dr. Aytan, pela incrível oportunidade, confiança e orientação nestes 4 anos de convivência! Obrigada por este trabalho maravilhoso que realizamos.

Às minhas parceiras de laboratório, por transformar nossa convivência em uma maravilhosa jornada. A Fabiana por sempre me indicar o caminho certo e por me ajudar a fazer as coisas andarem, à Carmen por todas as suas correções e conselhos, a Iedinha por todas as perguntas difíceis, a Jaci e a Mariana por estarem ao meu lado. Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de vocês!

Ao Dr. André por sua imensa ajuda ao me ensinar a metodologia deste trabalho e também nos momentos de dúvida. Ao Prof. Márcio, que instigou em mim a vontade de trabalhar com pesquisa. Ao Edson por sua imensa ajuda na lida com os animais.

As minhas colegas, pelos momentos juntos, especialmente à Julia e a Cassiana, que se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês! Eu não poderia me esquecer da Cidinha, nossa companheira que me fez ver o quanto a vida é curta, e por isso devemos aproveitar hoje antes que amanhã seja tarde demais.

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro, que foi fundamental! E, finalmente, gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina da USP e ao

Departamento de Gastroenterologia por abrirem as portas para que eu pudesse realizar meu sonho!

A minha Mãe, meu infinito agradecimento, só cheguei até aqui, porque você sempre esteve ao meu lado me apoiando. Obrigada pelo amor incondicional!

E por último e não menos importante, ao meu querido Marido e companheiro Luiz, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Muitos me perguntaram como eu fui capaz de não desistir nesses 4 anos, e a verdade é uma só: só fui capaz porque você sempre esteve ao meu lado, e todas as vezes em que pensei em desistir, eu chegava em casa e você estava lá me apoiando e me lembrando do motivo da minha luta. Obrigada por fazer da nossa vida um caminho maravilha de ser percorrido!

“Uma andorinha só não faz verão”.

Obrigada a Todos pela ajuda na realização deste trabalho!

NAKUTIS, FS. *Avaliação do estresse oxidativo em modelo experimental da doença de Crohn submetido ao tratamento de oxigênio hiperbárico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O conhecimento da fisiopatogênese da Doença Inflamatória Intestinal (DII) tem evoluído nas últimas décadas. No entanto, apesar das terapias terem evoluído, 2/3 dos casos ainda necessitam de drogas alternativas e terapias de suporte. A busca constante de tratamentos alternativos e modalidades mais eficazes tem gerado algumas abordagens promissoras, tais como a utilização do oxigênio hiperbárico (HBO). O uso dessa terapia cresceu rapidamente nos anos 90 mostrando bons resultados e poucos efeitos colaterais sendo, posteriormente “esquecida” ante a eficácia apresentada pelo uso das terapias biológicas. **Objetivos:** Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do tratamento com HBO em camundongos com colite induzida quimicamente pelo ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico 2,5% (TNBS), sobre a avaliação dos animais, a análise histológica, o perfil inflamatório através das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, fator de necrose tumoral α (TNF α) e Interferon γ e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) em intestino de camundongos. **Metodologia:** Camundongos machos foram divididos em 6 grupos. No grupo 1, a colite foi induzida por TNBS 2,5% + Etanol 35%, sendo chamado de grupo TNBS; o grupo 2 também recebeu TNBS 2,5% + Etanol 35% seguido do tratamento com o HBO, sendo chamado de grupo TNBS+HBO; o grupo 3 recebeu apenas o veículo etanólico a 35%, sendo chamado de grupo ÁLCOOL; o grupo 4 também recebeu o veículo etanólico a 35% associado ao HBO, sendo chamado de grupo ÁLCOOL+HBO; o grupo 5 recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%), sendo chamado de grupo SALINA; e o grupo 6 recebeu a solução salina associado ao HBO, sendo chamado de grupo SALINA+HBO. Durante o tratamento os animais foram avaliados diariamente. O tratamento com HBO foi realizado por 4 dias e, ao final, as amostras da porção final do intestino foram retiradas e armazenadas para análise histológica, enzimas antioxidantes e citocinas. **Resultados:** A avaliação mostrou que o HBO promoveu uma melhora significativa no quadro clínico desses animais. A aplicação do ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico nos animais do grupo TNBS resultou na perda de 12,71% do peso corpóreo dos animais após 24 horas e, ao final do período experimental uma perda de peso total de 14,63%. Por outro lado, os animais que também receberam 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico associado ao tratamento com o HBO (TNBS+HBO) tiveram uma perda de apenas 7,52% nas primeiras 24 horas, apresentando uma recuperação de 5,58% de seu peso no final do período experimental. A avaliação do quadro histológico mostrou uma melhora significativa entre o grupo TNBS+HBO quando comparado com o grupo TNBS. O tratamento com HBO aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx em todos os grupos, sendo somente significativo entre os grupos TNBS vs TNBS+HBO, não sendo observado diferença da GR entre os grupos. Com relação ao perfil inflamatório foi observado que o tratamento com o HBO promoveu a diminuição das citocinas pró-inflamatórias INF γ , IL-12, IL-17 e TNF α e o aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, e não houve alteração da IL-13. Em modelo experimental, esses dados representam, o potencial efeito anti-inflamatório e o do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas promovido pelo HBO.

Descritores: Modelos Animais, Doença de Crohn, Colite Ulcerativa, Estresse oxidativo, Citocinas, Inflamação, Oxigenação Hiperbárica.

NAKUTIS, FS. *Evaluation of oxidative stress in experimental model of Chron's disease under hyperbaric oxygen treatment* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

ABSTRACT

Introduction: The Knowledge about the physiopathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) has evolved over the last decades. However, although therapies have improved, 2/3 of the cases still need alternative drugs and support therapy. The constant search for alternative treatments and more effective modalities has brought to light some promising strategies, as the use of hyperbaric oxygen (HBO). The use of such therapy surged rapidly in the 90's showing good results and few side effects being, later on, "forgotten" due to the efficacy shown by the use of biological therapies.

Objective: This study aimed to evaluate the effects of HBO treatment in mice with chemically induced colitis, using 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid 2,5% (TNBS) over the evaluation of the animals, histological analysis, inflammatory profile through cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α and interferon γ , and also the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in intestine of mice. **Methodology:** Male mice were divided into 6 groups, in group 1, colitis was induced by TNBS 2,5%+ Ethanol 35%, named as TNBS, group 2 also received TNBS 2,5%+ Ethanol 35% + HBO, named as TNBS+HBO, group 3 received only Ethanol 35%, named as ALCOHOL, group 4 received Ethanol 35% associated with HBO, named as ALCOHOL+HBO, group 5 received Saline (NaCl 0,9%), named as SALINE and group 6 received Saline combined with HBO, named as SALINE+HBO. During the treatment the animals were evaluated daily. The treatment with HBO was performed for 4 days and at the end, the samples of the final portion of the bowel were removed and stored for histological, antioxidant enzymes and cytokines analysis. **Results:** This study has shown that the HBO promoted a significant improve on these animals clinical status. The group which received TNBS showed a 12,71% body weight loss after 24 hours, and by the end of the experimental period the average weight loss was 14,63%. On the other hand, the animals treated with HBO showed only 7,52% weight loss during the first 24 hours, having recovered the weight lost in 5,58% by the end of the experimental period. The histological evaluation of the TNBS+HBO group presented a significant improvement when compared with TNBS group. The treatment with HBO increased the activity of the antioxidant enzymes SOD and GPx in all groups, being only significant among the groups TNBS vs TNBS+HBO, difference in the activity of GR was not observed among the groups. Regarding the inflammatory profile, it was observed that the treatment with HBO promoted the decrease of pro-inflammatory cytokines INF γ , IL-12, IL-17 and TNF α , as well as the increase of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, while IL-13 was not affected. These data represents, in experimental model, the potential anti-inflammatory effect and the increase of the enzymatic antioxidant defenses promoted by the HBO.

Descriptors: Animal Models, Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, Oxidative Stress, Cytokines, Inflammation, Hyperbaric Oxygenation.

LISTAS	VI
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Doença Inflamatória Intestinal</i>	<i>2</i>
1.2 <i>Modelos Experimentais da Doença Inflamatória Intestinal</i>	<i>5</i>
1.3 <i>Tratamento com Oxigênio Hiperbárico.....</i>	<i>6</i>
1.4 <i>Radicais Livres e o Estresse Oxidativo</i>	<i>7</i>
1.5 <i>Estresse Oxidativo na DII</i>	<i>8</i>
1.6 <i>Oxigênio Hiperbárico na DII</i>	<i>8</i>
1.7 <i>Justificativa</i>	<i>10</i>
2 OBJETIVOS.....	13
3 METODOLOGIA	15
3.1 <i>Considerações Éticas</i>	<i>15</i>
3.2 <i>Constituição dos Grupos de Animais</i>	<i>15</i>
3.3 <i>Anestesia.....</i>	<i>17</i>
3.4 <i>Indução da Inflamação Intestinal.....</i>	<i>17</i>
3.5 <i>Tratamento com Câmara Hiperbárica</i>	<i>18</i>
3.6 <i>Delineamento Experimental</i>	<i>20</i>
3.7 <i>Avaliação Clínica dos Camundongos.....</i>	<i>20</i>
3.8 <i>Extração e Armazenamento do Tecido Extraído</i>	<i>20</i>
3.9 <i>Avaliação Histológica da Inflamação Colônica.....</i>	<i>20</i>
3.10 <i>Preparo dos Tecidos para Análise do Estresse Oxidativo.....</i>	<i>21</i>
3.11 <i>Preparo dos Tecidos para Análise das Citocinas.....</i>	<i>22</i>
3.12 <i>Análise Estatística</i>	<i>23</i>
4 RESULTADOS.....	25
4.1 <i>Avaliação Clínica dos Animais.....</i>	<i>25</i>
4.2 <i>Variação de Massa Corpórea dos Animais</i>	<i>26</i>
4.3 <i>Avaliação Histológica da Inflamação Colônica.....</i>	<i>28</i>
4.4 <i>Análise das Enzimas Antioxidantes</i>	<i>31</i>
4.5 <i>Análise das Citocinas</i>	<i>33</i>
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	43
Anexos	44

<i>Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética.....</i>	<i>45</i>
<i>Anexo 2 - Preparo do Homogenato para Estresse Oxidativo.....</i>	<i>46</i>
<i>Anexo 3 - Preparo do Homogenato para Citocinas</i>	<i>47</i>
REFERÊNCIAS	49

LISTAS

Listas de Figuras

Figura 1: Divisão dos Grupos Experimentais	16
Figura 2: Etapas das Separação dos Animais	16
Figura 3: Cateter de 3,5F Acoplado a uma Seringa de 1 mL (utilizado para instilação retal)	17
Figura 4: Instilação Retal em Camundongos	18
Figura 5: Câmara Hiperbárica Ecobar 400 da ECOTEC® Utilizada para o Tratamento com HBO	19
Figura 6: Exemplos do Intestino nos Seis Grupos	28
Figura 7: Avaliação Microscópica do Intestino (H.E.), em Corte Transversal (40X)	30

Listas de Gráficos

Gráfico 1: Esquema de uma Sessão de HBO	19
Gráfico 2: Avaliação dos Animais	25
Gráfico 3: Variação de Peso de Todos os Grupos Durante o Período Experimental	26
Gráfico 4: Comparação do Peso entre os Grupos Tratados e Não Tratados com HBO	27
Gráfico 5: Avaliação Histológica Colônica dos Grupos Experimentais	29
Gráfico 6: Dosagem da SOD em Intestino de Camundongos	32
Gráfico 7: Dosagem da GPx em Intestino de Camundongos	32
Gráfico 8: Dosagem de GR em Intestino de Camundongos	33
Gráfico 9: Dosagem de INF γ em Intestino de Camundongos	34
Gráfico 10: Dosagem de IL-12 em Intestino de Camundongos	34
Gráfico 11: Dosagem de IL-17 em Intestino de Camundongos	35
Gráfico 12: Dosagem de TNF α em Intestino de Camundongos	35
Gráfico 13: Dosagem de IL-4 em Intestino de Camundongos	36
Gráfico 14: Dosagem de IL-10 em Intestino de Camundongos	37
Gráfico 15: Dosagem de IL-13 em Intestino de Camundongos	37

Listas de Tabelas

Tabela 1: Escala de Dano Microscópico	21
Tabela 2: Atividade das Enzimas Antioxidantes Dosadas em Intestino de Camundongos	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

A doença inflamatória intestinal (DII) é definida por uma inflamação crônica do trato gastrointestinal sem uma causa ou patógeno específico. Incluída nessa classificação está a retocolite ulcerativa (RCUI) que envolve exclusivamente o cólon e o reto, caracterizando-se por um infiltrado celular inflamatório mononuclear superficial na mucosa e pela presença de úlceras superficiais (1, 2).

A outra forma bem conhecida de apresentação da DII é a doença de Crohn (DC) que pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal. Essa doença se caracteriza por um processo inflamatório focal, transmural e frequentemente granulomatoso, que pode resultar no aparecimento de fístulas, perfurações e estenoses. A retocolite ulcerativa é caracterizada por ulcerações da mucosa, infiltrado inflamatório na submucosa e eventuais manifestações extra intestinais (3).

O conhecimento da fisiopatogênese da DII tem evoluído nas últimas décadas, aceitando-se que um único agente ou mecanismo isolado não parece ser suficiente para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais, em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células de origem imune e não imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal (4, 5).

Na fase inicial da colite, o sistema imune é capaz de mediar a inflamação da mucosa de duas formas, a primeira age de forma direta através de uma ação autoimune contra o epitélio intestinal e a segunda por uma ação não autoimune através da ativação das células T (6).

A ativação de células imunes é, posteriormente, acompanhada pela produção de mediadores da inflamação, como por exemplo: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, assim como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (7, 8).

A resposta imune intestinal tem a função de proteger o organismo da entrada de agentes patogênicos, sendo essencial para a manutenção da fisiologia e para a

prevenção de infecções. Um estímulo infeccioso desencadeia uma resposta imunológica inicial, inata e rápida (9).

O repertório de citocinas produzido pelos linfócitos Th determina um tipo específico da resposta imunitária. A resposta do tipo Th1 compreende uma produção aumentada de interferon γ (INF- γ) e interleucina 2 (IL-2), que ativam predominantemente linfócitos T citotóxicos e macrófagos, capazes de atuar diretamente sobre o antígeno ou de causar lesão. Os macrófagos ativados, por sua vez, produzem citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 e TNF α , que favorecem a reação do tipo hipersensibilidade tardia e também produzem IL-12, que estimula linfócitos Th1 em um mecanismo de *feedback* positivo. Na resposta do tipo Th2 ocorre aumento na produção de IL-4, IL-5 e IL-6, que favorecem por sua vez, a imunidade humoral estimulando a proliferação e diferenciação de linfócitos B e a consequente produção de anticorpos. Além disso, a resposta do tipo Th2 é capaz de inibir paralelamente a resposta Th1, através do aumento na produção de IL-10 e de IL-13, responsáveis pelo *feedback* negativo sobre os linfócitos Th1 e macrófagos, respectivamente (10).

O TNF α é um dos mediadores mais importantes nesta doença. É produzido por vários tipos de células e tem entre outras funções, a produção de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, apoptose celular, recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação, ativação da coagulação e indução da formação de granulomas. Vários estudos demonstraram um aumento do TNF α no soro, fezes e mucosa intestinal de indivíduos com DC. Um desequilíbrio entre a secreção e a inibição do TNF α poderá estar implicado na patogênese da doença. O bloqueio do TNF α por anticorpos monoclonais (Infliximab) diminui as respostas Th1, sendo por isso usado como uma forma de tratamento eficaz na DC moderada a severa, com melhoras em termos clínicos e endoscópicos (11, 12).

Os macrófagos e as células dendríticas não só estão aumentados em número, como também expressam de forma acentuada TLR2 e TLR4, moléculas co-estimuladoras e produzem mais citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, com a consequente ativação de células Th1. Além disso, as células dendríticas produzem menos IL-10, o que diminui as respostas reguladoras. As células de Paneth também têm uma contribuição importante na resposta imune. Na DC, a mutação do gene NOD-2 diminui a produção das defensinas por estas células, o que reduz a resistência contra

os microorganismos entéricos. As moléculas de adesão 1 (ICAM-1) e as integrinas, são essenciais para a migração dos leucócitos para o foco inflamatório. A sua produção está aumentada na DC (11, 12).

O sistema imune adaptativo também desempenha um papel essencial na patogênese da DC. A natureza das respostas imunitárias e o tipo de citocinas produzidas estão sob o controle genético e determinam as características do processo inflamatório. No sistema imune adaptativo, uma resposta exagerada das células Th1 aos componentes da microflora intestinal contribui para a inflamação na DC. Estas células, têm entre outras funções, o aumento da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade II (MHC-II) nas células apresentadora de antígeno (APC), a ativação de células T citotóxicas (células T CD8+), ativação de macrófagos e a produção de IgG pelos linfócitos B (11, 12).

Mais recentemente foi observado que células Th17 estão envolvidas no desenvolvimento da doença juntamente com as células Th1 (13). A IL-23, produzido pelas células apresentadoras de antígenos, tais como a células dendríticas e macrófagos, estimula a produção de IL-17, TNF α e IL-6 pelas células Th-17 (14).

Nas últimas décadas o aumento da incidência das DII tem sido associado com o aumento da industrialização das regiões estudadas e à ocidentalização do estilo de vida, incluindo hábitos alimentares e tabagismo (15).

A terapêutica utilizada para o tratamento da DII tem evoluído nos últimos anos e inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores (16), além da terapia biológica (17, 18).

Atualmente, o controle ou a atenuação da DII é feito através da supressão da resposta imunológica alterada, por meio de anticorpos dos mediadores inflamatórios, como interleucinas e moléculas de adesão. No entanto, apesar dessas terapias terem evoluído na última década, existem casos que ainda necessitam de drogas alternativas e terapias de suporte (19).

A busca por tratamentos alternativos e com menos efeitos colaterais é constante e já gerou várias abordagens, dentre elas o tratamento com oxigênio hiperbárico (HBO) (20).

1.2 Modelos Experimentais da Doença Inflamatória Intestinal

Nas últimas décadas, um grande número de estudos têm sido realizados para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da DII.

Os estudos com modelos animais na DII permitiram um grande avanço científico bem como um avanço no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, além de possibilitar um melhor entendimento da fisiopatologia e do comportamento da DII (10).

Embora esses modelos animais não representem na totalidade a complexidade da doença que acomete o homem, eles constituem uma ferramenta valiosa para a análises de diversos aspectos da DII, que são difíceis de serem estudados em humanos (21).

A colite experimental acarreta inúmeras alterações de caráter estrutural, fisiológico e molecular no intestino grosso. Vários modelos de colite experimental foram desenvolvidos e podem ser classificados de acordo com suas características de apresentação (aguda ou crônica), pela forma de desenvolvimento (induzido ou espontâneo), e pela forma de indução (tóxica, introdução infecciosa e imunomediada) (6).

Existem diversos modelos experimentais desenvolvidos para o estudo da doença de Crohn (DC) são eles: por indução química, por transferência de células imunes ou por manipulação genética. Os modelos da DC que são quimicamente induzidos, incluem o ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico (TNBS), dextran sulfato de sódio (DSS) e oxalazone. Estes modelos são particularmente úteis no estudo das vias bioquímicas do processo inflamatório e na comprovação de novas estratégias terapêuticas (22).

O modelo mais amplamente utilizado, com indução química da inflamação feita por meio da administração de agente químico exógeno para o estudo da DC é a indução da inflamação com o TNBS. Este modelo se baseou na hipótese de que, na doença de Crohn, há um aumento na permeabilidade da mucosa, o que resulta na entrada de um antígeno luminal, na lâmina própria, que não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico da mucosa. Neste modelo utiliza-se uma solução contendo etanol (um “rompedor de barreira”) e o TNBS, um hapteno, que ao se

associar com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, são capazes de desencadear uma resposta imunológica (23).

1.3 Tratamento com Oxigênio Hiperbárico

O tratamento com HBO é definido como a inalação de oxigênio a 100% sob uma pressão de mais de uma atmosfera absoluta (ATA). Esta quantidade de oxigênio resulta em um aumento de quase 20 vezes o nível plasmático de oxigênio (24).

Para que o organismo exerça todas suas funções, até mesmo a restauração de lesões, é necessário que tecidos e células usem oxigênio continuamente. Entretanto, em situações onde os tecidos sofrem trauma, infecção ou inflamação (como na colite), nem mesmo o valor mínimo de oxigênio local é alcançado. Durante a fase de oxigenação todas as funções de defesa oxigênio-dependentes como fagocitose de bactérias por polimorfonucleares, produção de fibroblastos e proliferação de células ósseas, são estimuladas. Simultaneamente, existe vasoconstrição que provoca aumento da velocidade de fluxo e reabsorção de líquidos do interstício, com redução de edemas, de grande utilidade no tratamento de processos inflamatórios (25).

O HBO tem sido recomendado para várias doenças, tais como a doença da descompressão, envenenamento por monóxido de carbono, entre outros. A terapia aumenta a concentração de oxigênio em todos os tecidos, mesmo naqueles com a circulação comprometida (26).

O HBO é aplicado em sessões intermitentes, em pressões entre 2 a 3 ATA, provocando redução de edemas e neovascularização. Por meio da hiperoxigenação, estimula respostas inflamatória e antibacteriana naturais do organismo e induz cicatrização mais rápida das lesões. Em processos infecciosos e inflamatórios, o HBO age como modulador da liberação de mediadores inflamatórios, com efeito sistêmico, sendo utilizado, nestes casos, de forma adjuvante aos demais procedimentos médicos ou cirúrgicos indicados. O HBO é efetivo na cicatrização de feridas extensas e encurta o tempo de cicatrização, sendo ferramenta útil no manejo de feridas infectadas e de difícil cicatrização (27).

Seu mecanismo de ação é multifatorial: reduz o edema tissular, estimula a síntese de colágeno, aumenta a neovascularização, estimula a resposta anti-

inflamatória e antibacteriana, estimula a atividade proliferativa capilar, resultando na cicatrização mais rápida das lesões (21, 28).

Além dos efeitos locais, tem sido demonstrado que a oxigenação hiperbárica funciona como um transdutor de sinal (29) que resulta na modulação de citocinas, redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e em elevação da expressão das enzimas antioxidantes (30, 31).

Devido a estas propriedades, a terapia de HBO é recomendada para o tratamento de várias doenças, inclusive a DII. No entanto mais estudos são necessários para o pleno entendimento dos mecanismos pelos quais o HBO age na doença inflamatória intestinal.

1.4 Radicais Livres e o Estresse Oxidativo

O metabolismo celular produz normalmente os radicais livres, no entanto as defesas antioxidantes atuam contra a toxicidade desses radicais e são responsáveis pela manutenção da homeostase entre a produção e a eliminação de radicais livres. No entanto, em certas condições tanto fisiológicas (fagocitose) quanto patológicas, pode ocorrer um aumento da produção de radicais livres, suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante, ou uma diminuição das defesas antioxidantes no organismo, favorecendo o chamado estresse oxidativo (32-34).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Por isso, são muito reativos e os principais alvos incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula. Dentre os radicais livres, podem-se destacar dois grupos: as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (35). ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), mas também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (36).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos podendo levar a célula à morte (37). Em geral, deve-se notar que a geração intracelular da ERO é considerada normal em níveis fisiológicos e não necessariamente lesiva, e possui um importante papel vital, uma vez que essas espécies, nesses casos produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (38).

Esses radicais livres são gerados em processos de oxidação biológica. A redução do oxigênio à água formam radicais livres, e o ânion superóxido é o primeiro radical livre formado nesse processo. Estima-se que na cadeia respiratória mitocondrial, 2 a 5% do oxigênio utilizado não é completamente reduzido à água, e ocorre a formação de ânion superóxido. Essa ERO é muito reativa e é removida rapidamente pela enzima antioxidante SOD, formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio forma o radical $\text{OH}\cdot$ e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase GPx, são tão importantes (33, 35).

1.5 Estresse Oxidativo na DII

Uma das principais características da DII é a infiltração de um grande número de leucócitos fagocitários para dentro da mucosa. Desta forma a mucosa sofre lesão resultando na produção e liberação da ERO (34).

Danos causados pelo estresse oxidativo foram encontrados não somente na mucosa intestinal de pacientes com DII (39), como também nos leucócitos sanguíneos (40), além das defesas antioxidantes estarem diminuídas (41).

Iborra e colaboradores (42) demonstraram que em pacientes com DC houve o aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (GPx) durante a fase ativa da doença e retorno ao normal em fases de remissão. Já o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ficou aumentado durante a atividade e remissão da doença, enquanto a catalase (CAT) permaneceu constantemente inibida.

1.6 Oxigênio Hiperbárico na DII

O efeito protetor do HBO sobre a mucosa enteral de ratos com ulcerações induzidas pela indometacina está relacionado não só à diminuição da produção de TNF α e IL-1 β na mucosa, como também a redução da produção sistêmica desses mediadores (43).

Em um estudo com modelo animal para a síndrome do intestino curto, a associação do hormônio de crescimento ou terapia de HBO e a combinação de ambas as terapias, promoveu o aumento na formação de mucosa epitelial (44).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia da terapia com HBO na DII, tanto na prática clínica (45-51), quanto em modelos experimentais (20, 43, 52-55).

Rothfuss, Dennog e Speit (56) mostraram em um estudo com 40 pessoas saudáveis que o HBO induz um aumento na defesa antioxidante, protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo.

Teoricamente, o HBO poderia aumentar o estresse oxidativo por aumento da produção da ERO devido à alta concentração de oxigênio (57). Contudo estudos mostraram uma diminuição do estresse oxidativo com o HBO, devido a sua capacidade de elevar os níveis de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (58, 59) e glutathione (54).

Existem trabalhos que mostram o sucesso do HBO no tratamento de pacientes com DC refratária e na colite experimental (20, 60, 61). Em animais com colite aguda provocada por ácido acético a 4% e submetidos a vários regimes terapêuticos, foi demonstrado que o acréscimo de HBO ao tratamento convencional reduziu a gravidade e a extensão da colite, mostrando que o HBO pode ser útil no tratamento das doenças inflamatórias colônicas (53).

Outro estudo foi realizado em ratos com colite distal por ácido acético a 4% os quais foram tratados com 10 sessões de HBO a 2,5 ATA. Foram medidos os níveis de superóxido dismutase, malonaldeído e glutathione peroxidase nos tecidos do cólon, no plasma e nas hemácias após tratamento. Foram comparados com ratos controles, não tratados com HBO. Neste trabalho, os níveis de malonaldeído e glutathione peroxidase encontravam-se reduzidos nos tecidos e no plasma e a superóxido dismutase elevou-se significativamente, mostrando que os resultados benéficos observados com o HBO nos animais tratados possam ser obtidos pelo seu efeito antioxidante (54).

Rachmilewitz e colaboradores (20) relataram o emprego do HBO como uma terapia alternativa e adjuvante no tratamento cicatrizante das lesões da DC perianal. O efeito possível de tal terapia pode ser explicado pela redução da atividade do óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e inibição de citocinas inflamatórias. Lavy e colaboradores (49) demonstraram o benefício do HBO na DC, sem efeitos colaterais, num seguimento de longo prazo (18 meses), sem recorrência das lesões. Takeshima, Makiyama e Doi (61) mostraram a eficácia do HBO no tratamento de úlceras entéricas em pacientes com DC que não tiveram resposta ao tratamento médico convencional e terapia nutricional.

Buchman e colaboradores (46) descreveram o primeiro caso de sucesso do tratamento com HBO na RCU, refratária ao tratamento convencional, obtendo remissão clínica livre de corticoide. Atug e colaboradores (60) demonstraram que a terapia com HBO é tão eficaz quanto a terapia de dexametazona em modelo experimental, e Rothfuss, Dennog e Speit (56), mostraram em um estudo humano, que o HBO induz o aumento da defesa antioxidante protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo. O uso dessa terapia cresceu rapidamente nos anos 90 apresentando bons resultados e poucos efeitos colaterais sendo, posteriormente “esquecida” ante a eficácia apresentada pelo uso das terapias biológicas (62).

1.7 Justificativa

Nas últimas décadas houve um sensível avanço nas terapias para a DII, no entanto apenas 2/3 respondem a essas terapias e no decorrer do tratamento 1/3 torna-se resistente.

Conquanto ainda há um grupo significativo de pacientes com DII que são intolerantes às várias estratégias terapêuticas existentes. Assim sendo, buscam-se constantemente estratégias e modalidades de tratamento para as DII, entre elas o uso do HBO. Apesar do tratamento com HBO mostrar bons resultados tanto na prática clínica quanto em modelos experimentais, os mecanismos responsáveis pelo efeito terapêutico do HBO ainda não são claros e mais trabalhos nesse sentido se fazem necessários.

Diante do exposto acima resolvemos estudar e relacionar o perfil inflamatório da DII, com a melhora da capacidade antioxidante em modelo animal tratado com HBO.

Objetivos

2 OBJETIVOS

- Observar a melhora e sobrevida dos camundongos tratados com oxigênio hiperbárico;
- Avaliar a inflamação colônica dos animais tratados com oxigênio hiperbárico por intermédio da histologia;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes intestinais com tratamento de oxigênio hiperbárico;
- Dosar citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-13, IL-17, TNF α e Interferon γ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10), no intestino de camundongos.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Éticas

Este é um trabalho experimental que foi desenvolvido no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental – LIM07 do HCFMUSP, do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (Anexo 1).

3.2 Constituição dos Grupos de Animais

Camundongos machos da linhagem Balb/c, pesando entre 20-25 gramas foram utilizados para a realização dos experimentos. Os animais foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas no Laboratório de Investigação Médica em Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM 07) da Universidade de São Paulo, com água e comida *ad libitum*, regime de 12h claro e 12h escuro.

Os animais foram separados em 6 grupos experimentais com 10 animais em cada grupo (Figura 1). No grupo 1, a colite foi induzida por TNBS + Etanol 35%, sendo chamado de grupo TNBS; o grupo 2 também recebeu TNBS + Etanol 35% seguido do tratamento com o HBO, sendo chamado de grupo TNBS+HBO; o grupo 3 recebeu apenas o veículo etanólico a 35%, sendo chamado de grupo ÁLCOOL; o grupo 4 também recebeu o veículo etanólico a 35% associado ao HBO, sendo chamado de grupo ÁLCOOL+HBO; o grupo 5 recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%), sendo chamado de grupo SALINA, e o grupo 6 recebeu a solução salina associado ao HBO, sendo chamado de grupo SALINA+HBO.

Figura 1: Divisão dos Grupos Experimentais

TNBS - Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico; HBO – Tratamento com Oxigênio Hiperbárico.

A separação dos animais se deu em duas etapas: a primeira etapa consistia na separação para qual instilação retal seria aplicada, sendo a solução etanólica 35%, TNBS ou salina. Este sorteio se deu antes da primeira pesagem dos animais. Após a instilação retal, e enquanto se esperava para recuperação total dos animais da anestesia, fazia-se o segundo sorteio separando-os em com ou sem HBO, conforme mostra a Figura 2.

Figura 2: Etapas das Separação dos Animais

TNBS - Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico; HBO – Tratamento com Oxigênio Hiperbárico.

3.3 Anestesia

Os camundongos foram anestesiados com uma diluição de quetamina e xilazina, sendo 450 μ L de quetamina mais 300 μ L de xilazina diluídos em 2250 μ L de salina. Foi injetado por via intraperitoneal um volume de 200 μ L a 250 μ L dependendo do peso dos animais. Para certificar-se do efeito do anestésico sobre os animais, verificou-se o reflexo pedal dos mesmos.

3.4 Indução da Inflamação Intestinal

A indução da inflamação intestinal foi feita por meio do agente químico TNBS, modelo adaptado proposto por Wirtz e colaboradores (63). A indução da inflamação é realizada através de uma instilação retal de 0,5 mg do reagente ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico 5% (TNBS) dissolvido em igual quantidade de etanol a 70%, nos camundongos anestesiados. Um volume de 100 μ L da mistura (TNBS 2,5% - etanol 35%) foi administrado lentamente com um cateter de 3,5F acoplado a uma seringa de 1 mL (Figura 3), este foi introduzido pelo ânus 4 cm para dentro do cólon proximal, conforme Figura 4. Os animais que não tiveram a colite induzida receberam 100 μ L do veículo de etanol a 35%, ou 100 μ L da solução salina a 0,9%. A instilação foi realizada apenas uma vez, no 1º dia do experimento.

Figura 3: Cateter de 3,5F Acoplado a uma Seringa de 1 mL (utilizado para instilação retal)

Figura 4: Instilação Retal em Camundongos

4A – Início da colocação do cateter. 4B – Colocação total do cateter e início da administração da solução, podendo conter TNBS, etanol 35% ou salina 0,9%, dependendo do grupo. TNBS - Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico; HBO – Tratamento com Oxigênio Hiperbárico.

3.5 Tratamento com Câmara Hiperbárica

A terapia foi realizada no Laboratório de Investigação Médica de Gastroenterologia Clínica e Experimental LIM-07, em uma pequena câmara Ecobar 400, cedida ao laboratório pela ECOTEC[®], própria para modelo experimental, conforme mostra Figura 5. Os animais dos grupos TNBS+HBO e ÁLCOOL+HBO foram submetidos ao tratamento com oxigênio hiperbárico a 100%, uma vez ao dia, durante os quatro dias de tratamento. As sessões consistiam em 10 minutos de compressão, 60 minutos a 2 ATA e mais 10 minutos para total descompressão, conforme Gráfico 1.

Figura 5: Câmara Hiperbárica Ecobar 400 da ECOTEC® Utilizada para o Tratamento com HBO
HBO – Oxigênio hiperbárico

Gráfico 1: Esquema de uma Sessão de HBO

C: Compressão por 10 min, **Tratamento:** 60 minutos de Tratamento (2ATA), **D:** Descompressão Total. Nos experimentos foram realizados 4 sessões de HBO nos grupos TNBS+HBO, ÁLCOOL+HBO e SALINA+HBO, uma vez ao dia. A primeira imediatamente após a recuperação dos animais da instilação retal (ou administração de salina 0,9% ou etanol 35%, conforme o grupo de animais). As outras nos 3 dias subsequentes ao início do tratamento. HBO – Oxigênio Hiperbárico; ATA– Atmosfera absoluta.

3.6 Delineamento Experimental

O experimento teve a duração de 4 dias, iniciado com a instilação retal e finalizado com o sacrifício dos animais. Todos os animais tiveram em seu primeiro dia a instilação retal de acordo com o sorteio previamente descrito. Após a recuperação da anestesia todos os animais foram retirados das gaiolas. Os animais que receberam o tratamento com o HBO foram para a câmara e os animais dos grupos que não receberam o tratamento foram colocados ao lado da câmara, por tempo correspondente ao de uma sessão com o HBO. No 4º dia e após o período do tratamento com o HBO, todos os animais foram sacrificados.

3.7 Avaliação Clínica dos Camundongos

Os camundongos foram avaliados diariamente do início ao final de cada grupo. Para os parâmetros avaliados, foram atribuídos valores de 0 ou 1, de acordo com os seguintes achados: muco perianal excretado, prolapso retal, diarreia ou perda de peso maior que 5%. Dessa forma, o índice clínico pode variar de 0 a 4 (64).

3.8 Extração e Armazenamento do Tecido Extraído

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ no final do período experimental no 4º dia. Imediatamente após o sacrifício foi retirado a porção final do cólon proximal do ânus e parte do tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenado a -80°C. Para a avaliação histológica, parte desse cólon retirado foi armazenado em solução de formol 10% tamponado.

3.9 Avaliação Histológica da Inflamação Colônica

Após a formolização, o tecido foi cortado em anéis, tratados e corados com hematoxilina e eosina (H.E.). A análise microscópica foi feita com suas identificações ocultas para não saber a qual grupo o animal pertencia. Na análise histológica

observou-se edema, áreas de necrose, infiltrado inflamatório, utilizando como referência o protocolo já desenvolvido por Gulec e colaboradores (54) na colite experimental. Cada escore do dano microscópico varia de zero (intestino normal) até três (colite grave), conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1: Escala de Dano Microscópico
Aparência Histológica Normal

	0
Inflamação da Mucosa e Submucosa	1
Inflamação de Toda a Parede Intestinal	2
Úlceras e Necrose em Toda a Parede Intestinal	3

3.10 Preparo dos Tecidos para Análise do Estresse Oxidativo

Para as análises de estresse oxidativo, fragmentos do intestino foram coletados e processados com o homogeneizador (MA102/ Mini - Marcone[®]) em baixa velocidade com tampão Fosfato de Potássio 0,1M (pH = 7,0) em volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 1.010 x g por 20 min, a 4° C (Eppendorf MOD 5417R). Foi colhido todo o sobrenadante em microtubos para nova centrifugação a 11.200 xg por 20 min a 4°C. O novo sobrenadante foi colhido, misturado a 5 mL de tampão Fosfato de Potássio 0,1M (pH = 7,0) e submetido à ultracentrifugação a 30.000 rpm por 60 min, a 4° C (Thermo Scientific Sorvall WX Ultra 100), conforme protocolo Anexo 2.

O sobrenadante foi transferido e armazenado em microtubos a -80° C até o momento da análise.

3.10.1 Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase

A determinação da atividade da enzima SOD foi realizada em um analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus[®]), usando um kit disponível comercialmente (Ransod 504; Randox[®] Laboratories, UK), conforme metodologia recomendada pelo fabricante. Essa técnica baseia-se no emprego da xantina e da xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido os quais reagem o I.N.T. (2-(4-iodophenyl)-3-(4-

nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride) para formar o corante formazan vermelho. A atividade da SOD é mensurada pelo grau de inibição dessa reação. Para tanto, foram preparados além da amostra, o substrato misto, tampão, xantina oxidase e o padrão, para posteriormente ser calculada a atividade da enzima em análise. A atividade da enzima foi normalizada pelo peso do tecido e expressa em U/g. Este é uma adaptação do protocolo primeiramente descrito por Stock e colaboradores (65).

3.10.2 Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase

A determinação da atividade da enzima GPx, foi realizada em um analisador bioquímico (Cobas Mira *Plus*®), usando um kit disponível comercialmente (Ransel 505; Randox Laboratories, UK). Essa técnica baseia-se na oxidação da glutathione por peróxido de hidrogênio. Na presença da glutathione redutase e NADH, a glutathione oxidada é imediatamente convertida a forma reduzida, com concomitante oxidação de NADH (reduzindo NADPH a NADH⁺). A atividade da enzima foi normalizada pelo peso do tecido e expressa em U/g. Este protocolo foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Paglia e Valentine (66).

3.10.3 Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Redutase

A determinação da atividade da enzima GR foi realizada em um analisador bioquímico automático (Cobas Mira *Plus*®), usando um kit disponível comercialmente (GR 2368; Randox Laboratories, UK), conforme metodologia recomendada pelo fabricante. O método baseia-se na reação em que a glutathione redutase catalisa a redução da glutathione oxidada em presença de NADPH, que é oxidado. A atividade da enzima foi normalizada pelo peso do tecido e expressa em U/g. Este é uma adaptação do protocolo primeiramente descrito por Melissinos e colaboradores (67).

3.11 Preparo dos Tecidos para Análise das Citocinas

Para as análises das citocinas pelo ensaio de Multiplex®, foram coletados fragmentos de 0,25g do intestino previamente congelado (de cada amostra) e

processados em baixa velocidade com homogeneizador em uma solução de tampão RIPA - Lysis Buffer 10X (Catalog # 20-188 – Milipore®) e um coquetel de inibidores de proteases - Protease Inhibitor Cocktail, 50X (Cat.# G6521 – Promega) em volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. Apenas com intuito de decantação do material foi perfomado um *spin* de 30 segundos (3.500 rpm). Todo o material foi sonicado em banho gelado por 10 minutos, e o sobrenadante foi pipetado em novo tubo para uma centrifugação a 10.000 rpm, a 10 minutos, a 4° C (Eppendorf MOD 5417R). Após a centrifugação 200µL do sobrenadante foi pipetado em microtubo e armazenado a -20° C até o momento do envio das amostras, conforme protocolo Anexo 3. O homogenato foi enviado para Genese® para a realização do ensaio de Multiplex®.

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados empregando-se a análise de variância de uma via, ANOVA, com nível crítico igual ou menor que 0,05, com teste *a posteriori* de Tukey.

Resultados

4.2 Variação de Massa Corpórea dos Animais

Para a determinação da massa corpórea, os animais foram pesados diariamente. A variação média de peso dos grupos é apresentada no Gráfico 3. A aplicação do ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico nos animais do grupo TNBS resultou na perda de 12,71% do peso corpóreo dos animais após 24 horas e, ao final do período experimental uma perda de peso total de 14,63%. Por outro lado, os animais que também receberam 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico associado ao tratamento com o HBO (TNBS+HBO) tiveram uma perda de apenas 7,52% nas primeiras 24 horas, apresentando uma recuperação de 5,58% de seu peso no final do período experimental.

Gráfico 3: Variação de Peso de Todos os Grupos Durante o Período Experimental

Os valores representam a média $\pm$ EPM; Letras indicam diferenças estatísticas onde: a=**, **= $p \leq 0,005$, TNBS vs SALINA, SALINA+HBO/ b=*, ** e ***, *= $p \leq 0,05$, TNBS vs TNBS+HBO e ÁLCOOL, **= $p \leq 0,005$, TNBS vs ÁLCOOL+HBO, ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs SALINA e SALINA+HBO/ c=*, ** e ***, *= $p \leq 0,05$, TNBS vs ÁLCOOL, **= $p \leq 0,005$, TNBS vs e TNBS+HBO e ÁLCOOL+HBO, ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs SALINA e SALINA+HBO; (n=10 animais/grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

No Gráfico 4, podemos observar separadamente os grupos com e sem o tratamento com HBO, e suas diferenças estatísticas. Podemos observar que o gráfico 4A (TNBS vs TNBS+HBO) foi o único que mostrou uma melhora estatisticamente significativa na perda de peso a partir do 3º dia de tratamento, nos gráficos 4B e 4C podemos observar que não houve diferenças significativas entre os grupos.

Gráfico 4: Comparação do Peso entre os Grupos Tratados e Não Tratados com HBO

Os valores representam a média $\pm$ EPM; $*=p \leq 0,05$, TNBS vs TNBS+HBO, $**=p \leq 0,005$, TNBS vs TNBS+HBO. TNBS - Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico; HBO - Oxigênio hiperbárico (n=10 animais/grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Na Figura 6 podemos observar as diferenças das amostras de intestino entre os grupos. Percebe-se que o TNBS (Figura 6A) apresentou visivelmente uma inflamação aguda, o que foi revertido após o tratamento com HBO (Figura 6B).

Figura 6: Exemplos do Intestino nos Seis Grupos

Fotos de exemplos de tecidos de cada grupo. 6A grupo que recebeu o TNBS- Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico (2,5%) + Etanol (35%). 6B recebeu o TNBS Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico (2,5%) + Etanol (35%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico). 6C recebeu etanol a 35%. 6D recebeu etanol a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); 6E recebeu solução Salina (NaCl 0,9%). 6F recebeu a solução Salina (0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

4.3 Avaliação Histológica da Inflamação Colônica

Os resultados da inflamação avaliados pela histologia, apresentou uma melhora significativa no grupo TNBS+HBO quando comparado com o grupo TNBS conforme apresentado no Gráfico 5.

Gráfico 5: Avaliação Histológica Colônica dos Grupos Experimentais

Os valores representam a média $\pm$ EPM; a=** e ***, **= $p \leq 0,005$, TNBS vs TNBS+HBO; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA e SALINA+HBO. Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Na Figura 7 podemos observar as diferenças das amostras histológicas entre os diferentes grupos experimentais. Percebe-se que o TNBS (Figura 7A) apresenta uma grande quantidade de infiltrados e ausência de vilosidade, já na amostra do grupo TNBS+HBO (Figura 7B), observamos essa estrutura recomposta. Os Grupos ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA e SALINA+HBO (Figura 7C, 7D, 7E e 7F, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas entre eles.

Figura 7: Avaliação Microscópica do Intestino (H.E.), em Corte Transversal (40X)

(A) Grupo TNBS: Colite Intensa, com alto infiltrado inflamatório em toda a parede intestinal; (B) Grupo TNBS+HBO: Colite de intensidade leve, com recomposição das vilosidades; (C) Grupo ÁLCOOL: Aparência com alterações histológicas com presença de infiltrado focal; (D) Grupo ÁLCOOL+HBO: Aparência histológica normal; (E) SALINA: Aparência histológica com pequenas alterações; (F) SALINA+HBO: Aparência histológica normal. Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

4.4 Análise das Enzimas Antioxidantes

As médias $\pm$ erro padrão da média das atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR estão descritas na Tabela 2. O tratamento com HBO promoveu uma diferença estatisticamente significativa com relação às enzimas SOD e GPx, quando comparadas aos grupos TNBS e TNBS+HBO. O mesmo não foi observado com relação a GR.

Tabela 2: Atividade das Enzimas Antioxidantes Dosadas em Intestino de Camundongos

Grupo	SOD (U/g)	GPx (U/g)	GR (U/g)
TNBS	31,01 $\pm$ 2,08 ^a	2005,97 $\pm$ 51,57 ^a	1077,33 $\pm$ 73,74 ^a
TNBS+HBO	44,35 $\pm$ 4,00 ^b	3028,34 $\pm$ 78,16 ^b	1310,90 $\pm$ 80,04 ^a
ÁLCOOL	21,62 $\pm$ 1,59 ^a	1748,71 $\pm$ 134,24 ^a	1004,90 $\pm$ 94,67 ^a
ÁLCOOL+HBO	40,37 $\pm$ 5,00 ^{a, b}	2741,17 $\pm$ 307,72 ^{a, b}	1280,15 $\pm$ 137,66 ^a
SALINA	20,14 $\pm$ 0,82 ^a	1693,84 $\pm$ 109,38 ^a	998,57 $\pm$ 22,81 ^a
SALINA+HBO	37,64 $\pm$ 3,27 ^{a, b}	2511,85 $\pm$ 429,79 ^{a, b}	1190,97 $\pm$ 184,56 ^a

Os valores representam a média $\pm$ EPM; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significante ($p < 0,05$). Não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos; (n=10 animais por grupo SOD e GPx / GR, n=5 animais por grupo: TNBS, ÁLCOOL+HBO e SALINA/ n=6 animais por grupo: TNBS+HBO, ÁLCOOL e ÁLCOOL+HBO); (SOD- Super óxido Dismutase; GPx – Glutathione Peroxidase; GR – Glutathione reductase). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

De forma geral pode-se observar um aumento na atividade de todas as enzimas antioxidantes nos grupos que receberam o tratamento com HBO quando comparadas com os grupos que não receberam, inclusive com relação à GR mesmo que esta não tenha apresentado diferenças estatisticamente significantes (Gráficos de 6 a 8).

Gráfico 6: Dosagem da SOD em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; (n=10 animais por grupo); (SOD- Superóxido Dismutase). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 7: Dosagem da GPx em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; Letras indicam diferenças estatísticas onde: a=*, **, *=p $\leq$ 0,05, TNBS+HBO vs TNBS; **=p $\leq$ 0,005, TNBS+HBO vs ÁLCOOL e SALINA/ b=*, *=p $\leq$ 0,05, ÁLCOOL+HBO vs ÁLCOOL e SALINA (n=10 animais por grupo); (GPx – Glutathione Peroxidase). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 8: Dosagem de GR em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (n=5 animais por grupo: TNBS, ÁLCOOL+HBO e SALINA/ n=6 animais por grupo: TNBS+HBO, ÁLCOOL e ÁLCOOL+HBO); (GR – Glutathione Redutase). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

4.5 Análise das Citocinas

Foi realizada a quantificação das citocinas no intestino dos animais, sendo elas: $\text{IFN}\gamma$, IL-4, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, $\text{TNF}\alpha$. Os resultados são apresentados nos Gráficos de 09 a 15 como média e erro padrão da média (EPM) de citocinas em pg/mg de proteína.

Podemos observar que a indução da colite pelo TNBS promoveu um aumento na $\text{INF}\gamma$, na IL-12, na IL-17 e no $\text{TNF}\alpha$, o que foi revertido de forma estatisticamente significativa pelo tratamento com HBO, quando comparados aos grupos TNBS vs TNBS+HBO (Gráfico 09, 10, 11 e 12).

Gráfico 9: Dosagem de INFγ em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média ± EPM; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs TNBS+HBO, ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA E SALINA+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 10: Dosagem de IL-12 em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média ± EPM; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs TNBS+HBO, ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA E SALINA+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 11: Dosagem de IL-17 em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs TNBS+HBO, ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA E SALINA+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 12: Dosagem de TNFα em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs TNBS+HBO, ÁLCOOL, ÁLCOOL+HBO, SALINA E SALINA+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Com relação a IL-4 e a IL-10 foi observado que a indução da colite pelo TNBS promoveu uma diminuição em ambas as citocinas quando comparado com os outros grupos, mas somente quando comparado com o grupo TNBS+HBO é que observamos um aumento estatisticamente significativo da IL-4 e da IL-10 (Gráfico 13 e 14).

A IL-4 promoveu um aumento apenas no grupo TNBS+HBO, não sendo observado uma aumento nos outros grupos tratados com HBO (ÁLCOOL+HBO e SALINA+HBO), conforme mostra o gráfico 13.

Gráfico 13: Dosagem de IL-4 em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; ***= $p \leq 0,0001$, TNBS vs TNBS+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Gráfico 14: Dosagem de IL-10 em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; $*=p \leq 0,05$, TNBS vs TNBS+HBO; (n = 10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

A indução da colite pelo TNBS e o tratamento com HBO não promoveu alterações em relação a IL-13, em nenhum dos grupos (Gráfico 15).

Gráfico 15: Dosagem de IL-13 em Intestino de Camundongos

Os valores representam a média $\pm$ EPM; Não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos; (n=10 animais por grupo). Grupo TNBS recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35%; O grupo TNBS+HBO recebeu TNBS 2,5% (Ácido 2,4,6 trinitro benzeno sulfônico) + Etanol 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo ÁLCOOL recebeu apenas o veículo etanólico a 35%; O grupo ÁLCOOL+HBO recebeu o veículo etanólico a 35% + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico); O grupo SALINA recebeu apenas solução salina (NaCl 0,9%); O grupo SALINA+HBO recebeu solução salina (NaCl 0,9%) + HBO (Tratamento com Oxigênio Hiperbárico).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são formas da DII que têm um repertório limitado de opções de tratamento e que atualmente consiste apenas em manter a remissão clínica nos pacientes. No final dos anos 80, ocorreram as primeiras evidências clínicas e experimentais de que o HBO poderia ser benéfico no tratamento da DII. Brady, Cooley e Davis (45) mostraram o primeiro relato de sucesso para o tratamento em pacientes com DC. Outros estudos mostraram que o HBO é eficaz na cicatrização de feridas perianais (50, 68, 69).

Em estudos prévios o HBO foi associado com melhorias na maioria dos pacientes tratados e, além disso, os eventos adversos relatados de pacientes foram mínimos na maioria dos estudos. Estudos com animais mostraram que o HBO promoveu uma diminuição da inflamação e de marcadores de estresse oxidativo e ainda resultou em melhorias teciduais tanto em nível microscópico quanto macroscópico (70).

Em nosso trabalho o tratamento com o HBO em camundongos com colite induzida por TNBS, mostrou nítida melhora clínica dos animais, tanto nos parâmetros de perda de peso sendo maior que 5%, quanto na presença de muco perianal e diarreia, em percentual de quase 50%, em relação aos animais não tratados.

Ercin e colaboradores (52) obtiveram resultados semelhantes com relação a perda de peso, em ratos com colite experimental induzida por ácido acético, embora sem a mesma magnitude. Em outro trabalho estes mesmos parâmetros incluídos em um índice de atividade da doença mostraram os mesmos resultados, em ratos com colite induzida por indometacina (43).

Nossos resultados mostraram o aumento das enzimas SOD e GPX. Essas enzimas possuem um papel fundamental na eliminação dos radicais livres, evitando assim danos associados a esses radicais. Este resultado é corroborado por Gulec e colaboradores (54), que também demonstraram o aumento dessas enzimas em ratos com colite induzida por ácido acético. Assim como Guven e colaboradores (55), em modelo de enterocolite necrotizante em filhotes de ratos, também apresentaram aumento das enzimas antioxidantes SOD e GPx, quando tratados com HBO.

Um estudo com 40 pessoas saudáveis também mostrou aumento das defesas antioxidantes SOD e GPx (56). Desta forma estes achados corroboram a tese de que embora o HBO promova o aumento do O₂ e consequentemente o aumento dos radicais livres, promove uma adaptação na capacidade antioxidante, favorecendo assim uma atenuação das lesões em colites experimentais.

Já a GR não possui a capacidade de eliminar diretamente os radicais livres, porém participa de uma via acessória e é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione e que será utilizada pela GPx para a diminuição dos radicais livres. Além da GPx e SOD, dosamos a GR para verificar se também há o aumento desta com o tratamento com o HBO, nossos resultados apesar de não serem estatisticamente significativos quanto a essa análise, mostrou que o HBO promoveu uma tendência para o aumento desta enzima.

O papel das citocinas no processo inflamatório na doença de Crohn e na colite experimental induzida por TNBS é mediada pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias. Dessas citocinas foram mensuradas: INF γ , IL-12, IL-17, TNF α . Todas elas foram intensamente suprimidas pelo tratamento com o HBO, incluindo a IL-17, que sabemos atualmente participar do processo inflamatório indutor da doença de Crohn e como fator importante na etiologia das lesões. Hoje os estudos demonstram que a resposta inflamatória na DC é determinada principalmente por resposta Th1 e Th17 (13, 14).

A diminuição das interleucinas inflamatórias: IL-1 β , IL-6 e TNF α foi observado em pacientes com DC durante o período do tratamento com o HBO, relacionando-se as alterações das citocinas aos efeitos clínicos (51). Já em modelo animal em ratos com colite induzida por indometacina, também foi observado uma diminuição destas citocinas inflamatórias (TNF α e IL1 β) assim como a redução significativa da ulceração induzida pela indometacina (71). Em outro modelo experimental, o de enteropatia induzida pela indometacina em ratos, o HBO promoveu uma diminuição das citocinas inflamatórias (TNF α e IL1 β) (43).

Todas as citocinas pró-inflamatórias dosadas em nosso experimento tiveram uma diminuição estatisticamente significativa, estando de acordo com os achados de pesquisas tanto em diversos modelos experimentais quanto em estudos com pacientes.

As citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, tiveram aumento significativo com o tratamento do HBO. Essa relação de supressão das citocinas pró-inflamatórias pelo aumento das anti-inflamatórias (IL-10) condiz com que é descrito na literatura na melhora da inflamação em colite experimental (72).

O efeito da terapia com o HBO na DC e em modelos experimentais são ligados à diminuição da permeabilidade induzida por diminuição do processo inflamatório (43, 51), além de promover um decréscimo do estresse oxidativo pela melhora da modulação da capacidade antioxidante enzimática (54).

Além desses importantes achados, devemos lembrar que a composição bacteriana desempenha um papel importante no desenvolvimento da DII, tanto em pacientes (73), quanto em modelos experimentais (74). O tratamento com o HBO tem um efeito importante na alteração da composição da microbiota intestinal em camundongos (75), assim como na periodontite inibindo o crescimento de bactérias anaeróbicas (76).

Com base nos resultados encontrados neste trabalho e corroborados pela literatura o HBO parece ser uma opção eficaz no tratamento da DII. Estudos futuros poderão contribuir para uma melhor compreensão do tratamento com HBO nos aspectos do processo inflamatório da mucosa, da permeabilidade intestinal e alterações das defesas antioxidantes, assim como na composição da microbiota intestinal.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Desta forma podemos concluir que o tratamento com HBO:

- ✓ Diminuiu a perda de peso, a secreção de muco e a diarreia, além de reduzir a taxa de mortalidade de 20% para 0%;
- ✓ Promoveu uma melhora na inflamação sob o aspecto histológico;
- ✓ Aumentou a atividade da SOD e da GPx, mas não foi capaz de promover alterações significativas na atividade da GR;
- ✓ Foi capaz de aumentar de forma significativa as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10;
- ✓ Reduziu significativamente as citocinas pró-inflamatórias $\text{INF}\gamma$, IL-12, IL-17 e $\text{TNF}\alpha$, mas não promoveu alteração na citocina IL-13.

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/04/2012, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 055/12 intitulado: "AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO EXPERIMENTAL NA DOENÇA DE CROHN SUBMETIDO AO TRATAMENTO DE OXIGÊNIO HIPERBÁRICO" apresentado pelo Departamento de GASTROENTEROLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Aytan Miranda Sipahi

Pesquisador (a) Executante: Fernanda Serafim Nakutis

CEP-FMUSP, 26 de Abril de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo 2 - Preparo do Homogenato para Estresse Oxidativo

Preparo do Homogenato de Tecido **Para Análise das Enzimas Antioxidantes (RANDOX®)**

Preparação Prévia (Dia Anterior):

- A. Identificar os microtubos de 2 ml, de acordo com as amostras em duplicata;
- B. Identificar microtubos em triplicata para armazenar;
- C. Preparar Tampão Fosfato de Potássio 0,1M (ajustar pH=7,0 com NaOH):
 Pesar: 4,80g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ + 2,85g de KH_2PO_4 e completar para 0,5 litro de água Milli-Q e manter à 4°C;

Preparação Prévia (No dia):

Preparar os tubos de ultracentrifugação com 5 mL do Tampão Potássio 0,1M (manter no gelo);

Homogenato:

1. Pesar 0,25g dos fragmentos de amostra em Tampão de Fosfato de Potássio 0,1M (pH=7,0), em volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa da amostra;
2. Processar as amostras no homogeneizador, até completa homogeneização dos fragmentos;
3. Centrifugar o homogenato a 1.010xg, por 20 minutos, a 4°C;
4. Transferir 0,5mL do sobrenadante para microtubos para nova centrifugação a 11.200xg, por 20 minutos, a 4°C;
5. Transferir todo o sobrenadante para os tubos previamente preparados com 5 mL de Tampão Potássio 0,1 M (pH=7,0) e submeter à ultracentrifugação a 30.000 rpm por 60 minutos, a 4°C;
6. Ao final, transferir o sobrenadante para microtubos (três tubos por amostra), e armazenar a -80°C até o momento da análise.

Anexo 3 - Preparo do Homogenato para Citocinas

Preparo do Homogenato de Tecido para Análise de Citocinas

Preparação Prévia (dia antes):

- A. Separar e identificar microtubos 2 mL;
- B. Separar e identificar microtubos de 1,5mL em duplicata (um encaminhado para Gênese e o outro para armazenamento);
- C. Pesar as amostras de tecido congelado, transferindo-a para os microtubos previamente identificados);

Preparação Prévia (No dia):

Diluir o Tampão RIPA - Lysis Buffer 10X (Catalog # 20-188 – Milipore®) para obter uma solução de 1x com Água Milli-Q e refrigerar a solução duas horas antes da utilização (conforme instruções do fabricante);
- 5ml do Tampão 10x completar q.s.p 50ml com água Milli-Q.

Imediatamente antes da utilização adicionar o Coquetel de Inibidores de proteases - Protease Inhibitor Cocktail, 50X (Cat.# G6521 – Promega) no Tampão RIPA 1x.

Homogenato

1. Retirar as amostras do freezer e colocar em microtubos (previamente identificados). Manter as amostras em isopor com gelo durante todo o tempo;
2. Adicionar tampão RIPA com o inibidor de Protease na quantidade de 3mL/g aos microtubos com amostra de tecidos;
3. Processar as amostras no homogeneizador, até completa homogeneização dos fragmentos;
4. Performar spin em centrífuga a 3500 rpm, por 30 segundos para decantação do material;
5. Sonicar em banho gelado por 10 min;
6. Centrifugar a 10.000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos;
7. Transferir 200 ul do sobrenadante em microtubos de 1,5 mL (2 microtubos para cada amostra previamente identificados);
8. Armazenar a -20 °C para posterior análise;
9. Reservar 1 microtubo com 1 mL do Tampão RIPA + Coquetel de Inibidor de Protease (branco);

* Visto que o Protocolo Multiplex™ não dá detalhes para o pesquisador de como processar a amostra de tecido, foi elaborado um protocolo para tal com base em estudos prévios.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Bannaga AS, Selinger CP. Inflammatory bowel disease and anxiety: links, risks, and challenges faced. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2015;8:111-7.
2. Shorter RG, Huizenga KA, Spencer RJ. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *The American Journal of Digestive Diseases*. 1972;17(11):1024-32.
3. Singleton JW. Progress in inflammatory bowel disease. *Chin J Dig Dis*. 6. 2005; 6(2): 59-61.
4. Bosca-Watts MM, Tosca J, Anton R, Mora M, Minguez M, Mora F. Pathogenesis of Crohn's disease: Bug or no bug. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6(1):1-12.
5. Vavricka SR, Rogler G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly*. 2009;139:527-34.
6. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007;236:217-26.
7. Hundorfean G, Neurath MF, Mudter J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(1):180-6.
8. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. England. 2002;16(6):933-43.
9. Baldaia C, Portela F, Andrade P, Leitão MC, Freitas D. Doença de Crohn: TNF- α e outras citocinas. *J Port Gastreterol*. 2002;9:187-95.
10. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(4):279-88.
11. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:298-306.
12. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:390-407.
13. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity*. 2009;31(3):389-400.
14. Torres MI, Rios A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol*. 2008;14(13):1972-80.
15. Elia PP, Fogaça HS, Barros RGGR, Zaltman C, Elia CSC. Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com doenças inflamatórias

- intestinais, internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio De Janeiro. *Arq Gastroenterol.* 2007;44(4):332-9.
16. Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(13):1893-6.
17. Morrison G, Headon B, Gibson P. Update in inflammatory bowel disease. *Aust Fam Physician.* 2009;38(12):956-61.
18. Sandborn WJ. Crohn's disease evaluation and treatment: clinical decision tool. *Gastroenterology.* 2014;147(3):702-5.
19. Teixeira LB, Epifanio VL, Lachat JJ, Foss NT, Coutinho-Netto J. Oral treatment with Hev b 13 ameliorates experimental colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2012;169(1):27-32.
20. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Rubenstein I, Better OS. Hyperbaric oxygen: a novel modality to ameliorate experimental colitis. *Gut.* 1998;43(4):512-8.
21. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1995;109:1344-67.
22. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med.* 2003;9:218-22.
23. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989;96:795-803.
24. Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med.* 1996;334(25):1642-8.
25. Nylander G, Nordstrom H, Eriksson E. Effects of hyperbaric oxygen on oedema formation after a scald burn. *Burns Incl Therm Inj.* 1984;10(3):193-6.
26. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM.* 2004;97(7):385-95.
27. Iezzi LE, Feitosa MR, Medeiros BA, Aquino JC, Almeida ALNRd, Parra RS, et al. Crohn's disease and hyperbaric oxygen therapy. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2011;26:129-32.
28. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009;96:988-95.
29. Ding Z, Tong WC, Lu XX, Peng HP. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: a review. *Interv Neurol.* 2014;2:201-11.
30. Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *Scientific World Journal.* 2006;6:425-41.
31. Fernandes TDF. Hyperbaric medicine. *Acta Med Port* 2009;22:323-334

32. Bondy SC, LeBel CP. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:633-42.
33. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:222-30.
34. Damiani CR, Benetton CAF, Stoffel C, Bardini KC, Cardoso VH, Giunta GD, et al. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(1846-1851).
35. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, New York: Oxford University Press. 1999.
36. Berra CM, Menck CRM, Di Mascio P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Quimica Nova*. 2006;29(6):1340-4.
37. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*. 1996;350:103-8.
38. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3:1109-15.
39. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol*. 2003;201(1):17-27.
40. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36(12):1289-94.
41. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49(9):1433-7.
42. Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical Society Transactions*. 2011;39:1102-6.
43. Yang Z, Nandi J, Wang J, Bosco G, Gregory M, Chung C, et al. Hyperbaric oxygenation ameliorates indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating TNF- α and IL-1 β production. *Dig Dis Sci*. 2006;51(8):1426-33.
44. Adas G, Adas M, Arian S, Sarvan AK, Toklu AS, Mert S, et al. Effect of growth hormone, hyperbaric oxygen and combined therapy on the gastric serosa. *World J Gastroenterol*. 2013;19(19):2904-12.
45. Brady CE, 3rd, Cooley BJ, Davis JC. Healing of severe perineal and cutaneous Crohn's disease with hyperbaric oxygen. *Gastroenterology*. 1989;97:756-60.
46. Buchman AL, Fife C, Torres C, Smith L, Aristizabal J. Hyperbaric oxygen therapy for severe ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol*. 2001;33(4):337-9.

47. Gurbuz AK, Elbuken E, Yazgan Y, Yildiz S. A different therapeutic approach in patients with severe ulcerative colitis: hyperbaric oxygen treatment. *South Med J*. 2003;96(6):632-3.
48. Kuroki K, Masuda A, Uehara H, Kuroki A. A new treatment for toxic megacolon. *The Lancet*. 1998;352(9130):782.
49. Lavy A, Weisz G, Adir Y, Ramon Y, Melamed Y, Eidelman S. Hyperbaric oxygen for perianal Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*. 1994;19(3):202-5.
50. Sipahi AM, Damiao AO, de Sousa MM, Barbutti RC, Trivellato S, Esteves C, et al. Hyperbaric oxygen: a new alternative in the treatment of perianal Crohn's disease. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 1996;51(5):189-91.
51. Weisz G, Lavy A, Adir Y, Melamed Y, Rubin D, Eidelman S, et al. Modification of in vivo and in vitro TNF-alpha, IL-1, and IL-6 secretion by circulating monocytes during hyperbaric oxygen treatment in patients with perianal Crohn's disease. *J Clin Immunol*. 1997;17(2):154-9.
52. Ercin CN, Yesilova Z, Korkmaz A, Ozcan A, Oktenli C, Uygun A. The effect of iNOS inhibitors and hyperbaric oxygen treatment in a rat model of experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2009;54(1):75-9.
53. Gorgulu S, Yagci G, Kaymakcioglu N, Ozkara M, Kurt B, Ozcan A, et al. Hyperbaric oxygen enhances the efficiency of 5-aminosalicylic acid in acetic acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2006;51(3):480-7.
54. Gulec B, Yasar M, Yildiz S, Oter S, Akay C, Deveci S, et al. Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res*. 2004;53(5):493-9.
55. Guven A, Gundogdu G, Uysal B, Cermik H, Kul M, Demirbag S, et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg*. 2009;44:534-40.
56. Rothfuss A, Dennog C, Speit G. Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis*. 1998;19(11):1913-7.
57. Alleva R, Nasole E, Di Donato F, Borghi B, Neuzil J, Tomasetti M. alpha-Lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:404-10.
58. Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA. Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol*. 2001;86(1):24-7.
59. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, et al. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2004;203:253-65.
60. Atug O, Hamzaoglu H, Tahan V, Alican I, Kurtkaya O, Elbuken E, et al. Hyperbaric oxygen therapy is as effective as dexamethasone in the treatment of TNBS-E-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2008;53(2):481-5.

61. Takeshima F, Makiyama K, Doi T. Hyperbaric oxygen as adjunct therapy for Crohn's intractable enteric ulcer. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3374-5.
62. Bedioui H, Makni A, Magherbi H, Ben Safta Z. [Hyperbaric oxygen in the treatment of perineal Crohn's disease era of infliximab: a renewal interest?]. *Tunis Med*. 2012;90:427-30.
63. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*. 2007;2(3):541-6.
64. Scheinin T, Butler DM, Salway F, Scallan B, Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(1):38-43.
65. Stocks J, Gutteridge JM, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med*. 1974;47(3):215-22.
66. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-69.
67. Melissinos KG, Delidou AZ, Varsou AG, Begietti SS, Drivas GJ. Serum and erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal failure. *Nephron*. 1981;28(2):76-9.
68. Colombel JF, Mathieu D, Bouault JM, Lesage X, Zavadil P, Quandalle P, et al. Hyperbaric oxygenation in severe perineal Crohn's disease. *Diseases of the Colon and Rectum*. 1995;38(6):609-14.
69. Nelson EW, Jr., Bright DE, Villar LF. Closure of refractory perineal Crohn's lesion. Integration of hyperbaric oxygen into case management. *Dig Dis Sci*. 1990;35(12):1561-5.
70. Rossignol DA. Hyperbaric oxygen treatment for inflammatory bowel disease: a systematic review and analysis. *Med Gas Res*. 2012;2(1):6.
71. Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, Yang ZJ, Levine RA. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;336(1-2):17-24.
72. Buras JA, Holt D, Orlow D, Belikoff B, Pavlides S, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. *Critical Care Medicine*. 2006;34(10):2624-9.
73. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334:105-8.
74. Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J Immunol*. 2005;174:2990-9.
75. Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*. 2014;147(5):1055-63.

76. Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, Canepari P. Microbiological evaluation of the effects of hyperbaric oxygen on periodontal disease. *New Microbiologica*. 2007;30(4):431-7.