

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IGOR PEDROSO SOARES

ÓLEO DE PEIXE PROMOVE RECUPERAÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE

CURITIBA

2018

IGOR PEDROSO SOARES

ÓLEO DE PEIXE PROMOVE RECUPERAÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Helena Appel.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Soares, Igor Pedroso

Óleo de peixe promove recuperação da mucosa intestinal em modelo experimental de colite. / Igor Pedroso Soares. – Curitiba, 2018.
80 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Coorientadora: Márcia Helena Appel

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Óleo de peixe. 2. Intestinos – doenças inflamatórias. 3. Ácidos graxos Ômega-3. I. Título. II. Fernandes, Luiz Cláudio. III. Appel, Márcia Helena. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.3447



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de Igor Pedroso Soares

Aos dois dias do mês de julho do ano de dois mil e dezoito, foi realizada no auditório do departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando **IGOR PEDROSO SOARES**, intitulada “**ÓLEO DE PEIXE ACELERA RECUPERAÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE**”. A abertura teve início às 14h30min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador do candidato, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Maria Fernanda de Paula Werner do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “apreciação”, habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 02 de julho de dois mil e dezoito.



Professora Doutora Maria Fernanda de Paula Werner
UFPR- Membro Titular



Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **IGOR PEDROSO SOARES** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à aprovação do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de julho de dois mil e dezoito.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
<i>Aprovado</i>	Professora Doutora Maria Fernanda de Paula Werner UFPR- Membro Titular	
<i>Aprovado</i>	Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva UFPR - Membro Titular	
<i>Aprovado</i>	Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora	

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo ao professor Luiz pela oportunidade e autonomia me dada no meu aprendizado.

Também agradeço a professora Lucélia pela ajuda com a microscopia eletrônica. A equipe da Imunova pela ajuda com ensaio de FITC-Dextran. A professora Ana Vitória, Suelen e professor Alex pela ajuda com o ensaio de ácido siálico. A Bruna e professora Katya pela ajuda com o HPLC, professora Marcia. E ao pessoal do laboratório, do departamento e da universidade. Agradeço ao irmão maior CAPES pela bolsa, CNPq pelo suporte financeiro e os braços.

RESUMO

Introdução: Doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do tipo autoimune e inflamatória que lesionam e comprometem funcionalmente o sistema gastrointestinal. Desta forma, modelos de colite experimental são usados afim de estudar a patogênese e possíveis tratamentos para a DII. O óleo de peixe é um promissor tratamento complementar para a DII devido a sua função anti-inflamatória e imunomodulatória. **Objetivo:** Verificar se o óleo de peixe previne colite experimental. **Metodologia:** Ratos Wistar jovens foram tratados oralmente com 2g/kg/dia de óleo de peixe por 30 dias antes da indução de colite experimental com TNBS (ácido trinitobenzeno sulfônico). Os animais continuaram recebendo óleo de peixe até serem eutanasiados em dois ou sete dias após a colite com TNBS. Analisamos muco intestinal com histologia AB/PAS e muco fecal com ácido siálico. A permeabilidade intestinal foi determinada com FITC-Dextrans e a inflamação com mieloperoxidase (MPO). A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para observar com maior detalhe a arquitetura do epitélio intestinal. E a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para determinar perfil dos ácidos graxos. **Resultados e Conclusão:** A colite com TNBS reduziu o conteúdo de muco histológico e fecal, aumentou a atividade da MPO, indicando alta atividade inflamatória no tecido, e promoveu perda da arquitetura epitelial, com maior espaçamento intercelular e maior permeabilidade intestinal. Em adição, o óleo de peixe não preveniu estes achados. Contudo, após sete dias de colite com TNBS, os animais tratados com óleo de peixe tiveram resolução da arquitetura epitelial, com maior conteúdo de muco histológico e menor atividade inflamatória no tecido, no entanto, o tecido continuava funcionalmente comprometido dada a alta permeabilidade intestinal. Desta forma, o óleo de peixe promoveu a recuperação da mucosa intestinal após a colite com TNBS.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais. Óleo de peixe. Ômega-3. TNBS. Colite.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory bowel diseases (IBD) are inflammatory and autoimmune diseases of the gastrointestinal system that damage and impair its functions. Therefore, experimental colitis have been used to study pathogenesis and potential treatments of IBD. One potential complementary treatment is fish oil due its anti-inflammatory and immunomodulatory functions. Aim: To verify whether fish oil prevents induced-colitis damages or not. Methodology: Young Wistar rats were orally supplemented with 2 g/kg/day of fish oil for 30 days before induced-colitis with TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid). Animals continued receiving fish oil after TNBS-colitis and were euthanized after 2 and 7 days of TNBS-colitis. Mucus content was visualized with AB/PAS positive histology and determined in feces with sialic acid assay. Intestinal permeability was determined with FITC-Dextran and tissue inflammation with myeloperoxidase (MPO). High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine fatty acids profile and electron transmission microscopy to visualize colonic epithelium. Results and Conclusion: TNBS-colitis damaged the epithelium colonic architecture, reducing AB/PAS positive histology and feces mucus content. Higher MPO activity and intestinal permeability were also found. In addition, fish oil did not prevent these colonic disruptions, but enhanced the resolution of epithelium architecture and reduced MPO activity after seven days of colitis. However, tissue functionality remained impaired given higher intestinal permeability. Therefore, fish oil enhances colon mucosa resolution after experimental colitis.

Keywords: Inflammatory bowel disease. Fish oil. Omega-3. TNBS. Colitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 INDUÇÃO DA COLITE COM TNBS	19
3.2 TRATAMENTO COM ÓLEO DE PEIXE.....	19
3.3 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	20
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC).....	20
3.5 ENSAIO DE ÁCIDO SIÁLICO.....	21
3.6 HISTOLOGIA.....	21
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	22
3.8 ENSAIO DE FITC-DEXTRAN	22
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADOS	23
4.1 MASSA CORPORAL.....	23
4.2 PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA.....	24
4.3 MIELOPEROXIDASE (MPO).....	25
4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC).....	26
4.5 HISTOLOGIA.....	28
4.6 ÁCIDO SIÁLICO.....	32
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	33
4.8 FITC-DEXTRAN.....	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	57
APÊNDICE 1	57
APÊNDICE 2	59

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças de componentes imunológico e inflamatório crônico do sistema gastrointestinal, com períodos recidivantes e de ativação imunológica e inflamatória. Elas são duas doenças que diferem biologicamente: a colite ulcerativa e a doença de Crohn. A doença de Crohn pode afetar qualquer região do trato gastrointestinal, sendo o íleo e o cólon as regiões mais comuns. Já a colite ulcerativa afeta o cólon, sendo o reto a região normalmente afetada. As lesões da colite ulcerativa são contínuas, enquanto as lesões da doença de Crohn são segmentares (WALLACE et al., 2014; JOSEPH; WEBER, 2018).

Estruturalmente, a doença de Crohn afeta transmuralmente o tubo gastrointestinal, enquanto a colite ulcerativa restringe-se normalmente à mucosa. Observações morfológicas comumente descritas na DII envolvem lesões na cripta, como distorção e inflamação focal na mesma, áreas de ulceração na mucosa que pode se estender até a muscular própria, edema submucoso, agregados linfoides na submucosa e infiltrado de polimorfonucleares intraepiteliais (JOSEPH; WEBER, 2018). Outros achados envolvem o comprometimento da função de barreira que o epitélio gastrointestinal possui. Assim, a permeabilidade intestinal está aumentada, bem como as junções celulares das células epiteliais estão reduzidas e o muco intestinal que recobre o epitélio e funciona como uma barreira contra os microorganismos luminiais está funcionalmente comprometido ou reduzido (ODENWALD; TURNER, 2018).

Imunologicamente, o intestino possui um estado basal de inflamação de baixo grau visto os estímulos ambientais e bacterianos que recebe. Na DII a resposta imunológica é alterada e leva o tecido a um grau de inflamação aumentado e descontrolado. Linfócitos T pró-inflamatórios participam da patogênese encontrada na DII, com linfócitos Th1, Th2 e Th17 que produzem quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias (e.g. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-17), além de haver expressão excessiva de NF- κ B na DII, o que aumenta ainda mais a produção de citocinas pró-inflamatórias (STEINBACH; PLEVY, 2014; WALLACE et al., 2014; KIM; CHEON, 2017).

Outros fatores também estão envolvidos na patologia da DII. Falhas na detecção de bactérias em pacientes com variantes genéticas em receptores de reconhecimento padrão, como TLRs (*toll-like receptors*) e NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) são descritos, bem como menor produção de defensinas que são produtos antimicrobianos. Vias da autofagia que participam na eliminação de patógenos por meio de TLRs também estão comprometidas na DII. Desta forma, falhas na resposta imunológica inata e adaptativa são encontradas na DII e em conjunto, essas falhas levam a danos estruturais no intestino e modificam o funcionamento do mesmo, reduzindo a função de barreira e o *clearance* de microorganismos potencialmente patogênicos (STEINBACH; PLEVY, 2014; WALLACE et al., 2014; KIM; CHEON, 2017).

Assim, a microbiota intestinal é outro fator envolvido na patogênese da DII e a redução da diversidade de microorganismos é encontrada na DII. Comumente, 4 filos predominam e compõe a microbiota: Firmicutes (~64%) é o filo predominante, seguido por Bacteroidetes (~23%), Proteobactérias (~8%) e Actinobactérias (~3%) (OSTERMAN; LICHTENSTEIN, 2014). A relação dos microorganismos intestinais com o sistema gastrointestinal é simbiótica e fundamental no desenvolvimento embriogênico do mesmo, como o desenvolvimento da rede neuronal entérica (KABOURIDIS et al., 2015), bem como na manutenção das funções intestinais de integridade e permeabilidade epitelial (BUTTÓ; HALLER, 2018). Os ácidos graxos de cadeia curta que os microorganismos produzem são agentes que promovem a manutenção da função intestinal por serem usados como substrato energético pelo epitélio. Na DII há diminuição na quantidade de Firmicutes e Bacteroidetes e consequente aumento de Proteobactérias e Actinobactérias. Esta alteração na composição modifica a simbiose intestinal para disbiose e a consequência é o aumento na proliferação de bactérias potencialmente patogênicas (e.g. *Escherichia coli*), indução de inflamação intestinal seja por maior produção de enterotoxinas ou invasão de patógenos no epitélio e menor produção de ácidos graxos de cadeia curta (BUTTÓ; HALLER, 2018).

Portanto, alterações de funções imunológicas, intestinais e a composição do microbioma intestinal fazem parte da DII. Pessoas com variantes genéticas específicas que modificam funções imunológicas e reduzem o *clearance* de microorganismos intestinais possuem maior probabilidade de desenvolver DII. Assim,

um fator etiológico da DII é o conjunto de várias variantes genéticas que contribuem nas alterações de funções descritas acima (WALLACE et al., 2014).

Além da predisposição genética, fatores ambientais de risco são relacionados como fatores etiológicos. Alimentação do tipo industrializada tem sido relacionada como um fator, bem como baixo consumo nutricional de fibras alimentares (MALIK, 2015) e ácidos graxos do tipo ômega-3 (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Além da alimentação, o sedentarismo, a poluição ambiental e o estresse também são fatores de risco. Estes fatores não apenas aumentam as chances de DII em pessoas com predisposição genética, mas são fatores que alteram a composição da microbiota intestinal, reduzindo a simbiose intestinal e aumentando a proliferação de espécies potencialmente patogênicas (MALIK, 2015; VATN, 2018).

Outro fator que tem sido relacionado é o de populações que vivem em regiões de baixa incidência de DII, mas que ao mudarem para regiões de alta incidência e prevalência de DII consequentemente aumentam as chances de desenvolver DII, indicando que o ambiente é um fator importante da DII (VATN, 2018). Assim, países industrializados possuem maior incidência e prevalência da DII, e em países semi-industrializados a incidência vem aumentando. No Brasil a prevalência pode estar entre 0.6-6.75/100.000 e 2.42-21/100.000 pessoas para doença de Crohn e colite ulcerativa, respectivamente, além de aumento anual de 11.1% e 14.9%, na ordem (NG et al., 2017).

Pessoas com DII possuem a qualidade de vida reduzida em razão dos sintomas e complicações da DII. Os sintomas normalmente descritos são diarreia, dor abdominal, perda de peso, febre e sangramento retal. Manifestações extraintestinais também podem ocorrer, porém, mais especificamente na doença de Crohn, como osteopenia, sarcopenia, dores articulares e lesões cutâneas (JOSEPH; WEBER, 2018). Em adição, câncer colorretal é uma condição cujo risco aumenta com a DII (BERNSTEIN, 2018).

Desta maneira, os tratamentos utilizados para reduzir os efeitos patológicos e sintomáticos da DII são medicamentos anti-inflamatórios e imunossupressores. Por exemplo, aminossalicilatos, antibióticos, glicocorticoides e anticorpos de TNF- α . Casos mais graves e a não responsividade farmacológica pode requerir intervenção cirúrgica como ressecção completa ou parcial do cólon (NEURATH, 2017).

Além disso, tratamentos complementares aos farmacológicos tem sido buscados e o óleo de peixe é um tratamento de grande interesse devido aos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios que possui (SCAIOLI et al., 2017). A princípio, o óleo de peixe pode ser eficiente no tratamento da DII devido aos ácidos graxos do tipo ômega-3 que o compõe: em particular, EPA (eicosapentaenóico, 20:5n-3) e DHA (docosahexaenóico, 22:6n-3). Estes ácidos graxos possuem atividade anti-inflamatória e imunomodulatória, e moléculas produzidas a partir deles atuam ativamente na resolução de processos inflamatórios (CHIANG; SERHAN, 2017). Dada essas funções, despertou-se interesse com o óleo de peixe como tratamento complementar da DII devido ao desbalanço inflamatório e imunológico da DII (SCAIOLI et al., 2017; UNGARO et al., 2017). Além do mais, o metabolismo de ácidos graxos ômega-3 está alterado na DII (PEARL et al., 2014) e também tem sido demonstrado que o maior consumo de ômega-3 diminui a incidência da doença de Crohn (CHAN et al., 2014) e da colite ulcerativa (ANANTHAKRISHNAN et al., 2014). No entanto, estudos com humanos focados na indução da remissão da DII com o óleo de peixe não suportam o uso (SCAIOLI et al., 2017; UNGARO et al., 2017), embora tenha sido demonstrado menor atividade inflamatória em humanos (NIELSEN et al., 2005) e efeitos protetivos em modelos experimentais de colite (IBRAHIM et al., 2011; HUANG et al., 2017). De qualquer forma, independente do consenso do óleo peixe como tratamento complementar da DII, ele é um dos suplementos mais utilizados por pessoas que possuem DII (CHEIFETZ et al., 2017).

Em relação aos dois principais ácidos graxos que compõe o óleo de peixe, o EPA e o DHA fazem parte da família de ácidos graxos ômega-3 (n-3). E ácidos graxos n-3 fazem parte da família dos ácidos graxos polinsaturados (PUFAS). Outros ácidos graxos da família dos PUFAS é o ômega-6 (n-6). Normalmente, n-3 são descritos como agentes de menor atividade inflamatória e n-6 como agentes de maior atividade inflamatória (SCAIOLI et al., 2017). Adicionalmente, EPA e DHA são dois ácidos graxos produzidos a partir do ácido graxo n-3 α -linolênico (18:3n-3). E α -linolênico só pode ser obtido através da alimentação. Assim, quando obtido pelo organismo, sofre modificações químicas de alongases e desaturases, produzindo outros ácidos graxos n-3 (Figura 1) (CALDER, 2017). Desaturases delta 5 e 6 fazem parte desses processos e, curiosamente, mutações em genes que as codificam (FADS 1 e FADS2) aumentam o risco de doença de Crohn (COSTEA et al., 2014).

O EPA é substrato das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase e citocromo P450 e a partir dele são produzidos eicosanoides – tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas (Figura 2). Os eicosanoides produzidos a partir do EPA possuem menor atividade inflamatória se comparada dos eicosanoides produzidos a partir do ácido araquidônico n-6 (20:4n-6). Desta forma, os eicosanoides são produzidos a partir de PUFAS da família n-6 e n-3; a diferença é que eicosanoides originados de n-3 tem menor atividade inflamatória do que os eicosanoides de n-6 (CALDER, 2017). Adicionalmente, maiores razões de n-6/n-3 exacerbam reações inflamatórias e aumentam a grade inflamatória sistêmica, enquanto menores razões de n-6/n-3 abrandam. Destaca-se que o maior consumo nutricional de n-3 e de óleo de peixe estão correlacionados com a melhora de parâmetros da artrite reumatoide e possivelmente da DII e da asma devido a menor grade inflamatória que n-3 produz (CALDER, 2014; SCAIOLI et al., 2017).

Além dos eicosanoides de menor atividade inflamatória produzidos pelo EPA, outros mediadores produzidos principalmente a partir do DHA têm sido descritos (Tabela 1). São as pró-resolvinas: protectinas, resolvinas e maresinas (Figura 2) (CALDER, 2014). As pró-resolvinas regulam a resolução de processos inflamatórios, acelerando a regeneração de tecidos lesionados (SERHAN et al., 2012), modificando fenótipo de macrófagos (DALLI; SERHAN, 2017), reduzindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão em modelos de colite experimental (BENTO et al., 2011). Desta maneira, pró-resolvinas são agentes fundamentais no processo de recuperação da homeostase quebrada pela inflamação (CHIANG; SERHAN, 2017).

Desta forma, nós conduzimos um estudo com o objetivo de verificar se o óleo de peixe poderia prevenir colite intestinal induzida. Escolhemos o modelo de colite quimicamente induzida com TNBS (ácido trinitobenzeno sulfônico). O modelo com TNBS é amplamente utilizado em modelos animais para estudar DII. Este modelo surge, a princípio, com o trabalho do grupo de Morris et al., 1989, cuja colite induzida em diferentes concentrações de TNBS (5, 10, 20 e 30mg) e intervalos de tempos diferentes de análise (24h - 8 semanas), resultou em danos estruturais no epitélio intestinal, causando necrose, infiltração intraepitelial de neutrófilos, granulomas, alta atividade inflamatória e aumento na taxa de mortalidade (MORRIS et al., 1989). O TNBS funciona como um antígeno e consegue ser absorvido epitelialmente com a

administração conjunta de etanol – o etanol aumenta a permeabilidade intestinal, assim, facilitando a absorção de TNBS pelo epitélio (ANTONIOU et al., 2016).

Tem sido demonstrado que a colite causada pelo TNBS envolve fenótipos de linfócitos Th1 e Th17, produzindo grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (e.g. TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-12) (MARTÍNEZ-AUGUSTIN et al., 2008; BRENNNA et al., 2013; ANTONIOU et al., 2016), maior expressão de NF- κ B e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (CHEN et al., 2005) e de proteínas envolvidas na identificação e *clearance* de microorganismos (TLRs 2 e 4) (BRENNNA et al., 2013). Uma análise de *microarray* identificou a expressão de genes relacionados com a DII no modelo de colite experimental com TNBS. Os genes identificados fazem parte de processos inflamatórios, como recrutamento de leucócitos (SCYB1 e IL-1B), degradação de matriz extracelular, de proteção contra patógenos (TIMP1 e MMP9) e citocinas pró-inflamatórias (IKKB) (RIVERA et al., 2006). Outra análise de *microarray* identificou padrões temporais de transcriptoma da colite com TNBS e subsequentemente foi comparado com o transcriptoma da DII. Após 3, 7 e 12 dias da colite com TNBS, obteve-se espécimes do cólon de ratos por meio de biópsia. Os autores encontraram alta relação do transcriptoma da DII com o da colite com TNBS. Assim, identificaram vias celulares com alta relação, como vias da apoptose, da organização das junções celulares, de processos inflamatórios, da interleucina 1, do NF- κ B e da sinalização de TNF (BRENNNA et al., 2013).

Os sinais clínicos da colite com TNBS envolve perda de peso, diarreia e sangramento retal. Além de morfológicamente a inflamação afetar transmuralmente o tubo intestinal (ANTONIOU et al., 2016). Desta forma, a colite com TNBS possui características clínicas, estruturais e patológicas que também são encontradas na DII e por isso é utilizada como modelo animal para estudo da DII.

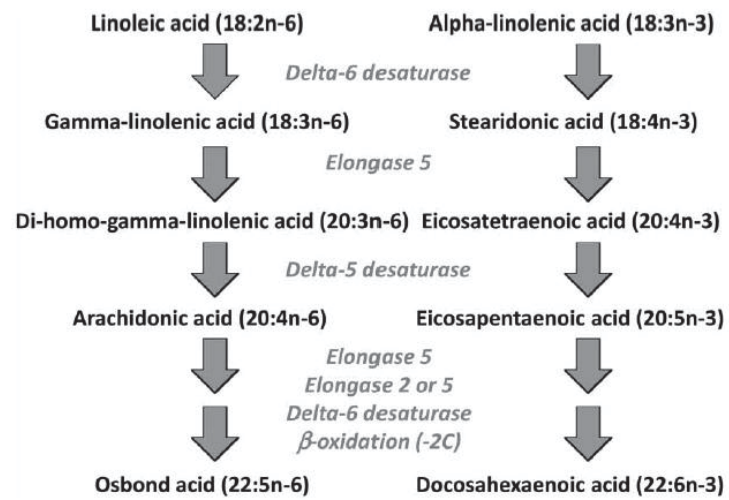


Figura 1. Ácidos graxos sintetizados a partir do n-6 e n-3. Lado esquerdo, n-6. Lado direito, n-3.

FONTE: Calder (2017).

Tabela 1 – Pró-resolvinas produzidas a partir do EPA e DHA

EPA	DHA
Resolvina E1, E2 e E3	Resolvina D1, D2, D3, D4, D5 e D6
	Protectina D1
	Maresina 1

FONTE: Chiang; Serhan (2017).

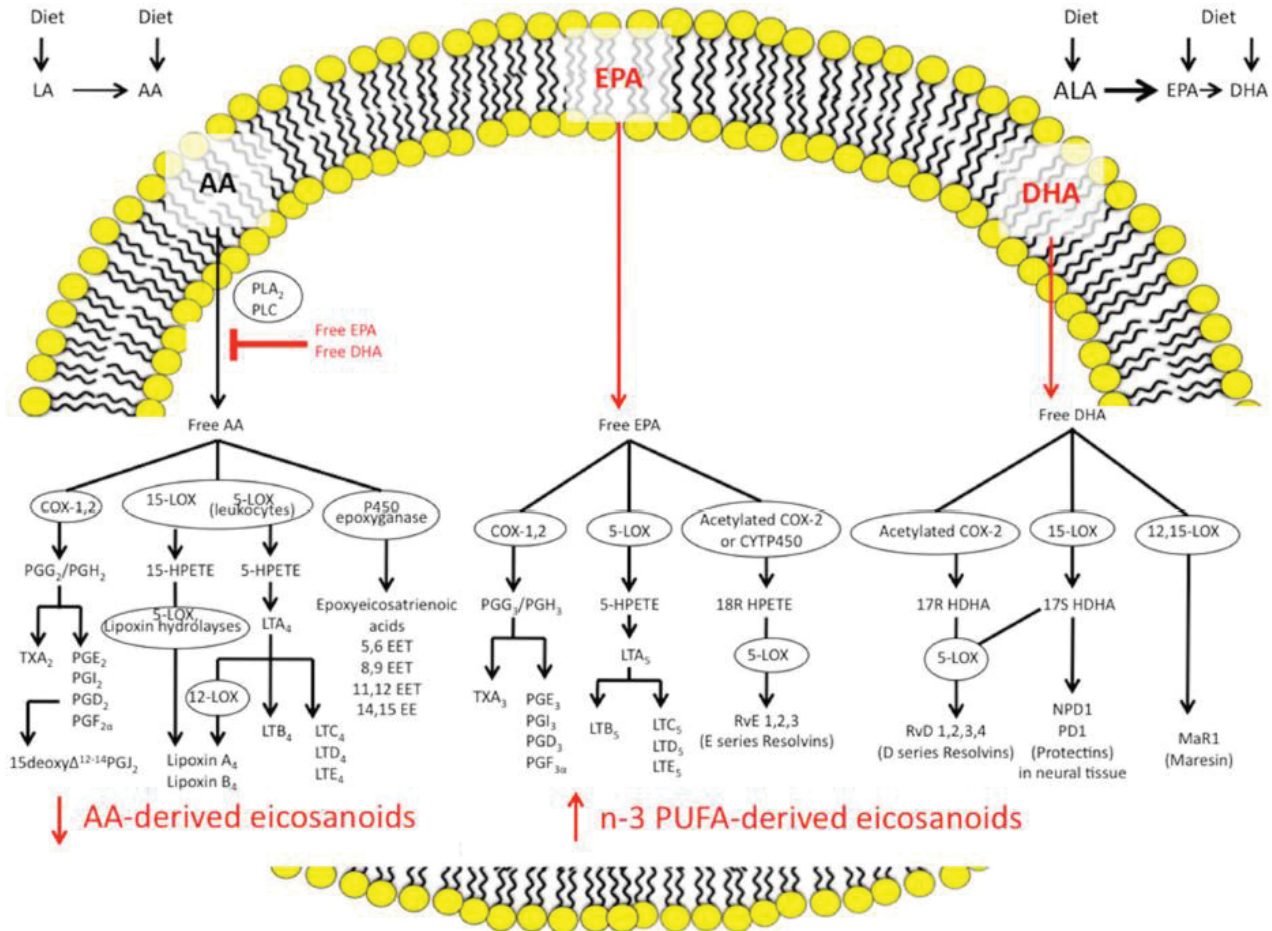


Figura 2. Mediadores sintetizados a partir de n-6 e n-3. A figura mostra que ácidos graxos linolênico (LA), araquidônico (AA), α -linolênico (ALA), EPA e DHA são obtidos da dieta e incorporados na membrana celular. AA, EPA e DHA produzem mediadores distintos. EPA e DHA inibem produção de eicosanoides derivados de AA. Diminuição de eicosanoides derivados do AA e aumento de eicosanoides derivados de n-3 acontecem com tratamento de óleo de peixe. COX, cicloxigenase; CYP450, citocromo P450; DHA, ácido docosahexaenoico; EET, ácido epoxieicosatrienoico; EPA, ácido eicosapentaenoico; HDHA, *dihydroxy-docosahexaenoic acid*; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico; LA, ácido linoleico; LT, leucotrieno; LOX, lipoxigenase; MaR, maresina; NPD1, neuroprotectina D1; PD1, protectina D1; PG, prostaglandina; PLA₂, fosfolipase A₂; PLC, fosfolipase C; PUFA, ácido graxo polinsaturado; RvD, resolvinas série D; RvE, resolvina série E; TX, tromboxano.

FONTE: Scaioli et al. (2017).

2 OBJETIVOS

Verificar se o óleo de peixe previne colite intestinal induzida com TNBS. Também verificamos se o óleo de peixe promove resolução das variáveis analisadas após sete dias de colite com TNBS. Assim, estudamos especificamente as seguintes variáveis:

1. Verificar se o óleo de peixe afeta ganho/perda de massa corporal antes e depois da colite com TNBS;
2. Verificar se o óleo de peixe previne redução da taxa de sobrevivência após colite com TNBS;
3. Verificar atividade da mieloperoxidase na mucosa do cólon após colite com TNBS;
4. Determinar perfil de ácidos graxos no plasma e na mucosa do cólon após colite com TNBS;
5. Verificar conteúdo de muco intestinal marcado histologicamente com AB/PAS após colite com TNBS;
6. Determinar conteúdo de muco nas fezes após colite com TNBS por meio do ensaio de ácido siálico;
7. Verificar estrutura epitelial após colite com TNBS por meio de microscopia eletrônica de transmissão;
8. Determinar permeabilidade intestinal após colite com TNBS por meio do ensaio de FITC-Dextran.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), nº 990. Foram usados ratos machos Wistar (~60 dias de idade). Os animais foram acomodados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em ciclo claro-escuro 12/12 horas, com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais conforme: controle (C), colite com TNBS (TNBS) e colite com TNBS em animais tratados com OP, sendo OP sigla de óleo de peixe (TNBS/OP). A divisão dos grupos é esta: C, TNBS 2 e TNBS/OP 2; C, TNBS 7 e TNBS/OP 7. Os números 2 e 7 representam os dias da eutanásia após a colite com TNBS. Assim, após dois dias de induzir a colite com TNBS, eutanasiamos três grupos (C, TNBS 2 e TNBS/OP 2) e outros três grupos após sete dias de TNBS (C, TNBS 7 e TNBS/OP 7).

A Figura 3 ilustra o modelo experimental. Após recebermos os animais e acomodá-los no biotério, os grupos TNBS/OP 2 e 7 foram tratados diariamente com óleo de peixe. Após 30 dias, foi induzida colite com TNBS. Dois dias e sete dias após a indução da colite, os animais foram eutanasiados e espécimes foram coletados para análise. Os espécimes coletados foram cólon, sangue e conteúdo fecal. O cólon coletado foi limpo com PBS (*phosphate buffered saline*) e sob lupa, separado a mucosa das camadas musculares. A mucosa foi utilizada e as demais partes descartadas. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue, 4.000 x g, 5 minutos, 4°C. Todos os espécimes coletados foram armazenados a -80°C até serem processados. Em adição, o cólon e o conteúdo fecal foram coletados da região visível da inflamação. Quando não havia inflamação aparente, espécimes foram coletados da região medial do cólon.

Após a coleta dos espécimes, os seguintes ensaios foram feitos: (i) evolução da massa corporal ao longo do experimento; (ii) taxa de sobrevivência; (iii) mieloperoxidase (MPO) para verificar atividade inflamatória do tecido intestinal lesionado pela colite; (iv) cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para determinar perfil de ácidos graxos no plasma e no cólon; (v) histologia AB/PAS para visualizar muco intestinal; (vi) ensaio de ácido siálico para determinar muco no

conteúdo fecal; (vii) microscopia eletrônica de transmissão (MET) para visualizar estrutura epitelial do cólon; (viii) ensaio de FITC-Dextran para verificar permeabilidade intestinal.

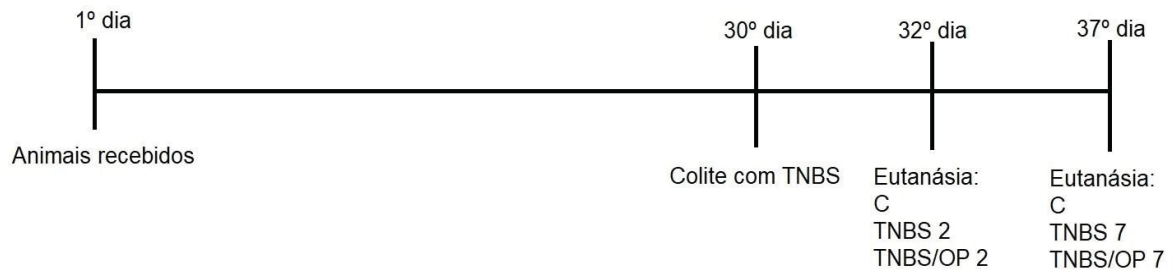


Figura 3. Modelo experimental utilizado. Os animais foram recebidos no primeiro dia e após 30 dias foi induzida colite com TNBS. Após dois e sete dias da colite, foram coletados espécimes para análise. Em adição, grupos tratados com óleo de peixe receberam o tratamento desde o primeiro dia do experimento até a coleta dos espécimes.

3.1 INDUÇÃO DA COLITE COM TNBS

Para induzir a colite com TNBS, seguimos o protocolo de Morris et al., 1989. Desta forma, 15 mg de TNBS foi preparado em uma solução com 50% de etanol para um volume final de 0.6 mL. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e antes da administração da solução de TNBS anestesiados com 50 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina. Após isto, 0.6 mL da solução de TNBS foi administrada com tubo de plástico flexível, inserido intrarectal até 8 cm da margem anal. Após a administração de TNBS os animais ficaram suspensos pela cauda por 30 segundos para evitar retorno da solução. Já animais do grupo controle receberam 0.6 mL de 0.9% de NaCl.

3.2 TRATAMENTO COM ÓLEO DE PEIXE

O tratamento com óleo de peixe em TNBS/OP 2 e TNBS/OP 7 foi feito com auxílio de micropipeta com 2 g/kg/dia de óleo de peixe. O tratamento iniciou 30 dias antes da indução da colite com TNBS e continuou até a coleta dos espécimes.

3.3 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Cinquenta mg de mucosa do cólon foi homogeneizado com 1 mL de 50 mM de tampão fosfato contendo 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio por 3 minutos a 25 Hz. Em seguida, foi centrifugado por 6 minutos, 13.000 x g, 4°C. O sobrenadante foi recuperado e 7 µL foi pipetado em placa de 96 poços e adicionado 200 µL de 0.167 mg/mL de o-Dianisidine com 0.0005% de peróxido de hidrogênio. A placa foi lida a 450 nm por 3 vezes, com intervalo de 30 segundos cada leitura. A MPO foi calculada e cada unidade de MPO representa a quantidade necessária para degradar 1 µmol de peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente. O resultado foi expresso em unidades por massa de tecido, U/mg de tecido (KIM et al., 2012).

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

A mucosa do cólon e o plasma foram usados para determinar o perfil (%) de ácidos graxos utilizando-se HPLC (*high performance liquid chromatography*). Primeiramente, foi feita a extração lipídica utilizando 20 mg de mucosa ou 100 µL de plasma que, em seguida, foram homogeneizados com 1:2 clorofórmio:metanol, centrifugados por 10 minutos, 5000 x g, e coletado o sobrenadante. No sobrenadante foi adicionado 480 µL de clorofórmio e 410 µL de água destilada, e em seguida foi homogeneizado manualmente. Após isto, foi adicionado 1 mL de Folch suplementada, por 3 vezes. Por fim, a solução foi evaporada com nitrogênio gasoso, restando gotas lipídicas aderidas ao tubo usado (FOLCH et al., 1956).

A etapa seguinte foi a saponificação que seguiu homogeneizando os tubos anteriores com 100 µL de metanol e NaOH 0,5 M. Os tubos foram deixados em banho maria por 2 horas, 37°C. Depois foram adicionados 1.5 mL de HCl 1 M e 1 mL de hexano, homogeneizados, o sobrenadante com hexano foi coletado em novo tubo, adicionado novamente 1 mL de hexano e coletado por mais 2 vezes. O hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e com este procedimento foram obtido ácidos graxos livres que ficaram aderidos no tubo usado (BEYER; JENSEN, 1989; NISHIYAMA-NARUKE, et al., 1998).

Finalmente, foi feita a derivatização com 200 μ L de acetonitrila, solução A (Bromometil-Metóxi-Coumarin e acetonitrila) e solução B (18-cron-6-eter e acetonitrila) (ABUSHUFA et al., 1994). O conteúdo foi transferido para tubos de injeção e lido no cromatógrafo líquido de alta eficiência da Central Analítica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.

3.5 ENSAIO DE ÁCIDO SIÁLICO

Vinte mg de conteúdo fecal desidratado foi homogeneizado com 40 mM de ácido periódico e mantido por 20 minutos a 4°C. Depois foi homogeneizado com 0.6% de resorcinol contendo 28% de HCl e 25 μ mol de sulfato de cobre a 100°C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 2-metil-2-propanol e homogeneizado por 3 minutos a 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, 1500 rpm, e lidas a 630 nm. Uma curva padrão com concentração crescente de *N-acetyl-d-mannosamine* (0.012-20 μ mol) foi feita para calcular a concentração de ácido siálico das amostras (JOURDIAN et al., 1971).

3.6 HISTOLOGIA

Peças do cólon foram preparadas para serem coradas com AB/PAS (*Alcian Blue e Periodic Acid Schiff*). Inicialmente foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas por 2 horas com 4% de paraformaldeído. Removidas do fixador e colocadas em 30% de sacarose, 4°C, por 24 horas. Então, emblocadas com *optimum cutting temperature* (OCT) e cortadas transversalmente a 7 μ m no criostato. Os cortes aderidos em lâminas com 2% de gelatina foram hidratados e incubados por 15 minutos com Alcian Blue, lavados, incubados com 0.5% de ácido periódico por 5 minutos, lavados, incubados com reativo de Schiff por 20 minutos, lavados e desidratados. Finalmente, as lâminas foram montadas com entelan e observadas no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com o microscópio Olympus BX51 ou Scanner de Lâminas Zeiss.

Imagens obtidas do Scanner de Lâminas Zeiss, 200x ampliadas, foram usadas para determinar a área positiva de AB/PAS nas criptas do cólon,

representando a área de muco marcado – o dado foi expresso como a porcentagem da área positiva de AB/PAS em relação a área total selecionada. O método completo é descrito no Apêndice 1.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A mucosa do cólon foi usada para MET. Fixada por 2 horas em Karnovsky (2% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído e tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2), em seguida lavada com cacodilato 0,1M, pH 7.2, pós-fixada com 2% de tetróxido de ósmio em cacodilato 0,1M, pH 7.2, durante uma hora. Contrastada em blocos com 2% de acetato de uranila durante 2 horas. Desidratada em série alcoólica crescente e em seguida colocada em acetona. A impregnação e inclusão ocorreu com resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrótomo Sorval Porter Blum MT-2 com navalhas de vidro e de diamante. Por fim, os cortes ultrafinos foram contrastados em solução aquosa de 2% de acetato de uranila (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). O material foi então observado no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.8 ENSAIO DE FITC-DEXTRAN

Os animais foram mantidos por duas horas em jejum e tratados com 4 mg de FITC-Dextran. Após seis horas da administração de FITC-Dextran, os animais foram eutanasiados e o plasma obtido para preparo do ensaio no dia seguinte. Assim, 200 μ L de plasma foi diluído com 200 μ L de PBS, homogeneizado, 150 μ L foi pipetado na placa e lido a 520 nm. Uma curva padrão de FITC-Dextran foi montada (0,034375 – 2,2 μ g/mL) para cálculo da concentração.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos com média e erro padrão da média. Para determinar diferença entre os grupos foi feita ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. O alfa adotado foi de 0.05 e o programa utilizado foi o GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS

4.1 MASSA CORPORAL

A massa corporal de cada animal foi anotada diariamente desde o recebimento dos animais até o dia da eutanásia. Ao final, a média da evolução da massa corporal de cada grupo foi calculada (Figura 4). Não foi encontrado diferença no ganho de massa corporal com o uso de óleo de peixe ($p>0.05$). Após o trigésimo dia houve decréscimo da massa corporal por dois fatores: (i) jejum de 12 horas e (ii) e colite com TNBS.

A Figura 5 mostra a evolução da massa corporal após o trigésimo dia de experimento. Assim, a massa corporal voltou a aumentar a partir do segundo dia após o uso de TNBS em todos os grupos. Contudo, o aumento da massa corporal dos grupos com óleo de peixe (TNBS/OP 2 e TNBS/OP 7) foi mais lento do que os grupos com TNBS (TNBS 2 e TNBS 7).

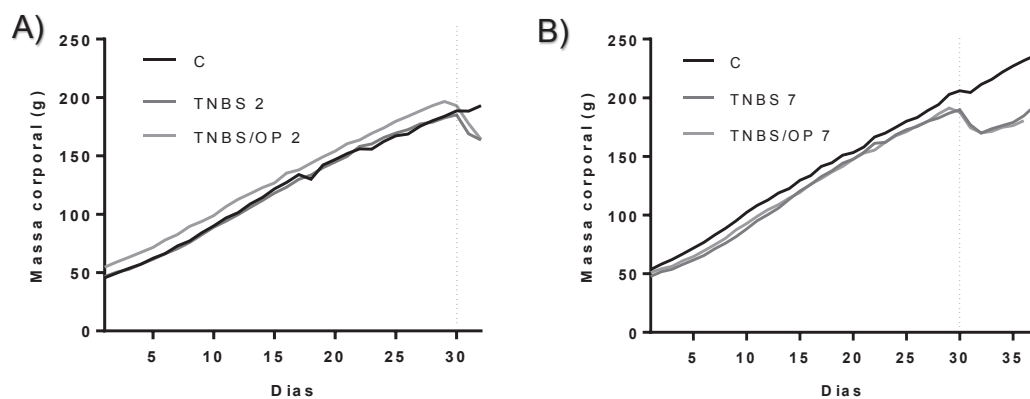


Figura 4. Evolução da massa corporal. A, grupos C, TNBS 2 e TNBS/OP 2. B, grupos C, TNBS 7 e TNBS/OP 7. Dados expressos em média. A linha tracejada representa o dia da colite com TNBS.

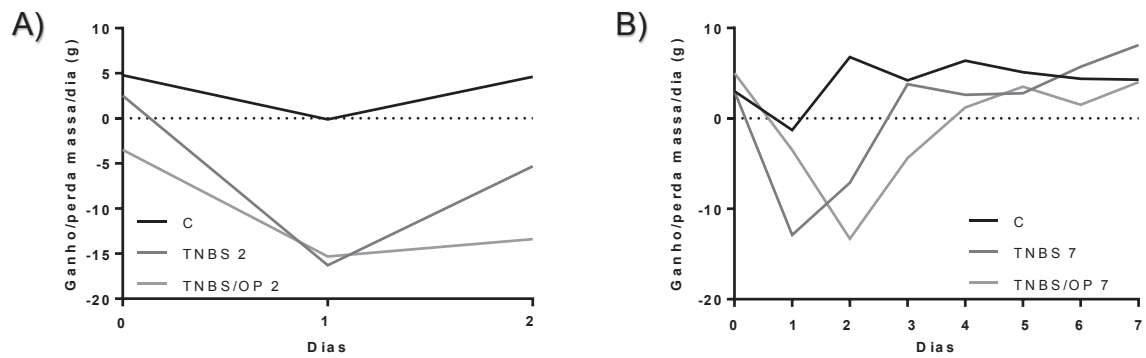


Figura 5. Evolução da massa corporal após dois dias (A) e sete dias (B) da colite com TNBS. Dados expressos em média.

4.2 PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA

Após o trigésimo dia de experimento foi avaliado a porcentagem de sobrevivência (Figura 6). Os animais do grupo controle tiveram 100% de sobrevivência. Por outro lado, a colite com TNBS reduziu a taxa de sobrevivência para 93% e 80% após dois e sete dias da colite com TNBS, respectivamente. O tratamento com óleo de peixe não preveniu a redução da taxa de sobrevivência, contudo, retardou a taxa de mortalidade. Ou seja, a mortalidade no grupo TNBS 7 iniciou no primeiro e segundo dia após a colite com TNBS enquanto no grupo TNBS/OP 7 iniciou no terceiro e sexto dia (Figura 6B).

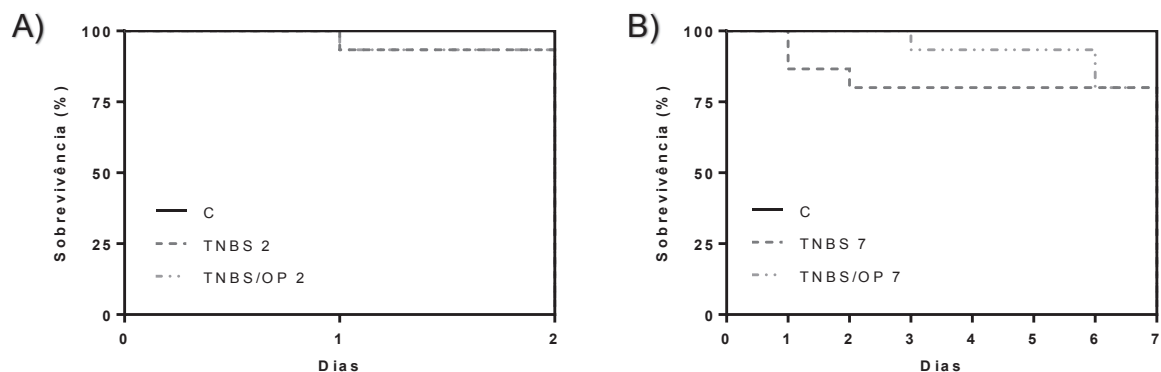


Figura 6. Taxa de sobrevivência após dois dias (A) e sete dias (B) da colite com TNBS.

4.3 MIELOPEROXIDASE (MPO)

Em modelos animais de colite experimental, a MPO é um dos marcadores comumente utilizados para verificar a atividade inflamatória no tecido inflamado, pois indica a infiltração de neutrófilos no tecido (KRAWISZ et al., 1984; KIM et al., 2012). Nossos resultados mostram que a colite com TNBS aumentou a atividade da MPO e os animais tratados com óleo de peixe tiveram menor atividade de MPO (Figura 7).

Após dois dias da colite com TNBS, a atividade da MPO aumentou cerca de 37.5 vezes se comparada com a atividade da MPO no grupo controle (C x TNBS 2, $p < 0.0001$). Sete dias depois da colite a atividade da MPO aumentou 51.5 vezes (C x TNBS 7, $p < 0.0001$). Os grupos tratados com óleo de peixe também tiveram aumento na atividade da MPO, porém, tiveram um aumento menor se comparado com os grupos TNBS 2 e 7 ($p < 0.05$). Assim, a atividade da MPO nos grupos TNBS/OP 2 e TNBS/OP 7 foi de, respectivamente, 24 e 10 vezes maior se comparada com a atividade da MPO no grupo controle. Adicionalmente, não foi encontrado diferença estatística do grupo TNBS/OP 7 com o grupo controle ($p = 0.16$). Além do mais, houve redução da atividade da MPO no grupo tratado com óleo de peixe após sete dias da colite com TNBS, diferentemente do grupo sem óleo de peixe (TNBS 7), no qual a atividade da MPO aumentou.

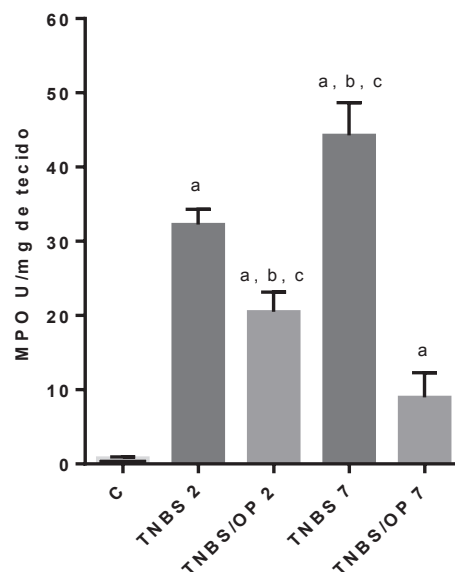


Figura 7. Atividade da mieloperoxidase da mucosa do cólon. Dados expressos em média e erro padrão da média. a – $p < 0.0001$ x C; b – $p < 0.05$ x TNBS 2; c – $p < 0.05$ x TNBS/OP 7.

4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

A Figura 8 apresenta a porcentagem de EPA e DHA no plasma e na mucosa do cólon, já a Tabela 2 apresenta a razão de n-6/n-3 dos mesmos tecidos. Assim, maiores porcentagens de EPA e DHA foram encontrados nos grupos tratados com óleo de peixe (TNBS/OP 2 e 7), indicando incorporação dos ácidos graxos no plasma e na mucosa (Figura 8). Também foi encontrado menor razão de n-6/n-3 com o tratamento de óleo de peixe (Tabela 2).

Houve maior utilização de EPA e DHA pela mucosa aos dois dias de colite nos animais tratados com óleo de peixe. Sobre o DHA: a quantidade na mucosa é 1.73 vezes maior aos dois dias em relação aos sete dias; já no plasma o quadro é o oposto, sendo 1.83 vezes maior aos sete dias em comparação aos dois dias (Figura 8A). Quanto ao EPA: a quantidade na mucosa é 1.43 vezes maior aos dois dias em relação aos sete dias, porém, no plasma é apenas 8% diferente (Figura 8B). Todas essas comparações não são estatisticamente significativas, $p < 0.05$, mas fisiologicamente são, pois, a maior quantidade de EPA e DHA na mucosa aos dois dias de colite é indicativo de maior utilização dos ácidos graxos pelo tecido (HILLIER et al., 1991; PEARL et al., 2014), além da quantidade no plasma ser inferior – ou seja, há menos EPA e DHA circulante e mais EPA e DHA no tecido com inflamação, no caso, a mucosa do cólon. Aos sete dias o quadro inverte, a circulação dos ácidos graxos aumenta e diminui no tecido inflamado. EPA e DHA são ácidos graxos que aumentam de concentração no tecido inflamado (PEARL et al., 2014). Desta forma, a quantidade de EPA e DHA foi maior aos dois dias de colite, bem como maior atividade de MPO foi encontrada, já aos sete dias de colite houve redução da atividade da MPO e da quantidade de EPA e DHA na mucosa do cólon.

Além de EPA e DHA, outros ácidos graxos tiveram alteração no seu perfil (Apêndice 2). Na mucosa, dois dias após colite com TNBS, houve redução do ácido oleico, ômega-9, em TNBS e TNBS/OP 2, e aumento do ácido linoleico, ômega-6, somente em TNBS 2. Após sete dias, os valores foram restaurados para a média do controle. Os demais ácidos graxos analisados não tiveram seu perfil alterado com TNBS ou óleo de peixe.

Em relação a razão de n-6/n-3, ácidos graxos da família ômega-6/ácidos graxos da família ômega-3 (Tabela 2). Nossos resultados mostram menor razão de n-6/n-3 na mucosa e no plasma dos grupos com óleo de peixe. Além disto, menor razão foi encontrada aos dois dias de colite na mucosa e maior razão aos sete dias. No plasma foi encontrado o oposto: maior razão aos dois dias e menor razão aos sete dias. Os resultados indicam maior utilização e incorporação na mucosa de n-3 aos dois dias de colite e menor utilização aos sete dias, tendo o grupo TNBS/OP utilizado maior quantidade dada as menores razões encontradas.

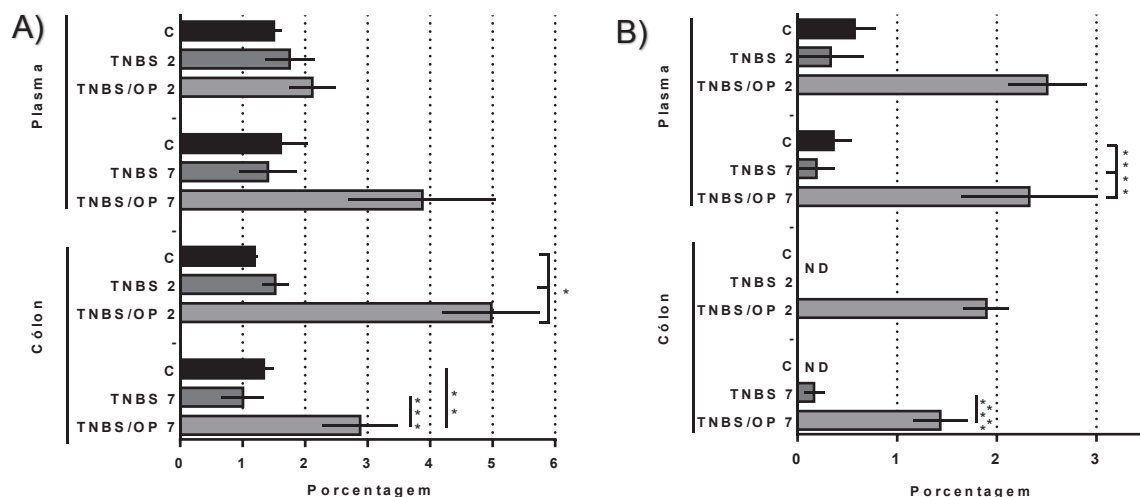


Figura 8. Quantidade (%) de DHA (A) e EPA (B) no plasma e na mucosa do cólon. Dados expressos como média e erro padrão da média, analisados com Anova de uma via e pós teste de Tukey, * $p=0.003$; ** $p=0.02$; *** $p=0.04$; **** $p=0.01$; ***** $p=0.005$. ND, não detectado.

	Cólón	Plasma
C	27:1	20:1
TNBS 2	24:1	23:1
TNBS/OP 2	5:1*	9:1*
C	26:1	20:1
TNBS 7	29:1	20:1
TNBS/OP 7	9:1*	8:1*

Razão de n-6/n-3 no plasma e na mucosa do cólon. n-6 inclui os ácidos graxos: araquidônico e linoleico. n-3 inclui os ácidos graxos: alfa-linolênico, EPA e DHA. * $p<0.05$ vs C e TNBS.

4.5 HISTOLOGIA

Usamos AB/PAS para visualizar o muco das criptas intestinais. Durante o procedimento, glicoproteínas ácidas são marcadas predominantemente com AB, cor azul, enquanto as remanescentes com PAS, cor magenta, ou quimicamente bloqueadas e não reagem subsequentemente. As glicoproteínas neutras são marcadas com PAS. Assim, o método permite visualizar glicoproteínas ácidas e neutras que fazem parte do muco intestinal (MOWRY, 1963; YAMABAYASHI, 1987). A combinação de AB/PAS é normalmente usada em modelos animais de colite experimental (PERIASAMY et al., 2012; NOWARSKI et al., 2015) e subsequentemente quantificada a área positiva marcada (NONOSE et al., 2009).

A Figura 9 mostra um caso representativo do grupo controle. O epitélio está mais preservado, não há erosão, e criptas com marcação positiva de AB/PAS são observadas. Já a colite com TNBS reduziu o conteúdo de muco marcado com AB/PAS (Figura 10). Após dois dias da colite com TNBS houve desestruturação e erosão epitelial. Embora as criptas tenham sido parcialmente preservadas, houve redução de área positiva de AB/PAS – em TNBS 2 é possível notar algumas criptas marcadas com AB/PAS (Figura 10C) e nenhuma em TNBS/OP 2.

Aos sete dias de colite houve reestruturação epitelial, com melhor preservação de criptas e de conteúdo marcado com AB/PAS, tanto em TNBS 7 quanto nos tratados com óleo de peixe, TNBS/OP 7 (Figura 11). Entretanto, o epitélio não foi recuperado completamente, pois haviam regiões com erosão e conseqüente falta de marcação positiva de AB/PAS. Estas regiões possuíam a mucosa sem criptas e logo em contato com o lúmen, diferente do que foi observado em dois dias de colite, pois em dois dias havia relativa preservação de criptas. Em adição, próximo a essas regiões haviam criptas preservadas com pouca marcação positiva de AB/PAS, enquanto criptas mais distantes possuíam mais marcação positiva.

Em seguida fizemos a quantificação da área positiva de AB/PAS (Figura 12). Encontramos diminuição da área positiva após dois dias de colite, $p=0.001$. A média dos grupos TNBS 2 e TNBS/OP 2 é de cerca de 1% da área positiva enquanto a área do grupo controle é de cerca de 25%. Após sete dias de colite houve aumento da área positiva, com maior média do grupo TNBS/OP 7, 18.4%, contra 6.8% do grupo TNBS

7, $p < 0.05$. Adicionalmente, a área do grupo tratado com óleo de peixe aumentou 10.6 vezes após sete dias da colite, $p < 0.0001$. Diferente do grupo sem óleo de peixe, TNBS 7, na qual a área positiva aumentou 5.6 vezes, $p < 0.05$.

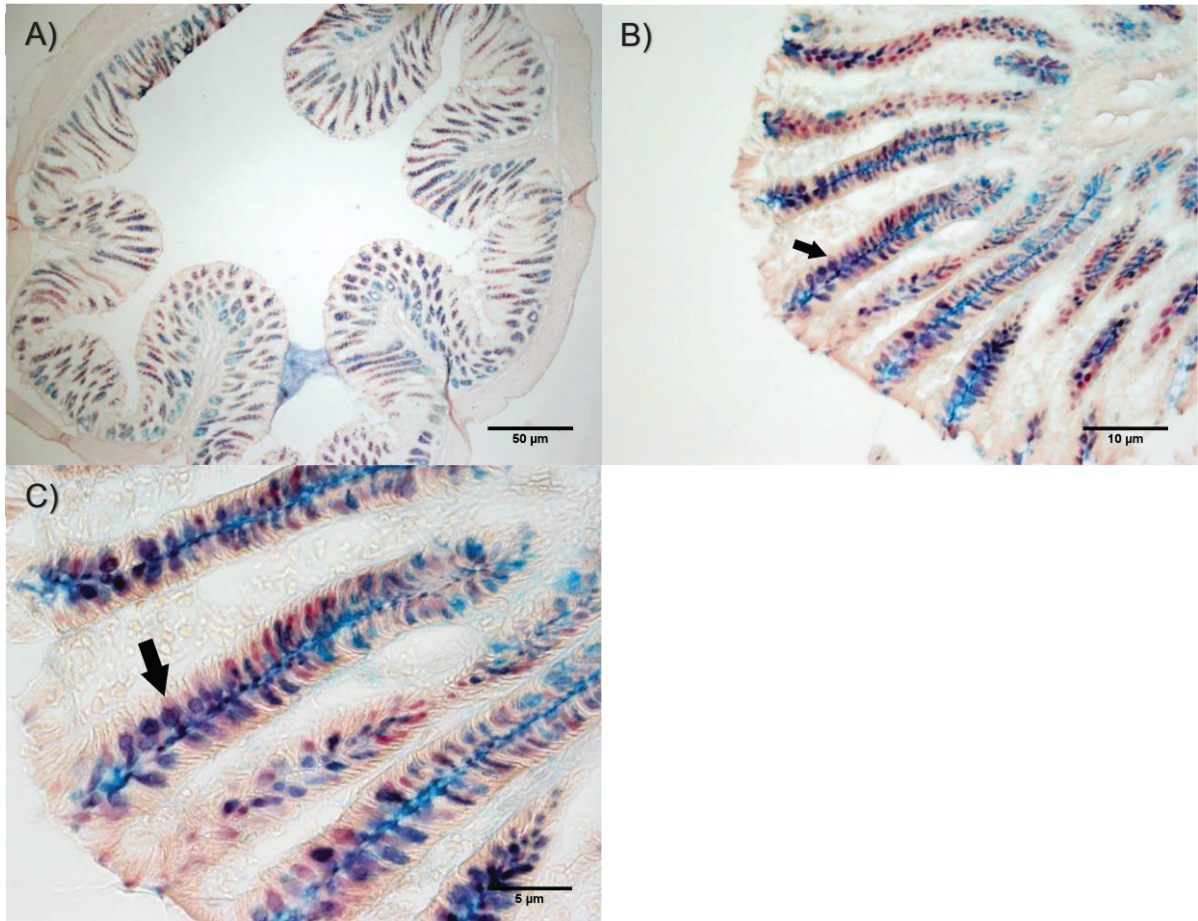
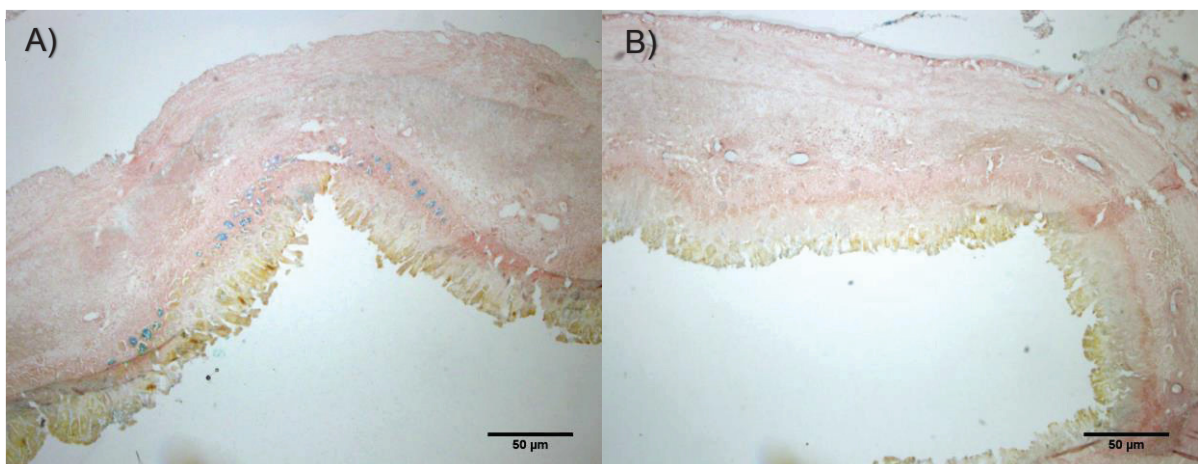


Figura 9. Histologia do epitélio do grupo controle. A: 40x ampliação. B: 200x ampliação. C: 400x ampliação. Seta preta: cripta com muco.



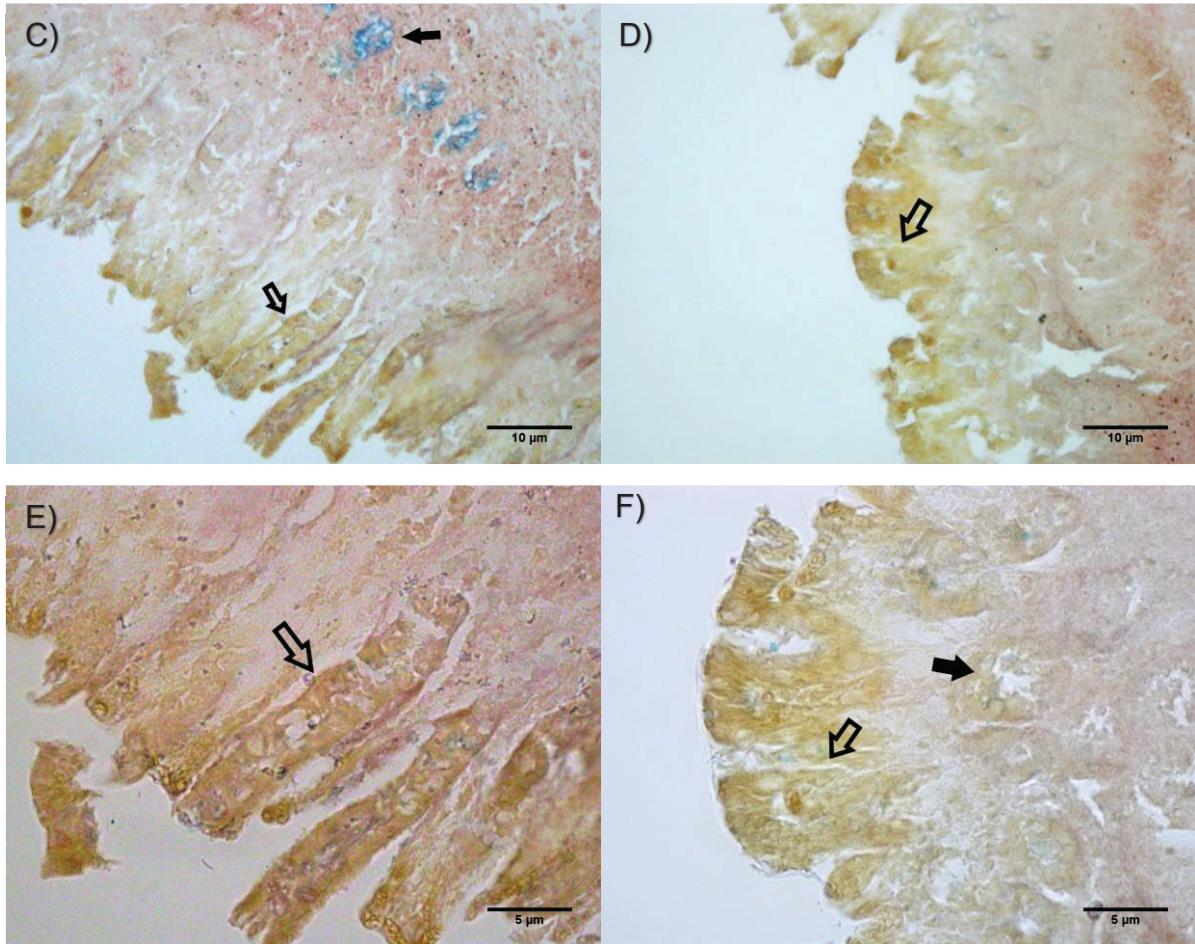
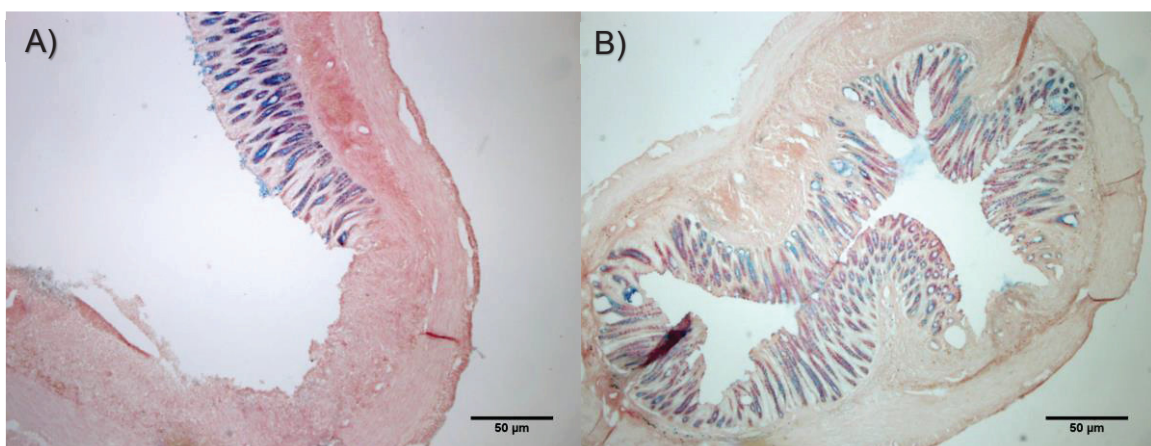


Figura 10. Histologia do epitélio após dois dias de colite com TNBS. A, C, E: TNBS 2 (lado esquerdo). B, D, F: TNBS/OP 2 (lado direito) A, B: 40x ampliação. C, D: 200x ampliação. E, F: 400x ampliação. Seta preta: cripta em corte transversal, repare na presença de muco na figura C. Seta preta não preenchida: cripta em corte longitudinal.



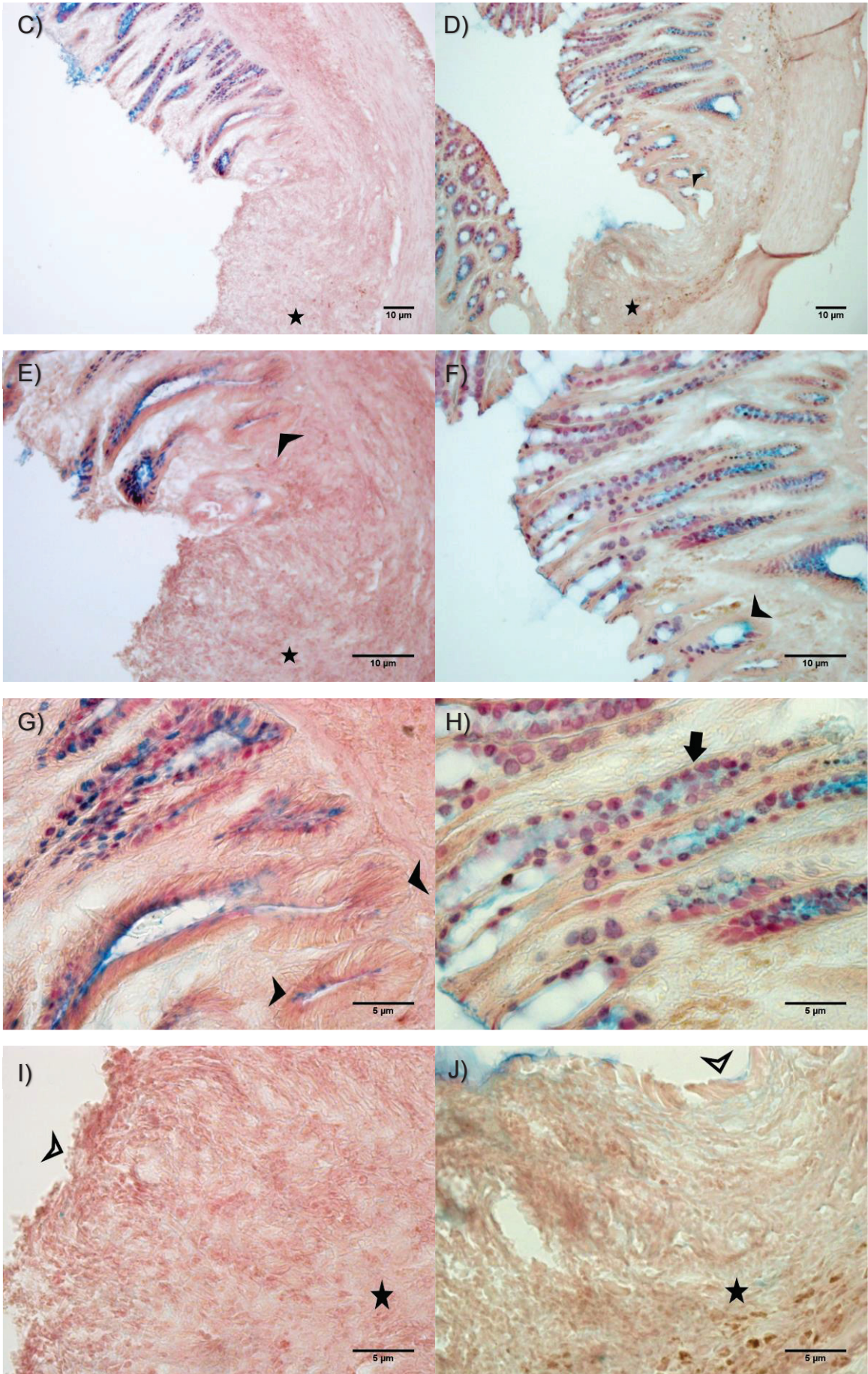


Figura 11. Histologia do epitélio após sete dias de colite com TNBS. A, C, E, G, I: TNBS 7 (lado esquerdo). B, D, F, H, J: TNBS/OP 7 (lado direito). A, B: 40x ampliação. C, D: 100x ampliação. E, F: 200x ampliação. G, H, I, J: 400x ampliação. Estrela preta: área com erosão. Seta pequena: cripta parcialmente corada. Seta grande: cripta com muco. Seta pequena não preenchida: contato da mucosa com o lúmen sem criptas visíveis.

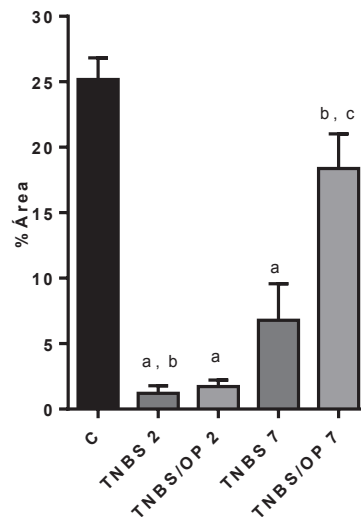


Figura 12. Quantificação da área positiva de AB/PAS. Dados expressos em média e erro padrão da média. a – $p < 0.001$ x C; b – $p < 0.05$ x TNBS 7; c – $p < 0.0001$ x TNBS/OP 2.

4.6 ÁCIDO SIÁLICO

O ácido siálico é um monossacarídeo que compõe a estrutura das mucinas. Desta forma, faz parte do muco presente nas criptas e também no lúmen (DHANISHA et al., 2018). Outros autores demonstraram diminuição de ácido siálico no tecido de pessoas com colite ulcerativa (CULLING et al., 1979). Aqui nós determinamos a concentração de ácido siálico no conteúdo fecal após colite com TNBS.

Sendo assim, a concentração de ácido siálico no conteúdo fecal diminuiu após a colite com TNBS (Figura 13). Mesmo após sete dias da colite com TNBS não houve aumento significativo de ácido siálico, $p > 0.05$. Embora tenha aumentado 0.01 $\mu\text{mol/mL}$ no grupo TNBS/OP 7, o tratamento com óleo de peixe não promoveu aumento significativo de ácido siálico ($p = 0.24$ x TNBS/OP 2).

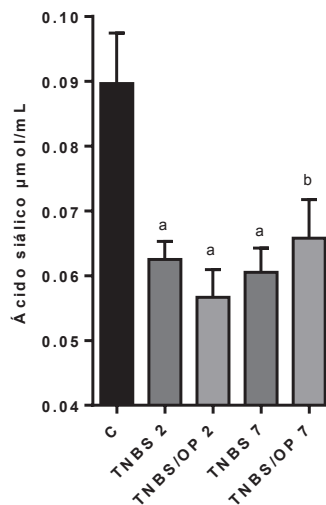


Figura 13. Concentração de ácido siálico no conteúdo fecal. Dados expressos em média e erro padrão da média. a – $p < 0.01$ x C; b – $p < 0.05$ x C.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A microscopia eletrônica representativa de um caso controle é apresentada na Figura 14. Encontramos um epitélio bem preservado, com muitas mitocôndrias nas células caliciformes e colonócitos. Além do mais, é possível observar muco no lúmen e dentro de células caliciformes. Microvilosidades em planos transversal e longitudinal também são vistas, bem como as três junções celulares bem preservadas: junções de oclusão, aderência e desmossomo. Por fim, pouca vacuolização foi encontrada.

A colite com TNBS danificou a arquitetura epitelial, causando necrose celular. Após dois dias de colite, em TNBS/OP 2, houve destruição epitelial, sem a preservação de organelas, por exemplo, mitocôndrias. Além de diminuir microvilosidades; aumentar o espaço intercelular, não preservando as junções celulares; e depletar muco luminal (Figura 15). Após sete dias, TNBS/OP 7, houve melhor preservação epitelial, com preservação de microvilosidades, de células caliciformes com muco intracelular e das junções celulares (Figura 16). No entanto, o tecido é mais vacuolizado que o caso controle. Também foram encontradas bactérias próximas do epitélio (Figura 17). Em TNBS 2 não foi encontrado epitélio a não ser a camada submucosa. Na figura é possível observar fibras de colágeno e elastina. O resultado é produto do plano de corte errado (Figura 18). Em TNBS 7 a destruição do tecido é mais grave que TNBS/OP, pois há uma grande quantidade de debris celular,

células em necrose e infiltrado de bactérias. Este infiltrado bacteriano alcançou a submucosa (Figura 19). O resultado indica um caso extremo ou área de erosão conforme o resultado histológico. Desta forma, TNBS 2 e 7 não servem como parâmetros de comparação.

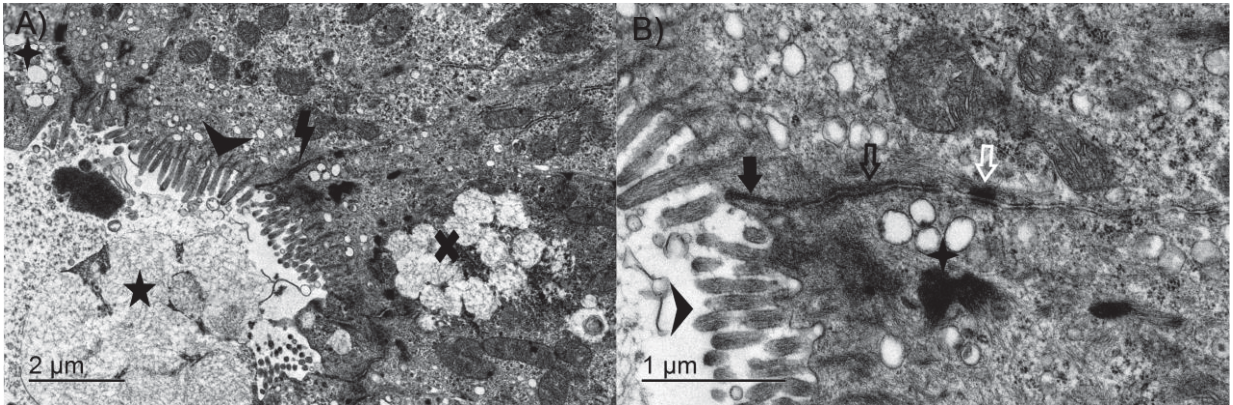


Figura 14. MET do epitélio do grupo controle, em que se destaca epitélio preservado, muitas mitocôndrias nas células caliciformes e colonócitos, com muco no lúmen e no interior das células caliciformes e pouca vacuolização. Estrela 4 pontos: vacúolos; estrela 5 pontos: muco luminal; cruz: muco intracelular; seta preta pequena: microvilosidades; raio: junções celulares; seta preta grande: junção de oclusão; seta preta sem preenchimento: junção de adesão; seta branca: desmossomo.

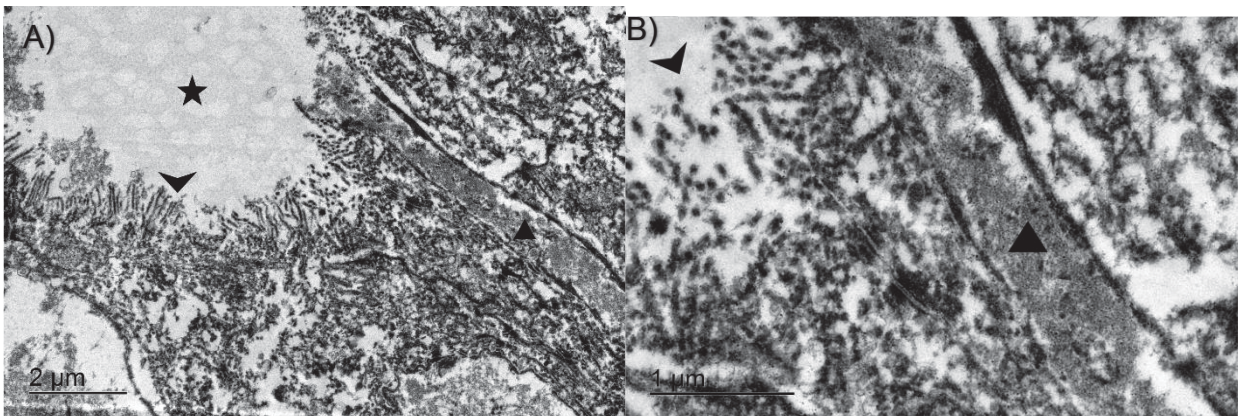


Figura 15. MET do epitélio após dois dias da colite com TNBS em animais tratados com óleo de peixe (TNBS/OP 2). Destaca-se dano na arquitetura epitelial e necrose celular. Estrela 5 pontos: lúmen; seta preta pequena: microvilosidades; triângulo preto, espaço intercelular.

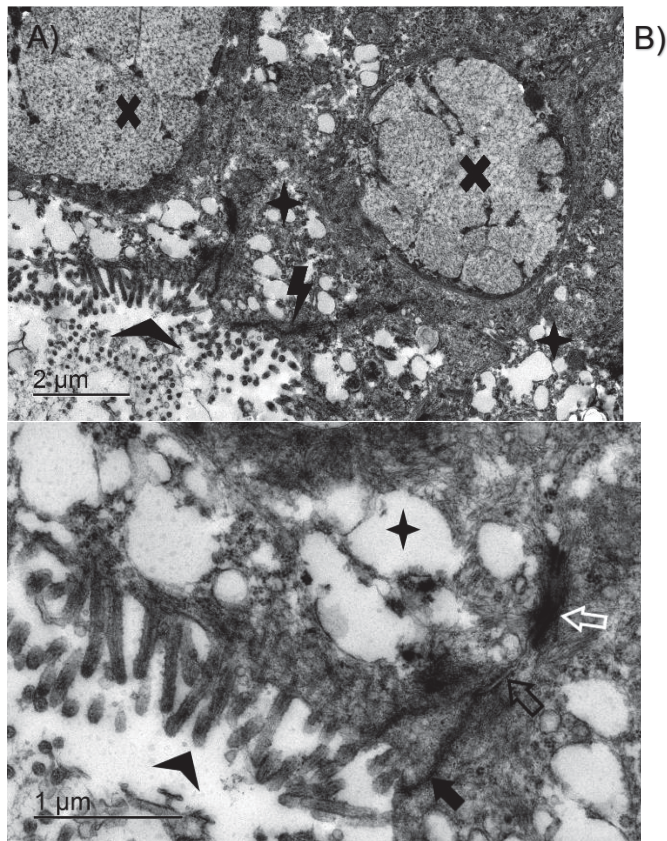


Figura 16. MET do epitélio após sete dias da colite com TNBS em animais tratados com óleo de peixe (TNBS/OP 7). Destaca-se melhor preservação de microvilosidades, de células caliciformes com muco intracelular e das junções celulares. Estrela 4 pontos: vacúolos; cruz: muco intracelular; seta preta pequena: microvilosidades; raio: junções celulares; seta preta grande: junção de oclusão; seta preta sem preenchimento: junção de adesão; seta branca: desmossomo.

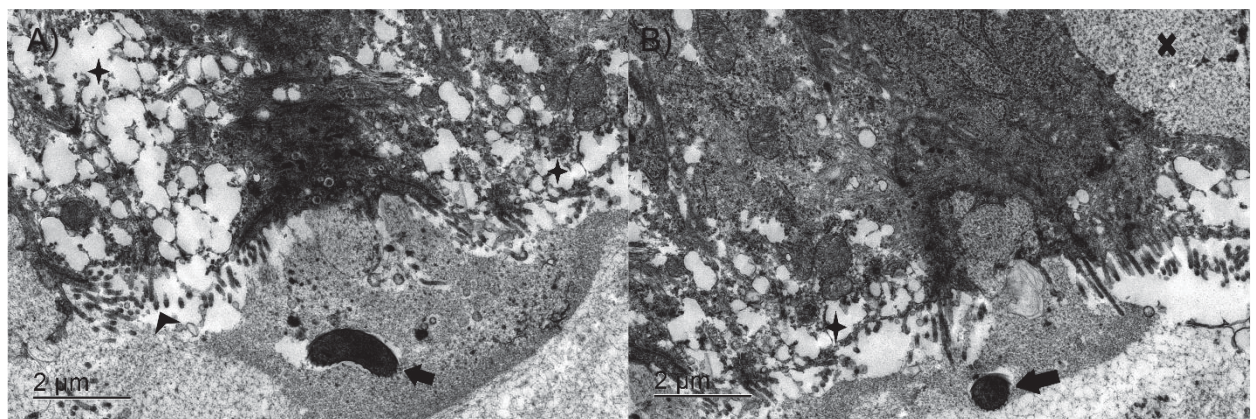


Figura 17. MET do epitélio após sete dias da colite com TNBS em animais tratados com óleo de peixe (TNBS/OP 7). Destaca-se vacúolos e presença de bactérias. Estrela 4 pontos: vacúolos; cruz: muco intracelular; seta preta pequena: microvilosidades; seta preta grande: bactéria.

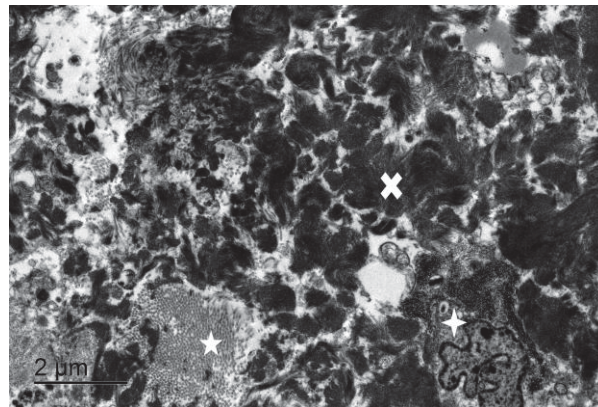


Figura 18. MET do epitélio após dois dias da colite com TNBS (TNBS 2). Destaca-se ausência de epitélio, porém presença da região submucosa. Estrela branca 5 pontos: colágeno; cruz branca: elastina; estrela 4 pontos: linfócito.

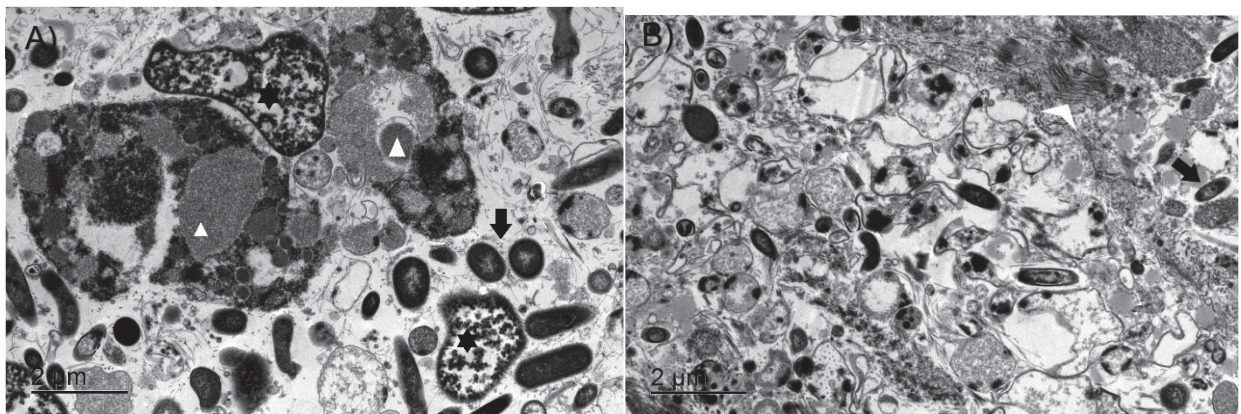


Figura 19. MET do epitélio após sete dias da colite com TNBS (TNBS 7). Destaca-se grande destruição tecidual, muitos debrís, necrose e infiltrado de bactérias na mucosa e submucosa. Triângulo branco: célula necrótica; estrela 6 pontos: debrí celular; seta preta: bactéria; seta branca: região lâmina própria.

4.8 FITC-DEXTRAN

FITC-Dextran é um ensaio usado para determinar permeabilidade e integridade intestinal. Valores elevados representam aumento de permeabilidade intestinal e perda de integridade intestinal já que FITC-Dextran normalmente não é absorvido em grandes quantidades (VOLYNETS et al., 2015).

Nossos resultados mostram que a colite com TNBS aumentou a concentração plasmática de FITC-Dextran e o óleo de peixe não preveniu este aumento. Após dois

dias da colite com TNBS, houve aumento de cerca de 8 vezes na concentração de FITC-Dextran. Após sete dias da colite com TNBS houve redução de 1.3 vezes de FITC-Dextran em TNBS/OP 7, porém, a concentração de FITC-Dextran manteve-se elevada em 6.5 vezes a mais do que a concentração do grupo controle. Assim, os resultados indicam que havia alta permeabilidade intestinal, mesmo havendo recuperação da arquitetura mucosa e diminuição da atividade de MPO no grupo tratado com óleo de peixe.

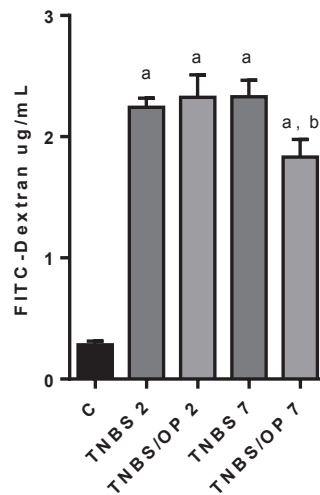


Figura 20. Ensaio de permeabilidade e integridade intestinal determinado por FITC-Dextran. Dados expressos em média e erro padrão da média. a – $p < 0.0001$ x C; b – $p < 0.05$ x TNBS 7.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo o óleo de peixe promoveu a recuperação da mucosa intestinal após colite com TNBS. Aos dois dias de colite o óleo de peixe não protegeu a mucosa da colite, porém, aos sete dias de colite houve recuperação da mucosa com o óleo de peixe. Possivelmente a recuperação se deu por maior incorporação de EPA e DHA na mucosa nos primeiros dias de colite que resultou em menor inflamação no final do experimento.

Nossos resultados mostram menor atividade da MPO. A MPO é um dos marcadores de inflamação intestinal, pois indica a atividade inflamatória do tecido. Ela é comumente utilizada em modelos experimentais de colite (KRAWISZ et al., 1984; KIM et al., 2012) e há perspectiva de uso clínico em humanos (HANSBERRY et al., 2017). MPO é uma proteína liberada predominantemente por neutrófilos durante o processo de degranulação. E com a inflamação intestinal há mobilização de neutrófilos da circulação para o tecido inflamado, aumentando o número de neutrófilos e consequentemente a expressão, concentração e atividade da MPO. Além do mais, a MPO forma espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas ao reagir com peróxido de hidrogênio e tirosina, como ácido hipocloroso e radical tirosil, respectivamente (HANSBERRY et al., 2017). Desta forma, a atividade da MPO aumenta após a colite com TNBS (SZALAI et al., 2014; DONG et al., 2017), porém reduz com o uso de óleo de peixe, conforme demonstramos.

A maior atividade inflamatória intestinal está associada com diminuição do conteúdo de muco intestinal (DHARMANI et al., 2011; LENNON et al., 2014). Conforme a inflamação avança com aumento de MPO, há diminuição da expressão e síntese de Muc2 – principal proteína que compõe o muco. Estas observações são intensificadas quando há erosão epitelial (DHARMANI et al., 2011). Em adição, modelos knockout de Muc2 $-/-$ não produzem muco e desenvolvem colite espontaneamente (VAN DER SLUIS et al., 2006), além de que mutações em Muc2 também causam colite espontânea (HEAZLEWOOD et al., 2008). No entanto, nem toda inflamação intestinal possui redução de muco. Em humanos é observado redução na colite ulcerativa, enquanto há aumento no conteúdo de muco na doença de Crohn (GERSEMANN et al., 2009; DOROFYEV et al., 2013). Embora tenha aumento na doença de Crohn, a função está prejudicada e há maior passagem de

microorganismos pela camada de muco (SWIDSINSKI et al., 2009). Adicionalmente, modelos knockout de IL 10^{-/-} possuem espessamento da camada de muco, porém, o muco por estar funcionalmente comprometido permite que microorganismos atravessem-no e tenham contato com o epitélio (JOHANSSON et al., 2014). Desta forma, muco é um fator importante para a função intestinal e funciona como uma barreira contra microorganismos luminais, sendo que a redução ou comprometimento de função do muco agrava a inflamação do tecido (SUN et al., 2016). Nossos resultados mostram que aos dois dias de colite com TNBS a inflamação é maior, assim como o conteúdo de muco sofre maior redução devido as áreas de erosões causadas pela inflamação e consequente diminuição de marcação positiva de AB/PAS. Desta maneira, o conteúdo de muco intestinal foi comprometido com a colite e o óleo de peixe não preveniu esta situação.

Sob microscopia eletrônica não encontramos muco revestindo o epitélio aos dois dias de colite com TNBS, as células estavam desestruturadas e com aumento de espaço intercelular. Aos sete dias houve recuperação. Muco revestindo o epitélio foi encontrado, bem como bactérias próximas do epitélio. Normalmente há bactérias aderidas no epitélio (BENTLEY-HEWITT et al., 2017), mas por conta da perda de barreira do muco na inflamação intestinal, bactérias patogênicas podem aderir no epitélio e exacerbar a inflamação (LENNON et al., 2014). Infelizmente nossos resultados não identificam as espécies de bactérias que encontramos. Por outro lado, sugerimos que provavelmente a função de barreira do muco e principalmente do epitélio continuavam comprometidas devido a concentração de FITC-Dextran se manter elevada.

Quando quantificamos a área positiva de AB/PAS, observamos a mesma tendência da MPO, isto é, redução de área positiva aos dois dias de colite, bem como alta atividade da MPO, e maior aumento de área positiva e menor atividade de MPO em TNBS/OP 7, além da diferença estatística com TNBS/OP 2 e da falta de diferença com o grupo controle; mesmos resultados não foram observados em TNBS 2 e 7. Deste modo, casos tratados com óleo de peixe tiveram redução da atividade da MPO e aumento da área positiva de AB/PAS.

Além do muco observado sob microscopia de luz e eletrônica, determinamos a concentração de um dos componentes do muco presente nas fezes: o ácido siálico. Nossos resultados com ácido siálico indicam que o óleo de peixe não preveniu

redução de muco no conteúdo fecal e também não promoveu aumento significativo após sete dias de colite com TNBS. O ácido siálico faz parte da estrutura das mucinas principalmente na forma O-acetilada (CULLING et al., 1979; DHANISHA et al., 2018). Histologicamente há diminuição de área positiva de ácido siálico O-acetilado nas criptas intestinais de pessoas com DII, sendo a diminuição mais expressiva em pessoas com colite ulcerativa (CULLING et al., 1979), provavelmente pela maior diminuição de muco na colite ulcerativa (DOROFEYEV et al., 2013). Assim, depleção de ácido siálico é um indicador de severidade da DII (DHANISHA et al., 2018). Na colite ulcerativa há alterações no metabolismo de mucinas. Há redução de ácido siálico O-acetilado, com maior atividade de sialidases e também glicosidases que aceleram a degradação de mucinas nas fezes (CORFIELD et al., 1993) - sialidases hidrolizam ligações de ácido siálico com resíduos glicosídicos de glicoproteínas, assim, liberando o ácido siálico (MIYAGI; YAMAGUCHI, 2012). Embora haja diminuição de ácido siálico na colite ulcerativa, há maior concentração na forma livre, sendo que maior disponibilidade de ácido siálico na DII é usado para a proliferação de *Escherichia coli*, com conseqüente exacerbação inflamatória (HUANG et al., 2015b). Em adição, foi demonstrado maiores concentrações de ácido siálico no plasma de modelos animais após colite com TNBS (TSUJIKAWA et al., 1999) e em pessoas com DII (RICCI et al., 1995), possivelmente por maior hidrolização de ácido siálico. Nossos dados mostram que (i) colite com TNBS diminui a concentração de ácido siálico no conteúdo fecal provavelmente por causa da diminuição no conteúdo de muco; (ii) o óleo de peixe não promove aumento na concentração de ácido siálico nas fezes mesmo com maior conteúdo de muco encontrado histologicamente.

Outros autores demonstraram maiores concentrações de ácido siálico no tecido colônico após colite com TNBS (GENC et al., 2011; ISIK et al., 2011). Entretanto, o método utilizado por eles apenas determina a concentração de ácido siálico livre (WARREN, 1959). O resultado era esperado já que por causa da maior atividade de sialidases na inflamação intestinal, há maior concentração de ácido siálico livre (CORFIELD et al., 1993; HUANG et al., 2015b). O método utilizado por nós determina a concentração total de ácido siálico (JOURDIAN et al., 1971), assim, nossos resultados refletem ácido siálico na forma livre e ligado a mucinas.

Em conjunto, nossos dados mostram que o óleo de peixe promove a recuperação da mucosa intestinal lesionada pela colite com TNBS. Provavelmente os

componentes do óleo de peixe que promoveram a maior recuperação da mucosa intestinal foram o EPA e o DHA que são os principais ácidos graxos do óleo de peixe. O tratamento com óleo de peixe aumenta a concentração de precursores de menor atividade inflamatória (MEISTER; GHOSH, 2005; WHITING et al., 2005; BARROS et al., 2011). Além de diminuir a concentração de precursores com maior atividade inflamatória (BARROS et al., 2011). Para que isso aconteça é necessário que haja incorporação de EPA e DHA no tecido inflamado (HILLIER et al., 1991), sendo o cólon umas das regiões gastrointestinais que mais incorpora EPA e DHA (GURZELL et al., 2014). Desta forma, nós encontramos maior incorporação de EPA e DHA na mucosa do cólon durante o período de maior atividade inflamatória do experimento que foi aos dois dias de colite. Mesmo sem o tratamento com óleo de peixe e outra fonte de ômega-3, há aumento na quantidade de DHA e precursores do ômega-3 no soro durante o período de maior atividade inflamatória intestinal e após a recuperação, os ácidos graxos diminuem (PEARL et al., 2014; LEE et al., 2017a). Quando animais são tratados com óleo de peixe ou isoladamente com EPA ou DHA a quantidade no soro aumenta ainda mais e o processo de recuperação acelera (LEE et al., 2017a). Nossos resultados mostram que o maior incorporamento dos ácidos graxos no tecido no começo do experimento resultou em menor atividade inflamatória no final do experimento – período que encontramos menor incorporação de EPA e de DHA no cólon e maior incorporação destes ácidos graxos no plasma.

Quando estudos com o óleo de peixe foram feitos com modelos animais de colite, foi encontrado maior recuperação ou proteção (LI et al., 2008; IBRAHIM et al., 2011; HUANG et al., 2017), demonstrando maior efeito em menores razões de n-6/n-3 (BARROS et al., 2011; HUANG et al., 2015a; TYAGI et al., 2014). Outros mostram que o efeito é ainda maior quando combinado com outro composto, como o medicamento mesalazina comumente usado na DII (MBODJI et al., 2013), mesalazina e ácido caprílico (KANDULA et al., 2016), triglicerídeos de cadeia média (KONO et al., 2010), azeite de oliva virgem (REDDY; NAIDU, 2016), mix com L-arginina, vitaminas C e E (ROBLES et al., 2016), mix com prebióticos, vitaminas e minerais (WIESE et al., 2011). Já tratamentos com somente DHA também tem mostrado efeito protetivo. Seja por via oral (ZHAO et al., 2015) ou intraperitoneal (YUM et al., 2017). Por outro lado, o óleo de peixe parece exacerbar inflamação intestinal e formação tumoral em modelo

de colite knockout SMAD3 $-/-$, que compromete a sinalização do TGF- β , somado a infecção com *Helicobacter hepaticus* (WOODWORTH et al., 2010).

Um modelo animal normalmente utilizado para determinar os efeitos do ômega-3 é o *fat-1* que é um modelo transgênico que produz ômega-3 e tem sido usado para determinar os efeitos do ômega-3 eliminando outros fatores da alimentação. Assim, tem sido demonstrado menor grade inflamatória sistêmica e supressão de *Escherichia coli* (KALIANNAN et al., 2015), proteção contra colite experimental (HUDERT et al., 2005; GRAVAGHI et al., 2011; YUM et al., 2017), colite associada com câncer (HAN et al., 2016) e diminuição de espécies reativas de oxigênio, citocinas e produtos pró-inflamatórios (GRAVAGHI et al., 2011; YUM et al., 2017). Desta forma, os resultados com modelo *fat-1* reforçam os resultados do tratamento com óleo de peixe em modelos de colite, indicando possível benefício clínico em humanos com DII.

Todavia, em humanos os resultados são conflitantes. Alguns autores mostram benefício com o óleo de peixe, como redução de relapsos (UCHIYAMA et al., 2010), estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2003), citocinas pró-inflamatórias (NIELSEN et al., 2005), índice inflamatório da doença, comorbidades como dores articulares (ARSLAN et al., 2002; BJØRKKJAER et al., 2004) e de calprotectina com uso isolado de EPA – calprotectina é marcador fecal das DII, altas concentrações representam maior atividade inflamatória (SCAIOLI et al., 2018). Porém, meta-análises mostram que o óleo de peixe provavelmente não é eficaz, pois não manteve a fase remissiva da doença de Crohn – risco relativo (RR) 0.77 [intervalo de confiança, 0.61, 0.98], embora este resultado seja promissor para o óleo de peixe, possui alta heterogeneidade $I^2=58\%$. Assim, os autores ajustaram para dois estudos de baixo viés e encontraram praticamente nenhum efeito do óleo de peixe, RR 0.88 [0.74, 1.05] $I^2=0\%$ (LEV-TZION et al., 2014). Com colite ulcerativa o óleo de peixe não manteve a fase remissiva, RR 1.02 [0.51, 2.03] $I^2=0\%$ (TURNER et al., 2007). Provavelmente os autores não encontraram benefício com o óleo de peixe devido ao baixo número amostral coletado, da falta de ensaios clínicos randomizados, da falta de padronização da dose de óleo de peixe, bem como da concentração de EPA e DHA e também do período de tempo dos estudos selecionados que é de cerca de um ano, com no máximo dois anos, pois de acordo com a história natural da DII, normalmente acontecem relapsos nos primeiros anos de diagnóstico (BERNSTEIN, 2018; WEIMERS; MUNKHOLM, 2018).

Independente do resultado das meta-análises, o objetivo buscado atualmente no tratamento da DII vai além da manutenção da fase de remissão. Atualmente tem sido proposto abordagens mais individualizadas de acordo com o diagnóstico e a severidade da DII, com o foco do tratamento em alvos específicos ao invés de focar somente na remissão da doença. Esta mudança na perspectiva do tratamento surge da grande variabilidade de sintomas, curso e fenótipo da DII que os pacientes experenciam. Desta forma, um dos focos do tratamento é a recuperação da mucosa intestinal lesionada pela inflamação (IM, et al. 2018), algo que pode ser buscado com a propriedade resolutive dos ácidos graxos ômega-3 (CHIANG; SERHAN, 2017) e que mostraram por nós serem eficientes na resolução da lesão epitelial causada pela colite com TNBS.

Além do mais, alguns autores têm mostrado que o maior consumo de ômega-3, EPA e DHA, diminui a probabilidade de desenvolver doença de Crohn (CHAN et al., 2014) e colite ulcerativa (TJONNELAND et al., 2009; JOHN et al., 2010; ANANTHAKRISHNAN et al., 2014). Além de que menores razões de n-6/n-3 diminui o número de relapsos da doença de Crohn e da colite ulcerativa (UCHIYAMA et al., 2010). Adicionalmente, crianças que possuem variantes específicas em genes (CYP4F3, FADS1 e FADS2) que controlam metabolismo do EPA e DHA e que nutricionalmente consomem alta razão de n-6/n-3, possuem maior probabilidade de desenvolver a doença de Crohn (COSTEA et al., 2014). Desta forma, mesmo com a evidência de que provavelmente o óleo de peixe é eficaz no tratamento da DII, o consumo nutricional de ácidos graxos ômega-3 pode afetar a incidência da DII, bem como a agressividade da doença naqueles já a possuem. Além de diminuir o risco de câncer colorretal (LEE et al., 2017b), pois DII aumenta as chances de câncer colorretal (BERNSTEIN, 2018).

Por fim, estudos com modelos animais de colite experimental suportam o uso de óleo de peixe, além de que em humanos um alto consumo de ômega-3, que pode ser facilitado com o óleo de peixe, parece reduzir a incidência e a agressividade da DII naqueles que já possuem. Nosso trabalho reforça o conhecimento atual sobre colite experimental e também do óleo de peixe como tratamento complementar para DII.

6 CONCLUSÃO

Óleo de peixe não protege a mucosa intestinal da colite experimental com TNBS. No entanto, o óleo de peixe promove a recuperação da mucosa após a colite. Após a colite com TNBS há depleção de conteúdo de muco, perda de integridade e erosão epitelial, e aumento da atividade inflamatória no tecido lesionado pela colite. O tratamento com óleo de peixe não evita que esses achados aconteçam, mas a incorporação de EPA e DHA obtidos do óleo de peixe no tecido lesionado promove a resolução dos marcadores citados.

REFERÊNCIAS

- ABUSHUFA, R. et al. Fatty acids erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707-12, 1994.
- ANTONIOU, E. et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. **Ann Med Surg**, v. 11, p. 9-15, 2016. DOI. 10.1016/j.amsu.2016.07.019. Acesso em: 14 mar. 2018.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Long-term Intake of Dietary Fat and Risk of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 776-84, 2014, DOI. 10.1136/gutjnl-2013-305304. Acesso em: 14 mar. 2018.
- ARSLAN, G. et al. Effects of Duodenal Seal Oil Administration in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Lipids**, v. 37, n. 10, p. 935-40, 2002. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BARBOSA, D. S. et al. Decreased Oxidative Stress in Patients With Ulcerative Colitis Supplemented With Fish Oil n-3 Fatty Acids. **Nutrition**, v. 19, n. 10, p. 837-42, 2003. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BARROS, K. V. et al. Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. **Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 221-6, 2011. DOI. 10.1016/j.nut.2009.11.014. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BENTO, A. F. et al. Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent Experimental Colitis in Mice. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1957-69, 2011, DOI. 10.4049/jimmunol.1101305. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BENTLEY-HEWITT, K.L. et al. Lactobacilli survival and adhesion to colonic epithelial cell lines is dependent on long chain fatty acid exposure. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 119, p. 1-10, 2017. DOI. 10.1002/ejlt.201700062. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BERNSTEIN, C. N. The Natural History of Inflammatory Bowel Disease. In: BAUMGART, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic**. Berlim: Springer, 2018. p. 301-9.

BEYER, R. S.; JENSEN, L. S. Overestimation of the cholesterol content of eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 917-20, 1989.

BJØRKKJAER, T. et al. Reduced Joint Pain after Short-term Duodenal Administration of Seal Oil in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Comparison with Soy Oil. **Scand J Gastroenterol**, v. 39, n. 11, p. 1088-94, 2004. Acesso em: 14 mar. 2018.

BRENNNA, Ø. et al. Relevance of TNBS-Colitis in Rats: A Methodological Study with Endoscopic, Histologic and Transcriptomic Characterization and Correlation to IBD. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013. DOI. 10.1371/journal.pone.0054543.

BUTTÓ, L. F.; HALLER, D. Intestinal Microbiology and Ecology in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. In: BAUMGART, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic**. Berlim: Springer, 2018. p. 67-74.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-84, 2015. DOI. 10.1016/j.bbalip.2014.08.010. Acesso em: 14 mar. 2018.

CHAN, S. S. M. et al. Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 39, n. 8, p. 834-42, 2014. DOI. 10.1111/apt.12670. Acesso em: 14 mar. 2018.

CHEIFETZ, A. S. et al. Complementary and Alternative Medicines Used by Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 415-29, 2017. DOI. 10.1053/j.gastro.2016.10.004. Acesso em: 15 mar. 2018.

CHEN, K. et al. Activation of nuclear factor-kappa B and effects of pyrrolidine dithiocarbamate on TNBS-induced rat colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 10, p. 1508-14, 2005.

CHIANG, N.; SERHAN, N. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. **Mol Aspects Med**, v. 58, p. 114-29, 2017. DOI. 10.1016/j.mam.2017.03.005. Acesso em: 14 mar. 2018.

CORFIELD, A. P. et al. The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin. **Glycoconj J**, v. 10, n. 1, p. 72-81, 1993. Acesso em: 15 mar. 2018.

COSTEA, I. et al. Interactions Between the Dietary Polyunsaturated Fatty Acid Ratio and Genetic Factors Determine Susceptibility to Pediatric Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 4, p. 929-31, 2014. DOI. 10.1053/j.gastro.2013.12.034. Acesso em: 14 mar. 2018.

CULLING, C. F. A. et al. A histochemical comparison of the O-acylated sialic acids of the epithelial mucins in ulcerative colitis, Crohn's disease, and normal controls. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p. 1272-77, 1979. Acesso em: 15 mar. 2018.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function. **Front Immunol**, v. 8, 2017. DOI. 10.3389/fimmu.2017.01400. Acesso em: 14 mar. 2018.

DHANISHA, S. S. et al. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 133, p. 98-122, 2018. DOI. 10.1016/j.critrevonc.2017.12.006. Acesso em: 15 mar. 2018.

DHARMANI, P. et al. Tumor Necrosis Factor- α and Muc2 Mucin Play Major Roles in Disease Onset and Progression in Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-13, 2011. DOI. 10.1371/journal.pone.0025058. Acesso em: 14 mar. 2018.

DONG, W. et al. Protective effect of NSA on intestinal epithelial cells in a necroptosis model. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 86726-35, 2017. DOI. 10.18632/oncotarget.21418. Acesso em: 14 mar. 2018.

DOROFEYEV, A. E. et al. Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. **Gastroenterol Res Pract.**, v. 2013, p. 1-10, 2013. DOI. 10.1155/2013/431231. Acesso em: 14 mar. 2018.

FOLCH, J. et al. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1956.

GENC, Z. et al. The Effect of Stinging Nettle (*Urtica dioica*) Seed Oil on Experimental Colitis in Rats. **J Med Food**, v. 14, n. 12, p. 1554-61, 2011. DOI. 10.1089/jmf.2011.0028. Acesso em: 15 mar. 2018.

GERSEMANN, M. et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. **Differentiation**, v. 77, n. 1, p. 84-94, 2009. DOI. 10.1016/j.diff.2008.09.008. Acesso em: 14 mar. 2018.

GRAVAGHI, C. et al. Cox-2 expression, PGE2 and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 4, p. 360-5, 2011. DOI. 10.1016/j.jnutbio.2010.03.003. Acesso em: 14 mar. 2018.

GURZELL, E. A. et al. Is the omega-3 index a valid marker of intestinal membrane phospholipid EPA+DHA content? **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 91, n. 3, p. 87-96, 2014. DOI. 10.1016/j.plefa.2014.04.001. Acesso em: 14 mar. 2018.

HAN, Y. et al. The ω -3 polyunsaturated fatty acids prevented colitis-associated carcinogenesis through blocking dissociation of β -catenin complex, inhibiting COX-2 through repressing NF- κ B, and inducing 15-prostaglandin dehydrogenase. **Oncotarget**, v. 7, n. 39, p. 63583-95, 2016. DOI. 10.18632/oncotarget.11544. Acesso em: 14 mar. 2018.

HANSBERRY, D. R. et al. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. **Cureus**, v. 9, v. 1, p. 1-7, 2017. DOI. 10.7759/cureus.1004. Acesso em: 14 mar. 2018.

HEAZLEWOOD, C. K. et al. Aberrant Mucin Assembly in Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis. **PLoS Med**, v. 5, n. 3, p. 1-21, 2008. DOI. 10.1371/journal.pmed.0050054. Acesso em: 15 mar. 2018.

HILLIER, K. et al. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 32, n. 10, p. 1151-5, 1991. Acesso em: 14 mar. 2018.

HUANG, C. et al. A soybean and fish oil mixture with different n-6/n-3 PUFA ratios modulates the inflammatory reaction in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. **Clin Nutr**, v. 34, n. 5, p. 1018-24, 2015a. DOI. 10.1016/j.clnu.2014.11.008. Acesso em: 14 mar. 2018.

HUANG, Y. et al. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. **Nat Commun**, v. 6, n. 8141, p. 1-11, 2015b. DOI. 10.1038/ncomms9141. Acesso em: 15 mar. 2018.

HUANG, C. et al. Dietary ω -6/ ω -3 PUFA Ratios Affect the Homeostasis of Th/Treg Cells in Mice With Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. **JPEN J Parenter**

Enteral Nutr, v. 41, n. 4, p. 647-56, 2017. DOI. 10.1177/0148607116638493. Acesso em: 14 mar. 2018.

HUDERT, C. A. et al. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, n. 30, p. 11276-81, 2006. Acesso em: 14 mar. 2018.

IBRAHIM, A. et al. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. **Clin Nutr**, v. 30, n. 5, p. 678-87, 2011. DOI. 10.1016/j.clnu.2011.05.002. Acesso em: 14 mar. 2018.

IM, J. P. et al. Changing treatment paradigms for the management of inflammatory bowel disease. **Korean J Intern Med**, v. 33, n. 1, p. 28-35, 2018. DOI. 10.3904/kjim.2017.400. Acesso em: 15 mar. 2018.

ISIK, F. et al. Protective Effects of Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil on TNBS-Induced Experimental Colitis in Rats. **Dig Dis Sci**, v. 56, n. 3, p. 721-30, 2011. DOI. 10.1007/s10620-010-1333-z. Acesso em: 15 mar. 2018.

JOHANSSON, M. E. V. et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 63, n. 2, p. 281-91, 2014. DOI. 10.1136/gutjnl-2012-303207. Acesso em: 14 mar. 2018.

JOHN, S. et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and the aetiology of ulcerative colitis: a UK prospective cohort study. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 5, p. 602-6, 2010. DOI. 10.1097/MEG.0b013e3283352d05. Acesso em: 14 mar. 2018.

JOSEPH, N. E.; WEBER, C. R. Pathology of Inflammatory Bowel Disease. In: BAUMGART, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic**. Berlim: Springer, 2018. p. 243-58.

JOURDIAN, G. W. et al. The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. **J Biol Chem**, v. 246, n. 2, 1971. Acesso em: 15 mar. 2018.

KABOURIDIS, P. S. et al. Microbiota Controls the Homeostasis of Glial Cells in the Gut Lamina Propria. **Neuron**, v. 85, p. 289-95, 2015. DOI. 10.1016/j.neuron.2014.12.037.

KALIANNAN, K. et al. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. **Sci Rep**, v. 5, p. 1-17, 2015. DOI. 10.1038/srep11276. Acesso em: 14 mar. 2018.

KANDULA, M. et al. Discovery and preclinical development of a novel prodrug conjugate of mesalamine with eicosapentaenoic acid and caprylic acid for the treatment of inflammatory bowel diseases. **Int Immunopharmacol**, v. 40, p. 443-51, 2016. DOI. 10.1016/j.intimp.2016.09.013. Acesso em: 14 mar. 2018.

KIM, J. J. et al. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. **J Vis Exp**, v. 60, p.1-6, 2012. DOI.1 0.3791/3678. Acesso em: 15 mai. 2018.

KIM, D. H.; CHEON, J. H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. **Immune Netw**, v. 17, n. 1, p. 25-40, 2017. DOI. 10.4110/in.2017.17.1.25. Acesso em: 14 mar. 2018.

KNOLLMANN, F. D. et al. Magnetic Resonance Imaging of Inflammatory Bowel Disease: Evaluation in a Rabbit Model. **J Magn Reson Imaging**, v. 15, n. 2, p. 165-73, 2002. Acesso em: 14 mar. 2018.

KONO, H. et al. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. **Transl Res**, v. 156, n. 5, p. 282-91, 2010. DOI. 10.1016/j.trsl.2010.07.012. Acesso em: 14 mar. 2018.

KRAWISZ, J. E. et al. Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity. **GASTROENTEROLOGY**, v. 87, p. 1344-50, 1984. Acesso em: 14 mar. 2018.

LEE, Y. et al. Analysis of endogenous lipids during intestinal wound healing. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1-23, 2017a. DOI. 10.1371/journal.pone.0183028. Acesso em: 14 mar. 2018.

LEE, J. Y. et al. Chemopreventive and Chemotherapeutic Effects of Fish Oil derived Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Colon Carcinogenesis. **Clin Nutr Res**, v. 6, n. 3, p. 147-60, 2017b. DOI. 10.7762/cnr.2017.6.3.147. Acesso em: 15. mar. 2018.

LENNON, G. et al. Correlations between colonic crypt mucin chemotype, inflammatory grade and *Desulfovibrio* species in ulcerative colitis. **Colorectal Dis**, v. 16, n. 5, p. 161-9, 2014. DOI. 10.1111/codi.12503. Acesso em: 14 mar. 2018.

LEV-TZION, R. et al. Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1-48, 2014, DOI. 10.1002/14651858.CD006320.pub4. Acesso em: 14 mar. 2018.

LI, Q. et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. **FEBS J**, v. 275, n. 3, p. 411-20, 2008. DOI. 10.1111/j.1742-4658.2007.06210.x. Acesso em: 14 mar. 2018.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophysical Biochem.Cytol**, v. 9, p. 209-14, 1961. Acesso em: 15 mar. 2018.

MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. et al. Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colonic inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis. **BMC Genomics**, v. 9, n. 490, p. 1-18, 2008. DOI. 10.1186/1471-2164-9-490.

MALIK, T. A. Inflammatory Bowel Disease: Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. **Surg Clin North Am**, v. 95, n. 6, p. 1105-22, 2015. DOI. 10.1016/j.suc.2015.07.006. Acesso em: 15 mar. 2018.

MBODJI, K. et al. Adjunct therapy of n-3 fatty acids to 5-ASA ameliorates inflammatory score and decreases NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 4, p. 700-5, 2013. DOI. 10.1016/j.jnutbio.2012.03.022. Acesso em: 14 mar. 2018.

MEISTER, D.; GHOSH, S. Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ culture: Differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 47, p. 7466-72, 2005. Acesso em: 14 mar. 2018.

MIYAGI, T.; YAMAGUCHI, K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology**, v. 22, n. 7, p. 880-96, 2012. DOI. 10.1093/glycob/cws057. Acesso em: 15 mar. 2018.

MORRIS, G. P. et al. Hapten-Induced Model of Chronic Inflammation and Ulceration in the Colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795-803, 1989. Acesso em: 15 mar. 2018.

MOWRY, R. W. THE SPECIAL VALUE OF METHODS THAT COLOR BOTH ACIDIC AND VICINAL HYDROXYL GROUPS IN THE HISTOCHEMICAL STUDY OF

XIUCINS. WITH REVISED DIRECTIONS FOR THE COLLOIDAL IRON STAI-V, THE USE OF ALCIAN BLUE G8X AND THEIR COHIBINATIONS WITH THE PERIODIC ACID-SCHIFF REACTION. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, 1963, DOI. 10.1111/j.1749-6632.1963.tb16654.x. Acesso em: 15 mar. 2018.

NISHIYAMA-NARUKE, A. et al. HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37°C –analysis of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, n. 14, p. 2565-76, 1998.

NEURATH, M. F. Current and emerging therapeutic targets for IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 5, p. 269-78, 2017. DOI. 10.1038/nrgastro.2016.208. Acesso em: 14 mar. 2018.

NG, S. C. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 390, n. 10114, p. 2769-78, 2017. DOI. 10.1016/S0140-6736(17)32448-0. Acesso em: 15 mar. 2018.

NIELSEN, A. A. et al. Omega-3 fatty acids inhibit an increase of proinflammatory cytokines in patients with active Crohn's disease compared with omega-6 fatty acids. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 22, p. 1121-28, 2005. Acesso em: 14 mar. 2018.

NONOSE, R. et al. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 4, p. 267-75, 2009. Acesso em: 15 mar. 2018.

NOWARSKI, R. et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1444-56, 2015. DOI. 10.1016/j.cell.2015.10.072. Acesso em: 15 mar. 2018.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. Understanding the Epithelial Barrier in IBD. In: BAUMGART, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic**. Berlin: Springer, 2018. p. 57-66.

OSTERMAN, M. T.; LICHTENSTEIN. Colites Ulcerativas. In: FELDMAN, M. (Ed.). **Sleisenger e Fordtran Gastroenterologia e Doenças do Fígado**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 2017-56.

PEARL, D. S. et al. Altered colonic mucosal availability of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in ulcerative colitis and the relationship to disease activity. **J Crohns Colitis**, v. 8, n. 1, p. 70-9, 2014. DOI. 10.1016/j.crohns.2013.03.013. Acesso em: 14 mar. 2018.

PERIASAMY, S. et al. Sesame Oil Accelerates Healing of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid–Induced Acute Colitis by Attenuating Inflammation and Fibrosis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 37, n. 5, p. 674-82, 2013. DOI. 10.1177/0148607112468768. Acesso em: 15 mar. 2018.

REDDY, K. V.; NAIDU, K. A. Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8 synthesis; in vitro and in vivo studies. **Int Immunopharmacol**, v. 35, p. 29-42, 2016. DOI. 10.1016/j.intimp.2016.03.019. Acesso em: 14 mar. 2018.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biology**, v. 17, p. 208-12, 1963. Acesso em: 15 mar. 2018.

RICCI, G. et al. Comparison of serum total sialic acid, C-reactive protein, al-acid glycoprotein and Pz-microglobulin in patients with non-malignant bowel diseases. **Biomed R Pharmacother**, v. 5, p. 259-62, 1995. Acesso em: 5 mar. 2018.

RIVERA, E. et al. Molecular Profiling of a Rat Model of Colitis: Validation of Known Inflammatory Genes and Identification of Novel Disease-Associated Targets. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, p. 950–66, 2006.

ROBLES, H. V. et al. Experimental Colitis Is Attenuated by Cardioprotective Diet Supplementation That Reduces Oxidative Stress, Inflammation, and Mucosal Damage. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-9, 2016. DOI. 10.1155/2016/8473242. Acesso em: 14 mar. 2018.

SCAIOLI, E. et al. The Imbalance between n-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review and Future Therapeutic Perspectives. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 12, p. 1-23, 2017. DOI. 10.3390/ijms18122619. Acesso em: 14 mar. 2018.

SCAIOLI, E. et al. Eicosapentaenoic Acid Reduces Fecal Levels of Calprotectin and Prevents Relapse in Patients With Ulcerative Colitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 2018. DOI. 10.1016/j.cgh.2018.01.036. Acesso em: 14 mar. 2018.

SERHAN, C. N. et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. **FASEB J**, v. 26, n. 4, p. 1755-65, 2012. DOI. 10.1096/fj.11-201442. Acesso em: 14 mar. 2018.

STEINBACH, E. C.; PLEVY, S. E. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. **Inflamm Bowel Dis**, v. 20, n. 1, p. 166-75, 2014. DOI. 10.1097/MIB.0b013e3182a69dca. Acesso em: 14 mar. 2018.

SUN, J. et al. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. **Nutrients**, v. 8, p. 1-15, 2016. DOI. 10.3390/nu8010044. Acesso em: 14 mar. 2018.

SWIDSINSKI, A. et al. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 6, p. 61-71, 2009. Acesso em: 14 mar. 2018.

SZALAI, Z. et al. Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 1-12, 2014. DOI. 10.1155/2014/925981. Acesso em: 14 mar. 2018.

TJONNELAND, A. et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case–control study within a European prospective cohort study. **Gut**, v. 58, n. 12, p. 1606-11, 2009. DOI. 10.1136/gut.2008.169078. Acesso em: 14 mar. 2018.

TSUJIKAWA, T. et al. Medium-chain triglycerides modulate ileitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 12, p. 1166-72, 1999. Acesso em: 15 mar. 2018.

TURNER, D. et al. Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in ulcerative colitis (Review). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 18, n. 3, 2007. Acesso em: 14 mar. 2018.

TYAGI, A. et al. Partial replacement of dietary linoleic acid with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 91, n. 6, p. 289-97, 2014. DOI. 10.1016/j.plefa.2014.09.003. Acesso em: 14 mar. 2018.

UCHIYAMA, K. et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acid Diet Therapy for Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 10, p. 1696-707, 2010. DOI. 10.1002/ibd.21251. Acesso em: 14 mar. 2018.

UNGARO, F. et al. Actors and Factors in the Resolution of Intestinal Inflammation: Lipid Mediators As a New Approach to Therapy in Inflammatory Bowel Disease. **Front Immunol**, v. 8, n. 1331, p. 1-13, 2017. DOI. 10.3389/fimmu.2017.01331. Acesso em: 15 mar. 2018.

VAN DER SLUIS, M. et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That Muc2 Is Critical for Colonic Protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117-29, 2006. Acesso em: 14 mar. 2018.

VATN, M. H. Environmental Factors in the Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease. In: BAUMGART, D. C. (Ed.). **Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic**. Berlim: Springer, 2018. p. 3-22.

VOLYNETS, V. et al. Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. **Dig Dis Sci**, v. 61, n. 3, p. 737-46, 2016. DOI. 10.1007/s10620-015-3935-y. Acesso em: 15 mar. 2018.

WALLACE, K. L. et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 1, p. 6-21, 2014. DOI. 10.3748/wjg.v20.i1.6.

WARREN, L. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. **J Biol Chem**, v. 234, n. 8, p. 1971-5, 1959. Acesso em: 15 mar. 2018.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophysical, Biochemi. Cytology**, v. 4, n. 4, p. 475-78, 1958. Acesso em: 15 mar. 2018.

WEIMERS, P.; MUNKHOLM, P. The Natural History of IBD: Lessons Learned. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 16, n. 1, p. 101-11, 2018. DOI. 10.1007/s11938-018-0173-3. Acesso em: 15 mar. 2018.

WHITING, C. V. et al. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce Disease and Colonic Proinflammatory Cytokines in a Mouse Model of Colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, n. 4, p. 340-9, 2005. Acesso em: 15 mar. 2018.

WIESE, D. M. et al. The Effects of an Oral Supplement Enriched With Fish Oil, Prebiotics, and Antioxidants on Nutrition Status in Crohn's Disease Patients. **Nutr Clin Pract**, v. 26, n. 4, p. 463-7, 2011. DOI. 10.1177/0884533611413778. Acesso em: 15 mar. 2018.

WOODWORTH, H. L. et al. Dietary Fish Oil Alters T Lymphocyte Cell Populations and Exacerbates Disease in a Mouse Model of Inflammatory Colitis. **Cancer Res**, v. 70, n. 20, p. 7960-9, 2010. DOI. 10.1158/0008-5472.CAN-10-1396. Acesso em: 15 mar. 2018.

YAMABAYASHI, S. Periodic acid- Schiff- Alcian Blue: a method differential staining of glycoproteins. **Histochem J**, v. 19, p. 565-71, 1987. Acesso em: 15 mar. 2018.

YUM, H. et al. Constitutive ω -3 fatty acid production in fat-1 transgenic mice and docosahexaenoic acid administration to wild type mice protect against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 487, n. 4, p. 847-55, 2017. DOI. 10.1016/j.bbrc.2017.04.140. Acesso em: 15 mar. 2018.

ZHAO, J. et al. DHA protects against experimental colitis in IL-10-deficient mice associated with the modulation of intestinal epithelial barrier function. **Br J Nutr**, v. 114, n. 2, p. 181-8, 2015. DOI. 10.1017/S0007114515001294. Acesso em: 15 mar. 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

O software ImageJ 1.51p foi usado para quantificar a área positiva de AB/PAS. Imagens obtidas do Scanner de Lâminas, 200x ampliadas, foram em seguida usadas no programa VSViewer V 2.1.102, 10x ampliadas, para selecionar a região epitelial do cólon - desde a base do epitélio até a região apical (Figura 21A). Em seguida, a área selecionada foi usada no ImageJ. Os passos são esses: Image > Adjust > Color Threshold > Color Space > RGB > Select. Assim, a região positiva com AB/PAS é selecionada. Para quantificar a área selecionada segue: Analyze > Measure. O resultado é a área positiva com AB/PAS. A área total da imagem é quantificada sem seleção da área com AB/PAS, ou seja, é a área total da imagem selecionada no programa VSViewer, que corresponde a 813.052 pixels (Figura 21).

Neste trabalho usamos a porcentagem da área selecionada com AB/PAS e não a área total dela. Seguindo o exemplo da Figura 21, divide-se o valor da área selecionada com AB/PAS (126.370 - a) pela área total da imagem (813.052 - b) e multiplica-se por 100, logo, $(a/b)*100$.

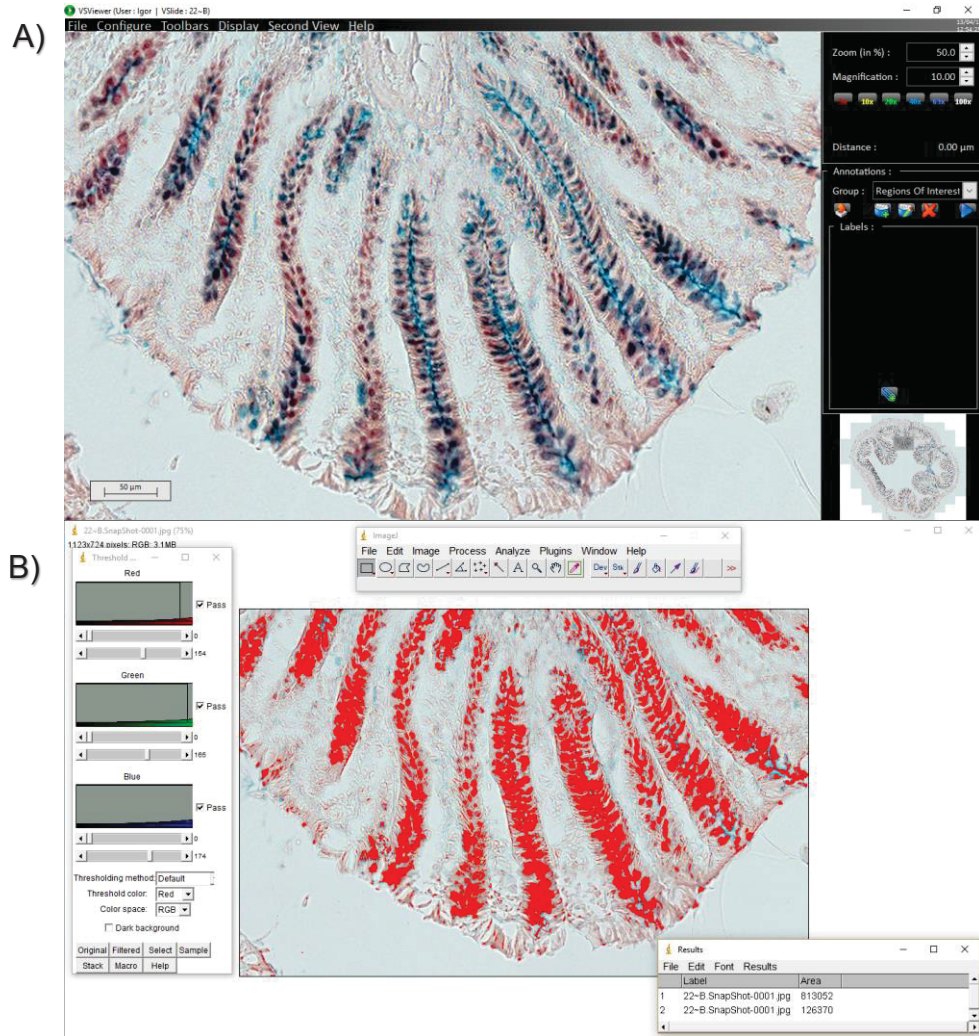


Figura 21. Exemplo de mensuração da área positiva de AB/PAS.

APÊNDICE 2

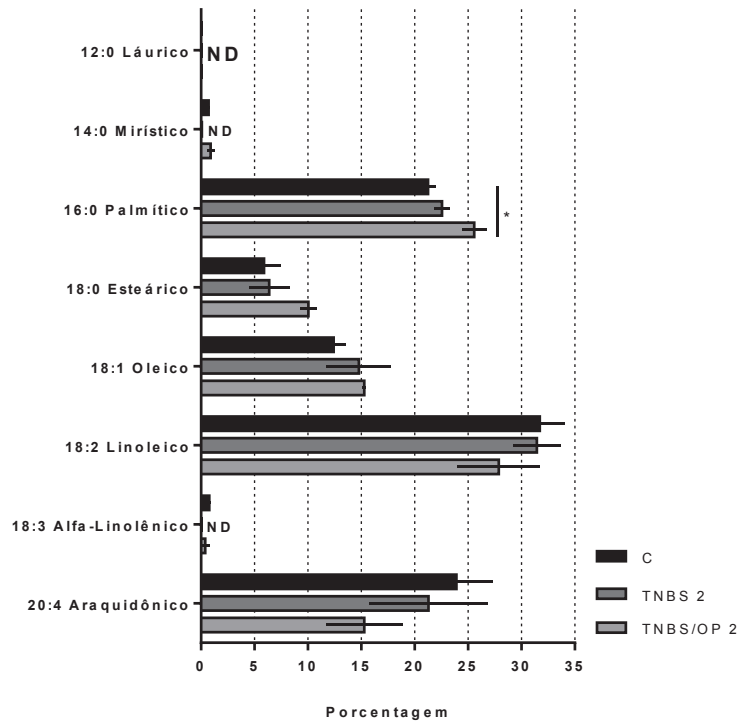


Figura 22. HPLC do plasma após dois dias de colite com TNBS. Dados expressos em média e erro padrão da média. * $p=0.03$. ND, não detectado.

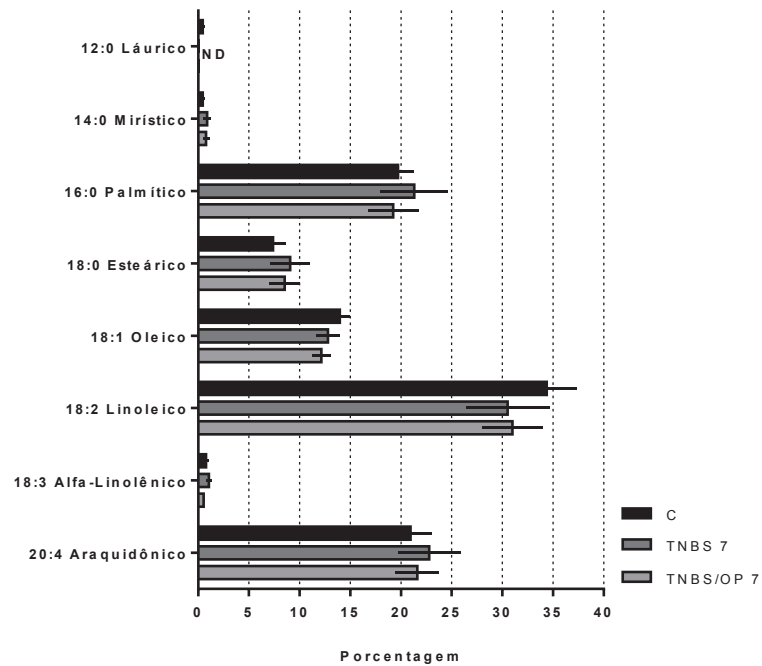


Figura 23. HPLC do plasma após sete dias de colite com TNBS. Dados expressos em média e erro padrão da média. ND, não detectado.

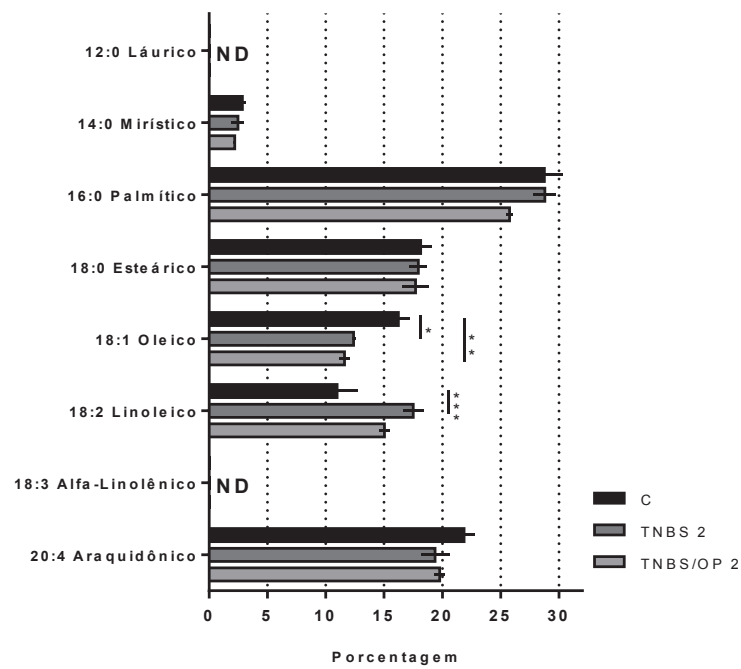


Figura 24. HPLC da mucosa do cólon após dois dias de colite com TNBS. Dados expressos em média e erro padrão da média. * $p=0.003$; ** $p=0.0009$; *** $p=0.006$. ND, não detectado.

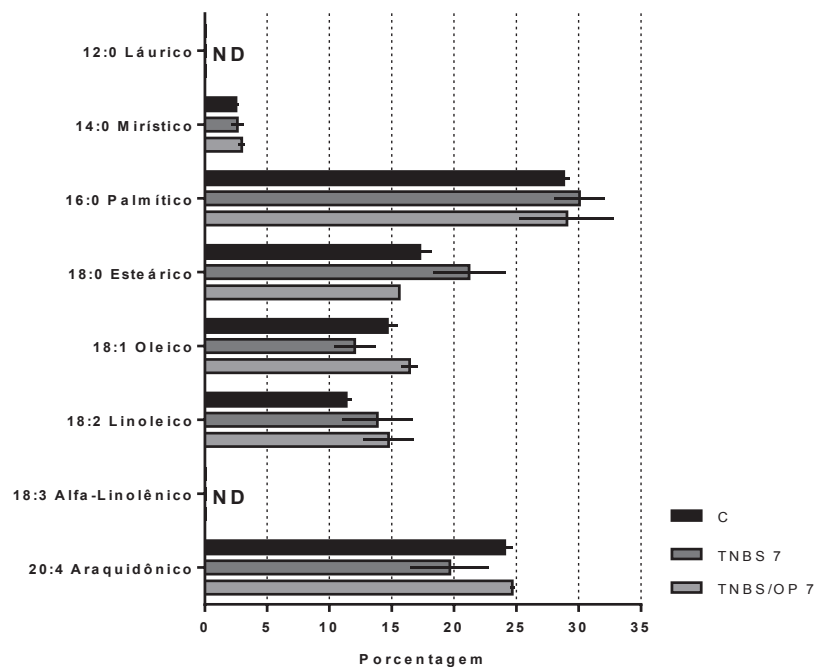


Figura 25. HPLC da mucosa do cólon após sete dias de colite com TNBS. Dados expressos em média e erro padrão da média. ND, não detectado.