



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**NAYONARA LANARA SOUSA DUTRA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA  
EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA VERMELHA, *Gracilaria Caudata* DURANTE A  
COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

**PARNAÍBA – PI  
MARÇO – 2017**

**NAYONARA LANARA SOUSA DUTRA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA  
EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA VERMELHA, *Gracilaria Caudata* DURANTE A  
COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA – PI

MARÇO– 2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

D978e Dutra, Nayonara Lanara Sousa.  
Efeito anti-inflamatorio da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha vermelha, gracilaria caudata durante a colite experimental induzida por ácido acético [manuscrito] / Nayonara Lanara Sousa Dutra. – 2017.

68 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

Área de concentração: Farmacologia

1. Biomedicina. 2. Colite Ulcerativa. 3. Ácido Acético. 4. Polissacarídeo. 5. Glacilária Caudata. I. Título.

CDD: 610

**NAYONARA LANARA SOUSA DUTRA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA  
EXTRAÍDA DA ALGA MARINHA VERMELHA, *Gracilaria Caudata* DURANTE A  
COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa  
Universidade Federal do Piauí/UFPI  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Baldomero Antônio Kato da Silva  
Universidade Federal do Piauí/UFPI

---

Prof. Dr. Cláudio Angelo Ventura  
Universidade Federal do Piauí/UFPI

PARNAÍBA – PI  
MARÇO – 2017

**Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força,  
Ele é tudo o que sempre preciso. (Salmo 73:26)**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à minha família em especial à meus pais, irmãos, avó e esposo Paulo, pelo amor e apoio nas minhas decisões e momentos mais difíceis.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, socorro presente na hora da angústia e que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Maria Auxiliadora e Francisco Dutra, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu esposo Paulo Júnior, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos, Narjara Dutra, Nayara Dutra, Dutra Júnior, Breno Dutra e aos meus cunhados que sempre torceram por mim.

À minha avó, Maria e aos meus tios e a toda minha família pelo incentivo e apoio constantes. Aos meus sogros pelo apoio.

Ao professor orientador Dr. André Luiz Reis Barbosa pelas orientações, ensinamentos, paciência, dedicação e, sobretudo pela atitude humana nos momentos mais difíceis e angustiantes ao longo dessa jornada.

Agradeço a colaboração dos amigos Diva Magalhães, Jalles Batista, Stefanny Guimarães e Francisco Júnior pelo companheirismo, momentos agradáveis, apoio e contribuições valiosas. Aos alunos do PIBIC, ICV e voluntários da Iniciação Científica (Cíntia, Ieda, Lauanda, Jayro, Victor e Afonso) pelo apoio e ajuda no Laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas pelos conhecimentos compartilhados.

Aos colaboradores do Laphis, especialmente Professor Daniel Vasconcelos e ao Felipe Rodolfo, do Leffag, Álvaro e Carlos Eduardo. Aos professores, técnicos e alunos do Laffex (UFPI) pela contribuição a este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>Lista de Abreviatura</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de Gráficos</b> .....	<b>vi</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1. Doenças inflamatórias intestinais.....	4
2.1.1 Colite Ulcerativa.....	5
2.1.2 Epidemiologia.....	7
2.1.2 Etiopatogenia da Colite Ulcerativa.....	8
2.1.3 Fisiopatologia da Colite Ulcerativa.....	9
2.1.4 Terapêutica das Doenças inflamatórias intestinais.....	13
2.2. Algas Marinhas: Conceito e Aplicação Biológica .....	14
2.3. Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas Vermelhas .....	16
2.4. Propriedades Farmacológicas de Polissacarídeos do gênero <i>Glacilaria</i> .....	17
2.5. <i>Glacilária Caudata</i> .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>



4.1. Fração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha <i>Glacilaria caudata</i> .....	21
4.2. Animais utilizados para os protocolos experimentais sugeridos.....	21
4.3. Padronização do modelo de colite ulcerativa experimental.....	21
4.3.1- Modelo de DII induzido por ácido acético adaptado.....	21
4.4. Avaliação dos escores macroscópicos.....	23
4.5. Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite.....	24
4.6. Avaliação dos escores microscópicos da lesão.....	24
4.7. Análise Bioquímica.....	25
4.7.1. Ensaio de Mieloperoxidase .....	25
4.7.2. Determinação de malonilaldeído (MDA) na mucosa intestinal .....	26
4.7.3. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal .....	26
4.7.4. Dosagem de Citocinas .....	27
4.8. Análise estatística .....	28
4.9. Questões Éticas.....	28
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
5.1 Avaliação dos escores macroscópicos em cólons intestinais .....	29
5.2 Avaliação do Peso úmido em 5cm de cólon.....	31
5.3 Efeito do PLS da <i>Glacilaria caudata</i> sobre os escores microscópicos de lesão intestinal na colite induzida por AA em camundongos.....	32
5.4 Determinação da atividade da MPO.....	36

5.5 Efeito do Pls da <i>Glacilaria caudata</i> sobre os níveis de MDA no Tecido intestinal.....	37
5.6 Efeito do Pls da <i>Glacilaria caudata</i> sobre os níveis GSH no Tecido intestinal.....	38
5.7 Efeito do Pls da <i>Glacilaria caudata</i> sobre os níveis colônicos de IL-1 $\beta$ .....	39
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
Anexo.....	67

## RESUMO

**INTRODUÇÃO** - As algas marinhas são consideradas uma fonte de moléculas bioativas. Dentre essas moléculas estão os polissacarídeos sulfatados, amplamente utilizados na indústria farmacêutica e bastante estudados devido às suas propriedades bioquímicas específicas. O Polissacarídeo da alga *Glacilária Caudata* possui alguns efeitos farmacológicos comprovados, dentre os quais se destaca sua ação antiinflamatória. **OBJETIVO** - Avaliar a ação anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da *Glacilária Caudata* sobre os efeitos deletérios da colite induzida pelo ácido acético em camundongos. **MATERIAIS E MÉTODOS** - O polissacarídeo utilizado neste estudo foi caracterizado por Barros et. al. (2013), usando técnicas de microanálise elementa, espectroscopia infravermelha e de ressonância magnética nuclear (RMN). Para os estudos farmacológicos foram usados camundongos Swiss pesando entre 25-30 g, sendo divididos em grupos de 5-7 animais. Inicialmente, a colite foi induzida nos animais usando o ácido acético a 6 % após 16 horas de jejum. Após a indução da colite os animais foram tratados com o PLS nas doses de (1, 3, 10 mg/kg, i.p.) e estabelecida a dose com a melhor resposta anti-inflamatória para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Os tratamentos com o polissacarídeo sulfatado ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) foram feitos 17 horas e 30 minutos após a indução da colite. Os animais foram eutanasiados após 18h da indução da colite, abertas suas cavidades abdominais e retirado uma porção de 5 cm do cólon de cada animal, então foram avaliados os parâmetros macroscópicos, peso úmido e parâmetros microscópicos da lesão. Em seguida o tecido foi dividido e estocado em amostras para se realizar posteriormente os seguintes ensaios: dosagens de mieloperoxidase (MPO), interleucina 1 beta, glutathione (GSH), ácido malondialdeído (MDA). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste de Newman-Keuls e para a análise dos escores microscópicos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. **RESULTADOS** - Com base nos resultados verificou-se que os animais tratados com este polissacarídeo na dose de 10 mg/kg demonstrou redução satisfatória da lesão intestinal, bem como uma diminuição do peso úmido quando comparado com o grupo do AA. O PLS (10mg/Kg, i.p.) da *G. Caudata* mostrou capacidade de reduzir o dano tecidual tais como, perda da arquitetura da mucosa 1 (1-1), infiltração de células 1(1-1), espessamento da camada muscular 1 (1-1) e promoveu uma significativa diminuição para os parâmetros Abscesso em cripta 0 (0-0) e Depleção de células calciformes 0 (0-0). O polissacarídeo estudado, mostrou uma redução significativa dos testes bioquímicos avaliados, como os marcadores de migração de leucócitos (mieloperoxidase), citocina pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ ) e marcadores de estresse oxidativo *in vivo* (ácido malondialdeído e glutathione). **CONCLUSÃO** - O polissacarídeo da alga marinha *Glacilária caudata* apresentou ação antinflamatória e reduziu o estresse oxidativo durante a colite induzida por AA em camundongos, podendo este representar uma alternativa terapêutica promissora para pacientes com colite ulcerativa.

**Palavras-chave:** Colite Ulcerativa, Ácido acético, Polissacarídeo, *Glacilária Caudata*

## Abstract

**INTRODUCTION** - Seaweed is considered a source of bioactive molecules. Among these molecules are sulphated polysaccharides, widely used in the pharmaceutical industry and widely studied for their specific biochemical properties. The polysaccharide of the algae *Glaciaria Caudata* has some proven pharmacological effects, among which its anti-inflammatory action is highlighted. **OBJECTIVE** - To evaluate the antiinflammatory action of the sulphated polysaccharide of *Glaciaria Caudata* on the deleterious effects of acetic acid induced colitis in mice. **MATERIALS AND METHODS** - The polysaccharide used in this study was characterized by Barros et. Al. (2013), using techniques of elemental microanalysis, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). For the pharmacological studies Swiss camogongs weighing between 25-30 g were used, being divided into groups of 5-7 animals. Initially, colitis was induced in the animals using 6% acetic acid after 16 hours of fasting. After induction of colitis the animals were treated with PLS at the doses of (1, 3, 10 mg / kg, i.p.) and the dose with the best anti-inflammatory response set to be used in the subsequent experiments. Treatments with sulfated polysaccharide or dexamethasone (2 mg / kg, s.c.) were done 17 hours and 30 minutes after induction of colitis. The animals were euthanized after 18 h of induction of colitis, their abdominal cavities were opened and a 5 cm portion of the colon was removed from each animal, then the macroscopic parameters, wet weight and microscopic parameters of the lesion were evaluated. The tissue was then divided and stored in samples to perform the following tests: myeloperoxidase (MPO), interleukin 1 beta, glutathione (GSH), malondialdehyde acid (MDA). Parametric data were analyzed by the Newman-Keuls test and for the analysis of microscopic scores the Kruskal-Wallis test was used followed by the Dunn test. **RESULTS** - Based on the results, it was verified that the animals treated with this polysaccharide at the dose of 10 mg / kg demonstrated a satisfactory reduction of the intestinal lesion, as well as a decrease of the wet weight when compared to the AA group. PLS (10mg / kg, ip) *G. caudata* showed ability to reduce tissue damage such as loss of mucosal architecture 1 (1-1), cell infiltration 1 (1-1), thickening of the muscular layer 1 (1-1) and promoted a significant decrease for the crypt abscess 0 (0-0) and depletion of goblet cells 0 (0-0). The polysaccharide studied showed a significant reduction of the biochemical tests evaluated, such as leukocyte migration markers (myeloperoxidase), proinflammatory cytokine (IL-1 $\beta$ ) and in vivo oxidative stress markers (malonyldialdehyde acid and glutathione). **CONCLUSION** - *Glaciaria caudata* seaweed polysaccharide presented anti-inflammatory action and reduced oxidative stress during AA-induced colitis in mice, which may represent a promising therapeutic alternative for patients with ulcerative colitis.

key words: Ulcerative Colitis, Acetic acid, Polysaccharide, *Glaciaria Caudata*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido Acético

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

CO<sub>2</sub>- Gás Carbônico

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CU- Colite Ulcerativa

DC – Doença de Crohn

DEXA – Dexametasona

DIIs – Doenças inflamatórias intestinais

DTNB – Reagente de Ellman

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

G. caudata – *Glacilaria caudata*

GI- Gastrointestinal

GSH – Glutathiona

HE – hematoxilina e eosina

HTAB- Hexadeciltrimetilamônio

IL – Interleucina

MDA –Malondialdeído

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PLS – Polissacarídeo sulfatado

SAL- Salina

UV- Ultravioleta

## Lista de Figuras

	<b>Páginas</b>
Figura 1 - Tipos de Colite Ulcerativa.....	06
Figura 2 –Fisiopatologia da Colite Ulcerativa.....	12
Figura 03 - Alga marinha vermelha <i>Gracilaria caudata</i> .....	19
Figura 04 – Representação Esquemática do modelo de colite induzida por ácido acético adaptado.....	23
Figura 05 - Imagens representando os efeitos da fração do polissacarídeo extraído da alga <i>Gracilaria caudata</i> sobre os danos macroscópicos da lesão intestinal provocado pela colite induzida por AA em camundongos.....	31
Figura 6 – Fotomicrografia (10X, escala 50µm) representando os efeitos da fração do polissacarídeo extraído da alga <i>Gracilaria caudata</i> sobre os danos microscópicos da lesão intestinal provocado pela colite induzida por AA em camundongos.....	35

## Lista de Tabelas

### Páginas

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por ácido acético.....	24
Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.....	25
Tabela 3. Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Glacilária Caudata</i> sobre os parâmetros microscópicos de lesão intestinal provocada pela colite induzida por AA em camundongos.....	34

## Lista de Gráficos

	<b>Páginas</b>
Gráfico 1 - Escores macroscópicos dos tecidos intestinais 18 horas após a indução da colite por AA.....	30
Gráfico 2 – Avaliação do peso úmido de 5 cm de cólon após 18 horas da indução da colite por AA.....	32
Gráfico 3 – Atividade da MPO no intestino após 18h da indução da colite por AA.....	36
Gráfico 4 – Concentração de MDA no tecido intestinal após 18h da indução da colite por AA. ....	37
Gráfico 5 – Concentração de GSH no tecido cólon dos animais após 18h da indução da colite por AA.....	38
Gráfico 6 - Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da <i>Glacilaria caudata</i> sobre os níveis colônicos de IL-1 $\beta$ do camundongo com colite induzida por AA.....	39



## 1- INTRODUÇÃO

A colite ulcerosa (CU) e doença de Crohn, conhecidas coletivamente como doença inflamatória do intestino (DII), são as condições inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal (GI). Embora a etiologia permaneça em grande parte desconhecida, tem sido sugerido que uma combinação de fatores de predisposição genética e a ativação do sistema imune da mucosa em resposta luminal a antígenos bacterianos comensais, juntamente com a produção de citocinas patológicas persistentes contribuem para a iniciação e a cronicidade da DII (Podolsky, 2002; Baumgart, 2007; Liu, 2009).

Doença inflamatória intestinal é um problema urgente de saúde pública com uma alta incidência em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, nos quais o estilo de vida ocidental vem ocorrendo, tais taxas estão em ascensão e apontam para a influência ambiental na gênese da DII. As taxas de prevalência, incidência e mortalidade no Brasil ainda são desconhecidas, apesar de relatos regionais descreverem um aumento no número de casos novos de DC, se comparados ao de CU (Zaltman, 2007).

Embora os tratamentos convencionais possam ser eficazes na manutenção da remissão e diminuição do período de doença ativa, os tratamentos não são sem efeitos secundários e um número significativo de pessoas que sofrem de CU não conseguem responder até mesmo os medicamentos mais fortes ( Kathleen,2003).

Atualmente, não existe uma terapia eficaz para curar a doença, mas o tratamento convencional depende da redução da inflamação anormal no revestimento do cólon, e assim alivia os sintomas da doença. O tratamento depende da gravidade da doença, portanto, é ajustado para cada indivíduo (Botoman, 1998). Geralmente, consiste na administração aguda e manutenção com corticosteróides, aminossalicilatos, agentes imunomoduladores e antibióticos, os quais foram todos utilizados com um sucesso limitado (Langmead, et. al, 2004). Os objetivos principais da terapia médica para pacientes com CU são dirigidas para induzir e, em seguida, manter a remissão dos sintomas da

inflamação da mucosa e para proporcionar uma melhor qualidade de vida com a menor quantidade de exposição a esteróides (Yadav, 2009). As poucas modificações evolutivas da DII com o tratamento e o surgimento em indivíduos jovens tendem a provocar grande impacto na capacidade laborativa, qualidade de vida e nos aspectos sócio-econômicos dos pacientes e familiares (Zaltman, 2007). Nos últimos anos, os medicamentos à base de plantas têm sido usados no tratamento da CU e demonstrou ser eficaz na clínica.

No ambiente marinho, as algas representam um dos maiores grupos em termos de diversidade. Do total de 32.000 espécies conhecidas, pelo menos 820 táxons foram identificados ao longo da costa brasileira. Para sobreviver no ambiente aquático altamente competitivo, as algas de água doce e marinha têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos produzidos através de diferentes vias metabólicas. Isto faz das algas, organismos promissores como fonte de novos compostos bioquimicamente ativos (Soriano et al., 2011), incluindo os polissacarídeos (Loannou & Roussis, 2009; Wang, Ooi, e Ang, 2008).

Algas vermelhas produzem uma variedade de galactanas sulfatadas e são fontes ricas em polissacarídeos sulfatados (PLS) (Rees et. al, 1961). Estudos recentes têm mostrado que PLSs extraídos de algas marinhas vermelhas demonstraram efeitos antioxidante e antiinflamatório, (Silva, et. al, 2012; Brito, et. al, 2013) diminuem a produção e liberação de sequestradores de radicais livres e previnem danos oxidativos no organismo vivo (Souza, et. al, 2007).

Os Polissacarídeos Sulfatados (PS) da alga vermelha *Gracilaria caudata* demonstraram potencial anti-inflamatório/imunomodulador (CHAVES, 2013) e atividade gastroprotetora com ação antioxidante (SILVA, 2011), e baseado nessas evidências científicas, de maneira inédita, o presente trabalho objetivou estudar os efeitos do PIs da *G. caudata* em modelo de colite induzida por AA em camundongos.

Considerando que as algas marinhas são importantes fontes de novas substâncias químicas com um potencial terapêutico, a avaliação do efeito anti-inflamatório da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha

vermelha, *Gracilaria caudata* durante a colite experimental induzida por ácido acético pode representar uma ferramenta terapêutica promissora para pacientes com CU.

## **2- REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Doenças inflamatórias intestinais**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem a Colite Ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DC). Caracterizam-se por processos inflamatórios crônicos e recidivantes do trato gastrointestinal (Esberard, 2012). A marca registrada da DII é a inflamação crônica e descontrolada da mucosa intestinal (Papadakis, 2005), que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal. O diagnóstico baseia-se na presença de distorção arquitetônica (por exemplo, infiltração granulomatosa irregular superficial) e células inflamatórias agudas. No entanto, inflamação crônica sem qualquer anormalidade diagnóstica também pode ser uma característica do intestino normal. O que distingue a DII das respostas inflamatórias observadas no intestino normal é a incapacidade de regular essas respostas. Em pessoas saudáveis, o intestino torna-se inflamado em resposta a um potencial patogênico, em seguida, retorna a um estado de tolerância, uma vez que o agente patogênico é erradicado do intestino. Em indivíduos com DII, contudo, a inflamação não é regulada, o sistema imune da mucosa permanece cronicamente ativado e o intestino permanece cronicamente inflamado (Hanauer, 2006).

Não existe uma causa conhecida, é provável que uma série de fatores contribuam para o desenvolvimento da inflamação da mucosa. Já se sabe que o processo inflamatório recorrente é resultado da conjugação de fatores relacionados ao conteúdo do canal alimentar (antígenos bacterianos e/ou alimentares e aumento na permeabilidade intestinal a esses produtos) e da alteração na resposta imunológica da mucosa, geneticamente determinada (Fiocchi, 1998; Korzenick, 2006).

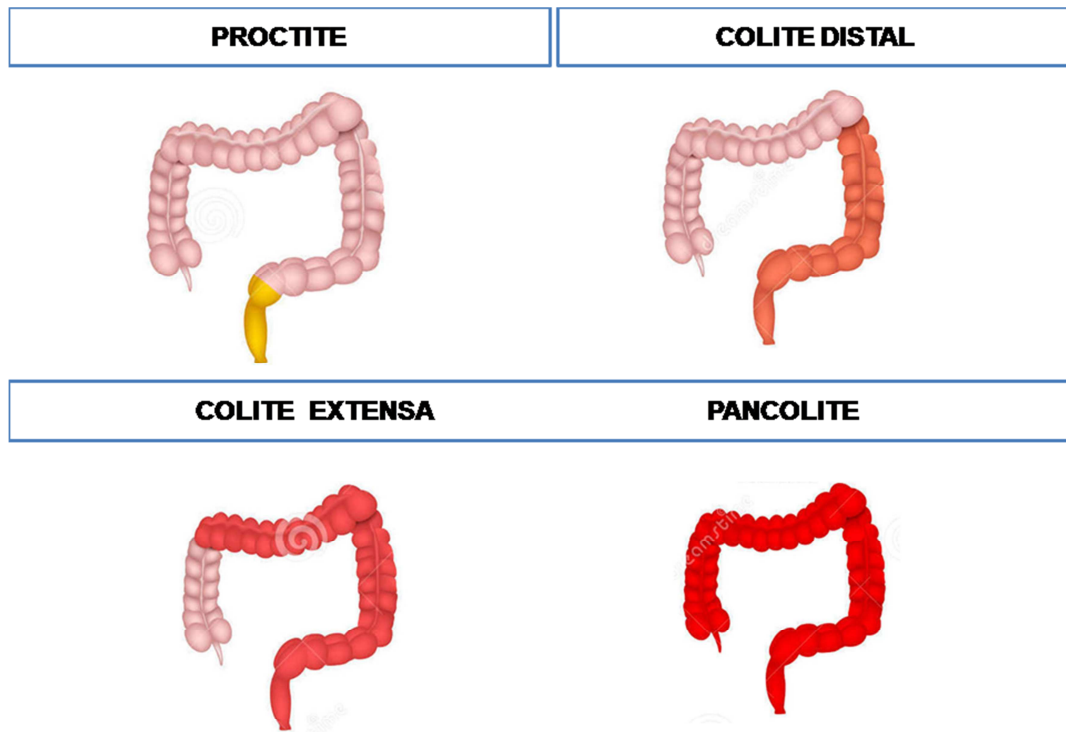
A CU é uma condição inflamatória crônica do trato gastrointestinal humano, afetando principalmente o cólon e o reto. É uma doença intermitente, com períodos de sintomas exacerbados e fases relativamente sem sintomas. Problemas associados à CU incluem diarreia sanguinolenta, úlceras de cólon, perda de peso e, em longo prazo, aumento do risco de câncer de cólon e patologias desconhecidas. (Xavier; Podolsky, 2007). A infiltração de

polimorfonucleados é considerada como a lesão primária e central da colite, a qual é geralmente seguida pela perda do epitélio, perda de células caliciformes e dano da cripta (Pile et al., 2012). A doença de Crohn é uma condição recorrente, inflamatória transmural que acomete a mucosa ou todas as camadas do intestino, podendo afetar todo o trato gastrointestinal da boca ao ânus. As suas manifestações clínicas resultam de uma infiltração substancial de leucócitos ativados para a mucosa intestinal tendo como consequência um processo inflamatório crônico (MARKS et al., 2010).

### **2.1.2- Colite Ulcerativa**

A Colite Ulcerativa é definida, segundo o Consenso Europeu, baseado em evidência para o diagnóstico e manutenção da colite ulcerosa, da European Crohn's and Colitis Organization (ECCO), como uma doença crônica inflamatória, remittente e recidivante, que apresenta inflamação contínua, concêntrica e confluyente da mucosa do cólon, com ausência de granulomas nas biópsias, afetando o reto e uma extensão variável do cólon em continuidade (Stange et al., 2008).

As principais características da colite ulcerativa incluem inflamação difusa na mucosa que se estende da proximal do reto para um grau variável. Conjuntamente com inflamação grave e a produção coincidente de uma mistura complexa de mediadores inflamatórios, desenvolve-se uma ulceração superficial extensa da mucosa. As características histopatológicas incluem a presença de um número significativo de neutrófilos na lâmina própria e nas criptas, onde formam micro-abscessos (Xavier, 2007). Pode ser classificada em proctite, na qual apenas está envolvido o reto; colite distal ou colite esquerda, em que a doença se estende para além do reto mas não ultrapassa o ângulo esplênico do cólon; e pancolite ou colite extensa, quando se estende para além do ângulo esplênico do cólon (Figura 1) (Silverberg et al., 2005).



Fonte: Adaptado. Disponível em: [http://it.123rf.com/photo\\_37565508\\_tipi-di-colite-ulcerosa-il-diagramma-mostra-i-tipi-di-uc-dal-proctite--che-coinvolge-solo-il-retto--.html](http://it.123rf.com/photo_37565508_tipi-di-colite-ulcerosa-il-diagramma-mostra-i-tipi-di-uc-dal-proctite--che-coinvolge-solo-il-retto--.html)

Figura 1- Tipos de Colite Ulcerativa.

O início da doença geralmente é gradual (Danese and Fiocchi, 2011) com sintomas presentes durante semanas e, por vezes, meses sem que o doente recorra ao médico (Stange et al., 2008). No entanto, 15% dos doentes têm sintomas iniciais insidiosos, apresentando crises severas com sintomas generalizados (Stange et al., 2008).

Os sintomas manifestados dependem do local do trato gastrointestinal afetado. Assim, quando só há atingimento do reto o doente apresenta urgência fecal, sangramento retal e, paradoxalmente, episódios de obstipação (Danese & Fiocchi, 2011). Quando a doença se estende ao cólon o doente refere diarreia, dejeções frequentes com sangue e muco, urgência fecal e tenesmo, dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso, dependendo da severidade da doença (Stange et al., 2008). Os sintomas expressos também dependem das

manifestações extra-intestinais (MEI), que estão presentes em 31% dos doentes (Vavricka et al., 2011), as quais podem atingir articulações, pele, fígado, olhos, boca e mecanismos da coagulação (Danese & Fiocchi, 2011).

A condição parece estar relacionada a uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Varreduras de genoma completo encontraram genes de suscetibilidade para CU nos cromossomos 1 e 4, embora estes loci não tenham sido uniformemente confirmados (Rutgeerts, 2001).

Para o diagnóstico de CU, utiliza-se a combinação da história médica com a avaliação clínica, achados endoscópicos, histológicos e procedimentos laboratoriais. O estudo genético não é aconselhado como forma de diagnóstico, uma vez que a CU é uma doença multifatorial e as mutações genéticas já identificadas não são suficientes para causar a doença, nem a sua ausência é suficiente para proteger da doença (Stange et al., 2008).

### **2.1.3 Epidemiologia**

A incidência das DIIs sofre diferenças geográficas e étnicas, sendo mais comum em brancos e na população originária do Norte da Europa, e um pouco menos comum na América do Sul, União Soviética e Japão (Corman, 2005). São doenças que geram repercussões importantes na qualidade de vida dos portadores (Pontes, 2004). A incidência da CU vem apresentando significativo aumento desde a Segunda Guerra Mundial, sobretudo ocorrendo incremento em áreas onde previamente àquele período havia baixas taxas da doença, tais como Europa Oriental, Ásia e países em desenvolvimento (Bernstein et al., 2010).

À medida que os países tornam-se industrializados a incidência de CU aumenta, seguida da DC, tal como aconteceu no Japão, Singapura e Coreia do Sul. Em África, América Central e América do Sul os dados são escassos ou não estão disponíveis (Cosnes et al., 2011). A industrialização está associada a um conjunto de potenciais fatores de risco ambientais para a DII (Berner and Kiaer, 1986, Molodecky et al., 2012).

Quando a DII é identificada numa nova população, a CU precede a DC e tem uma maior incidência (Danese and Fiocchi, 2011), com algumas exceções

como Canadá e Austrália. A incidência anual (número de novos casos em 100 000 habitantes) de CU na Europa varia entre 0.6 e 24.3, 0.1 e 6.3 na Ásia e Médio Oriente, e varia entre 0 e 19.2 na América do Norte. Nos países ocidentais a incidência de CU aumentou de 8 para 14 em 100 000 pessoas, quanto à prevalência da CU, em 100 000 pessoas, aumentou de 120 para 200 (Cosnes et al., 2011).

Na CU também há maior incidência em adultos jovens, com pico entre a terceira e quarta décadas, mas as taxas de casos novos continuam elevadas entre a terceira e sétima décadas, sobretudo na população masculina (Bernstein et al., 2010; Binder, 2004). Há tendência do crescimento de suas incidências, inclusive no Brasil, embora sejam escassos os estudos sobre a ocorrência da CU nos países em desenvolvimento, principalmente no nordeste brasileiro (Salviano, 2007).

Durante muitos anos, as DII foram consideradas como exclusivas da América do Norte e Europa. Sua incidência vem apresentando um crescimento aparente na América do Sul, à medida que aumenta a capacidade dos médicos diagnosticarem a doença. A maioria das informações sobre as DII tem sido acumulada em países do Primeiro Mundo onde a prevalência da doença é maior. No Brasil, onde a prevalência oficial das DII ainda é baixa há pouca informação na literatura. Aumento significativo da incidência das DII em nosso meio tem sido registrado nas Regiões Sul e Sudeste (Quilici, 2007). Embora seja considerada região de baixa prevalência, a realidade no Brasil pode ser diferente, pois não existem registros públicos de saúde eficazes sobre as DII. Essas doenças não são classificadas, como de notificação compulsória, e as anotações nos prontuários dos pacientes e nos arquivos dos serviços de saúde são inadequadas (Souza, 2011).

#### **2.1.4 Etiopatogenia da Colite Ulcerativa**

A causa exata da colite ulcerativa permanece indeterminada, mas as atuais teorias etiológicas se concentram em fatores ambientais, fatores genéticos, defeitos imunoregulatórios e exposição microbiana. (Hanauer, 2006)



Os fatores ambientais estão relacionados com a "ocidentalização" do estilo de vida, como mudanças na dieta, tabagismo, variações na exposição à luz solar, poluição e produtos químicos industriais. O fator de risco ambiental mais importante para DII é o tabagismo, particularmente entre os consumidores de cigarros. O tabagismo pode influenciar o curso da colite ulcerativa. Em um estudo, fumantes franceses com colite ulcerativa que pararam de fumar tiveram mais atividade doença, mais hospitalizações e maior necessidade de corticosteróides ou azatioprina em comparação com aqueles que continuaram a fumar (Beaugerie, 2001). A nicotina pode aliviar os sintomas da CU por inibir a produção das células T-helper 2 (Th2), que estão presentes na patogênese dessa doença (Sartor, 2006; Higuchi, et al., 2012).

Fatores genéticos podem contribuir para a patogênese da doença. A varredura em todo o genoma com marcadores de DNA de microssatélites identificou vários sítios genéticos como sendo potencialmente associados com CU ou DC, relatados nos cromossomos 1, 3, 6, 7, 12, 14, 16 e 19 (Hendrickson, 2002). Estudos indicam que há uma maior taxa de incidência em gêmeos monozigóticos versus dizigóticos tanto para CU como DC. Estes estudos também mostram que a taxa de incidência para CU é muito menor do que para DC. Para a CU, as taxas de incidência relatadas para gêmeos monozigóticos e dizigóticos variam de 6% a 17% e 0% a 5%, respectivamente (Satsangi, 2003; Tysk, 1988; Subhani, 1998).

Os defeitos imunorregulatórios na mucosa parecem estar associados à exposição microbiana. Os modelos de camundongos demonstram que a colite não se desenvolve em linhagens mutantes mantidas em um ambiente livre de germes (Sartor, 1999). Quando uma única carga bacteriana comensal ou mista é introduzida, isso resulta rapidamente em inflamação da mucosa (Rath, 2001). Em pacientes com CU, os gatilhos são possivelmente antígenos epiteliais ou aeróbios funcionalmente alterados (Sartor, 1999).

### **2.1.5 Fisiopatologia da Colite Ulcerativa**

Entre os achados patológicos associados à CU estão um aumento de certos mediadores inflamatórios, sinais de estresse oxidativo, ambiente colônico perturbado, conteúdo glicosaminoglicano anormal (GAG) da mucosa, aumento da permeabilidade intestinal ( Kathleen,2003).

No processo inflamatório, os neutrófilos desempenham um papel central e respondem antecipadamente a todos os tipos de agressão. Durante a resposta imune inata inicial, eles são vistos passando da circulação através de lacunas no endotélio vascular para infiltrar os tecidos. Uma vez lá, os neutrófilos libertam peptídeos antimicrobianos e intermediários de oxigênio reativos que podem por si mesmos causar danos teciduais adicionais. Os neutrófilos também recrutam e ativam outros glóbulos brancos (por exemplo, macrófagos) através da produção de quimiocinas e das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF)-a, interleucina (IL) -1b, IL-6 e IL-8 (Cassatella, 1995). O dano tecidual característico e a formação de granulomas podem ser em parte o resultado final da migração e de granulação de neutrófilos. Existem evidências de que o braço mediado por células da resposta imune adaptativa que ocorre na CU segue a via de um fenótipo TH2 excessivo (Podolsky, 2002; Bouma, 2003; Neurath, 2002; Fuss, 2004).

A CU é uma condição associada a uma resposta Th-2 atípica, onde IL-12 e IL-23 estimulam a diferenciação das células T em Th-2, Th-17 e NK, com produção aumentada de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17 (Esberard, 2012).

O perfil de citocinas em pacientes com CU fornece mais evidência de uma resposta Th2 exagerada - interleucina 5 elevada (IL-5), mas sem elevação significativa de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e outras citocinas associadas a uma resposta Th1 hiperativa (Blumberg, 2001). Outras citocinas associadas com inflamação generalizada - IL- 1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são encontradas elevadas em condições inflamatórias do intestino (MacDonald ,1994).

Especula-se que a inflamação da mucosa pode resultar de um defeito nas células T maduras, nas células TH3 e T reguladoras 1 (TR1), células supressoras que produzem o fator de crescimento transformante (TGF) -b, IL-10 e outras proteínas imunoinibidoras de citocinas. Tal defeito precipitaria a perda de

tolerância aos antígenos comuns na microflora da mucosa, resultando na proliferação e produção de citocinas inflamatórias. Em apoio a isto, estudos experimentais mostram que ratos deficientes em IL-10 desenvolvem colite, enquanto que o fornecimento de TGF- $\beta$  ou IL-10 melhora a colite. (Abreu, 2002)

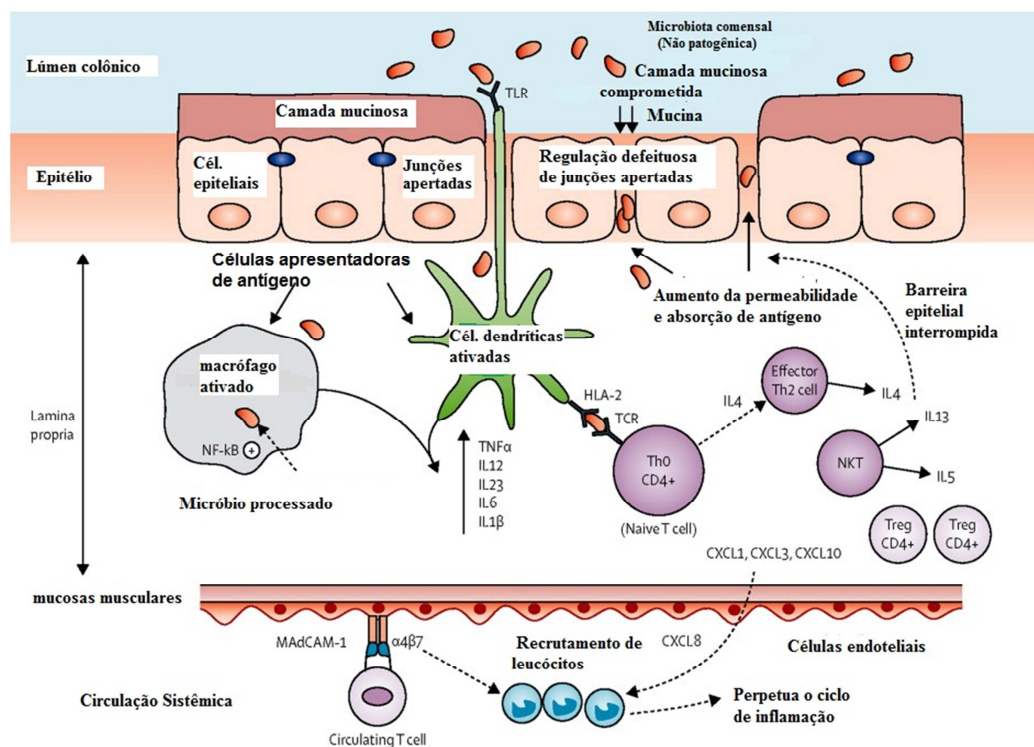
Modelos animais de colite têm produzido evidências da condição mediada por Th2. Num modelo de ratos, as respostas de citocinas Th2 resultaram em alterações atróficas difusas nas criptas e na camada mucosa. Os autores concluem que no modelo animal as respostas Th2 induzem lesões semelhantes à CU (Dohi, 2000).

A CU está associada a uma maior permeabilidade do revestimento epitelial do intestino resultando numa estimulação contínua do sistema imunitário da mucosa. Tem sido sugerido que este pode ser o defeito primário em indivíduos com DII. Estudos em animais mostram uma tendência para o desenvolvimento de inflamação grave em áreas do intestino que se encontram sob o defeito de permeabilidade (Bouma, 2003). Bactérias Luminais parecem intensificar o defeito de permeabilidade ainda mais, estabelecendo um ciclo auto-sustentável de inflamação da mucosa que permite a captação e translocação de bactérias (Farrel, 2002).

Os produtos bacterianos atravessam a barreira mucosa e, em seguida, entrarão em contato direto com as células imunes, resultando em uma clássica resposta imune adaptativa (Podolsky, 2002; Abreu, 2002). Uma variedade de citocinas inflamatórias são produzidas, recrutando células adicionais na parede intestinal. Estas incluem citocinas que reduzem as junções apertadas entre as células endoteliais na vasculatura intestinal, o que por sua vez facilita o recrutamento de neutrófilos para a mucosa a partir do sangue periférico (Podolsky, 2002).

A interrupção de junções apertadas e a camada de muco cobrindo a camada epitelial provoca uma maior permeabilidade do epitélio intestinal, resultando numa absorção aumentada de antígenos luminiais. Os macrófagos e células dendríticas (células imunes inatas), no reconhecimento de bactérias não patogênicas (microbiota comensal) através de receptores de reconhecimento de

padrões moleculares (TLR), mudam seu status funcional de tolerogênico para fenótipo ativado. A ativação das vias NF- $\kappa$ B estimula a transcrição de genes pró-inflamatórios, resultando em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , interleucinas 12, 23, 6 e 1 $\beta$ ). Após processamento de antígenos, os macrófagos e as células dendríticas os apresentam a células T CD4 ingênuas, promovendo a diferenciação em células efetoras de Th2, caracterizadas pela produção de interleucina 4. As células T NK são a principal fonte de interleucina 13, que tem sido associada com a ruptura da barreira celular epitelial. As células T circulantes que possuem integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 ligam-se às células endoteliais colônicas da microvasculatura através da molécula 1 de adesão de células endoteliais vasculares da mucosa, cuja expressão é aumentada no intestino inflamado, conduzindo a uma entrada aumentada de células T específicas do intestino na lâmina própria. A regulação ascendente de quimiocinas inflamatórias, tais como CXCL1, CXCL3 e CXCL8, leva ao recrutamento de leucócitos circulantes que perpetua o ciclo de inflamação (Figura 2) (Ordás, 2012).



Fonte: Adaptado de Órdas, 2012.

Figura 2 - Fisiopatologia da Colite Ulcerativa

### 2.1.6 Terapêutica da Colite Ulcerativa

O tratamento clínico da CU é complexo devido ao limitado conhecimento dos eventos imunológicos e inflamatórios subjacentes e à falta de padrão ouro para mensurar a atividade da doença. Até o momento, a intervenção terapêutica concentra-se, sobretudo, no combate às conseqüências geradas pela ampliação das cascatas imunológicas e inflamatórias e nas repercussões sistêmicas geradas como conseqüências (Amaral, 2001). As medidas terapêuticas dependem da forma, extensão e gravidade da doença (Souza, 2011).

Os fármacos convencionais para a colite ulcerativa incluem aminosalicilatos, corticosteróides, antibióticos e imunomoduladores. Os protocolos mais comuns incluem aminosalicilatos para a manutenção da remissão e corticosteróides durante episódios agudos (Kathleen,2003). Os avanços na compreensão da patogênese da CU introduzem a possibilidade de terapia direcionada para interromper a cascata inflamatória (Hanauer, 2006) e muitas vezes requer um tratamento de longo prazo baseado em uma combinação de drogas para controlar a doença, sendo possível ocorrer interações medicamentosas e efeitos colaterais (Guideline DII, 2015).

Um estudo demonstrou que o anticorpo anti-IL-12 evitou a colite induzida em animais, sugerindo que esta citocina também tenha importante papel na patogênese da doença (Bauditz; Wedel; Lochs, 2002). Uma outra estratégia terapêutica é o uso do ácido 5-aminosalicílico, sua ação consiste no bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos inibindo a liberação de peptídeos bacterianos que são capazes de induzir a migração de neutrófilos (Podolsky, 2002).

O uso de ciclosporina pode ser efetivo no tratamento de colites ulcerativas severas, em pacientes hospitalizados que necessitam de proctocolectomia. Este agente age, provavelmente, pelo bloqueio da ativação dos linfócitos. O mecanismo de ação parece ser a transcrição inibida de interleucina-2 e de seu receptor nos linfócitos T auxiliares e a produção de fatores que ativam as células B e de interferon-gama pela células T auxiliares. Altas doses podem alcançar o

controle da doença. É indicada quando a terapia com altas doses de corticosteróides não alcançou resultado (Cohen,1999; Hermida-Rodrigues, 1999; McCormack, 2002). A budesonida tem sido usada sob a forma de enemas com bons resultados para o tratamento de colite distal (Lindgren, 2002).

Até o momento os fármacos utilizados no tratamento da CU possuem muitos efeitos adversos e na maioria das vezes não aliviam a queixa principal, que é o desconforto abdominal acompanhado de muitas dores intestinais. Na última década, muitos estudos foram realizados e novas vias inflamatórias foram descritas influenciando no entendimento e desenvolvimento de novas drogas (Souza, 2011), principalmente as de origem natural, que possam melhorar esta condição causando o mínimo de efeito adverso e trazendo qualidade de vida ao paciente, devem ser estudadas.

## **2.2 ALGAS MARINHAS: Conceito e Aplicação biológica**

As algas são os organismos aquáticos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). As algas, por serem organismos fotossintetizantes, são responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, possibilitando a vida de todos os seres vivos aeróbicos sobre a superfície do planeta pela produção de oxigênio molecular e a consequente formação da camada de ozônio que filtra os raios ultravioletas (UV). São organismos eucariotos que apresentam clorofila a e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas. No ambiente aquático, as algas podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água) (Horta, 2000).

As algas marinhas apresentam importância, tanto sob o ponto de vista econômico, como ambiental e social. As algas podem realizar a manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, que pode ser utilizada pela humanidade como fonte de alimento e de matéria-prima. Algumas espécies são empregadas como indicadoras da qualidade dos sistemas aquáticos para os quais, inclusive, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos gêneros de algas presentes: quanto menos diversificada a população, maior a poluição do sistema (Vidotti e Rollemberg,

2004). As macroalgas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais como parte importante de sua dieta alimentar e assumem grande significado social e econômico em vários países da Ásia, os quais podem responder por até 98% da produção mundial de algas (Rocha, 2001).

As macroalgas ocorrem em todo o globo e sendo a base da cadeia alimentar, serve como fonte de nutrientes para uma grande variedade de organismos aquáticos. Elas são os principais consumidores de nitrato e CO<sub>2</sub> e liberam uma grande quantidade de oxigênio para a atmosfera via fotossíntese. Consequentemente, as algas desempenham um papel vital na manutenção do equilíbrio marinho e preservação da biodiversidade. Algas e produtos de algas também têm um impacto econômico em vários setores, como na aquicultura, na indústria farmacêutica, nutracêutica, biomedicina, medicina veterinária e indústria de cosméticos (Soriano et al., 2011).

As Algas são expostas a luz e ao oxigênio molecular, que são responsáveis pela formação de diversos agentes oxidativo e espécies de radicais livres. Ausência de danos oxidativos nos componentes estruturais destas espécies, sugeriu a presença de metabólitos bioativos com os sistemas de defesa antioxidantes em seu sistema celular (Escrig, Jiménez-Jiménez, Pulido, & Saura-Calixto, 2001). Muitos investigadores estabeleceram que algas são ricas em compostos com propriedades de eliminação de radicais livres (Wang, Zhang, Duan, & Li, 2009;. Zubia et al, 2009), que podem agir contra a oxidação lipídica em alimentos, estresse oxidativo em tecidos alvo e mostram um grande potencial como agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiviral e drogas anti-tumorais (Souza et al, 2012;. & Chakraborty Paulraj, 2010).

Apenas três tipos de compostos encontrados em algas são explorados comercialmente: (1) alginatos, o ácido manurônico e o ácido gulurônico contendo polímeros a partir de algas pardas; (2) ágar, a D-galactose e o 3,6-anidro-L-galactose contendo polímeros que são isolados a partir de algas vermelhas, e (3) carragenas (Campo et al., 2009).

As algas são divididas em algas vermelhas (*Rhodophyta*), pardas (*Phaeophyta*) e verdes (*Chlorophyta*) (Vidotti e Rollemberg, 2004). Os gêneros mais importantes compreendem *Porphyra*, *Chondrus*, *Rhodymenia*, *Hypnea*, *Gracilaria*, *Laurência*, *Iridae* (vermelhas); *Undaria*, *Durvillaea*, *Ecklonia*,

*Sargassum*, *Turbinaria* (pardas); *Ulva*, *Enteromorpha*, *Monostroma* e *Gaulerpa* (verdes) (Dhargalkar e Verlecar, 2009).

As rodófitas ou algas vermelhas constituem o grupo com o maior número de espécies na costa brasileira. As rodófitas são quase exclusivamente macroscópicas, sendo organismos de portes médios ou grandes, possuem um conteúdo razoável de biomassa. Os produtos naturais de algas vermelhas caracterizam-se pela grande abundância de substâncias com atividade biológica (Repka et al., 2004). Estes compostos estruturalmente bioativos são importantes fontes de novas substâncias. E relatos de diversos pesquisadores afirmam que as algas marinhas são fontes de compostos que exibem várias atividades biológicas relevantes (Wijesekara; Kim, 2010; Wijesekara; Yoon; Kim, 2010).

Os dados descritos na literatura evidenciam o grande potencial das algas marinhas como fontes naturais de ingredientes funcionais. Os compostos biologicamente ativos podem ser largamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (Cabral, et. al., 2011).

### **2.3- Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas Vermelhas**

O interesse crescente por produtos naturais que possuem funções farmacológicas tem contribuído significativamente para a descoberta de substâncias com aplicações terapêuticas (Barbosa, et al., 2008; Correa, et al., 2008). Portanto, algas marinhas tornaram alvo de estudos por serem fontes valiosas de diversos bioativos estruturalmente compostos como os carotenóides, pigmentos, polifenóis, enzimas, (Giulietti et al., 2005; Pereira et al., 2014) e diversos polissacarídeos sulfatados, que são reconhecidos como tendo uma série de atividades biológicas, incluindo gastroprotetora (Silva, et al., 2011), anti-inflamatória (Cumashi, et al., 2007) e atividades antinociceptivas (Rocha, et al., 2006), o que pode dar-lhes relevância em aplicações farmacêuticas.

As algas vermelhas são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados, como as carragenas e o ágar que chegam a representar mais de 70% do seu peso e têm razoável valor comercial (Van den hoek, Mann e Jahns, 1997). Carragenas são polissacarídeos sulfatados lineares de D-galactose e 3,6-anidro-D galactose, extraídos de certas algas vermelhas da classe *Rhodophyceae*. Têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia, como espessante, geleificante



e proteína-agente de suspensão, e pela indústria farmacêutica como excipiente em comprimidos. Além das atividades biológicas conhecidas relacionadas com inflamação e respostas imunes, carragenas são potentes inibidores dos vírus da herpes e do papiloma humano (HPV) e há indícios de que possam oferecer alguma proteção contra a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Buck *et al.*, 2006).

Algas marinhas vermelhas biossintetizam principalmente polissacarídeos sulfatados (PLS), polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituídos de unidades repetitivas alternadas de  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) D-galactose e  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  3) D-galactose dotados de radicais sulfatos, os quais são componentes da matriz extracelular e de grande aplicação em biotecnologia (Araújo *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2008; Campo *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009), sobretudo devido à sua biocompatibilidade e atoxicidade (Farias, 2014).

Modelos de estudo *in vivo* com PLS de algas marinhas vermelhas indicam resultados promissores em que demonstraram efeito protetor contra dano intestinal através de mecanismos que envolvem a inibição da infiltração de células inflamatórias, de liberação de citocinas, peroxidação lipídica (Brito, 2014) e resposta inflamatória reduzida do cólon induzida pela administração de TNBS, através da inibição de migração de células para o tecido inflamado e a redução do processo oxidativo (Brito, 2016).

Os polissacarídeos sulfatados têm atraído a atenção de pesquisadores, pois estão envolvidos em numerosos processos celulares e possuem uma gama de atividades farmacológicas (Silva, *et al.*, 2011). Estes compostos de macromoléculas complexas encontrados na matriz extracelular desempenham um papel importante na regulação mecânica, osmótica e iônica (Kloareg, 1988 ; Rocha, *et al.*, 2006). No Brasil, várias espécies do gênero *Gracilaria*, incluindo *Gracilaria caudata*, prosperam em regiões costeiras.

## **2.4 - Propriedades Farmacológicas de Polissacarídeos do gênero *Gracilaria***

O gênero *Gracilaria Greville* (Rhodophyta, *Gracilariales*) inclui cerca de 100 espécies amplamente distribuídas no mundo (Oliveira & Plastino 1994) é

amplamente difundida em regiões tropical e temperada e é um dos maiores gêneros na família *Gracilariaceae* (Marinho-Soriano & Bourret, 2005). Várias espécies de *Gracilaria* são encontradas no Brasil e compreendem macroalgas marinhas vermelhas mais utilizadas para fins comerciais em todo o mundo. A exploração dessas algas deve-se principalmente à produção do polissacarídeo ágar, de elevado valor comercial, associado à rápida taxa de crescimento, facilidade de reprodução vegetativa e outros atributos facilitadores de seu cultivo (Kain; Destombe, 1995).

Polissacarídeos do gênero *Gracilaria* são compostos principalmente por resíduos alternados de 3-ligado-d-galactopirranose (Unidade G) e 4-ligado-3,6-anidro-L-galactopirranose (unidade LA) (Araki, 1966). Vários grupos hidroxilo podem ser substituídos por éster sulfato, grupos metil e ácido pirúvico com a sua posição variando de espécie para espécie. As possíveis mudanças estruturais afetam as propriedades físicas e reológicas destes polímeros (Andriamanantoanina, Chambat, e Rinaudo, 2007; Freile-Pelegrin & Murano, 2005; Lahaye, 2001; Lahaye & Rochas, 1991; Lahaye & Yaphe, 1988; Melo, Feitosa, Freitas, & de Paula, 2002; Usov, 1998; Valiente, Fernandez, Perez, Marquina, & Velez, 1992).

As galactanas sulfatadas tipo ágar têm sido consideradas importantes fontes de atividades biológicas, como a atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado tipo ágar extraído da alga *Gracilaria corticata* (Mazumder et al., 2002), a atividade estimuladora de macrófagos do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria verrucosa* (Yoshizawa et al., 1996) e a atividade antitumoral do polissacarídeo tipo ágar de *Gracilaria domingensis* (Fernandez et al., 1989).

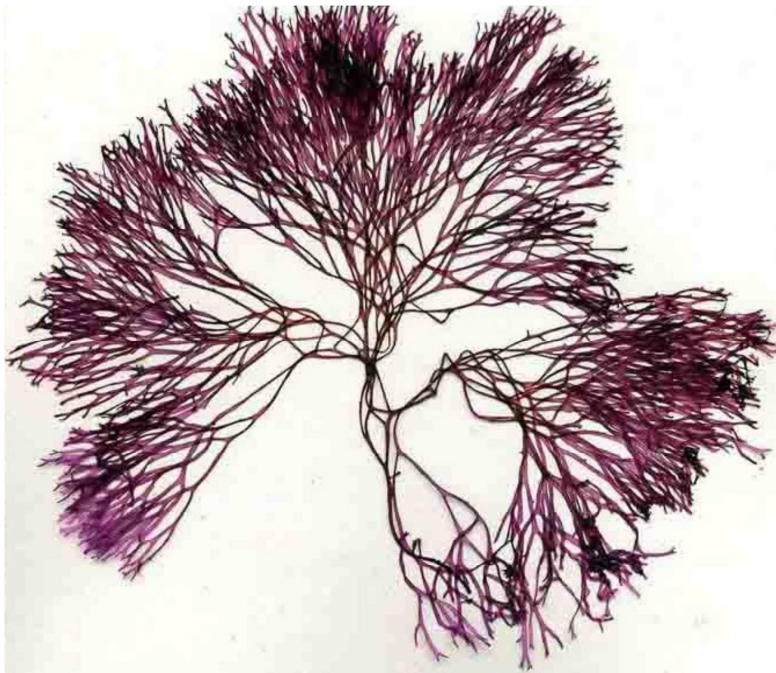
## **2.5 - *Glacilária Caudata***

As espécies *G. caudata* J. Agardh é uma alga que cresce naturalmente ao longo da costa brasileira, em particular no nordeste, onde são recolhidas e vendidas por pescadores para a extração de ágar. Portanto, o crescente interesse comercial e científico em agar de *Gracilaria* exige uma elucidação química destes polímeros e um melhor conhecimento da relação entre propriedades moleculares,

estruturais e funcionais ( Murano,1995; Silva et al, 2011.; Coura et al, 2012; Souza et al., 2012).

O polissacarídeo isolado a partir de *G. caudata* é um tipo de polissacarídeo de ágar composto principalmente de pelo -D-galactopiranosose ligada a 3,6 - Anidro - L-galactose, com metilo ou grupos piruvato substituído em C-6 de D-galactose ( Barros et. al., 2013).

Estudos realizados em modelos in vivo com PLS *G.caudata* resultaram em efeitos terapêuticos promissores. Demonstraram atividade anti-inflamatória por reduzir a migração de neutrófilos e a concentração de citocinas em modelo de edema em pata de ratos (Chaves et al., 2013), atividade protetora contra lesões gástricas induzidas por etanol em ratos através da ativação da via NO / KATP e devido à queda da produção de radicais livres e peroxidação de lípidos (Silva et. al., 2011) e atividade antidiarréica (Costa et. Al., 2016). Assim, demonstrando seu potencial efeito terapêutico biológico em doenças de aspecto inflamatório.



Fonte: Costa, 200

Figura 03. Alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*.

### 3- OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

- Avaliar a ação anti-inflamatória da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* durante a colite experimental induzida por ácido acético.

#### Objetivos específicos

- Averiguar o efeito do PLS sobre os parâmetros macroscópicos e microscópicos no cólon de camundongos na colite experimental induzida por ácido acético;
- Analisar a ação do PLS sobre o peso úmido e da relação peso/comprimento do cólon na colite experimental induzida por ácido acético em camundongos;
- Avaliar a ação do PLS na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na colite em camundongo;
- Avaliar a ação do PLS nos indicadores de peroxidação lipídica, tais como malondialdeído e glutatona no cólon de camundongos;
- Averiguar a ação do PLS sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias na colite em camundongos;

## **4- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1-Fração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria caudata***

A alga marinha vermelha foi coletada durante maré de sizígia, na praia do Pacheco, município de Caucaia – CE. O extrato seco dos Polissacarídeos Sulfatados (PLS) da alga marinha *Gracilaria caudata*, foi cedido pelo Laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A análise química foi realizada por microanálise, espectroscopia infravermelha e ressonância magnética nuclear (Barros et. al., 2013). O PLS foi utilizado como droga na colite experimental induzida por ácido acético em camundongos.

### **4.2- Animais utilizados para os protocolos experimentais sugeridos**

Para este estudo foram utilizados 42 camundongos Swiss machos (25–30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Piauí. Dezesesseis horas antes, em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água.

### **4.3- Padronização do modelo de colite ulcerativa experimental**

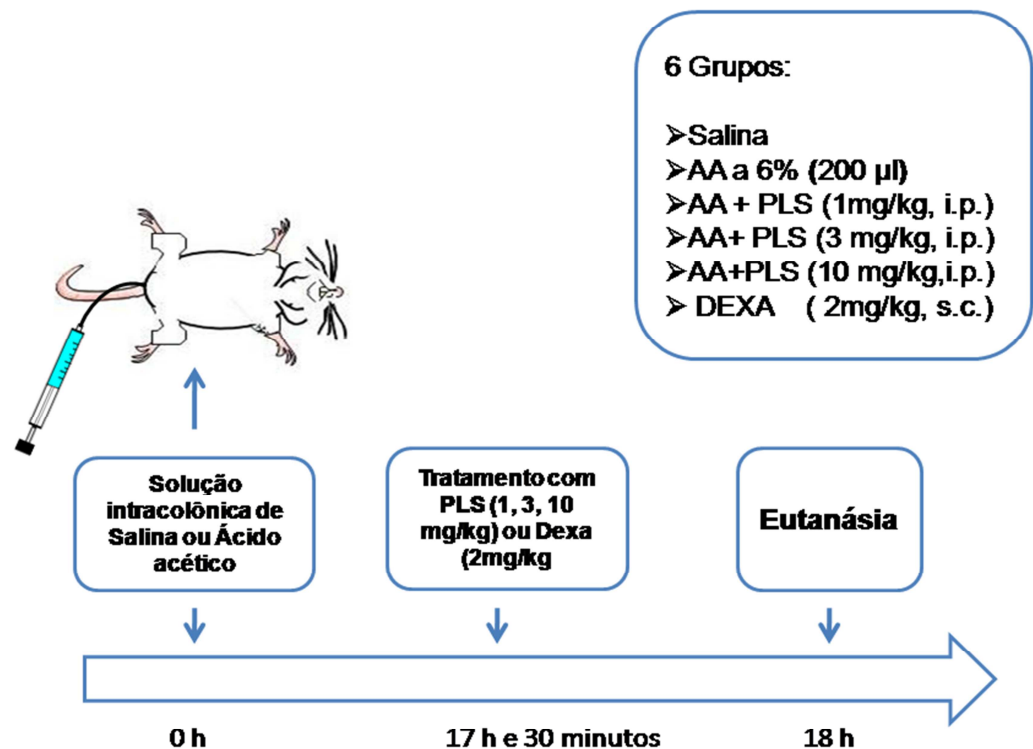
#### **4.3.1- Modelo de Colite induzido por ácido acético adaptado**

A colite foi induzida de acordo com método descrito por Guazelli (2013) com modificações. Inicialmente, os animais passaram por um processo de preparação do cólon, permaneceram em jejum durante 16 horas recebendo somente água *ad libitum*. Posteriormente, foram submetidos à limpeza do cólon por enema com 100 µL de solução salina. Para a indução da colite os animais

foram previamente anestesiados com Quetamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, uma sonda uretral de polietileno nº 6 medindo 3 cm de comprimento para a administração de uma única dose intracólon de solução salina ou solução aquosa de ácido acético a 6% no volume de 200 µL. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções.

Uma hora antes da indução da colite os animais foram divididos em seis grupos (7 animais por grupo). O grupo 1 controle negativo, os animais receberam intracólon uma solução salina (200 µL), o Grupo 2, recebeu ácido acético a 6% intracólon e os outros quatro destes seis grupos foram tratados da seguinte forma: dexametasona (2 mg/kg) por via sub cutânea (s.c.); PLS nas doses 1 mg/kg, 3 mg/kg e 10 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.).

Os tratamentos com o polissacarídeo sulfatado nas doses de (1, 3, 10 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) foram feitos 17 horas e 30 minutos após a indução da colite. Os animais foram eutanasiados após 18h da indução da colite, abertas suas cavidades abdominais e foi retirado uma porção de 5 cm do cólon de cada animal, então foram avaliados os parâmetros macroscópicos, peso úmido e em seguida o tecido foi dividido e estocado em amostras para se realizar posteriormente os seguintes ensaios: análise dos parâmetros microscópicos, dosagens de mieloperoxidase (MPO), ácido malonildialdeído (MDA), glutathiona (GSH) e IL-1 $\beta$ .



Fonte: Autoria própria

Figura 04 - Representação esquemática do Modelo de Colite induzido por ácido acético adaptado.

#### 4.4- Avaliação dos escores macroscópicos

Os animais foram eutanasiados 18 horas após a indução das colites. Em seguida, foi feita uma incisão mediana com abertura na cavidade peritoneal. Após a identificação do reto e cólon, foi isolada uma extensão de 5 cm do cólon dos animais. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para uma avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita por Morris et al., em 1989 conforme mostrado na (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por ácido acético.

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentada em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Fonte: Morris, 1989.

#### 4.5 - Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite

Após a análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite e tratados com o polissacarídeo sulfatado nas doses de (1, 3 e 10 mg/kg, i.p.) ou com dexametasona (2 mg/kg, s.c.) foram retirados fragmentos do colon medindo 5 cm de comprimento cada. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos como peso úmido de 5 cm de cólon.

#### 4.6- Avaliação dos escores microscópicos de lesão

Após a avaliação do peso úmido foi realizado a análise dos escores microscópicos de lesão. Os segmentos intestinais foram fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH=7), lavadas e submetidas a desidratação gradual crescente com soluções alcólicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e por fim no álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos, inclusão em parafina líquida para banho I por 15 durante 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, essa foi aparada em um bloco e cortada com lâmina de aço pelo micrótomo (*LUPETEC®*, MRP 09). A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Em seguida foi feita a hidratação com álcool absoluto por 7 minutos, álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por dois minutos cada. A coloração foi feita com



hematoxilina por 2 minutos, banho em água corrente por 3,5 minutos, seguido da coloração eosina por 5 minutos e banho em água corrente, foi secado em temperatura ambiente e seguido para a montagem das lâminas para visualização em microscópio de luz (NOVA®). Foram obtidas uma lâmina para cada animal, totalizando 6 lâminas por grupo. Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da colite pela técnica descrita por Appleyard & Wallace (1995) de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da camada muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células caliciformes	0 – 1

Fonte: Appleyard e Wallace em 1995.

## 4.7. Ensaios Bioquímicos

### 4.7.1- Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Para a avaliação da atividade da MPO em animais com ou sem colite, frações do cólon foram retiradas e processadas. A análise dessa enzima seguiu de acordo com o protocolo estabelecido por Bradley et al (1982).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador qualitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração desta enzima, 50 a 100 mg de cólon de animais com ou sem colite e tratados ou não com o PLS da *G. Caudata* (1, 3 e 10 mg/kg), foram colocados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Posteriormente, foram maceradas em um macerador Polytron (13000 rpm) e centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, do sobrenadante foi pipetado numa placa (10µl) em seguida foram acrescentados nessa placa 200µl da solução de leitura (27 ml de H<sub>2</sub>O + 5 mg de O-dianisidina

em 3 ml de fosfato de potássio + 15 µl de peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida a placa foi lida em um leitor de ELISA a 450nm. O resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido.

#### 4.7.2- Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal

Após a eutanásia, frações do cólon dos animais foram retiradas para a análise dos níveis de MDA na mucosa intestinal.

Os níveis de malondialdeído na mucosa intestinal foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). As amostras de tecido foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) na proporção de 100mg de tecido para 1 ml de KCl a 0,15 M, em seguida foram retirados 250 µL do homogenato e acrescentado 1,5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em banho-maria e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 min. com um misturador "vortex" e depois centrifugados a 1200 rpm por 15 minutos, a fase butanólica de cada amostra foi lida em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda simultâneos: 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

#### 4.7.3- Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal

Após a eutanásia dos animais (18h após a indução da colite), fragmentos do cólon dos animais foram retirados para a análise dos níveis de glutathiona na mucosa intestinal. O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. A glutathiona reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ela exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991).

Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa intestinal de cada animal foi homogeneizada em EDTA 0.02 M, seguindo a proporção de 1:10, ou seja, para cada 100 mg de tecido foi usado 1 ml de EDTA. Alíquotas de 400  $\mu$ L do homogenato foram misturadas a 320  $\mu$ L de água destilada e a 80  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400  $\mu$ L do sobrenadante foi adicionado 800  $\mu$ L de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20  $\mu$ L de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por três minutos e cada amostra foi lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 412 nm. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em mg de GSH/g de tecido.

#### 4.7.4- Dosagem de Citocina IL-1 $\beta$

Para dosagem de IL-1 $\beta$ , fragmentos do cólon de animais foram retirados e adicionados em um tampão inibidor de protease (500  $\mu$ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4° C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2  $\mu$ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100  $\mu$ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi lavada com PBS -Tween 20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100  $\mu$ L por poço, incluídos em placa, por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi então incubada com a curva padrão das citocinas (TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do intestino a serem dosados, 100  $\mu$ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado diluído de 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina peroxidase (DAKO) diluída de 1:5000 em tampão de lavagem, 100  $\mu$ L por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi então lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão, 100  $\mu$ L por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos

dependendo da citocina. A reação foi parada com 150  $\mu$ L por poço de  $H_2SO_4$  1M. A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da quantidade de IL - 1 $\beta$  em pg/ml (TAVARES-MURTA et al., 2008).

#### **4.8. Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como a média ( $\pm$  EPM) de animais em cada grupo (n=6). As análises estatísticas foram realizadas no software *Graphpad Prism* (versão 6.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foram determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Para todos os testes foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### **4.9. Questões Éticas**

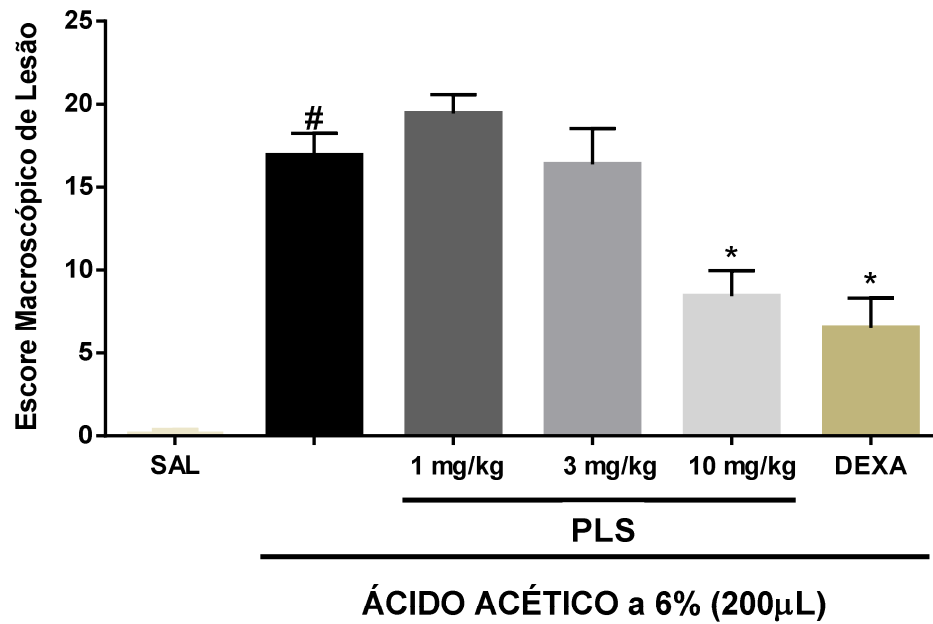
O presente projeto foi realizado com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí – UFPI e aprovado sob o protocolo de número: 194/16, conforme anexo 01.

## 5. RESULTADOS

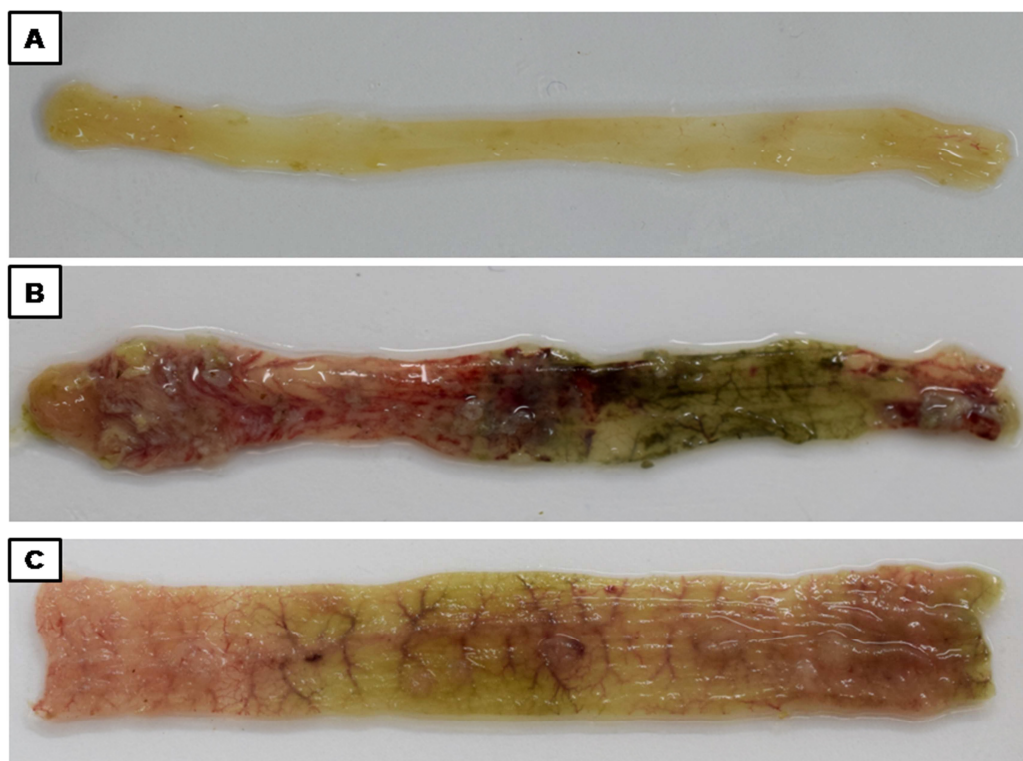
Os resultados obtidos da caracterização da alga *Gracilaria caudata* foram publicados por Francisco Clark Nogueira Barros em Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). Carbohydrate polymers, v. 92, n.1, p. 598-603, 2013.

### 5.1- Avaliação dos escores macroscópicos dos cólons intestinais

O Pls da *Gracilaria caudata* nas diferentes doses (1; 3; 10 mg/kg) foi testado na tentativa de estabelecer a melhor dose do polissacarídeo que possuísse efeito anti-inflamatório satisfatório e que assim seria aplicada nos demais ensaios. No gráfico 1, os animais submetidos a colite por AA ( $16,92 \pm 1,311$  escores de lesão) apresentaram aumento dos escores macroscópicos, quando comparados ao grupo que recebeu apenas salina ( $0,1667 \pm 0,1667$  escores de lesão). E verifica-se que a dose de 10 mg/kg, v.i (10 mg/Kg:  $8,429 \pm 1,518$  escores de lesão) obteve melhor resultado comparada às outras doses testadas, uma vez que promoveu uma redução significativa dos escores macroscópicos de lesão, quando comparado aos animais que receberam somente AA (Figura 5C). Efeitos semelhantes foram observados para a dexametasona ( $6,50 \pm 1,80$  escores de lesão), uma droga de escolha para o tratamento de CU. Em face disso, a dose do polissacarídeo da *Gracilaria caudata* utilizada para os demais ensaios foi a dose de 10mg/kg por via intraperitoneal.



**Gráfico 1 – Avaliação dos escores macroscópicos dos cólons intestinais.** Os animais com colite induzida por ácido acético a 6% (volume de 200 µL, por enema), foram tratados com PIs da alga *Glacilária caudata* (1, 3 e 10 mg/Kg, i.p.) 17 horas e 30 minutos após a indução da colite ou Dexametasona (DEXA) (2mg/kg, s.c.). Após 18 horas de indução da colite, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram 5 cm do cólon coletado para avaliação macroscópica. Os resultados são expressos em média ± EPM dos escores macroscópicos de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs grupo AA; #  $p < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

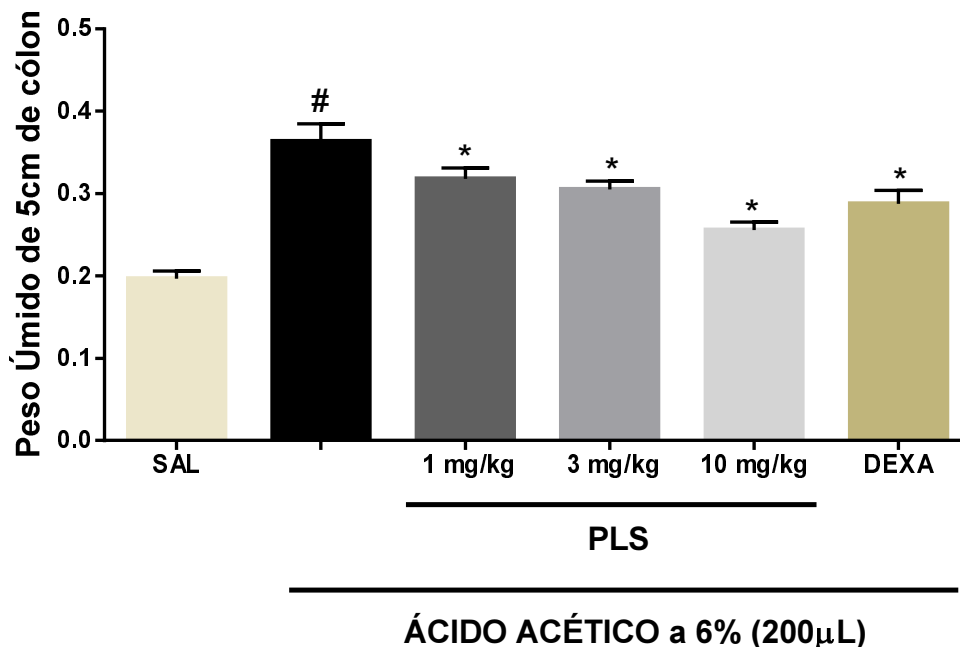


**Figura 5 - efeito da fração do polissacarídeo extraído da alga *Glacilaria caudata* sobre os danos macroscópicos da lesão intestinal provocado pela colite induzida por AA em camundongos.** Cólon de um animal que recebeu apenas solução salina por via retal (A); Cólon de um animal que recebeu apenas AA a 6% por via retal (grupo controle) (B); Cólon de um animal com colite induzida por AA a 6% e tratado com PLS (10 mg/kg, i.p.) (C).

## 5.2- Avaliação do Peso úmido de 5 cm de cólon

Conforme mostra o Gráfico 2, os animais que receberam somente AA a 6% apresentaram um aumento significativo do peso úmido dos cólons ( $0,363 \pm 0,021$  g) quando comparados ao grupo que recebeu apenas salina ( $0,19 \pm 0,00$ g). O PIs da *Glacilaria caudata* reduziu significativamente o peso úmido dos cólons nas doses de 1, 3, 10 mg/kg, i.p. (1 mg/Kg:  $0,31 \pm 0,01$ g; 3 mg/kg:  $0,30 \pm 0,01$ ; 10 mg/kg:  $0,25 \pm 0,00$ ) e DEXA (2mg/Kg, s.c.) ( $0,28 \pm 0,01$ g) quando comparados ao

grupo AA, com destaque para a dose de 10mg/kg que mostrou melhor resultado anti-inflamatório.



**Gráfico 2 – Avaliação do peso úmido de 5 cm de cólon.** Os animais com colite induzida com AA a 6% (200  $\mu$ L, por enema), foram tratados com PIs da Alga *Glacilária caudata* (1, 3, 10mg/Kg, i.p.) após 17h e 30 minutos da indução da colite ou Dexametasona (DEXA) (2mg/kg, s.c.). Após 18 horas da indução da colite, os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram 5 cm do cólon coletado para aferição do peso úmido. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM dos escores macroscópicos de 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  vs grupo AA; #  $p < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

### 5.3 - Efeito do PLS da *Glacilária caudata* sobre os escores microscópicos de lesão intestinal na colite induzida por AA em camundongos

Após submetidos à colite por AA, o tecido do cólon dos animais foi coletado para a análise histológica. Os resultados mostram que os animais do grupo Salina, apresentaram as pontuações mínimas de escores microscópicos para todos os parâmetros avaliados, representado pela (Tabela 3), através da análise da fotomicrografia fica evidente a manutenção da arquitetura tecidual e a ausência de infiltrado inflamatório no tecido (Figura 6). Por outro lado, o grupo que recebeu

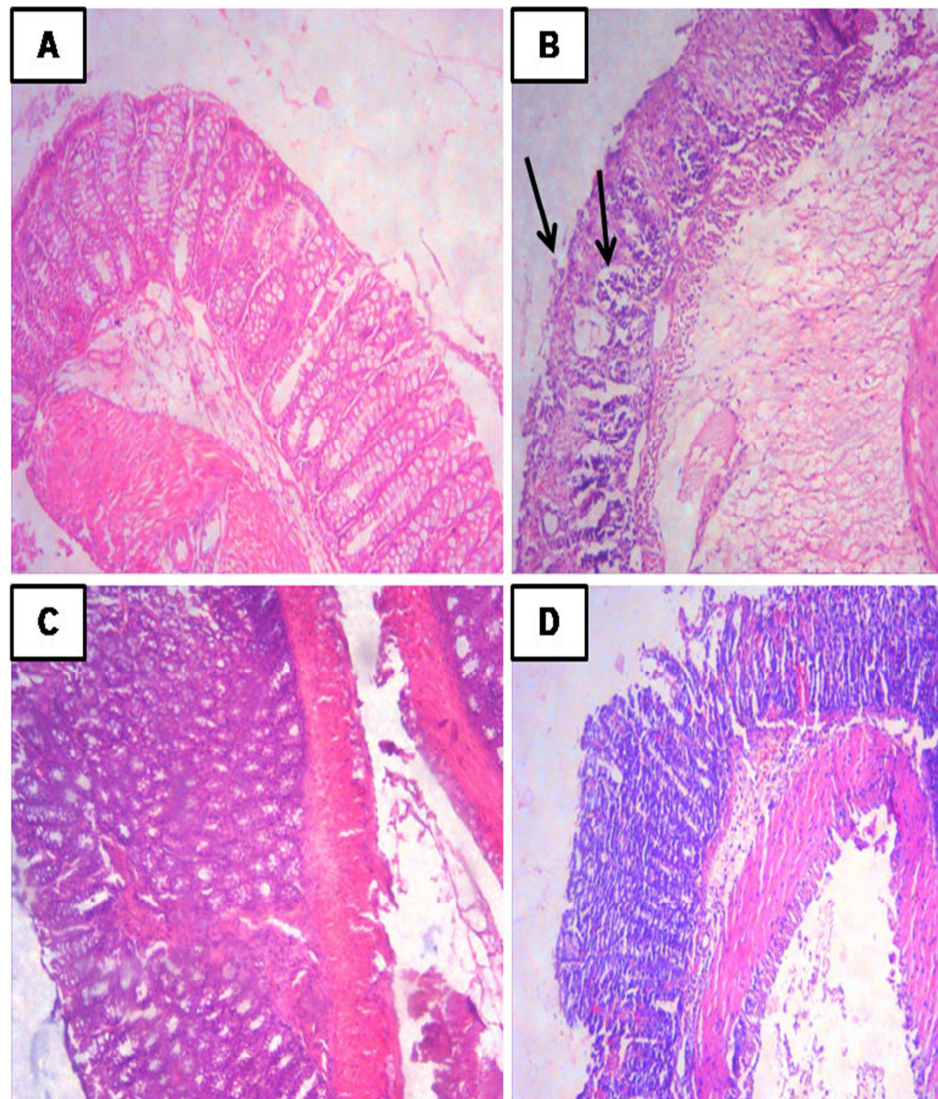


AA a 6% via retal apresentou aumento significativo da pontuação dos escores microscópicos, como a perda da arquitetura da mucosa 3 (3-3), intensa infiltração de células 3 (2-3), espessamento da camada muscular 3 (3-3), formação de abscessos em cripta 1 (1-1) e depleção de células caliciformes 1 (1-1) em relação (Tabela 3). A análise da fotomicrografia mostrou significativa mudança do aspecto tecidual com perda da arquitetura da mucosa e intensa infiltração celular (Figura 6B). O PLS (10mg/Kg, i.p.) da *G. Caudata* mostrou capacidade de reduzir o dano tecidual tais como, perda da arquitetura da mucosa 1 (1-1), infiltração de células 1 (1-1), espessamento da camada muscular 1 (1-1) e promoveu uma significativa diminuição para os parâmetros Abscesso em cripta 0 (0-0) e Depleção de células caliciformes 0 (0-0) como visto na (Tabela 3) e representado pela Fotomicrografia da (Figura 6C). Como estabelecido por seu mecanismo de ação, a Dexametasona dexametasona (2 mg/kg, s.c) também reduziu os escores microscópicos avaliados quando comparados com o grupo do AA (Tabela 3) e representado pela (Figura 6D).

**Tabela 3. Efeito do PLS da *Glacilaria caudata* sobre os escores microscópicos de lesão intestinal na colite induzida por AA em camundongos.**

Parâmetros Histológicos	Média dos Escores			
	SALINA	AA	AA +PLS(10mg/kg)	AA + DEXA
Perda da arquitetura da mucosa	0 (0-0)	3 (3-3)#	1 (1-1)	1 (1-1)
Infiltração celular	0 (0-0)	3 (2-3)#	1 (1-1)	1 (1-2)
Espessamento muscular	0 (0-0)	3 (3-3)#	1 (1-1)	1 (1-1)
Abscesso em cripta	0 (0-0)	1 (1-1)#	0 (0-0)*	0 (0-1)
Depleção de células de caliciformes	0 (0-0)	1 (1-1)#	0 (0-0)*	0 (0-1)
Escore Total de danos	0 (0-0)	11 (10-11)	3 (3-3)	3 (3-6)

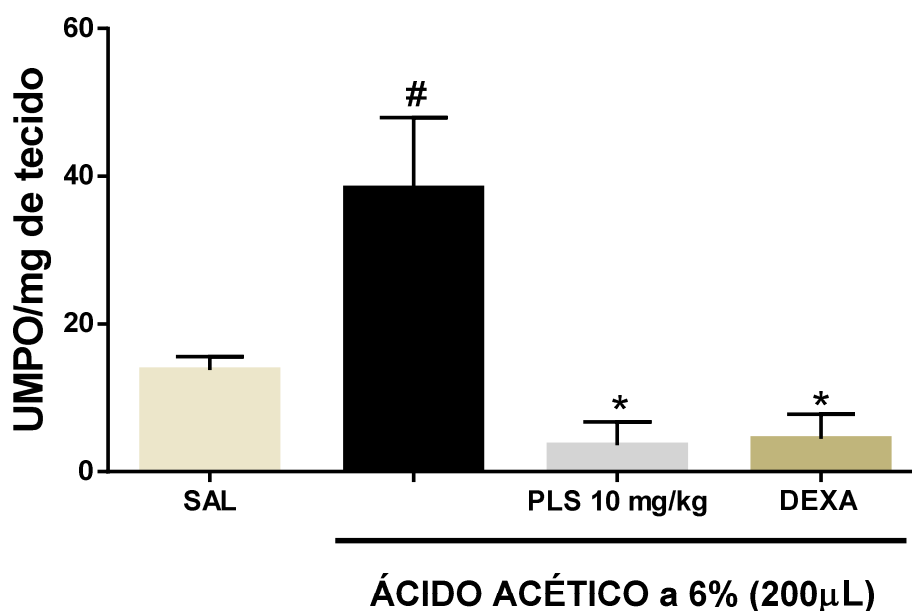
Os camundongos foram tratados com PLS (10 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (DEXA, s.c) (2 mg/kg) 17 horas e 30 minutos após a indução da colite. No tempo de 18 horas após a indução da colite, os animais foram eutanasiados e os abdômens foram abertos. Após a identificação do intestino, amostras de tecido (5 cm) foram recolhidas para avaliação histológica. Avaliação de escores microscópicos foi realizada conforme proposto por Appleyard e Wallace em 1995. Escores de lesão histológica expressos como média  $\pm$  erro (n = 5-7). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.\* P <0,05 quando comparado ao grupo controle (AA).# P <0,05 quando comparado ao salina.



**Figura 6 - Fotomicrografia (10X, escala 50 $\mu$ m) representando os efeitos da fração do polissacarídeo extraído da alga *Glacilaria caudata* sobre os danos microscópicos da lesão intestinal provocado pela colite induzida por AA em camundongos. Cólon de um animal que recebeu apenas solução salina por via retal (A); Cólon de um animal que recebeu apenas AA por via retal (grupo controle) (B); Cólon de um animal com colite e tratado PLS (10 mg/kg, i.p.) (C); Cólon de um animal com colite e tratado com dexametasona (2 mg/kg, s.c.) (D). Pode-se observar que a indução por AA resulta em perda da arquitetura da mucosa, intensa infiltração celular representado pela (Figura 6B, Setas). O tratamento com *Glacilaria Caudata* foi capaz de reverter estas alterações.**

#### 5.4- Determinação da atividade da MPO

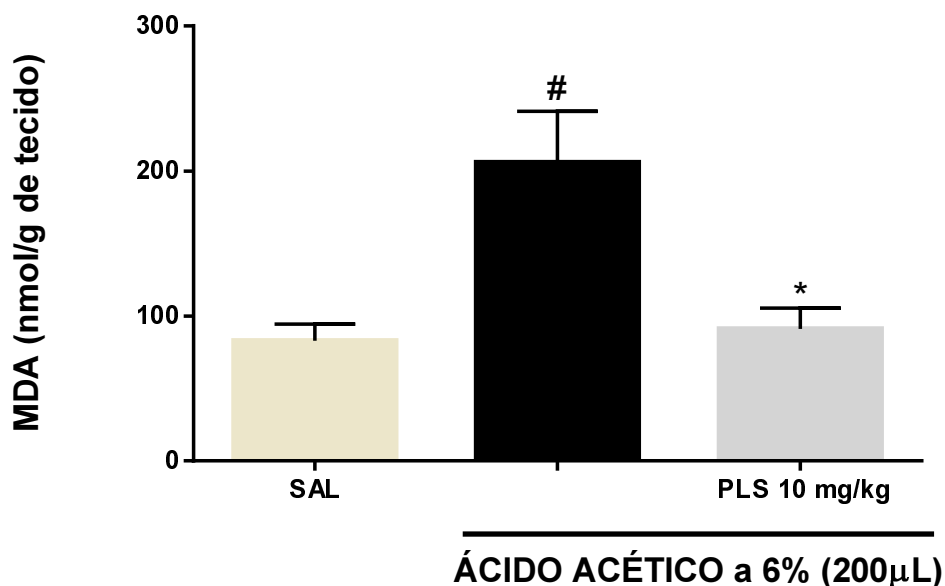
A avaliação da infiltração neutrofílica foi mensurada a partir da atividade da MPO. Após 18 horas da indução da colite, amostras dos cólons foram submetidas ao ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais que receberam AA a 6% apresentaram aumento significativo na infiltração de neutrófilos ( $38,40 \pm 3,905$  UMPO/mg de tecido colônico) quando comparados ao grupo Salina ( $13,7 \pm 1,04g$ ). O grupo de animais tratados com PLS na dose de 10m/Kg, i.p., apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade dessa enzima, quando comparado com o grupo do AA a 6%, i.p. ( $3,590 \pm 1,409$  UMPO/mg de tecido colônico). Efeitos similares são apresentados pela DEXA (2mg/Kg, s.c.) ( $4,457 \pm 1,362$  UMPO/mg de tecido colônico) na redução da infiltração de neutrófilos quando comparados ao grupo AA.



**Gráfico 3 – Atividade da MPO no intestino após 18h da indução da colite por AA.** Os animais com colite induzida por AA a 6% (200 µL, por enema) tratados com PLS (10m/Kg), após 17h e 30 minutos da indução da colite, apresentaram diferença estatística em relação ao grupo AA. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs grupo AA; #  $p < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

### 5.5 – Efeito do PIs sobre os níveis de MDA nos tecidos intestinais.

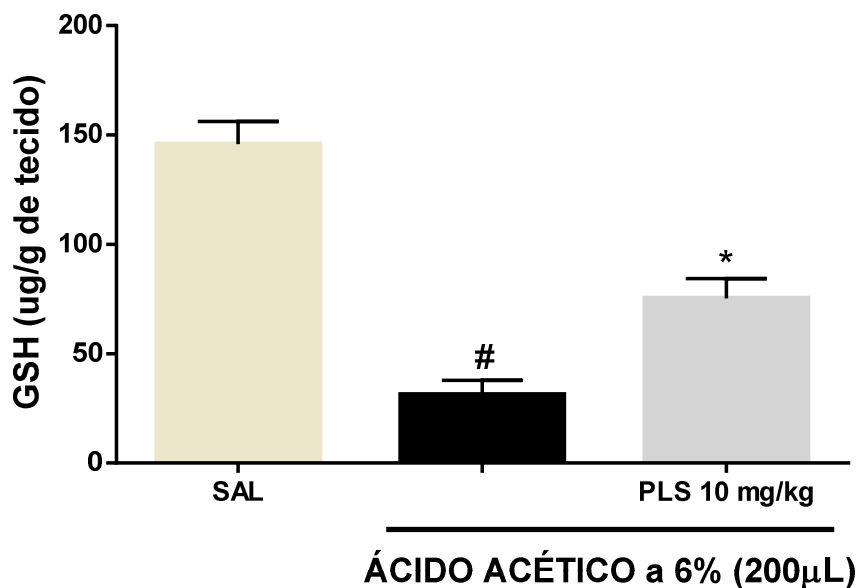
Após 18h de indução da colite, as amostras dos cólons intestinais foram coletadas para a mensuração dos níveis de MDA. De acordo com o Gráfico 5, os animais que receberam AA a 6% (200  $\mu$ L, por enema) apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de MDA nos cólons intestinais ( $205,7 \pm 35,48$  nmol/g de tecido), quando comparados ao grupo Salina ( $82,94 \pm 11,47$  nmol/g de tecido). O PLS da *Glacilária caudata* na dose de 10mg/Kg, i.p. reduziu significativamente os níveis de MDA ( $90,88 \pm 14,57$  nmol/g de tecido) no tecido da mucosa inflamada.



**Gráfico 4 – Efeito do PIs sobre os níveis de MDA nos tecidos intestinais.** Os animais com colite induzida por AA a 6% ((200  $\mu$ L, por enema), foram tratados com o PIs da *Glacilária caudata* (PLS) (10mg/Kg, i.p.) após 17h e 30 minutos da indução da colite. A concentração de MDA foi avaliada em amostras do tecido intestinal após 18h da indução da colite e comparadas com os controles. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs grupo AA; #  $p < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc)

### 5.6- Efeito do PIs sobre os níveis de GSH nos tecidos intestinais

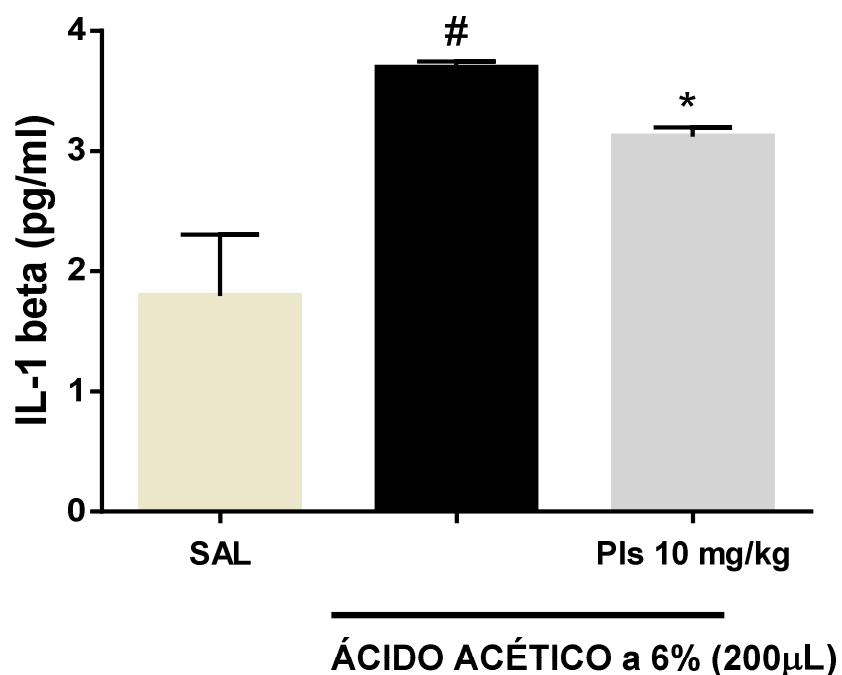
Após 18h de indução da colite, as amostras dos cólons intestinais foram coletadas para a mensuração dos níveis de GSH. De acordo com o Gráfico 6, os animais que receberam apenas AA a 6% (200  $\mu$ L, por enema) apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de GSH nos cólons intestinais ( $31,22 \pm 6,611$  ug/g de tecido), quando comparados ao grupo Salina ( $145,7 \pm 10,40$   $\mu$ g/g de tecido). O PLS da *Glacilária caudata* na dose de 10mg/Kg, i.p. aumentou significativamente os níveis de GSH ( $75,22 \pm 9,093$   $\mu$ g/g de tecido), quando comparado ao grupo que recebeu somente AA. Dessa forma, evitando seu consumo no tecido da mucosa inflamada.



**Gráfico 5 – Efeito do PIs sobre os níveis de GSH nos tecidos intestinais.** Os animais com colite induzida por AA a 6% (200  $\mu$ L, por enema), foram tratados com o PIs da *Glacilária caudata* (PLS) (10mg/Kg, i.p.) após 17h e 30 minutos da indução da colite. A concentração de GSH foi avaliada em amostras do cólon dos animais após 18h da indução da colite e comparadas com os controles. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  vs grupo AA; #  $p < 0,05$  vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

### 5.7 - Efeito do PIs da *Glacilaria caudata* sobre os níveis colônicos de IL-1 $\beta$

Após 18 horas da indução da colite por AA, os animais foram eutanasiados e as amostras dos intestinos foram retiradas para a dosagem de citocina pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ ) nos cólons intestinais. No Gráfico 6, os animais submetidos à colite induzida por AA (200  $\mu$ L, por enema) apresentaram um aumento significativo dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  ( 3,6  $\pm$  0,02 pg/ml), quando comparado ao grupo Salina (1,7  $\pm$  0,20). O PLS da *Glacilaria caudata* (10 mg/kg, v.o) promoveu uma redução significativa dos níveis da citocina IL-1 $\beta$  (3,1  $\pm$  0,03 pg/ml), quando comparado ao grupo que recebeu somente AA a 6%.



**Gráfico 6 - Efeito do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído da *Glacilaria caudata* sobre os níveis colônicos de IL-1 $\beta$  do camundongo com colite induzida por AA.** Os animais foram tratados com PLS (10 mg/kg, v.o) 17 horas e 30 minutos após a indução da colite. Após 18h de indução da colite, os camundongos foram eutanasiados, as amostras de cólon foram recolhidas e os níveis da citocina, IL-1 $\beta$ , foram avaliados. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro de 6 animais por grupo. \* P <0,05 vs grupo AA; #P <0,05 vs grupo salina (ANOVA seguido pelo teste Newman – Keuls post hoc).

## 6- DISCUSSÃO

A CU é caracterizada por excesso de inflamação e estresse oxidativo (Cetinkaya, 2006), que é considerado um fator chave na patogênese e perpetuação dos danos da mucosa. Vários modelos de colite em animais foram desenvolvidos nos últimos 20 anos e são ferramentas indispensáveis para elucidar os mecanismos subjacentes à patogênese das DII, bem como para ensaiar terapêuticas potenciais (Chassaing, 2014). O modelo de colite induzida pelo ácido acético (AA) tem sido amplamente utilizado para investigar os efeitos de terapias à base de plantas em colite experimental (Mehrabani, 2011; Redwan, 2007).

Neste trabalho estudamos o efeito da fração polissacarídica sulfatada da alga *Glacilaria caudata* sobre a colite intestinal. Inicialmente, foi induzida a colite por ácido acético em camundongos, uma vez que é considerado um modelo experimental com algumas características patológicas e clínicas semelhantes à colite ulcerativa humana (Minaiyan et al., 2014), que inclui a infiltração de neutrófilos no tecido intestinal, necrose das camadas mucosa ou submucosa, dilatação vascular, edema e ulceração submucosa (Randhawa et al., 2014).

O primeiro relato deste modelo foi demonstrado por MacPherson e Pfeiffer em 1978, onde introduziram ácido acético de 10% no reto de ratos durante 10 segundos, seguido por lavagem do lúmen com solução salina. Nestes ratos, observou-se uma colite difusa com características histopatológicas incluindo ulceração do cólon distal e anormalidades da cripta ( MacPherson & Pfeiffer, 1978). A administração via retal de ácido acético diluído proporciona um método alternativo para criar uma lesão química ao epitélio da mucosa que induz um fenótipo transitório que imita a CU (Low, 2013).

As vantagens da colite induzida por ácido acético são o seu baixo custo e a facilidade de administração. Há um grande número de estudos que descrevem compostos que podem melhorar a colite induzida por ácido acético, sugerindo que pode ser um bom modelo para estudar a eficácia de fármacos que visam interferir



com espécies reativas de oxigênio (Cetinkaya, 2005; Kuralay, 2003; Yoshida, 1999; Tahan, 2011).

A colite nos modelos animais tem início definido e são caracterizadas pela desregulação de citocinas e tornaram-se ferramentas úteis para estudar a patologia das doenças com potencial para a caracterização da modulação imunológica e inflamatória na iniciação e perpetuação da patogênese da doença (Abdel-salam et. al., 2009; Silva et al., 2013).

Atualmente, os medicamentos mais potentes utilizados para colite ulcerativa não produzem resposta em 20-30% dos casos. Há uma necessidade de medicamentos mais eficientes e confiáveis (Can et. al, 2016). Várias substâncias de origem natural vem sendo pesquisadas no sentido de melhorar a colite através de uma ação direta sobre o processo inflamatório e sobre o estresse oxidativo. Neste trabalho utilizamos o Pls da *Glacilaria caudata*, fração caracterizada por Barros (2013) e demonstrado efeito anti-inflamatório em modelo de edema em patas de camundongos (Chaves et. al, 2013) e antioxidante em modelo gástrico (Silva et. al, 2011).

O modelo experimental de colite ulcerativa induzida por AA é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda, seguida por um espessamento da parede do cólon, ulcerações no cólon e infiltração de células inflamatórias (TÜZÜN, et al., 2002; VARSHOSAZ, et. al., 2010). Estas são as características principais para a atribuição dos escores macroscópicos de lesão proposto por Morris et al. (1989). Os resultados do presente estudo mostraram que os camundongos do grupo ácido acético tiveram um aumento significativo dos escores macroscópicos de lesão quando comparados aos animais que receberam somente salina via retal 18h após a indução da colite experimental (Figura 5B; Gráfico 1).

Em estudo de Najafi (2017), a administração de ácido acético a 3% via retal causou danos graves à mucosa do cólon, com edema, ulcerações profundas e hemorragia no grupo controle da colite. Enquanto que o grupo Salina apresentou aspecto mucoso normal. De acordo com El-Abhar (2008) a indução da colite por ácido acético a 3% via retal causou inflamação edematosa macroscópica grave no cólon, conforme avaliado pela alta pontuação de dano do cólon.

O Pls da *Glacilaria caudata* foi capaz de diminuir significativamente os escores macroscópicos de lesão no cólon, com uma maior significância na dose de 10 mg/kg como visto no Gráfico 1 e representado na Figura 5C. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Silva et. al. (2011) em que o tratamento com o PLS *Glacilaria caudata* atingiu seu efeito máximo com uma dose de 30 mg/kg reduzindo o dano gástrico macroscópico. De forma semelhante, tal resultado foi encontrado para polissacarídeos de outras algas vermelhas, como o isolado da *Gracilaria birdiae ameliorates* que mostraram efeitos semelhantes reduzindo os escores de dano de lesões macroscópicas no tecido do cólon, com o efeito máximo observado a uma dose de 90 mg/kg (Brito et. al., 2014). De acordo com estes resultados pode-se inferir que o Pls da *Glacilaria caudata* produz efeito anti-inflamatório em colite induzida por AA em camundongos.

A colite é um processo inflamatório gastrointestinal que tem sido associado a uma resposta imune local intensa seguida pela libertação de citocinas e mediadores inflamatórios. A migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico, bradicininas e citocinas presentes em macrófagos, linfócitos e outros tipos celulares servem para iniciar, coordenar e amplificar o processo inflamatório (Witaicenis, 2010). Isto promove um aumento do peso úmido do tecido do cólon inflamado. Este é considerado um indicador da gravidade e extensão da resposta inflamatória. (Vinod Prabhu et al., 2014)

Os resultados mostram que o grupo do ácido acético tiveram um aumento significativo do peso úmido do cólon quando comparado ao grupo que recebeu somente solução salina via retal 18h após a indução da colite experimental (Gráfico 02). Estes resultados são consistentes com os relatados em outros estudos, em que os pesos colônicos médios foram significativamente aumentados no grupo AA 4%, em comparação com o grupo controle (Fantini, 2016) e a administração de AA a 3% via retal aumentou o peso úmido do cólon (EI-Abhar, 2008).

O tratamento com o Pls da *Glacilaria caudata* nas doses (1, 3 e 10mg/kg) reduziram significativamente o peso úmido dos cólons de camundongos com colite experimental induzida por AA. Com efeito máximo observado para a dose

de 10 mg/Kg. Os dados apresentados corroboram com o estudo de Brito et. al. (2016) em que o Pls da alga *Hypnea musciformis* nas doses de (10, 30 e 60 mg / kg p.o.) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o dano intestinal macroscópico e diminuiu o peso úmido do cólon, com efeito máximo observado na dose de 60mg/kg. De acordo com os resultados apresentados, pode-se sugerir que este polissacarídeo possui uma importante ação anti-inflamatória intestinal, onde pode-se observar seu efeito pela redução do peso úmido e conseqüente diminuição do escores macroscópicos avaliados, podendo estar relacionado a diminuição de mediadores inflamatórios específicos.

As alterações histológicas na colite experimental induzida por AA se assemelham a CU em humanos. As características histológicas da CU estão bem documentadas, compreendendo atividade inflamatória leve, moderada ou severa que resulta em distorção da arquitetura do revestimento mucosal do cólon (Gramlich, 2007). Conjuntamente com inflamação e a produção concomitante de uma mistura complexa de mediadores inflamatórios, desenvolve-se ulceração superficial extensa da mucosa com a presença de um número significativo de neutrófilos dentro da lâmina própria e criptas, onde formam micro-abscessos. A depleção de mucina das células caliciformes também é comum (Xavier, 2007)

A análise dos critérios microscópicos do tecido intestinal de camundongos submetidos à colite induzida por AA apresentaram algumas características como, edema, destruição da camada mucosa do cólon, necrose e perda de células glandulares e epiteliais, aparecimento de granulações extensivas com a presença de um maciço infiltrado de neutrófilos, presentes principalmente na mucosa e sub-mucosa. Apresentando resultados semelhantes, El-Abhar (2008) em colite experimental por ácido acético, constataram, edema, inflamação difusa e infiltração celular na mucosa. Ocorreu ulceração focal da mucosa colônica, estendendo-se através da mucosa muscular, áreas descamadas com perda do epitélio. A arquitetura das criptas foi distorcida, a lâmina própria foi espessada em áreas periféricas de criptas distorcidas, especialmente em áreas basais e um infiltrado constituído por células inflamatórias foi observado. Em outro estudo, o ácido acético causou lesões graves à mucosa do cólon, degeneração e necrose de células epiteliais, distorção da cripta, infiltração difusa de leucócitos

polimorfonucleares na submucosa e na lâmina própria em colite induzida por AA a 4%. (Anzoise, 2016).

O grupo dos animais tratados com o Pls da *Glacilaria caudata* na dose de 10 mg/kg conforme visto na (Tabela 3) e principalmente representado pela (Figura 6C), mostrou redução do dano tecidual microscópico, reorganização da camada mucosa, diminuição do edema, proteção das células epiteliais e glandulares e diminuição do infiltrado celular no cólon de camundongos com colite experimental induzida por AA quando comparado ao grupo ácido acético. Resultados semelhantes foram encontrados para o Pls da *Glacilaria caudata* em modelo de proteção gástrica em que o Pls na dose de 30mg/kg reduziu o dano gástrico microscópico (Silva et. al., 2011) Outro Polissacarídeo mostrou resultados similares, em um estudo com Pls extraído da *Gracilaria birdiae* em dano gástrico mostrou que o tratamento com PLS diminuiu significativamente a infiltração de células inflamatórias, a formação de edema e a perda de células epiteliais (Silva et. al., 2012) A partir desses resultados iniciais foi possível confirmar a eficácia do Pls da *Glacilaria caudata* como atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por AA.

Com base nos resultados obtidos, a dose de 10 mg/kg promoveu a melhor resposta em reduzir os parâmetros inflamatórios e apresentou um efeito estatisticamente significativo no modelo de colite induzida por AA a 6%, a dose foi utilizada nos demais ensaios. A dose de 10mg/kg se apresentou menor que a dose (30mg/kg) que mostrou efeito antioxidante em modelo gástrico em estudos de Silva et. al.(2011).

Foram propostos protocolos que avaliassem a influência das colites sobre a migração de células inflamatórias, como por exemplo, a MPO (específica para neutrófilos), que é um indicador da acumulação de neutrófilos (Silva, 2013). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente em grânulos primários de neutrófilos polimorfonucleares, e, em pequena quantidade, em monócitos e macrófagos. Alterações dos seus níveis são apontadas como parâmetro para analisar a gravidade de inflamações em vários tecidos, inclusive no intestino (Yin et. al., 2011).

Os neutrófilos são críticos nos mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também podem produzir danos nos tecidos em processos inflamatórios. Neste sentido, a atividade de MPO a partir dos tecidos inflamados é um marcador de recrutamento de neutrófilos e um indicador de inflamação intestinal aguda (Vinod Prabhu et al., 2014).

No presente estudo, os resultados mostraram que o AA produziu um aumento significativo na atividade da mieloperoxidase (Gráfico 3) e o tratamento com o Pls da *Glacilaria caudata* na dose de 10mg/kg reduziu significativamente a atividade da MPO. Dados na literatura mostram que o Pls da alga *Glacilaria caudata* na dose de 10mg/kg reduziu a atividade de MPO (Chaves, 2012) em modelo de edema em patas de camundongos.

Polissacarídeos de outras algas, como o isolado da *Passiflora edulis* foi capaz de reduzir a atividade de MPO (Silva et. al., 2015) e o Pls da *Gracilaria cornea* que apresentou efeitos semelhantes nas doses mais baixas (3 e 9 mg / kg), mostraram a maior inibição de Infiltração celular (Coura et. al., 2011). Com base nos resultados, pode-se supor que o Pls poderia contribuir para a atenuação da inflamação induzida pelo ácido acético e para a regulação do tráfego de neutrófilos.

Outro componente importante da inflamação é o estresse oxidativo, ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) são superproduzidas, excedendo a capacidade do sistema antioxidante endógeno e levando a lesão tecidual (Keeble, 2009). O estresse oxidativo está relacionado com a infiltração de neutrófilos dentro da inflamação na mucosa do cólon. O recrutamento e a ativação de neutrófilos durante a inflamação aguda contribuem para a superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio o que perpetua a inflamação do cólon (Cuzzocrea S et al, 2001). Portanto, este estudo avaliou o potencial antioxidante do Pls da *Glacilaria caudata* através de dois marcadores de estresse oxidativo: MDA e GSH.

O malondialdeído (MDA é um produto de processos lipoperoxidativos que ocorrem como consequência de insulto oxidativo do cólon. (Pacher, 2007) Sendo utilizado como indicador de peroxidação lipídica e do estresse oxidativo in vivo,

mostrando que o aumento de tais níveis causa alterações estruturais e na respostas imunológicas (Lima e Abdalla, 2001). O modelo experimental de colite induzido por AA promove o aumento dos níveis de MDA, fato este observado neste estudo e em outros, como o de kuznietsova, et. al.(2016) em que a colite induzida por AA a 4% aumentou os níveis de MDA (em 89%) e sugeriram o aumento da oxidação de lipídios, proteínas e desenvolvimento de estresse oxidativo. Em estudos de Harputluoglu (2006), relataram aumento das concentrações de MDA nos grupos que receberam AA a 4% mostrando ser um indicativo do aumento de estresse oxidativo.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o PLS da *Glacilaria caudata* na dose de 10mg/kg reduziu a concentração de MDA na mucosa inflamada do cólon (Gráfico 4). Demonstrando, assim, sua ação antioxidante. De acordo com Silva, et. al.(2011) o PIs na dose de 30mg/kg promoveu redução dos níveis gástricos de MDA. Em PIs de outras algas, como a *Passiflora edulis* e *Hypnea musciformis* (90mg/kg) efeitos semelhantes foram encontrados, relataram diminuição dos níveis de MDA (Silva et. al., 2015; Brito et. al.,2014).

Tem sido relatado na literatura que PLSs mostrando atividade antioxidante, como os extraídos de algas marinhas, protegem contra a morte celular devido à sua capacidade de degradação de espécies excessivamente reativas de oxigênio. (Urso, 2003) O GSH, um antioxidante endógeno, protege as células contra danos oxidativos, mantendo os grupos sulfidrilo (-SH) de proteínas reduzidas e impedindo-os de reagirem com radicais livres (Amirshahrokhi, 2011).

Uma diminuição da atividade de GSH aumenta o stress oxidativo e conduz à acumulação de produtos tóxicos (Hagar, 2007) em pacientes com doença inflamatória intestinal e em modelos experimentais de colite (Tahan, 2011). De acordo com a literatura, os resultados demonstraram que o AA a 6% diminuiu os níveis de glutathiona no tecido colônico. Em estudos de damasceno et. al.(2012) os resultados mostraram que os níveis de GSH gástrico em camundongos tratados com etanol a 50% eram menores do que aqueles em camundongos tratados com salina.

A fração do PLS da *Glacilaria caudata* na dose de 10mg/kg aumentou os níveis de GSH em animais com colite induzida por AA (Gráfico 5). Confirmando este resultado, o mesmo Polissacarídeo apresentou aumento dos níveis de GSH em modelo de proteção gástrica (Silva, et. al., 2011). Os Polissacarídeos isolados da alga *Solieria filiformis* (Sousa et. al., 2016) e da *Hypnea musciformis* (Damasceno et. al., 2012) mostraram resultados semelhantes, aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ) os níveis de GSH na mucosa gástrica, em comparação com o grupo salina.

Os resultados indicam que a administração de AA além de aumentar os níveis de MDA, promove redução nas concentrações de GSH no cólon de animais submetidos à colite. Assim, estes dados confirmam que a migração de neutrófilos para o local inflamado produz metabólitos reativos que agravam e intensificam a reação inflamatória. (Santiago et al., 2015). Além disso, as substâncias oxidantes podem causar lesão e destruição dos tecidos quando a sua taxa de produção superar a capacidade de defesa dos antioxidantes endógenos.

Sabe-se que a capacidade antioxidante do cólon é relativamente deficiente, quando comparada com a de outros órgãos e tecidos, dessa forma, o dano oxidativo ocorre de forma intensa e marcada na mucosa colônica (Tham et al., 2002). Isso sugere que a inflamação do cólon pode produzir altos níveis de substâncias oxidantes que provavelmente, irão exceder a baixa capacidade antioxidante do intestino e provocar lesão tecidual.

A peroxidação lipídica é a auto-oxidação das cadeias laterais dos ácidos graxos poli-insaturados. Ocorre uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre as cadeias de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios. Dessa forma, um evento inicial pode desencadear vários ciclos de auto-oxidação, suficientes para alterar a função da membrana interrompendo a ação sobre a permeabilidade seletiva. Isso causa um descontrole na entrada e saída de ânions, comprovado pela perda de fluidez. Quando ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes oxidantes e, nessa situação, diz-se que a célula ou o

organismo encontra-se sob estresse oxidativo com potenciais danos a eles (Llesuy, 2002). Assim, pode-se sugerir que a ação do PLS para reduzir a resposta inflamatória no cólon está aparentemente relacionada com a diminuição do estresse oxidativo.

Evidências sugerem que a colite ulcerativa é caracterizada pelo aumento na liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e espécies reativas de oxigênio produzidas a partir de neutrófilos e macrófagos ativadas, que, por sua vez, conduzem a inflamação crônica, ulcerações e lesões na mucosa colônica pela infiltração de leucócitos (Roessner et al, 2008; Sadar et al., 2016; Villegas et al., 2003).

A citocina anti-inflamatória IL-1 $\beta$  apresenta sua concentração aumentada na CU (Bamias, et al., 2011). Essa citocina contribui para a migração celular e destruição da mucosa durante a inflamação intestinal (Raddatz et al., 2001). Os resultados indicam que os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente nos tecidos do cólon de camundongos tratados com AA (Gráfico 6). Em estudo de Araújo et. al. (2016), a produção de IL-1 $\beta$  no cólon inflamado aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) nos segmentos colônicos de ratos com colite em comparação com o grupo saudável. Em outro estudo, a administração intra-colônica de ácido acético em camundongos aumentou significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (Guazelli et. al., 2013).

Os animais tratados com o PLS da *Glacilaria caudata* na dose de 10 mg / kg diminuíram a concentração dessa citocina na mucosa intestinal inflamada. Estes resultados revelaram que o PLS reduz a resposta inflamatória através da inibição de citocinas pró-inflamatórias na lesão intestinal resultante da colite induzida por AA em camundongos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo de Chaves et. al. (2012), em que o tratamento com PLS da mesma alga na dose de 90 mg / kg reduziu, significativamente, as concentrações da citocina IL-1 $\beta$  e para o PLS da *H. musciformis*, houve uma acentuada diminuição da citocina IL-1 $\beta$  (Brito et. al., 2016).

Considerando os resultados apresentados, pode-se sugerir que o PLS atua modulando a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  durante o processo inflamatório intestinal da colite, o que leva a uma diminuição da sinalização, da



ativação e do recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão, reduzindo assim os danos teciduais.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que a fração polissacarídica sulfatada extraída da *Glacilaria caudata* possui atividade anti-inflamatória e antioxidante, apresentando uma possibilidade para o desenvolvimento farmacológico. Todos os resultados apresentados neste trabalho são inéditos, destacando sua contribuição para o estudo farmacológico desta alga.

## 7- CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o polissacarídeo sulfatado da alga *Glacilária caudata*, em modelo experimental de colite em camundongos na dose de 10mg/kg foi capaz de reduzir diversos parâmetros inflamatórios tais como critérios macroscópicos e microscópicos, peso úmido, citocina pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ ), mieloperoxidase, malondialdeído e aumentou os níveis de glutathione. De acordo com os resultados obtidos sugere-se que a alga *Glacilaria caudata* possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes podendo ser alvo de pesquisas para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica para pacientes com colite ulcerativa.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p. 2066-2078, 2009;

ABREU, M. T. The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. **Curr Gastroenterol Rep.** v. 4, p.481–489, 2002.

ABDEL-SALAM, O.M.E.; SLEEM, A.A. Study of the analgesic, anti-inflammatory, and gastric effects of gabapentin. **Drug Discov Ther.** v. 3 p. 18–26. 2009.

ALEISA, A.M.; AL-REJAIE, S.S.; ABUHASHISH, H.M.; OLA, M.S.; PARMAR, M.Y.; AHMED, M.M. Pretreatment of *Gymnema sylvestre* revealed the protection against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **BMC Complement Altern Med.** v.14 p. 49, 2014.

AL-REJAIE, S. S. et. al. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **World Journal of Gastroenterology : WJG.** v.19 n.34 p.5633-5644, 2013.

AMIRSHAHROKHI, K. *et al.* The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. **T Appl Pharmacol.** v. 253 p.197–202, 2001.

AMARAL, R.; PIZZOL, Júnior A.; PORTINHO, C.P.; BRAGA, P.; MOREIRA, L.F.; GUS P. Enemas de ciclosporina (CYA) no tratamento da colite ulcerativa induzida, em ratos, por ácido acético. **Rev Bras Colo-Proctol.** v.2, n.4, p.219-27, 2001.

ANDRIAMANANTOANINA, H.; CHAMBAT, G.; & RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascan *Gracilaria corticata* polysaccharides: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v.68, n.1, p. 77–88, 2007.

ANZOISE, M. L.; MARRASSINI, C.; BACH, H.; GORZALCZANY, S. Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis. **Journal of Ethnopharmacology.** v.194 p.137–145, 2016.

ARAÚJO, G.S. et al. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodófito *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n.4, p. 548-554, 2008.

ARAÚJO, D.F.S. Goat whey ameliorates intestinal inflammation on acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Dairy Science.** v. 99 n. 12, 2016.

ARAKI, C. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. **Proceedings of the International Seaweed Symposium.** v.5, p. 3–17, 1966.

BAMIAS, G.; KALITSA, G.; LADAS, S. D. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Discovery Medicine.** v. 60, p. 459-467, 2011

BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES, X.P.; TOMAZ, A.C.A.; SENA-FILHO, J.G.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; SOUZA, M.F.V.; CUNHA, E.V.L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: a twentieth century review. **Braz J Pharmacogn.** v.18, p.135–154, 2008.

BARROS, F. C., DA SILVA, D. C., SOMBRA, V. G., MACIEL, J. S., FEITOSA, J. P., FREITAS, A. L., & DE PAULA, R. C. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n.1, p. 598-603, 2013.

BAUDITZ, J., WEDEL, S., LOCHS, H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor a and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut.** v. 50, p. 196–200, 2002.

BAUMGART, Daniel C.; CARDING, Simon R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **The Lancet.** v. 369, 2007.

BEAUGERIE, L.; MASSOT, N.; CARBONNEL, F.; CATTAN, S.; GENDRE, J.P.; COSNES, J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 96 p.2113–2116, 2001.

BERNER, J. & KIAER, T.. Ulcerative colitis and Crohn's disease on the Faroe. A retrospective epidemiological survey. **Scand J Gastroenterol**, v.21, p. 188-92, 1986.

BERNSTEIN CN, et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 112-24, jan. 2010.

BINDER V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. Best practice & research. **Clinical gastroenterology**, v. 18, n. 3, p. 463–79, jun. 2004.

BLUMBERG, R.S., STROBER, W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. **JAMA**, v.285 p.643-647, 2001.

BOTOMAN, V.A. et. al. Management of inflammatory bowel disease. **Am. Fam. Phys**, v. 57, p. 57–68, 1998.

BOUGHTON-SMITH, N. K. et. al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet.** v.342 p.338–340, 1993.

BOUMA G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol.**, v.3, p.521–533, 2003.

BOYKO, E.J.; PERERA, D.R.; KOEPESELL, T.D.; KEANE, E.M.; INUI, T.S. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. **Scand J Gastroenterol.** v. 23 p.1147–1152, 1988.

BRITO, T. V *et al.* Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **J Pharm Pharmacol.**, v. 65, p. 724–733, 2013.

BRITO, T.V. *et al.* Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 66(8), p. 1161-70, 2014.

BRITO, T. V *et al.* Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydrate Polymers.** 2016

BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; ROBERTS, J. N.; MÜLLER, M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Carrageenan is a potent inhibitor of Papillomavirus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. 671-680, 2006.

CABRAL, I. S. R. *et al.* PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS MARINHAS E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, jul./dez. 2011.

CAGIN, Y. F. Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats. *Experimental and therapeutic medicine.* v.12 p. 2958-2964, 2016.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis– A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167–180, 2009.

CAMPOS F.G., TEIXEIRA, M.G. Doença de Crohn. In: Coelho JCU, editor. *Aparelho digestivo: clínica e cirúrgica.* 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p.772-85.

CAN, Guray, *et al.* The efficacy of tyrosine kinase inhibitor dasatinib on colonic mucosal damage in murine model of colitis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology.** v. 40, p. 504—516, 2016.

CASSATELLA, M. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol Today.** v.16, p. 21–26, 1995.

CETINKAYA, A. *et al.* Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. **Dig Dis Sci.** v. 51 p. 488-494, 2006.

CETINKAYA, A. *et al.* Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **Tohoku J Exp Med.** v. 206 p.131-139, 2005.

CHAKRABORTY, K.; & PAULRAJ, R. Sesquiterpenoids with free radical scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. **Food Chemistry**, v.122, p.31–41, 2010.

CHASSAING, B.; AITKEN, J.D.; MALLESHAPPA, M.; VIJAY-KUMAR, M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Curr Protoc Immunol**. v.104 p. 15-25, 2014.

CHAVES, L.S *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacol Immunotoxicol** v. 35 p. 93–100, 2013.

CHO J.H. The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol**. v.133, p.1427-39, 2007.

COHEN, R.D., STEIN, R., HANAUER, S.B. Intravenous cyclosporine in ulcerative colitis: a five-year experience. **Am J Gastroenterol**. v.199 n. 94 p.1587-92.

CORMAN, Marvin L. **Colon and rectal surgery**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1743 p.

CORREA, M.F.P.; MELO, G.O.; COSTA, S.S. Natural products from plant origin potentially useful in the asthma therapy. **Braz J Pharmacogn**. v.18, p. 785–797, 2008.

COSNES, J., et alii. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.140, p.1785-94, 2011.

COSTA, D. S. et al. Sulphated Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Gracilaria caudata* Exerts an Antidiarrhoeal Effect in Rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, p.440–448, 2016.

COURA, C. O.; DE ARAUJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERE, A. L. G.; FONTES, B. P., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.110, n.4, p.335–341, 2012.

Crohn's and Colitis Foundation of America, Inc. 1996-2002.  
<http://www.ccfa.org/physician/colitisb.html>

CUMASHI, A. et. al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**. v.17, p.541–552, 2007.

CUZZOCREA, S. *et al.* Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/ reperfusion injury. **Pharmacol Ver**. v.53 p. 135–159, 2001.

DAMASCENO, S. R. B. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** v.23 n.2 Mar.- Apr. 2013

DANESE S, FIOCCHI C. Ulcerative colitis. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 18, p. 1713-25, 3 nov. 2011.

DHARGALKAR, V.K.; VERLECAR, X.C. Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n.1, p. 229 - 242, 2009.

DOHI, T.; FUJIHASHI, K.; KIYONO, H., et al. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. **Gastroenterology**. v. 119 p.724-733, 2000

DUERR, R.H. Update on the genetics of inflammatory bowel disease. **J Clin Gastroenterol**. v.37 p. 358-367, 2003.

EL-ABHAR, H.S.; HAMMAD, L.N.; GAWAD, H.S. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. **J Ethnopharmacol**. v.118 p. 367-372, 2008.

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

ESBERARD, B.C. Etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v.11, p.1-5. 2012.

ESCRIG, J. A., JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I., PULIDO, R., & SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.81, p.530–534, 2001.

FANTINI, A. J. *Myrrh* attenuates oxidative and inflammatory processes in acetic acid-induced ulcerative colitis. **Experimental and therapeutic medicine**. v.12 p. 730-738, 2016.

FARIAS, E.A.O. Prospecção do rendimento da carragenina extraída da alga *Hypnea musciformis* coletada na Praia do Coqueiro, estado do Piauí, submetida a quatro tratamentos prévios. **Demetra**. v. 9, n.4, p. 1019-1025, 2014.

FARRELL, R.J.; LAMONT, J.T. Microbial factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 31 p.41–62, 2002.

FELLOWS, I.W.; FREEMAN, J.G.; HOLMES, G.K. Crohn's disease in the city of Derby. **Gut**. v.3, n.11, p. 1262-5, 1990.

FERNANDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L.; VELEZ, H.;

ROSADO, A. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr. Res.**, v. 190, p. 77–83, 1989.

FIOCCHI, Claudio. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **GASTROENTEROLOGY**. v.115, p.182–205,1998.

FONSECA, R. J. C. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n.3, p. 539-545, 2008.

FREILE-PELEGRIN, Y., & MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatan Peninsula. **Bioresource Technology**, v.96, n.3, p.295–302, 2005.

FUSS, I.J.; HELLER, F.; BOIRIVANT, M. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **J Clin Invest**. v.113, p.1490–1497, 2004.

GASSULL, M.A.; FERNANDEZ-BANARES, F.; CABRÉ, E.; ESTEVES-COMAS, M. Enteral nutrition in inflammatory bowel disease. Clinical nutrition: enteral and tube feeding. Philadelphia. **W.B. Saunders**. p.403-16, 1997.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GRAMLICH, T.; PETRAS, R. E. Pathology of inflammatory bowel disease. **Semin Pediatr Surg**. v.16 p.154–163, 2007.

GRISHAM, M.B.; YAMADA, T. Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. **Ann NY Acad Sci**. v. 664 p. 103-115, 1992.

GUAZELLI, C. F. S. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. **Journal of Natural Products**. v. 76, p. 200–208, 2013.

HAGAR, H.H.; EL –MEDANY, A., EL-ETER, E.; ARAFA, M. Ameliorative effect of Pyrrolidinedithiocarbamate on acetic acid induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**. v.554 p. 69-77, 2007.

HALYNA, M. Anti-Inflammatory Effects of Protein Kinase Inhibitor Pyrrol Derivate. **Scientific World Journal**. p. 8, 2016.



HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators Inflamm.** p. 2007:45673, 2007.

HANAUER, Stephen B.; M.D. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. **Inflamm Bowel Dis.** v. 12, n.1, January, 2006.

HARPUTLUOGLU, M.M. et, al. The effects of Gingko biloba extract on acetic acid-induced colitis in rats. **Turk J Gastroenterol.** v.17 p. 177-182, 2006.

HENDRICKSON, B.A.; GOKHALE, R.; CHO, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin Microbiol Rev.** v.15 p.79–94, 2002.

HERMIDA-RODRIGUES, C.; CANTERO, P.J.; GARCIA-VALRIBERAS, R.; PAJARES, G. J.M.; MATE-JIMENEZ J. High-dose intravenous cyclosporine in steroid refractory attacks of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology** v.199 n.46 p. 2265-8.

HIGUCHI, L. M.; KHALILI, H.; CHAN, A. T.; RICHTER, J. M.; BOUSVAROS, A.; FUCHS, C. S. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. **American Journal Gastroenterology**, v. 107 n. 9, p. 1399-406, 2012.

HORTA, P.A. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia. 301 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

JEWEL, D.P. Ulcerative colitis. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. 6th ed. Philadelphia: **Saunders**, 1998. p. 1735-61.

KAIN, J.M.; DESTOMBE, C. A review of the life history, reproduction and phenology of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 269-281, 1995.

KATHLEEN A.; HEAD, N.D.; JULIE S.; JURENKA, M.T. (ASCP). Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. **Alternative Medicine Review.** n.3, v. 8, p.247-283, 2003.

KEEBLE, J.E. et al. Hydrogenperoxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1- dependent and independent mechanism. **Pain.** v.141 p. 135–142, 2009.

KLOAREG, K.; QUATRANO, R. S. Cell walls of marine algae: structure and function. **Oceanog. Mar. Biol.** v. 26, n., p. 57, 1988.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology.** v.133, p.427-437. 2004.

KORZENICK, J.R.; PODOLSKY, D.K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nature Rev.** v.5, p.197-209, 2006.

KOUTROBAKIS, I.; MANOUSOS, O.N.; MEWWISSEN, S.G.M.; Pena, A.S. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology.** v.43 p. 381–393, 1996.

KRONBLUTH, A.; SACHAR, D.K.; SALOMON, P. Crohn's disease. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. 6th ed. Philadelphia: **Saunders**,1998. p. 1708-34.

KURALAY, F. et. al. Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. **J Toxicol Environ Health A.** v.66 n.2 p.169–179, 2003.

LAKATOS, P.L.; FISCHER, S.; LAKATOS, L. et al. Current concept on the pathogenesis of IBD – crosstalk between genetics and microbial factors: pathogenic bacteria and bacterial sensing or changes in mucosal integrity take “tool”? **WJG.** v.12, p.1829-41,2006.

LANGMEAD, L.; MAKINS, R.J.; RAMPTON, D.S. Anti-inflammatory effects of *aloe vera* gel in human colorectal mucosa *in vitro*. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.19, p. 521–527, 2004.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v.13, n.2, p.173–184, 2001.

LAHAYE, M.; & ROCHAS, C. Chemical-structure and physicochemical properties of agar. **Hydrobiologia**, v.221, p.137–148,1991.

LAHAYE, M.; & YAPHE, W. (1988). Effects of seasons on the chemical-structure and gel strength of *Gracilaria pseudoverrucosa* agar (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, v.8, n.4, p.285–301.

LARRICK, J.W.; Wright, S.C. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. **FASEB J.** v. 4 p. 3215-3223, 1990.

LIMA, É.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v.37, 2001.

LINDGREN, S., et., al. Effect of budesonide enema on remission and relapsed rate in distal ulcerative colitis and proctitis. **Scand J Gastroenterol.** v. 37 p.706-10, 2002.

LIU, Z.J.; YADAV, P.K.; SU, J.L.; WANG, J.S.; FEI, K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.** v. 15, p. 5784–5788, 2009.

LLESUY, S.F. “Especies Activas de Oxígeno”. In: Marroni, N.A.P. et al. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Canoas: Ulbra. 2002.

LOW, D.; NGUYEN, D. D.; MIZOGUCHI, E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. **Drug Design, Development and Therapy,** v.7, 2013.

IOANNOU, E.; & ROUSSIS, V. (2009). Plant-Derived Natural Products. Synthesis, Function and Application: Natural Products from Seaweeds. *Springer: Berlin, Germany*, p. 51-81.

LOFTUS, EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology.** v. 126, p. 1504–1517, 2004.

LOFTUS, C.G.; LOFTUS, E.V. J.R.; HARMSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R.; TREMAINE, W.J.; MELTON, L.J.; 3RD, SANDBORN, W.J. Update on the incidence and prevalence of Crohn’s disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. **Inflamm Bowel Dis.** v.13, n.3, p.254-61, 2007.

MACDONALD TT, MURCH SH. Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. **Baillieres Clin Gastroenterol** v.8 p.1-34, 1998.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion.** v.17 n.2 p.135–150, 1978.

MAHIDA YR, CESKA M, EFFENBERGER F, et al. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. **Clin Sci (Lond)** v. 82 p.273-275, 1992.

MARINHO-SORIANO, Eliane. *et. al.* Frontiers on algae bioactive compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 21 n.2 Mar.- Apr, 2011.

MARKS, D.J.B. Crohn’s Disease: an Immune Deficiency State. *Clinic Rev.* **Allerg. Immunol.** v. 38, p. 20–31, 2010.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; & RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules,** v.31, n.1–3, p.87–95, 2002.

MCCORMACK, G.; MCCORMICK, P.A.; HYLAND, J.M.; O'DONOGHUE, D.P. Cyclosporin therapy in severe ulcerative colitis: is it worth the effort? **Dis Colon Rectum**, v. 45 p.1200-5, 2002.

MEHRABANI, D. et, al. The effect of calendula officinalis in therapy of acetic Acid induced ulcerative colitis in dog as an animal model. **Iran Red Crescent Med J** v.13 p. 884-890, 2011.

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; & DE PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers.**, v.49, n.4, p. 491–498, 2002.

MINAIYAN, M.; ASGHARI, G.; TAHERI, D.; SAEIDI, M.; NASR-ESFAHANI, S. 2014. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. **Avicenna J. Phyto med.** v.4 p.127–136.

MIRANDA, A.; NORDSTROM, E.; MANNEM, A.; SMITH, C.; BANERJEE, B.; SENGUPTA, J.N. The role of transiente receptor potential vanilloid 1 in mechanical and chemical visceral hyperalgesia following experimental colitis. **Neurociense.** v.148 n.4 p.1021-32, 2016.

MOLODECKY NA, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54, jan. 2012.

MORA, J.R.; VON, ANDRIAN, U.H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. **Trends Immunol.** v.27 p. 224–235, 2006.

MURANO, E. Chemical-structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology.** v.7, n.3, p.245–254, 1995.

NAJAFI, A. et. al. The effect of sodium valproate on acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammopharmacol.** v. 25, p.137–145, 2017.

NEUMAN, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Transl Res.** v.149, n.4, p.173-86, 2007 Review.

NEURATH, M.F.; WEIGMANN, B.; FINOTTO, S. et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. **J Exp Med.** v.195, p.1129–1143, 2002.

OLIVEIRA, E.C.; PLASTINO EM 1994. *Gracilariaceae*. In Akatsuka I (ed.) *Biology of Economic Algae*. The Hague: SPB Academic Publishing, p. 185-226.

ONYIAH, J.C.; COLGAN, S.P.; Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 2016.

ORDÁS, I.; ECKMANN, L.; TALAMINI, M.; BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Ulcerative colitis. **The Lancet.** v. 380 p. 1606–1619, 2012.

ORIDA, N.K; LAI, C.; Nitric oxide and renal patients. **Dial Transplant**. v. 29, p. 174-185. 2000.

ORSI, P.R.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. *Hymenaeastigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of ethnopharmacology**. v. 151, n. 1, p. 380385, 2014.

PACHER, P. *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Ver**. v. 87 p. 315–424, 2007.

PAPADAKIS, K.A.; TARGAN, S.R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Annu Rev Med**. v.51,p.289–298, 2000.

PAVLICK, K.P. *et al.* Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radic Biol Med**. v. 33 p. 311–322, 2002.

PEREIRA, J.G. *et al.* Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydrate Polymers**. v. 108, p. 17–25, 2014.

PILE, J. E. *et al.* Interventional Effects of Plumbagin on Experimental Ulcerative Colitis in Mice. **Journal of Natural Products**. v. 76(6), p. 1001-1006, 2012.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med**. v. 347 n.6 p. 417-429, 2002.

PONTES, R.M.A.; MISZPUTEN, S.J.; FERREIRA-FILHO, O.F.; MIRANDA, C.; FERRAZ, M.B. Qualidade de vida em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal: tradução para o português e validação do questionário Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ). **Arq Gastroenterol**. v.4, n.2,p.137-43, 2004.

POPOV, S.V.; MARKOV, P.A.; NIKITINA, I.R.; PETRISHEV, S.; SMIRNOV, V.; OVODOV, Y.S. Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice. **World J Gastroenterol**. v. 12 p. 6646-6651, 2006.

QUILICI, F.A.; MISZPUTEN, S.J. editores. Guia prático: doença inflamatória intestinal. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

QUINDERÉ, A.L.G. *et al.* Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**. v. 65, p. 600-613, 2013.

RACHMILEWITZ, D. *et al.* Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**. v.36: p.718–723, 1995.

RADDATZ, D.; TOTH, S.; SCHWÖRER, H.; RAMADORI, G. Glucocorticoid receptor signaling in the intestinal epithelial cell lines IEC-6 and Caco-2: evidence of inhibition by interleukin-1beta. **International Journal of Colorectal Disease**. v. 16, p. 377-383, 2001.

RANDHAWA, P.K.; SINGH, K.; SINGH,N.; JAGGI,A.S. 2014. Are view on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **Korean J. Physiol. Pharmacol**. v. 18 p.279–288.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**. v.68 p.921–931, 2001.

RATH, H.C.; SCHULTZ, M.; FREITAG, R., et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. **Infect Immun**. v. 69 p. 2277–2285, 2001.

REES, D. A. Biogenesis of 3,6-anhydro-l-galactose. **Biochemical Journal**, v. 78 n.3, p. 25, 1961.

REDWAN, el-R.M.; TABLL, A. Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. **J Immunoassay Immunochem**. v. 28 p. 267-277, 2007.

REPKA, J.C.D. et al. Proposta de um novo modelo experimental de indução de doença inflamatória intestinal. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n.5, p. 548-554, 2004.

RIBBONS, K. A. et. al. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in Rhesus macaques. **Gastroenterology**. v.108 p.705–711, 1995.

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Braz J Med Biol Res**. v. 34, n. 5, p. 621-626, 2001.

ROCHA, A.C.; FERNANDES, E.S.; QUINTAO, N.L.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **Br J Pharmacol**. v.148, p.688–695, 2006.

RODRIGUES, J.A.G. et al. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 40, n.2, p. 224-231, 2009.

RUTGEERTS P, GEBOES K. Understanding inflammatory bowel disease – the clinician’s perspective. **Eur J Surg Suppl**. v. 586 p. 66-72, 2001.

SALVIANO, Flávia Nunes.; BURGOS, Maria Goretti Pessoa de A.; SANTOS, Eduíla Couto. PERFIL SOCIOECONÔMICO E NUTRICIONAL DE PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL INTERNADOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO. **Arq Gastroenterol.** v. 44, n. 2, abr-jun, 2007.

SARTOR R. B. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirshner JB, ed. **Inflammatory Bowel Disease.** v.199, p.153–178.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* v. 3, n.7, p. 390-407, 2006.

SATSANGI J., MORECROFT J., SHAH N.B., et al. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v.17 p.3–18, 2003

SINGER, I. I. et. al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.** v.111 p.871–885, 1996.

SPITZ, D.R. *et al.* Metabolic oxidation/ reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. **Cancer Metastasis Rev.** v. 23 p. 311–322, 2004

SANTIAGO, R.F. et al., Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation.** v. 38, n. 6, p. 2203-38(6):2203-2215, 2015.

SARTOR, R.B. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology.** v.106 p. 533-539, 1994.

SEO, H.G. et, al. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. **Arch Biochem Biophys.** v. 324 p. 41-47, 1995.

SHIVANANDA, S. et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). **Gut.** v. 39, p. 690–697, 1996

SILVA, R.O.; DOS SANTOS, G.M.; NICOLAU, L.A.; LUCETTI, L.T.; SANTANA, A.P.; CHAVES, L.D.E.S.; BARROS, F.C.; FREITAS, A.L.; SOUZA, M.H.; MEDEIROS, J.V. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Mar Drugs.** v. 9, p. 2188–2200, 2011.

SILVA RO *et. al.* A sulfated polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen induced gastrointestinal damage in rats. **Mar Drugs** v.10, p.2618–2633, 2012.

SILVA, V.G., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod**. V. 76, p. 1071–1077, 2013.

SILVA, R. O. Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.67, pp. 1017–1027, 2015.

SILVERBERG M.S., et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, v. 19 Suppl A, n. September, p. 5A-36A, set. 2005.

SOUZA MCR *et al.* Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Phyco**. v.19, p.153–160, 2007.

SOUZA, Mardem Machado de. et al. Qualidade de vida de pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. **Acta Paul Enferm**. v.24, n.4, p.479-84, 2011.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; TEIXEIRA, J. A., et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.287–292, 2012.

SORIANO, E.M. et al. Frontiers on algae bioactive compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 21, n.2, p. 2, 2011.

STANGE E.F., et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 2, n. 1, p. 1-23, mar. 2008.

SUBHANI, J., MONTGOMERY, S.M., POUNDER, R.E., et al. Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease (IBD) [abstract TW159]. **Gut**. v.42 n.A40, 1998.

SYMONDS D. A. The glycosaminoglycans of the human colon in inflammatory and neoplastic conditions. **Arch Pathol Lab Med**. v. 102 p.146-149, 1978.

THAM D. M., WHITIN J. C., COHEN H. J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. **Pediatric Research**, v. 51, p. 641-646, 2002.

TAHAN, G. *et al.* Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. **Dig Dis Sci**. v. 56 p. 715–720, 2011.



TYSK, C.; LINDBERG, E.; JÄRNEROT, G. et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. **Gut**. v.29 p.990–996, 1988.

TÜZÜN, A.; ERDİL, A.; İNAL, V.; AYDIN, A.; BAĞCI, S.; YEŞİLOVA, Z.; SAYAL, A.; KARAEREN, N.; DAĞALP, K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 569-572, 2002.

YADAV, P.K.; LIU, Z. Current strategies for the treatment of ulcerative colitis. *Recent. Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* v.3, p.65–72, 2009.

YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F., AMETANI, A. & KAMINOGAWA, S. *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 1667–1671, 1996.

YOSHIDA, N. et al. A novel water-soluble vitamin E derivative protects against experimental colitis in rats. **Antioxid Redox Signal**. v.1 n.4 p.555–562, 1999.

YIN, B. et al. Blocking TNF- $\alpha$  by combination of TNF- $\alpha$ - and TNFR-binding cyclic peptide ameliorates the severity of TNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**. v. 656, n. 1-3, p. 119-24, 2011.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. v. 189 p. 41–54, 2003

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v.12, n.3, p.301–308, 1998.

VALIENTE, O.; FERNANDEZ, L. E.; PEREZ, R. M.; MARQUINA, G., & VELEZ, H. Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Botanica Marina**. v.35, n.2, p.77–81, 1992.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. Algae: an introduction to physiology. Cambridge: *Academic Press*, 1997.

VANTRAPPEN, G.; GEBOES, K. Glycosaminoglycans and the gut. **Lancet**. v. 341 p. 730-731, 1993.

VARSHOSAZ, J.; EMAMI, J.; FASSIHI, A.; TAVAKOLI, N.; MINAIYAN, M.; AHMADI, F.; MAHZOUNI, P.; DORKOOSH, F. Effectiveness of budesonidesuccinatedextran conjugate as a novel prodrug of budesonide against acetic acid-induced colitis in rats. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 25, p. 1159-1165, 2010.

VAVRICKA, S. R., et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. **Am J Gastroenterol**, v. 106, p. 110-9, 2011.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VINOD PRABHU, V.; GURUVAYOORAPPAN, C. 2014. Protective effect of marine mangrove *Rhizophora apiculata* on acetic acid induced experimental colitis by regulating anti-oxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits. **Int. Immunopharmacol.**v.18 p.124–134.

WANG, B. G.; ZHANG, W. W.; DUAN, X. J.; & LI, X. M. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). **Food Chemistry**, v.113, p.1101–1105, 2009.

WIJESEKARA, I.; YOON, N.Y.; KIM, S.K. Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. **Biofactors**. v. v.36, n.6, p. 408-414, 2010.

WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240-6, 2014.

WILLER, M. S. et. al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**. v. 152, n.5 p. 140–148 Nov. 2016.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION GLOBAL GUIDELINES. **Inflammatory Bowel Disease**. August, 2015

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**. v. 448, p. 427–434, 2007.

ZALTMAN, Cyrla. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro, v.23 n.5 p.992-993, 2007.

ZUBIA, M.; FABRE, M. S.; KERJEAN, V.; LANN, K. L.; POUVREAU, V. S.; FAUCHON, M., et al. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**, v.116, p.693–701, 2009.

# **ANEXO**

## Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
 Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo visceral da fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha vermelha, *Garcilaria caudata* durante a colite experimental induzida por ácido acético**", registrada nº **194/16**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA- Farmacologia Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **19/09/2016**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	<b>Outubro/ 2016 à Março/ 2017</b>
Espécie/Linhagem/raça	<b>Camundongo heterogênico/ Swiss</b>
Nº de Animais	<b>186</b>
Peso/ Idade	<b>25-30 g/ ---</b>
Sexo	<b>Machos</b>
Origem	<b>Biotério da Universidade Federal do Piauí- Teresina- PI.</b>

Teresina, 16 de Setembro de 2016.

  
**Prof. Ivete L. de Mendonça**  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora