



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

LUCAS RODRIGUES DE CARVALHO

**EPIISOPILOTURINA, UM ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EXTRAÍDO DE *Pilocarpus microphyllus*, REDUZ OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS.**

PIAUI  
2016

LUCAS RODRIGUES DE CARVALHO

**EPIISOPILOTURINA, UM ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EXTRAÍDO DE *Pilocarpus microphyllus*, REDUZ OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**

LUCAS RODRIGUES DE CARVALHO

**EPIISOPILOTURINA, UM ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EXTRAÍDO DE *Pilocarpus microphyllus*, REDUZ OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profº Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (Orientador)**  
**Universidade Federal do Piauí (UFPI)**

---

**Profª Dra. Rita de Cassia Meneses Oliveira**  
**Universidade Federal do Piauí (UFPI)**

---

**Profº Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**  
**Universidade Federal do Piauí (UFPI)**

A meus pais que tanto me incentivaram, pelo apoio e carinho em todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, razão da minha existência te agradeço senhor por tudo que me proporcionastes, pelas grandes batalhas que enfrentei, tu sempre estive ao meu lado, e mesmo quando achava que não suportaria, tu me erguestes e me fez continuar para que no final eu alcançasse a vitória.

Ao meu orientador André Luiz dos Reis Barbosa por me conduzir sempre de maneira ética e sábia, dividindo o conhecimento e me guiando para que eu não tropeçasse em meio às dificuldades encontradas nesse árduo caminho.

Aos colegas do laboratório LAFFEX, que estavam presentes me ajudando e auxiliando, em especial ao Tarcísio Vieira, que me acolheu e ajudou desde o início, incentivando e guiando todos os meus passos, sempre me conduziu colaborando com os experimentos e resultados dessa pesquisa. Grande amigo, muito obrigado por tudo.

Aos Laboratórios BIOTEC, LEFAG, LAFFEX, NEMPI, NPPM por me receber e proporcionar toda a infraestrutura necessária para a realização dessa pesquisa, que é de grande valia para sociedade científica brasileira.

Aos meus Pais, Arlete e Jorge, fonte inesgotável de amor e compreensão, pela garra e perseverança no propósito da educação de seus filhos, muitas vezes deixaram os seus sonhos para realizar os nossos, a vocês queridos pais, meu amor e admiração eterno.

Aos meus irmãos Daniel e Danyella pelo companheirismo e paciência, por sempre estarem ao meu lado incentivando e ajudando nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, em especial Dainesy Martins e Andreanne Vasconcelos que sempre estiveram comigo, ajudando e compartilhando os seus saberes, muito me apoiaram para que essa pesquisa tivesse êxito.

À banca, professora Dra. Rita de Cássia e o Dr. Daniel Vasconcellos pelas valiosas contribuições que fizeram a fim de engrandecer e melhorar a pesquisa, à vocês meu muito obrigado.

## RESUMO

LUCAS, R. C. **EPIISOPILOTURINA, UM ALCALOIDE IMIDAZÓLICO EXTRAÍDO DE *Pilocarpus microphyllus*, REDUZ OS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DURANTE A COLITE INDUZIDA POR TNBS.** Teresina, 2016. 88p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal do Piauí.

A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por inflamação crônica de uma ou mais partes do tubo digestivo, acometendo geralmente o íleo e o cólon, mas pode acometer também outras regiões intestinais de forma descontínua. Um dos principais alcaloides extraídos da *Pilocarpus microphyllus* é a epiisopiloturina, e sua similaridade na estrutura química com a pilocarpina torna a epiisopiloturina um alcaloide promissor quanto as suas propriedades biologicamente ativas. Dessa forma, o presente estudo buscou investigar o efeito da epiisopiloturina sobre os parâmetros inflamatórios e deletérios da mucosa colônica durante a colite induzida por TNBS em ratos. Após o terceiro dia de indução da colite, a atividade anti-inflamatória e antioxidante da epiisopiloturina (0,1; 0,3 e 1 mg/kg via *i.p*) foi avaliada. Os resultados demonstraram que a epiisopiloturina na dose 1,0 mg/kg (melhor dose) reduziu significativamente os escores macroscópicos, microscópicos e peso úmido dos cólons em relação ao grupo TNBS. O grupo epiisopiloturina foi capaz de reduzir a infiltração neutrofílica juntamente com a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . A epiisopiloturina na dose 1,0 mg/kg aumentou os níveis de GSH concomitante diminuição dos níveis de MDA. O grupo epiisopiloturina demonstrou redução da imunomarcagem para IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2 e redução na contagem de células por campo positivas. O grupo tratado com a epiisopiloturina conseguiu reduzir a expressão de COX-2 e iNOS no colón quando comparada ao TNBS. Com isso, a epiisopiloturina demonstrou ter um efeito antiinflamatório e antioxidante no modelo experimental de colite induzida por TNBS.

**Palavras-chave:** Doença de Crohn, Atividade anti-inflamatória, *Pilocarpus microphyllus*, Epiisopiloturina.

## ABSTRACT

LUCAS, R. C. **EPIISOPILOTURINE, AN ALKALOID IMIDAZOLE EXTRACTED FROM *Pilocarpus microphyllus*, REDUCES THE PARAMETERS INFLAMMATORY AND LIPID peroxidation DURING INDUCED Colitis.** Teresina, 2016. 88p. Dissertation (MSc in Pharmacology) - Federal University of Piauí.

Crohn's disease (CD) is characterized by chronic inflammation of one or more parts of the digestive tract, usually involving the ileum and colon but may also affect other intestinal regions discontinuously. One of the main alkaloid extracted from *Pilocarpus microphyllus* is epiisopiloturina, and their similarity in chemical structure with pilocarpine makes epiisopiloturina a promising alkaloid as their biologically active properties. Thus, aim of the present study was to investigate the effect of epiisopiloturina on inflammatory parameters and deleterious of colonic mucosa during TNBS-induced colitis in rats. After the third day of colitis induction, anti-inflammatory and antioxidant activity of epiisopiloturina (0.1, 0.3 and 1 mg / kg i.p. route) was evaluated. The results showed that epiisopiloturina dose 1.0 mg / kg (best dose) significantly reduced scores macroscopic, microscopic and wet weight of the colon compared to TNBS group. The epiisopiloturina group was able to reduce neutrophil infiltration together with the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . The epiisopiloturina at a dose 1.0 mg / kg increased the GSH levels concomitant decrease in MDA levels. The epiisopiloturina group demonstrated reduced immunostaining for IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-2 in epiisopiloturina group had shorten and decrease in cell count by positive field. The group treated with epiisopiloturina able to reduce the expression of COX-2 and iNOS in the colon compared to TNBS. Thus, the epiisopiloturina shown to have an anti-inflammatory and antioxidant effects in the experimental model of colitis induced by TNBS.

**Keywords:** Crohn's disease, Anti-inflammatory activity, microphyllus *Pilocarpus*, Epiisopiloturina.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tabela de escores macroscópicos lesões do intestino.....	40
Tabela 2	Tabela de escores microscópicos lesões do intestino.....	41
Tabela 3	Avaliação histológica de lesões do intestino.....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência e prevalência mundial combinadas da Doença de Crohn	18
Figura 2	Estrutura química do TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico)	27
Figura 3	<i>Pilocarpus microphyllus</i>	30
Figura 4	Estrutura química da molécula de pilocarpina	31
Figura 5	Estrutura química da Epiisopiloturina	32
Figura 6	Ilustração do protocolo experimental.	37
Figura 7	Indução da colite. Rato suspenso pela cauda.	39
Figura 8	Avaliação dos escores macroscópicos de lesão	49
Figura 9	Peso úmido dos cólons de ratos com ou sem colite	50
Figura 10	O tratamento com Epiisopiloturina melhora as alterações histopatológicas em colite induzida por TNBS	52
Figura 11	Atividade da MPO no cólon no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.	53
Figura 12	Epiisopiloturina reduz os níveis de IL-1 $\beta$ no cólon de camundongos submetidos à colite intestinal induzida por TNBS	54
Figura 13	Concentração de GSH no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite	55
Figura 14	Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite	56
Figura 15	Epiisopiloturina 1 mg/kg reduz os níveis de NO $x$ no cólon de ratos submetidos à colite por TNBS	57
Figura 16	Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de iNOS nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS	59
Figura 17	Contagem de células por campo positivas para iNOS.	60
Figura 18	Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de IL-1 $\beta$ nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS	61
Figura 19	Contagem de células por campo positivas para IL-1 $\beta$	62

- Figura 20 Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de COX-2 nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS. 63
- Figura 21 Epiisopiloturina diminui o número de células imunomarcadas para COX-2 no cólon de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS. 64
- Figura 22 Epiisopiloturina reduz a expressão proteica de iNOS e COX-2 no cólon de ratos submetidos a colite induzida por TNBS. Mediante Western blot (n=6) # $p < 0,05$  versus grupo controle; e \* $p < 0,05$  versus grupo controle TNBS. 65

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-MMP	metilmercaptapurina
6-TGN	nucleotídeos 6-tioguanina
ANOVA	Análise de variância
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
CU	Colite Ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DIIs	Doenças Inflamatórias Intestinais
DSS	Sulfato de sódio dextrano
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI	Epiisopiloturina
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
H&E	Hematoxilina e eosina
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
M	Molar
MDA	Malondialdeido
MPO	Mieloperoxidase da enzima
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear-Kb
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Metabólitos de óxido nítrico

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PMNs	leucócitos polimorfonucleares
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBST	Tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
THC	D9-tetra-hidrocanabinol
THDCA	ácido taurohiodeoxicólico
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	Problematização.....	16
1.2	Doenças Inflamatórias Intestinais.....	18
1.3	Fisiopatologia da Doença de Crohn.....	20
1.4	Tratamento convencional da DC.....	22
1.5	Colite induzida por TNBS.....	26
1.6	Plantas medicinais aplicadas no tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais.....	28
1.7	Jaborandi como fonte de alcaloides com propriedades terapêuticas.....	29
1.8	Epiisopiloturina e uso terapêutico.....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
<b>3.0</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
3.1	Aspectos éticos.....	35
3.2	Animais.....	35
3.3	Extração e isolamento da Epiisopiloturina.....	35
3.4	Protocolo experimental.....	36
3.4.1	Grupos experimentais.....	36
3.5	Modelo de doença de Crohn induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).....	38
3.6	Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite.....	39
3.7	Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão.....	39
3.8	Ensaio de mieloperoxidase.....	41
3.9	Dosagem da citocina IL-1 $\beta$ .....	42
3.10	Análise dos níveis de glutatona na mucosa intestinal.....	42
3.11	Determinação de malonilaldeído na mucosa intestinal.....	43
3.12	Dosagem de nitrito/nitrato.....	43
3.13	Efeito da Epiisopiloturina sobre a imunomarcação de iNOS, IL-1 $\beta$ e COX-2 no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS.	44
3.14	Expressão protéica de iNOS, COX-2.....	45

3.14.1	Extração de proteínas.....	46
3.14.2	Dosagem de proteína.....	46
3.14.3	Western Blotting.....	46
3.15	Análise estatística.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	Avaliação dos escores macroscópicos de lesão em cólons de ratos com ou sem colite.....	49
4.2	Peso úmido do cólon de animais com ou sem colite.....	50
4.3	Avaliação dos escores microscópicos de lesão em cólons com ou sem colite.....	51
4.4	Efeito da Epiisopiloturina no cólon sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) de animais submetidos à colite induzida por TNBS.....	53
4.5	Efeito da Epiisopiloturina nos níveis teciduais de IL-1 $\beta$ no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.....	54
4.6	Efeito da Epiisopiloturina sobre a quantificação de glutathiona (GSH) no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.....	55
4.7	Efeito da Epiisopiloturina sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.....	56
4.8	Efeito da Epiisopiloturina nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.....	57
4.9	Efeito da epiisopiloturina sobre a imunomarcação de iNOS, IL-1 $\beta$ e COX-2 no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS.....	58
4.10	Expressão protéica de iNOS e COX-2.....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO 1- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE PROJETO EM COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Problematização

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem duas desordens crônicas do intestino: doença de crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU). As DII ocorrem em todo o mundo e representam um sério problema de saúde, pois atingem preferencialmente pessoas jovens, cursam com recidivas freqüentes e admitem formas clínicas de alta gravidade (CAMBUI; NATALI, 2015).

Estima-se que a cada 1.000.000 habitantes cerca de 50 a 70 pessoas tendem a contrair as DII por ano e a faixa etária mais acometida por essa doença é de 15 a 30 anos de idade (CAMBUI E NATALI, 2015). Não há predominância de sexo, mas uma possível associação com certas síndromes genéticas. Sugere-se que as DII decorram de anormalidades imunológicas celulares, ou seja, da reatividade anormal dos linfócitos T da mucosa gastrintestinal a uma microflora normal não patogênica, porém a patogênese permanece desconhecida (TILLACK *et al.*, 2014).

A RCUI consiste em uma inflamação idiopática que envolve a mucosa do cólon e do reto, resultando em friabilidade difusa e erosões com sangramento. Pode em 40 a 50% dos pacientes, ser limitada ao reto ou ao retossigmóide. Em 30 a 40% dos doentes vai além do sigmóide, não atingindo o cólon em toda a sua extensão. Os principais sintomas são: diarreia, entero-hemorragia, tenesmo, eliminação de muco e dor abdominal tipo cólica. A doença é caracterizada por períodos de recidiva sintomática e remissões, os sintomas em geral, permanecem por semanas e até meses. Além disso, há intensa correlação da gravidade com a extensão da doença. (SARTOR, 2006).

A DC caracteriza-se por inflamação crônica de uma ou mais partes do tubo digestivo. A DC acomete geralmente o íleo e o cólon, mas pode acometer também outras regiões intestinais de forma descontínua. Essa patologia pode vir associada com a formação de granulomas intestinais e fistulas e a lesão gerada por ela atinge locais distantes do foco da inflamação primária que está no cólon (ASSCHE *et al.*, 2010; CONRAD, 2014).

A apresentação clínica da doença varia de acordo com a extensão, a intensidade e as complicações presentes. Acomete, com maior freqüência, o íleo terminal e o cólon, iniciando-se tipicamente com crises de diarreia, febre, dor abdominal e emagrecimento. Na evolução, podem surgir complicações locais,



nutricionais e sistêmicas. A doença se agrava e as crises tornam-se mais freqüentes, gerando comprometimento do estado geral e piora da qualidade de vida do indivíduo (ASSCHE *et al.*, 2010; LAASS; ROGGENBUCK; CONRAD, 2014).

Por ser uma doença idiopática e que acomete uma grande parcela da população mundial levando a uma diminuição da qualidade de vida desses indivíduos, além dos altos custos e inúmeros efeitos colaterais dos tratamentos convencionais dessa patologia, se faz necessário elaborar estratégias voltadas ao tratamento da doença que restaure as funções imune e inflamatória relacionadas ao quadro infeccioso dessa afecção intestinal.

Existem varias espécies de plantas com propriedades medicinais catalogadas no Brasil. Dentre elas, destacam-se o jaborandi, da espécie *Pilocarpus microphyllus*, a qual é utilizada para o isolamento de alcaloides como propriedades farmacológicas (JUN-HO *et al.*, 2013).

Um dos principais alcaloides extraídos do jaborandi é a epiisopiloturina, que possui estrutura química similar a pilocarpina, tornando-a um alcaloide promissor quanto as suas propriedades farmacológicas. (VERAS *et al.*, 2013).

## 1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais

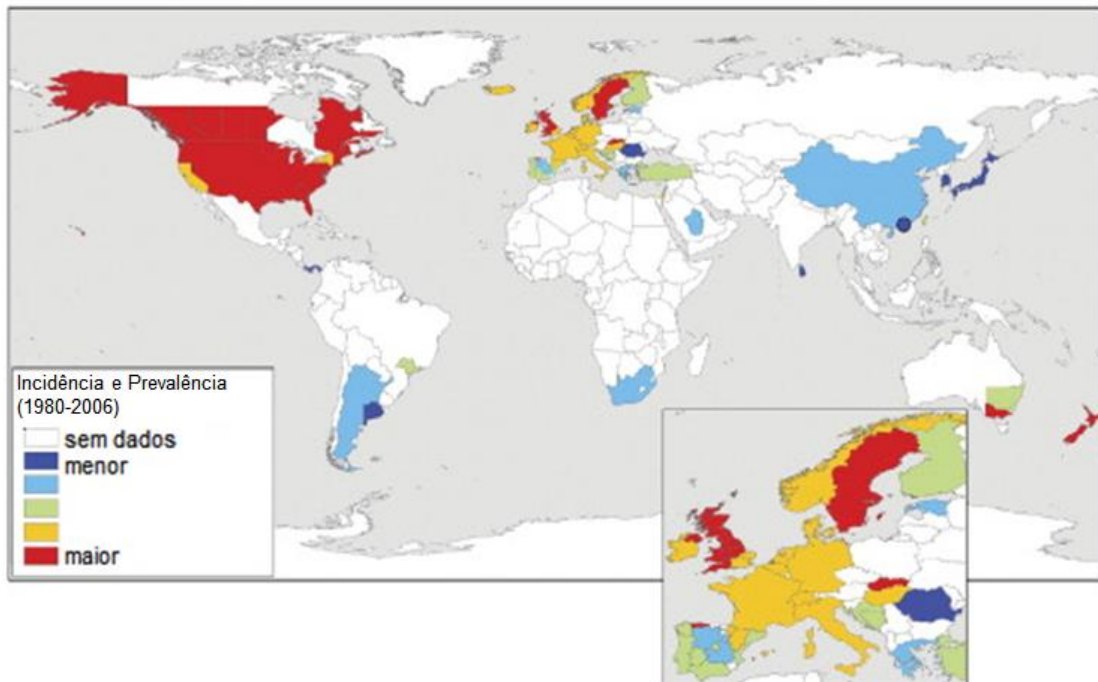
As Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs) abrangem um conjunto de condições inflamatórias com etiopatogenia indefinida que afetam o trato intestinal, entre as quais destacam-se a doença de crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) (CAMBUI; NATALI, 2015).

A DC é um processo inflamatório de caráter crônico que afeta o intestino desde segmentos proximais, como a boca, até segmentos mais distais, como o ânus. De acordo com a décima revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10 versão 2016) proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016) a Doença de Crohn é considerada uma enterite regional e dividida em: K50.0 - DC do intestino delgado, a qual afeta duodeno, íleo e jejuno; K50.1 - DC do intestino grosso, que inclui a colite granulomatosa e afeta cólon e reto; K50.8 - Outras formas de DC; K50.9 - DC inespecífica.

Os sintomas da DC são heterogêneos, mas geralmente incluem diarreia sanguinolenta ou não por mais de 6 semanas, o que ajuda a diferenciar da diarreia infecciosa; dor abdominal e/ou perda de peso; também sendo comum sintomas sistêmicos de mal-estar, anemia, anorexia ou febre (ASSCHE et al., 2010). Manifestações extraintestinais podem ocorrer antes mesmo que os sintomas característicos se tornem proeminentes, sendo as mais frequentes anomalias reumatológicas, fístulas perianais e manifestações dermatológicas, como eritema nodoso (ASSCHE et al., 2010; LAASS; ROGGENBUCK; CONRAD, 2014).

As DIIs constituem um problema de saúde pública em muitos países. As incidências mundiais descritas para CU e DC variam de 0 a 24,3/100.000 habitantes e de 0 a 20,2/100000 habitantes, respectivamente, com as maiores prevalências na Europa e América do Norte, como mostra a figura 1 (WILSON, 2015; MOLODECKY et al., 2012).

Figura 1 – Incidência e prevalência mundial combinadas da Doença de Crohn.



Adaptado de: MOLODECKY et al., 2012.

Cambui e Natali (2015) relatam que existe uma tendência mundial para o aumento da incidência em torno de 50 a 70 casos/1.000.000 por ano, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. A DC afeta 1,4 milhões de norte-americanos, dos quais 140 mil com idade de até 18 anos. Aproximadamente 25% de todos os novos casos na população têm menos de 20 anos de idade, e cerca de 30 mil novos pacientes são diagnosticados anualmente (BANDZAR; GUPTA; PLATT, 2013). A incidência de DC e CU aumentou na América do Norte e Europa Ocidental durante o século XX (NØRGÅRD *et al.*, 2014). No entanto, são poucos os relatos sobre se a incidência diminuiu, estabilizou ou mesmo continuou a aumentar no momento presente, principalmente no Brasil.

No Brasil, por ainda ser muito desconhecida, pouco se sabe sobre a real incidência da DII. Alguns estudos revelam que existe uma maior incidência nas regiões Sul e Sudeste. Dessa forma há uma necessidade de mais pesquisas epidemiológicas em nosso país para que possamos ter dados mais fidedignos quanto à essa patologia. Atualmente é observado um esforço em conjunto dos centros nacionais de referência das DII no sentido de coletar dados estatísticos mais

confiáveis que possam ser comparados e discutidos com os achados mundiais.(DAMIAO AOMC; SIPAHI AM, 2004).

### 1.3 Fisiopatologia da Doença de Crohn

A fisiopatologia da DC envolve fatores imunológicos, genéticos e ambientais, porém sua etiologia não está totalmente revelada. Em linhas gerais, a DC está associada a um aumento local de células Th1 e Th17 do sistema imune da mucosa intestinal, levando a um aumento da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 17 (IL-17) (TILLACK et al., 2014; OGINO et al., 2013).

Células Th17 presentes na mucosa intestinal regulam a imunidade contra uma variedade de bactérias, incluindo *Mycobacteria tuberculosis*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter rodentium* e *Pneumocystis carinii*, além de provavelmente serem responsáveis pelo controle de fungos patogênicos como *Candida albicans* (YANG et al., 2014). Assim, a atividade anormal dessas células pode implicar o surgimento de doenças inflamatórias como a DC.

De fato, pesquisas demonstram que um desequilíbrio na relação entre a microbiota intestinal comensal e o sistema imune do hospedeiro pode resultar no desenvolvimento da DC em indivíduos geneticamente suscetíveis (BAUMGART; SANDBORN, 2012; GERARD et al., 2015). De maneira simplificada, esse desequilíbrio pode estar na diminuição da diversidade de bactérias comensais (KOSTIC; XAVIER; GEVERS, 2014; FUJIMOTO et al., 2013); na disfunção de células de Paneth, que são uma das principais linhagens de células epiteliais responsáveis por produzir peptídeos antimicrobianos (CHAMAILLARD; RADULOVIC, 2016); na alteração da expressão, síntese e secreção de muco pelas células caliciformes devido mutações no gene MUC (DOROFEYEV et al., 2013); ou no defeito em junções oclusivas das células epiteliais do intestino via sinalização de TNF- $\alpha$ , resultando em perda da barreira epitelial (SU et al., 2013). Esses fatores levam ao aumento da permeabilidade e acesso de antígenos presentes no lúmen à lâmina própria, a qual é densamente repleta com células do sistema imune inato, desencadeando uma resposta inflamatória.

Evidências genéticas reforçam o papel da microbiota intestinal na patogênese da DC. Mutações no gene NOD2/CARD15 (*nucleotide-binding oligomerisation domain 2/caspase recruitment domains 15*) estão fortemente associados com o

aumento do risco de desenvolvimento de DC, uma vez que perde a função primária na defesa imunitária contra bactérias (SALKIC et al., 2015; KOSTIC; XAVIER; GEVERS, 2014). NOD2 é expresso nas células de Paneth que estão localizadas predominantemente na porção terminal do íleo, sendo capaz de induzir a produção do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e, por conseguinte, de citocinas pró-inflamatórias e de peptídeos antimicrobianos, além de ativar a via de autofagia celular (KOSTIC; XAVIER; GEVERS, 2014; SALEM et al., 2015).

Sabe-se que o aumento da iNOS é um dos responsáveis por efeitos de perda de função e integridade intestinal na doença intestinal inflamatória. Entretanto, o papel do NO na fisiopatologia da colite ainda não está totalmente elucidado, porém existem indícios que favorecem a participação do NO em processos patológicos (FILLMANN E MARRONI, 2002). Estudos revelaram que em pacientes com a doença de Chron há um aumento significativo da iNOS que se encontra em parâmetros inflamatórios histológicos tais como a depleção de células caliciformes e ulcerações (KOLIOS, VALATAS E WARD, 2004).

A indução de iNOS no epitélio do cólon humano inflamado está associada com a formação de peroxinitrito e a nitração celular. Ademais, é conhecido que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio desempenham um papel chave na DII. Estas espécies são agentes citotóxicos, que induzem a lipoperoxidação e estresse oxidativo celular por proteínas de ligação, lipídeos e ácidos nucleicos, que causam morte, dano e, eventualmente, disfunção celular (ZINGARELLI, SZABÓ e SALZMAN, 1999).

Além disso, há outros fatores presentes nos processos inflamatórios, um deles é a cicloxigenase (COX), uma enzima que está envolvida com a formação de importantes mediadores biológicos como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano (HALTER et al., 2001), existe três formas da cicloxigenase: COX-1, COX-2 e COX-3, sendo a COX-2 encontrada em macrófagos ativados ou em outras células em sítios de inflamação (FILLMANN et al., 2007). A enzima COX-2 é identificada em epitélios que tenham inflamação, não sendo presentes em epitélio normal, deste modo há um aumento da expressão desta em doenças intestinais inflamatórias (HALTER et al., 2001).

Menos recente, Wakefield et al. (1989), estudando a patogênese vascular da DC, demonstra que a via procoagulante celular, que faz parte da resposta imune mediada por células, pode ser induzida por uma lesão vascular trombótica discreta,

e se encontra ativa na DC, representando um possível foco de atividade para o estímulo biológico que causa a doença. Consistentemente, Ibrahim e colaboradores (2010) relataram que a circulação mesentérica ou a microcirculação intestinal alteradas e a isquemia intestinal são potenciais fatores etiológicos de doenças inflamatórias intestinais, embora seu envolvimento possa ser secundário.

Mecanismos relacionados ao estresse oxidativo também tem sido considerados potenciais fatores etiológicos da DC, mediante um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) oriundas do sistema imune hiperreativo e as enzimas antioxidantes. Os compostos  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , e  $HO^{\cdot}$  secretados por fagócitos se acumulam em sítios de inflamação resultando em peroxidação lipídica e podem potencializar as reações imunes, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), além de causarem dano tecidual e dano ao DNA (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; MORET-TATAY *et al.*, 2016).

Adicionalmente, mecanismos epigenéticos relacionados, sobretudo, a microRNAs, uma classe de RNAs não codificantes que regulam a expressão de genes em nível pós-transcricional, também são considerados elementos chaves na patogênese da DC, conforme relata Moret-Tatay *et al.* (2016). Os microRNAs estão envolvidas no desenvolvimento de células imunes maduras e no controle de suas funções, sendo capazes de regular citocinas envolvidas no processo inflamatório, podendo regular a permeabilidade das junções oclusivas no epitélio intestinal, a expressão de IL-12/IL-23 p40, diferenciação de células Th17 e o tráfico de células inflamatórias (IBORRA *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2015). Guo e colaboradores, investigando a expressão de microRNAs em mucosa ileal terminal inflamada e não-inflamada de pacientes com DC ativa, constatou que ambas com as amostras apresentaram padrão de expressão de microRNAs distintos do controle saudável. Esses achados sugerem que microRNAs desregulados podem de fato contribuir para a patogênese da DC.

#### **1.4 Tratamento convencional da DC**

Devido em parte à etiologia ainda pouco definida, o tratamento da DC é voltado basicamente para diminuir os sintomas da fase aguda e crônica da doença. A DC pode ser tratada através de terapia medicamentosa com o uso de aminossalicilatos, corticoides, anticorpos monoclonais, antibióticos ou

imunossupressores, dependendo da gravidade da doença, localização, comportamento e necessidade de cirurgia (LAAS; ROGGENBUCK; CONRAD, 2014).

Hutfless e colaboradores (2014), em uma revisão para a *Agency for Healthcare Research and Quality* dos Estados Unidos, relatam que corticoides e aminosalicilatos tais como sulfassalazina têm sido usados desde a década de 1950; Imunomoduladores (6-mercaptopurina, azatioprina e metotrexato) têm sido utilizados para o tratamento da DC desde 1970, embora a utilização destes medicamentos não tenha sido rotina até a 1990; O primeiro inibidor de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), infliximabe, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da DC em adultos em 1998; Os anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  aprovados pela FDA também incluem adalimumabe e certolizumabe pegol; Outros agentes biológicos utilizados para o tratamento da DC incluem natalizumabe, um anticorpo monoclonal contra a molécula de adesão celular integrina- $\alpha$ 4, que é aprovado pela FDA para a DC em adultos.

Todas essas classes de medicamentos compõem o protocolo de tratamento padronizado pelo SUS. Em 2014 foi aprovado através da Portaria nº 966 o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da DC. Nela consta a lista de fármacos aprovados no Brasil para o tratamento da DC a fim de reduzir os sintomas e melhorar a qualidade de vida, a saber: Sulfassalazina (comprimido de 500 mg); Mesalazina (comprimido de 400, 500 e 800 mg); Hidrocortisona (solução injetável de 100 e 500 mg); Prednisona (comprimido de 5 e 20 mg); Metilprednisolona (solução injetável 500 mg); Metronidazol (comprimido de 250 e 400 mg); Ciprofloxacino (comprimido de 500 mg); Azatioprina (comprimido de 50 mg); Metotrexato (solução injetável de 50 mg); Ciclosporina (ampola de 50 mg/ml); Infliximabe (frasco-ampola com 100 mg); Adalimumabe (seringas pré-preenchidas com 40 mg); e Alopurinol (comprimidos de 100 e 300 mg).

Outras abordagens terapêuticas da DC atualmente consiste na intervenção cirúrgica em situações em que necessitam de desobstruções, em caso de complicações supurativas ou quando o paciente não responde ao tratamento medicamentoso (ASSCHE *et al.*, 2010).

A sulfassalazina é formada pela ligação de uma sulfapiridina ao ácido 5-aminossalicílico que é desfeita no cólon por azorredutases bacterianas, liberando então o ácido 5-aminossalicílico para agir no cólon (CHEIFETZ; CULLEN, 2016).

Enquanto o ácido 5-aminossalicílico é o principal responsável pela eficácia da sulfassalazina, a sulfapiridina é responsável por muitos dos seus efeitos colaterais como cefaleia, vômitos, dores abdominais e hemólise (CHEIFETZ; CULLEN, 2016).

O ácido 5-aminossalicílico não conjugado, que configura a mesalazina, não têm os efeitos colaterais associados com a sulfapiridina, mas é rapidamente absorvida no jejuno, fazendo com que apenas 20% atinjam o íleo terminal e o cólon (CHEIFETZ; CULLEN, 2016). Por isso, um número de compostos de ácido 5-aminossalicílico tem sido desenvolvido para prevenir a absorção do princípio ativo no trato gastrointestinal proximal e, assim, aumentar a entrega ao cólon. Os seguintes mecanismos de ação têm sido propostos para essa classe de fármaco: inibição da síntese de citocinas, inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, inibição de radicais livres, atividade imunossupressora e comprometimento da função e adesão dos leucócitos (ROUSSEAU; LEFEBVRE; DUBUQUOY, 2005; CHEIFETZ; CULLEN, 2016).

Os antibióticos metronidazol e ciprofloxacina podem ser utilizados no tratamento das agudizações leves a moderadas e no tratamento de fístulas. O tratamento com antibióticos tem o potencial de influenciar o curso das DIIs por vários mecanismos: diminuindo a concentração de bactérias e fungos no lúmen do intestino; alterando a composição da microbiota intestinal para favorecer bactérias benéficas; diminuindo invasão bacteriana do tecido e tratando microabscessos; diminuindo a translocação bacteriana e a disseminação sistêmica (SARTOR, 2016). Os efeitos secundários de metronidazol incluem anorexia, náuseas, alteração do paladar e neuropatia periférica dependente da dose cumulativa, enquanto os efeitos colaterais da ciprofloxacina incluem fotossensibilidade, tendinite e rara ruptura do tendão, inibição do crescimento de cartilagem em fetos e crianças, aftas e candidíase (SARTOR, 2016).

Os corticoides são utilizados no tratamento das agudizações manifestadas em qualquer segmento do trato gastrointestinal, sendo muito eficazes para a remissão da DC moderada a grave, porém estão associados a complicações significativas em longo prazo, incluindo um aumento do risco de infecções graves e de mortalidade em pacientes com DC (CHEIFETZ, 2013). A eficácia dos corticoides ficou estabelecida através de dois ensaios clínicos randomizados, em que prednisona e metilprednisolona foram utilizadas em pacientes com doença ativa (SUMMERS *et al.*, 1979). Nesse estudo foi mostrado que o uso de ambos os medicamentos resultou



na melhoria do quadro inflamatório e infeccioso da DC. Porém, a corticoterapia pode causar em pacientes pediátricos retardos no crescimento ósteo-muscular e compromete a modelagem esquelética (TSAMPALIEROS *et al.*, 2013).

Em um cenário de pacientes com DC que permanecem refratários ao tratamento com corticoides, ácido 5-aminossalicílico e antibióticos, ou que dependem de corticoides para controlar a doença, os medicamentos mais comumente usados são os imunomoduladores (metotrexato ou as tiopurinas como azatioprina e seu metabólito 6-mercaptopurina) e os produtos biológicos (infiximabe, adalimumabe e pegol), que induzem resposta e remissão em um número significativo de pacientes com DC, além de todos serem capazes de induzir a cicatrização da mucosa (MacDERMONTT, 2016).

A 6-mercaptopurina e o seu pró-fármaco azatioprina são convertidas em nucleotídeos 6-tioguanina (6-TGN), que é o principal metabólito ativo responsável pela eficácia terapêutica, porém o metabolismo destes produtos também produz 6-metilmercaptopurina (6-MMP), do qual os níveis elevados têm sido relacionados com o aumento da hepatotoxicidade e mielotoxicidade (AMIN *et al.*, 2015).

Com base na literatura disponível, AMIN e colaboradores (2015) relatam que várias estratégias de dosagem para melhorar a resposta terapêutica e reduzir as reações adversas podem ser consideradas, incluindo a utilização da terapia de combinação de alopurinol com tiopurina, da mesalamina com tiopurina ou anti-TNF com tiopurina. De fato, o uso concomitante de azatioprina/6-mercaptopurina pode diminuir a ocorrência de lesões cutâneas adversas em pacientes recebendo terapia anti-TNF, um anticorpo monoclonal amplamente utilizado para tratar pacientes com DC moderada a grave (SOH *et al.*, 2015).

O infiximabe, constituído de IgG1 com região variável de murino e região constante de humano, promove uma atmosfera anti-inflamatória através da manipulação do sistema de sinalização celular do TNF- $\alpha$  (BANDZAR; GUPTA; PLATT, 2013). Ele aumenta a liberação de TNFR2 por monócitos e reduz a expressão de TNFR2 na superfície de monócitos (BANDZAR; GUPTA; PLATT, 2013). Ao aumentar a quantidade de TNFR2 solúvel, as células contribuem para a neutralização de TNF- $\alpha$ . Adalimumabe é um anticorpo IgG completamente humano, que neutraliza a atividade de TNF- $\alpha$  por inibição da sua interação com os receptores p55 e p75 da superfície das células (NOVACEK *et al.*, 2014). Embora esse anticorpo seja potente no combate do desenvolvimento da DC, ele pode levar a risco de

quadros de tuberculoses em pacientes com doenças inflamatórias que recebem esses fármacos (CANTINI; NICCOLI; GOLETTI, 2014).

Outros agentes biológicos, como o Secukinumabe, um anticorpo monoclonal anti-IL17A humano, tem sido relatado na literatura para uso em DC moderada a severa (PATEL *et al.*, 2012). Não obstante, em estudo realizado por Hueber e colaboradores (2012), avaliando se o Secukinumabe era seguro e eficaz para o tratamento da DC ativa em um estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado de prova de conceito com 59 pacientes, demonstraram que o bloqueio de IL-17A foi ineficaz e maiores taxas de eventos adversos foram observados em comparação com placebo.

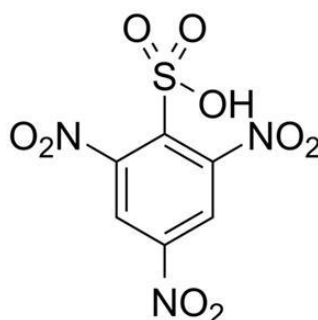
Considerando que as células Th17 têm sido implicadas na etiologia da doença, tendo-as como alvo no tratamento da DC pode proporcionar uma melhor eficácia clínica no contexto de doença auto-imune clínica, quando comparado com a inibição da IL-17 sozinha, uma vez que inibe também outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por essas células (YANG *et al.*, 2014). Segundo Yang et al. (2014) essa é uma promessa para maximizar o benefício ao paciente por impactar múltiplas citocinas inflamatórias (IL-17, IL-17F, IL-22, IL-26, e GM-CSF), que são susceptíveis de agir em sinergia para conduzir a inflamação dos tecidos.

### **1.5 Colite induzida por TNBS**

A necessidade de se esclarecer os mecanismos fisiopatogênicos e as formas de tratamento eficaz contra as DIIs fez surgir modelos experimentais de Doença de Crohn em animais. Os modelos experimentais contribuem para a avaliação dos fatores envolvidos e elucidação dos possíveis mecanismos de instalação da doença, embora, segundo Oh *et al.* (2013), não existam modelos animais que imitam eficazmente a DII humana.

Para Elson et al. (2005), os modelos animais frequentemente utilizados, induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas diluídas, apresentam-se histologicamente similares às DIIs humanas. Dentre esses agentes que evocam respostas imunes e colite em ratos estão dextrana sulfato de sódio (DSS) ou ácido 2,4,6- trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (Figura 2) em etanol.

Figura 2 – Estrutura química do TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico).



Fonte: G-Biosciences.

Oh e colaboradores (2013) realizaram um estudo comparando os mecanismos de resposta inflamatória em ratos, estabelecendo 3 modelos distintos de DII: colite aguda induzida por 2% de TNBS; colite aguda induzida por 4% de DSS e colite crônica induzida por 2% de DSS. Neste trabalho foram observadas alterações proeminentes tanto de peso corporal quanto de sobrevivência após o primeiro dia nos animais tratados com 2% TNBS e após o quinto dia nos animais que receberam 4% DSS e mostraram em ambos os modelos um edema do intestino maciço, ruptura das células epiteliais e aumento de células T secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-17.

Há muito, Morris e colaboradores (1989) já haviam proposto um modelo de colite difusa por TNBS diluído em etanol 50%, administrado por via retal, segundo os quais pode ser reproduzido em 100% dos casos. A lesão é inicialmente produzida pela ação do álcool, um potente pró-inflamatório, que quebra a barreira do cólon e altera a permeabilidade (WIRTZ et al., 2007; OH et al., 2013). Vê-se que a colite não é induzida pelo TNBS sozinho.

A utilização do modelo de indução de colite por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) combinada ao etanol (50%) reproduz o que ocorre na doença em humanos, especialmente considerando-se suas características histopatológicas e clínicas, como ulceração, perda de apetite e peso corporal. (BRENNAN *et al.*, 2013).

O TNBS é metabolizado pelas enzimas do cólon produzindo uma reação imunomediada por citocinas pró-inflamatórias e substâncias citotóxicas, caracterizada pelo aumento da infiltração de leucócitos, edema e ulceração, associada com a ativação predominante de resposta mediada por Th1 (RANDHAWA

*et al.*, 2014). Nesse modelo a lesão pode ser aguda ou crônica dependendo da dose de TNBS a ser administrada.

### **1.6 Plantas medicinais aplicadas no tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais**

O uso dos medicamentos convencionais para o tratamento da DC por períodos prolongados pode levar ao aparecimento de sérios efeitos colaterais e assim limitar seu próprio uso (BANDZAR; GUPTA; PLATT, 2013). Por essa razão, o desenvolvimento de novas substâncias que combinem eficácia e baixos efeitos colaterais no tratamento das afecções inflamatórias intestinais configura uma alternativa indispensável.

Vários estudos mostram as plantas e seus compostos bioativos como alternativas terapêuticas nessas afecções. Por exemplo, efeitos benéficos de diferentes compostos antioxidantes em modelos experimentais de colite induzida por TNBS em ratos têm sido relatados. Wu *et al.* (2011), estudando o efeito protetor de extrato de antocianinas de *Vaccinium ashei*, popularmente conhecida como mirtilo ou uva-do-monte, em modelo de DII induzida por injeção intracolônica de 0,5 mg de TNBS dissolvido em etanol 50% em ratos, demonstraram um considerável efeito protetor contra os danos no cólon a uma dose de 40 mg/Kg de extrato, prevenindo a perda de peso e a diarreia, e reduzindo os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO), óxido nítrico, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Orsi, Seito e Di Stasi (2014) também demonstraram efeito protetor do extrato de planta em modelo de DII. Em seu estudo, extrato da casca e da polpa da fruta do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) impediu danos no cólon induzido por TNBS, associado a um efeito antioxidante considerando a presença de flavonoides e taninos em ambas as amostras testadas.

Extratos hidroalcoólicos de *Phlomis purpurea* L. e *Phlomis lychnitis* L. apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por TNBS em rato, confirmando assim o seu uso tradicional nas queixas inflamatórias digestivas (ALGIERI *et al.*, 2013). Segundo os autores, em adição às suas propriedades antioxidantes, outros mecanismos podem contribuir para o efeito benéfico das plantas, como uma melhoria da barreira epitelial do intestino e uma regulação negativa da resposta imune.

Outro manuscrito publicado em periódico de circulação internacional demonstrou que o ácido taurohioideoxicolico (THDCA) extraído de *Pulvis Fellis Suis* foi capaz de reverter parâmetros da inflamação colônica induzida por TNBS, como por exemplo, a atividade da enzima MPO, a concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6), além de atenuar os danos gerados na mucosa do cólon de animais com colite (HE *et al.*, 2011).

Alguns medicamentos botânicos, bem como seus mecanismos e os compostos ativos, foram avaliados em ensaios clínicos na IBD humana, dentre os quais estão *Aloe vera*, *Andrographis paniculata*, *Artemisia absinthium*, *Boswellia serrata*, *Cannabis sativa* e *Curcuma longa* (ALGIERI *et al.*, 2015). A planta *Cannabis sativa* foi relatada em vários estudos como portadora de efeitos benéficos para pacientes com doenças inflamatórias do intestino. Naftali *et al.* (2013) realizaram um estudo prospectivo em 21 pacientes com idade média de 40 anos portadores da DC ativa, os quais foram tratados com a planta contendo 115 mg de D9-tetra-hidrocanabinol (THC) durante 8 semanas. Neste estudo, o efeito da planta na remissão da doença não foi superior ao placebo, mas produziu benefícios clínicos por diminuir efeitos colaterais.

Essa tentativa da descoberta de produtos de origem vegetal como alternativa de tratamentos das doenças inflamatórias intestinais se torna crescente. Mesmo sabendo que o número de ensaios experimentais para tal fim cresce constantemente, ainda não foi possível propor um novo fitoterápico para a prevenção e controle da inflamação que ocorre durante o desenvolvimento da DC. Assim, o nosso estudo busca propor a utilização de uma nova substância com esse potencial terapêutico.

### **1.7 Jaborandi como fonte de alcaloides com propriedades terapêuticas**

Existem várias espécies de plantas com propriedades medicinais catalogadas no Brasil. Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse destacam-se as plantas conhecidas pela denominação jaborandi, que incluem várias espécies nativas e cultivadas no Brasil, sobretudo a *Pilocarpus microphyllus*. Essa espécie é utilizada como matéria prima para isolamento de alcaloides com propriedades farmacológicas (CHO *et al.*, 2013). Alcaloides são uma importante classe de compostos estruturalmente diversificados que possuem átomos

de nitrogênio no anel heterocíclico e são derivados de aminoácidos (KAUR; ARORA, 2015).

*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes mostrada na figura 2, é uma planta arbustiva de pequeno porte, pertencente à família Rutaceae, que possui uma morfologia bem característica: flores pequenas com formato de cachos compactos; os seus frutos formam cachos brancos dispostos em cápsulas de cor acinzentada e lisa (MONFORT, 2015) (Figura 2). No território brasileiro, essa espécie pode ser encontrada na região leste amazônica e nas regiões Centro e Sul nordestino, sendo largamente distribuída no Piauí e Maranhão (LIMA *et al.*, 2015).

Figura 3: *Pilocarpus microphyllus*.

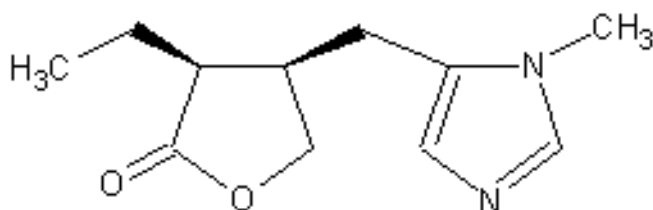


Fonte: <http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com>

A partir de espécies de jaborandi (*Pilocarpus* sp) já foram identificadas os seguintes alcaloides: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, epiisopilosina, epiisopiloturina (SAWAYA; COSTA; MAZZADERA, 2015; SANTOS; MORENO, 2004; VERAS *et al.*, 2013). Alguns deles já tiveram as suas estruturas químicas determinadas, porém ainda sem descrição de atividade farmacológica, podendo ser promissores como o objetivo de pesquisa pré-clínica, para a medicina humana e veterinária.

A pilocarpina (Figura 4) é um alcaloide imidazólico provavelmente derivado da histidina, extraído das folhas do jaborandi por métodos baseados em solvente orgânicos, em fluido supercrítico ou enzimático, usado para reduzir a pressão intraocular no tratamento do glaucoma ou para estimular a salivação e transpiração no tratamento da xerostomia (CHO *et al.*, 2013).

Figura 4- Estrutura química da molécula de pilocarpina.



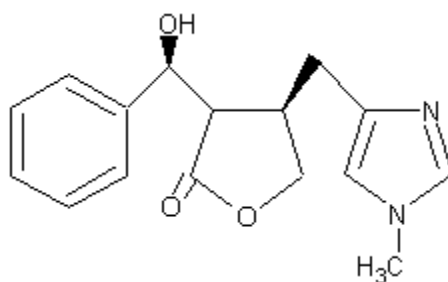
(SANTOS; MORENO, 2004).

O gênero *Pilocarpus*, enfaticamente a espécie *Pilocarpus microphyllus* tem grande importância econômica e industrial e estabelece perspectivas futuras na descoberta de novas aplicações farmacológicas e biotecnológicas dos demais alcaloides que até o momento permanecem desconhecidas (LIMA *et al.*, 2015).

### 1.8 Epiisopiloturina e uso terapêutico

Um dos principais alcaloides extraídos do jaborandi é a epiisopiloturina (2(3H)-Furanone,dihydro-3-(hydroxyphenylmethyl)-4-[(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)methyl]-, [3S-[3a(R\*),4b]]) (VERAS *et al.*, 2013). Sua estrutura química (Figura 5) difere da pilocarpina pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico, e assemelha-se a ela pela presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico através de uma ligação C-C (VERAS *et al.*, 2013). A similaridade entre as estruturas destes dois compostos torna a epiisopiloturina um alcaloide promissor quanto as suas propriedades biologicamente ativas.

Figura 5 – Estrutura química da Epiisopiloturina



(SANTOS; MORENO, 2004).

A literatura é consistente ao mostrar que derivados imidazólicos apresentam potenciais propriedades farmacológicas (KAUR; ARORA, 2015; RANI; SHARMA; SINGH, 2013). Veras *et al.* (2012) mostrou que a epiisopiloturina possui efeito antiparasitário, sendo capaz de inibir o crescimento e proliferação do parasita *Schistosoma mansoni* em diferentes estágios do seu desenvolvimento, sem toxicidade em células mamárias. O tratamento *in vivo* contra o parasita em fase juvenil com uma dose de 40 mg/Kg apresentou uma redução de 50,2% da carga parasitária total em ratos, e com DL50 de 8000 mg/Kg avaliado em cortes histológicos de fígado, baço, pulmão e rim (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Em outro estudo envolvendo a epiisopiloturina, verificou-se que esse alcaloide foi capaz de inibir o processo inflamatório agudo gerado em modelos clássicos de inflamação (SILVA *et al.*, 2013). A atividade anti-inflamatória da molécula foi avaliada usando o modelo de peritonite e edema de pata induzido por vários agentes em camundongo Swiss, e foi verificado que o pré-tratamento com a molécula (0,1; 0,3; e 1 mg/kg, ip) reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina, além do que a dose de 1 mg/kg inibiu efetivamente o edema induzido por dextrana, serotonina e bradicinina (SILVA *et al.*, 2013). Adicionalmente, reduziu a migração leucocitária, a atividade de MPO e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na cavidade peritoneal, neste mesmo estudo.

Visto suas propriedades farmacológicas, alguns estudos têm explorado formulações farmacêuticas. A epiisopiloturina foi complexada com sais de zinco ou cobre e caracterizada estruturalmente e espectroscopicamente (PORTES *et al.* 2016). Foi observado que os complexos metálicos também são estáveis em solução, os quais foram testados contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em comparação com o alcaloide livre como agente anti-helmíntico. Constatou-se que a



coordenação com cobre melhorou as propriedades esquistossomicida do alcaloide, enquanto que a ligação a zinco diminuiu sua atividade.

Formulação lipossomal também já foi proposto para a epiisopiloturina, devido seu caráter apolar, com difícil solubilidade, sendo que os lipossomas carregados com o alcaloide (300 µg/ml) foram capazes de eliminar 100% do *Schistosoma mansoni in vitro* (GUIMARÃES *et al.*, 2014).

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito da epiisopiloturina sobre os parâmetros inflamatórios e deletérios da mucosa colônica durante a colite induzida por TNBS em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar a atividade da epiisopiloturina sobre os critérios macroscópicos, microscópicos e sobre o peso úmido do cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

Avaliar o efeito da epiisopiloturina sobre a concentração de MPO no cólon de ratos com colite induzida por TNBS.

Verificar o papel da epiisopiloturina sobre a produção de IL-1 $\beta$  na mucosa do cólon de ratos tratados com TNBS.

Avaliar a ação da epiisopiloturina sobre os níveis colônicos de MDA e GSH de ratos com colite induzida por TNBS.

Determinar os níveis de nitrato e nitrito na mucosa do colon de animais com colite induzida por TNBS e tratados com epiisopiloturina.

Avaliar a ação da epiisopiloturina sobre a expressão colônica de COX-2, INOS e IL-1 $\beta$ .

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Piauí no protocolo 056/15 (Anexo 1). Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do COBEA.

#### 3.2 Animais

No protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), pesando 150 - 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí.

Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério setorial da Universidade Federal do Piauí. Doze horas antes em todos os experimentos, os animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água.

#### 3.3 Extração e Isolamento

O passo inicial é baseado na alcalinização das folhas de jaborandi com uma solução de carbonato de potássio, seguida pela extração de todos os alcalóides (extração sólido-líquido) com os solventes tolueno e cloreto de metileno. A fase orgânica foi submetida a extração líquido-líquido com uma solução aquosa de ácido sulfúrico. Daqui por diante, a solução aquosa com um teor médio de 2% (m / v) de EPI sob a forma de sulfato de sódio foi arrefecida, alcalinizada com solução de hidróxido de amônio e tratada com carvão ativado e areia de diatomáceas.

Após o tratamento com carvão e areia de diatomáceas, o EPI impuro foi dissolvido numa solução aquosa contendo ácido clorídrico e filtrado em um filtro de pressão de lentilha. O filtrado contendo cloridrato de EPI foi alcalinizada com solução de hidróxido de amônio para precipitar a forma neutra de EPI, e, em seguida, a solução foi filtrada sob pressão reduzida. O objetivo do passo anterior foi de remover as impurezas tais como carbono e areia de diatomáceas, a fim de

apresentar EPI para processo adicional de purificação por meio da cromatografia líquida de alta eficiência.

A EPI bruta foi dissolvida na fase móvel com fosfato de potássio a 5% (v / v), filtrada por uma membrana de 0,45  $\mu$ m e definida para fins preparativos a cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (SHIMADZU Prominence, AUTOSAMPLER SIL-10AF, CTO-20A, DGU-20A5, LC-6AD, CBM-20A, SPD-20A, Tokyo, Japan).

Por fim, foi obtido a epiisopiloturina com pureza maior que 98% a partir de folhas de jaborandi. Todo o processo de extração e isolamento foi realizado em parceria com o Laboratório BIOTEC-UFPI, *campus* Parnaíba.

### 3.4 Protocolo experimental

#### 3.4.1 Grupos experimentais

Todos os grupos, exceto o grupo controle (Salina 0,9%), foram administrado TNBS em etanol a 50% para a indução da colite. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo cada um composto por seis animais:

**Grupo controle:** Os animais que receberam soro fisiológico estéril 0,9% por via retal.

**Grupo TNBS:** Os animais que receberam TNBS por via retal.

**Grupo DEXA:** Animais tratados com dexametasona (2 mg/kg, via s.c..) 1 hora antes da indução da colite por TNBS, e uma vez ao dia pelo período de três dias.

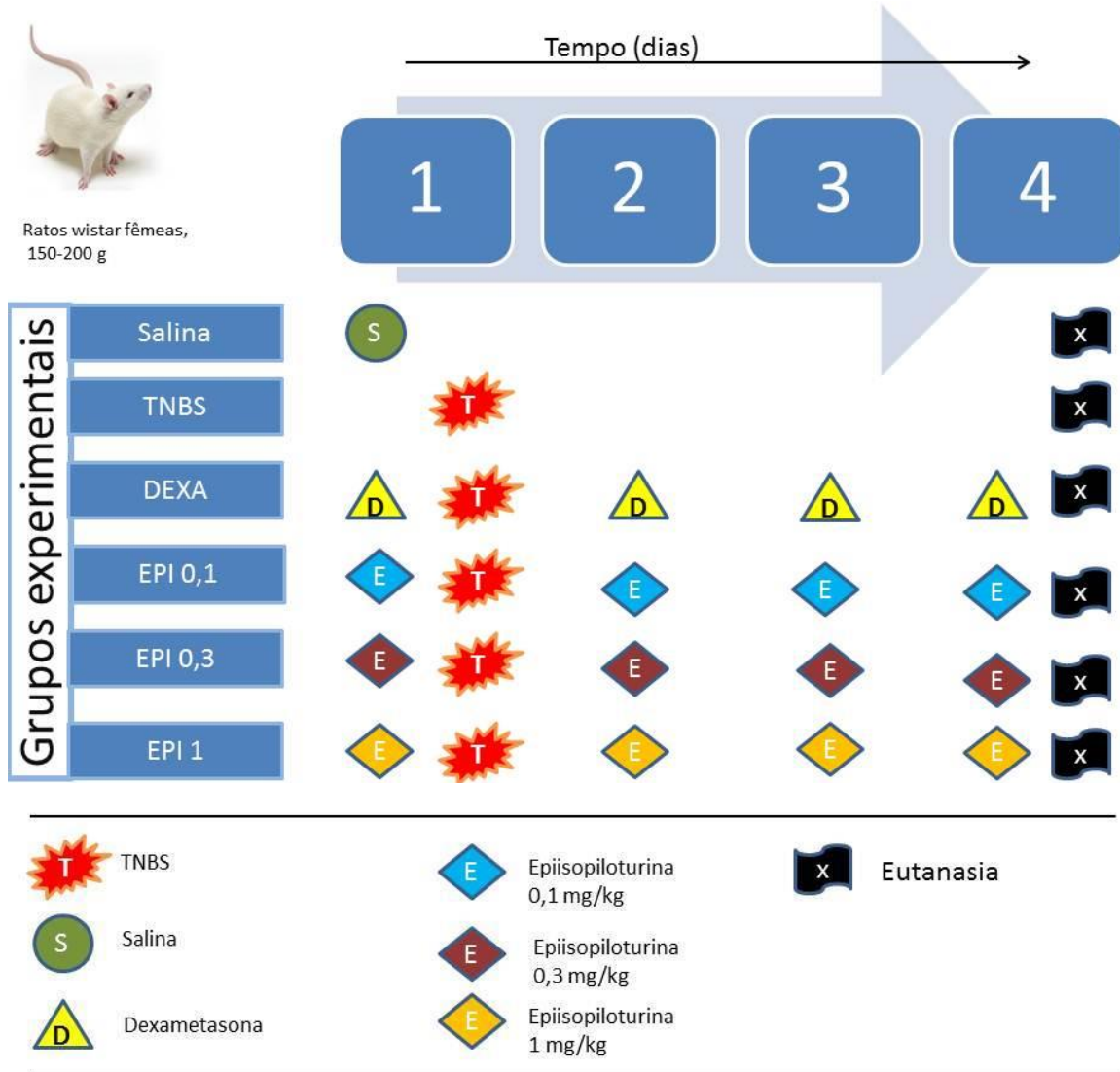
**Grupo EPI 0,1:** Animais tratados com epiisopiloturina(0,1 mg/kg, via *i.p.*) 1 hora antes da indução da colite por TNBS, e uma vez ao dia pelo período de três dias.

**Grupo EPI 0,3:** Animais tratados com epiisopiloturina (0,3 mg/kg, via *i.p.*) 1 hora antes da indução da colite por TNBS, e uma vez ao dia pelo período de três dias.

**Grupo EPI 1,0:** Animais tratados com epiisopiloturina (1,0 mg/kg, via *i.p.*) 1 hora antes da indução da colite por TNBS, e uma vez ao dia pelo período de três dias.

O protocolo experimental encontra-se ilustrado na figura 6.

Figura 6- Ilustração do protocolo experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## PADRONIZAÇÃO DO MODELO DA DOENÇA DE CROHN EXPERIMENTAL

### 3.5 Modelo da Doença de Crohn induzido por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

Inicialmente, os animais passaram por um processo de preparação do cólon, onde os animais permaneceram 12 a 14 horas recebendo somente água *ad libitum*. Posteriormente, foram submetidos à limpeza do cólon por enema com 5 mL de solução salina a 0,9%, em cada animal 1 hora antes do procedimento.

As colites foram induzidas pela administração de TNBS (20mg) diluído em etanol a 50%, sendo a solução administrada em um volume de 0,8 ml por animal. O grupo controle recebeu apenas salina (0,9%, em volume de 0,4 ml). Para a indução da colite os animais foram previamente anestesiados com Tribromoetanol (250 mg/Kg via *i.p*), e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 até 8 cm da margem anal para a administração das soluções. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções, conforme figura 7.

Todos os experimentos foram realizados três dias após a indução das colites e os tratamentos com a epiisopiloturina (0,1; 0,3 e 1 mg/kg via *i.p*) e dexametasona (2 mg/kg via *s.c*) foram feitos 1 hora antes e uma vez ao dia após a indução da colite por TNBS. Após os três dias de tratamento, os animais foram sobre efeito do anestésico Tribromoetanol (250 mg/Kg via *i.p*) eutanasiados por deslocamento cervical e posteriormente foram retiradas as amostras para as análises.

Figura 7- Indução da colite. Rato suspenso pela cauda.



Fonte: Do autor (2015).

### **3.6 Avaliação do peso úmido dos colóns de animais com ou sem colite.**

Antes da análise macroscópica dos escores de lesão dos cólons de animais com ou sem colite e tratados com epiisopiloturina (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) e com dexametasona (2mg/kg) foram retirados fragmentos de cólon medindo 1 cm de comprimento cada. Posteriormente, foi feita a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos pela unidade peso úmido / cm de lesão.

### **3.7. Avaliação dos escores macroscópicos e microscópicos de lesão.**

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 com ou sem colite e tratados com epiisopiloturina (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) e com dexametasona (2 mg/kg). 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 (1989) (Tabela 1).

Tabela 1- Tabela de escores macroscópicos lesões do intestino

Critério	Escore
Aparência normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espaçamento 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 aumentando em 1 para cada centímetro adicional.	6 – 10

Depois disso, os segmentos obtidos do colón 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. Foi realizado a inclusão em parafina líquida para banho I por 15 - 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, ela foi aparada em um bloco que foi cortado com lâmina de aço pelo micrótomo (LUPETEC®, MRP 09).

A desparafinização é feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Segue 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 induzida por TNBS seguindo a técnica de APPLEYARD & WALLACE (1995). (Tabela 2)



Tabela 2- Tabela de escores macroscópicos de lesões do intestino

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

## ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### 3.8. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Para a quantificação de MPO nos cólons de animais com ou sem colite e tratados com epiisopiloturina (1 mg/kg), frações do cólon foram retiradas e processadas para tal fim e a análise dessa enzima seguirá o protocolo estabelecido por Bradley e colaboradores (1982).

Para mensurar a concentração dessa enzima, 50 a 100 mg de cólon de animais com ou sem colite e tratados com epiisopiloturina (0,1; 1 e 10 mg/kg), foram colocados num tampão (NaCl 0,1 M + EDTA 0,015 M/L de NaPO<sub>4</sub> 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, foram homogeneizados num Politron (13000 rpm) e centrifugado a 15 minutos (3000 rpm) em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente será centrifugado nas mesmas condições e no mesmo tampão. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado novamente (Politron - 13000 rpm) em um outro tampão (HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO<sub>4</sub> 0,05M). A próxima etapa foi a de colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2X).

Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado numa placa (5-10 ul) e foram acrescentados nessa placa 45 ul de NaPO<sub>4</sub> 0,08M junto com a solução de leitura [TMB 25 ul (5 min) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 ul (ul)]. A reação foi terminada com o acréscimo de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450nm. O resultado foi expresso como sendo UMPO/mg de tecido.

### **3.9 Dosagem da citocina IL-1 $\beta$**

Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no cólon foi quantificada por ELISA. Para a dosagem de IL-1 $\beta$ , foi utilizado a melhor dose de epiisopiloturina (1 mg/kg).

Os tecidos coletados foram homogeneizados em PBS. A detecção da citocina IL-1 $\beta$  foi realizada por meio do *Kit DuoSet* (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1 $\beta$  por 18h em temperatura ambiente com 100 $\mu$ L de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200 $\mu$ L de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200 $\mu$ L de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100 $\mu$ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200 $\mu$ l de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 $\beta$  em temperatura ambiente por 2 horas.

Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200 $\mu$ L de tampão de lavagem e incubadas com 100  $\mu$ L de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200 $\mu$ L de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100  $\mu$ L da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50  $\mu$ L solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

### **3.10. Análise dos níveis de glutathiona na mucosa intestinal**

O método de Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968) foi utilizado para análise de glutathiona nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg da mucosa intestinal dos animais foi homogeneizada em 1 ml de EDTA 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de

400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL 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 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M.

A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de NP-SH/g de tecido.

### **3.11. Determinação de malonaldeído na mucosa intestinal**

Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa foram homogeneizados com KCl gelado 1,15% para o preparo de 10% de homogenato. Meio mililitro (0.5ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml. Foi acrescentado a esse homogenato 3ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 40 segundos com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica será mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol de MDA/g de tecido.

### **3.12. Dosagem de nitrito/nitrato**

A dosagem de nitrito/nitrato (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) foi obtida como um indicador indireto da produção de NO no cólon, e foi determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess. Para a dosagem de nitrito/nitrato (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), foi utilizado a melhor dose de epiisopiloturina (1 mg/kg) para a realização do teste.

Inicialmente, preparou-se um homogenato a 10%, adicionando solução gelada de KCl a 1,15% ao cólon previamente pesados. O homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm. Primeiramente, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dos homogenatos (40µL) foi convertido em NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pela incubação, *overnight* em temperatura ambiente,

em uma solução (40 $\mu$ L) contendo nitrato redutase (1U/50 $\mu$ L, Sigma-Aldrich, EUA), NADPH (5mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA), tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e água ultrapura, respectivamente na seguinte proporção: 1:10:20:19. Após essa etapa, uma série de diluições da curva-padrão de referência de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (200  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 3,12  $\mu$ M, 1,56  $\mu$ M, 0,78  $\mu$ M, 0,39  $\mu$ M e 0,19  $\mu$ M) foi preparada. Na etapa seguinte, adicionou-se 80  $\mu$ L da solução de Griess (constituída por uma parte de 2% de sulfanilamida em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%, duas partes de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%, uma parte de 0,2% de NEED em água ultrapura e uma parte de água ultrapura) em cada poço.

A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os níveis teciduais de nitrito/nitrato foram expressos em NO<sub>x</sub> ( $\mu$ M/mg de tecido).

### **3.13. Efeito da Episopiloturina sobre a imunomarcagem de iNOS, IL-1 $\beta$ e COX-2 no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS.**

Para avaliar a localização de marcadores inflamatórios (iNOS, IL-1 $\beta$ , COX-2) no cólon foi realizado imunohistoquímica para esses imunomarcadores.

Após a retirada dos segmentos do cólon, os mesmos foram isolados, separados e fixados em formol tamponado a 10% por 20 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4 $\mu$ m que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cólons foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol por cinco minutos cada. Em seguida, os cólons foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho Maria (95°C). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos.

Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Abcam) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram

lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para anti-iNOS, anti IL-1 $\beta$  e anti-COX-2 por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar a área imunomarcada para iNOS, IL-1 $\beta$  e COX-2, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ da área imunomarcada} = \frac{\text{Área imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

### **3.14. Expressão protéica de iNOS, COX-2**

Para avaliar a expressão protéica de iNOS, COX-2 nos segmentos intestinais avaliados, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

### 3.14.1 Extração de proteínas

Os segmentos intestinais (em torno de 30 mg) foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

### 3.14.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para a cuprosa ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1.

Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

### 3.14.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando

(10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (COX-2, e  $\beta$ -actina) ou 8% (iNOS e  $\beta$ -actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS).

Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada.

Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-COX-2, anti-iNOS ou anti- $\beta$ -actina (Millipore, EP1123Y, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

### 3.15 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman Keuls e para os escores histológicos foi realizado por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos ( $p$ ) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

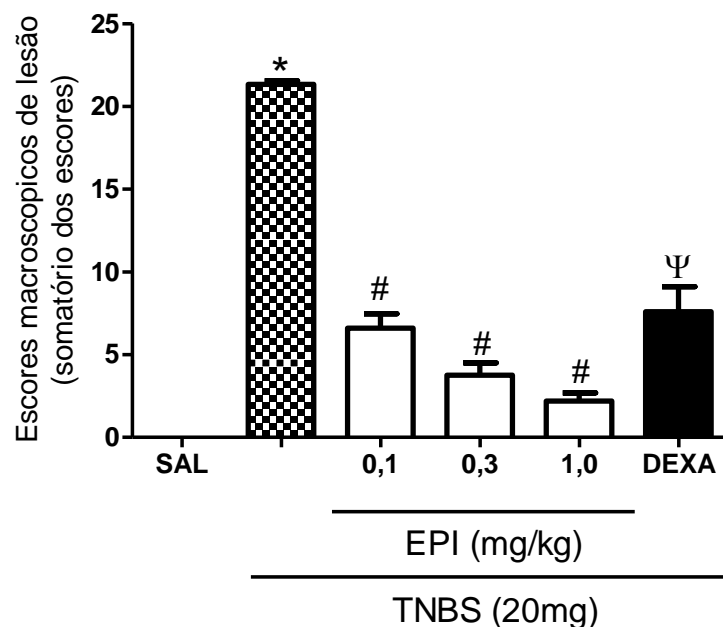


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão em cólons de ratos com ou sem colite

O escore macroscópico de atividade inflamatória segundo Morris e colaboradores (1989) foi aplicado nas amostras de intestino coletadas após três dias de indução da colite. Os animais submetidos à colite por TNBS apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na pontuação desses escores ( $21,33 \pm 0,51$ ) em relação ao grupo salina. O grupo tratado com o fármaco de referência anti-inflamatório, DEX ( $7,60 \pm 3,36$ ), teve diminuição significativa nos escores macroscópicos comparados ao grupo TNBS. Os animais com colite induzida tratados com EPI 0,1 mg/kg ( $6,60 \pm 1,94$ ), EPI 0,3 mg/kg ( $3,75 \pm 1,50$ ) e EPI 1 mg/kg ( $2,20 \pm 1,09$ ) apresentaram diminuição dos escores macroscópicos com diferença estatística em relação ao grupo TNBS. (Figura 8).

Figura 8- Avaliação dos escores macroscópicos de lesão.

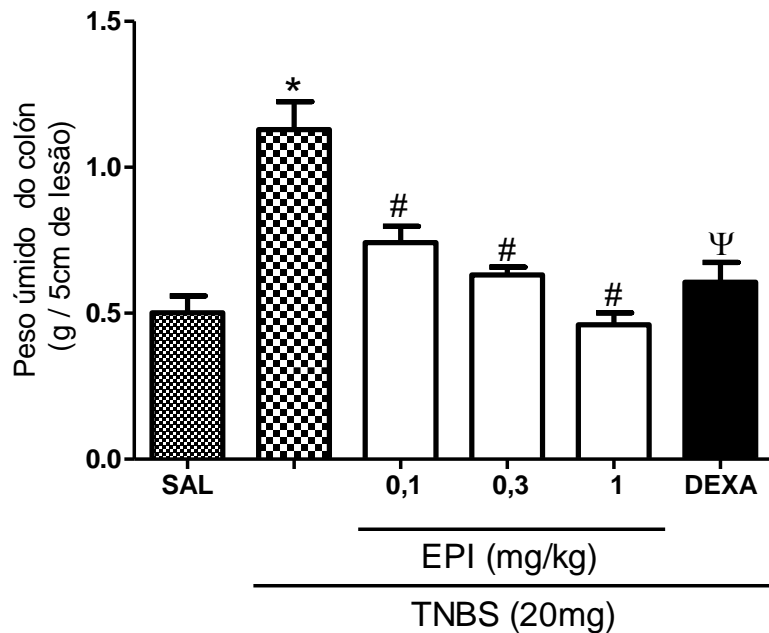


Ratos com ou sem colite (grupo salina) tiveram as porções colônicas retiradas, abertas e lavadas com solução salina 3 dias após a indução ou não da colite. Após o preparo dos segmentos foi feita a análise macroscópica utilizando a técnica descrita por Morris et al., 1989. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM do somatório dos escores obtidos a partir dos critérios estabelecidos por Morris. \* $p < 0,05$  vs grupo salina; # $p < 0,05$  vs o grupo TNBS;  $\Psi p < 0,05$  vs o grupo TNBS.. ANOVA/Bonferroni.

#### 4.2 Peso úmido do cólon de animais com ou sem colite.

Observou-se aumento com significância estatística ( $p < 0.05$ ) do peso úmido do cólon 3 dias após a indução de colite com TNBS ( $1,12 \pm 0,21$ ) quando comparado ao grupo salina ( $0,50 \pm 0,11$ ). Houve prevenção desse aumento nos animais tratados com EPI 0,1 mg/kg ( $0,74 \pm 0,14$ ), EPI 0,3 mg/kg ( $0,63 \pm 0,06$ ), EPI 1 mg/kg ( $0,46 \pm 0,09$ ) e DEX 2mg/kg ( $0,60 \pm 0,16$ ) quando comparados ao grupo TNBS ( $p < 0,05$ ). (Figura 9).

Figura 9- Peso úmido dos cólons de ratos com ou sem colite



Ratos com ou sem colite tiveram as porções colônicas retiradas, abertas e lavadas com solução salina e pesadas 3 dias após a indução ou não da colite. Após o preparo dos segmentos foi realizado a pesagem dos tecidos. As colunas representam à média  $\pm$  peso do cólon/cm de lesão das amostras de 6 animais por grupo. \* $p < 0.05$  vs grupo salina; # $p < 0.05$  vs o grupo TNBS; Ψ $p < 0.05$  vs o grupo TNBS. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni

### 4.3 Avaliação dos escores microscópicos de lesão em cólons com ou sem colite

Os cólons dos animais dos diferentes grupos experimentais foram também analisados histologicamente quanto ao dano tecidual microscópico. A tabela 3 apresenta a quantificação dos escores microscópicos relativo aos cortes histológicos apresentados na figura 10.

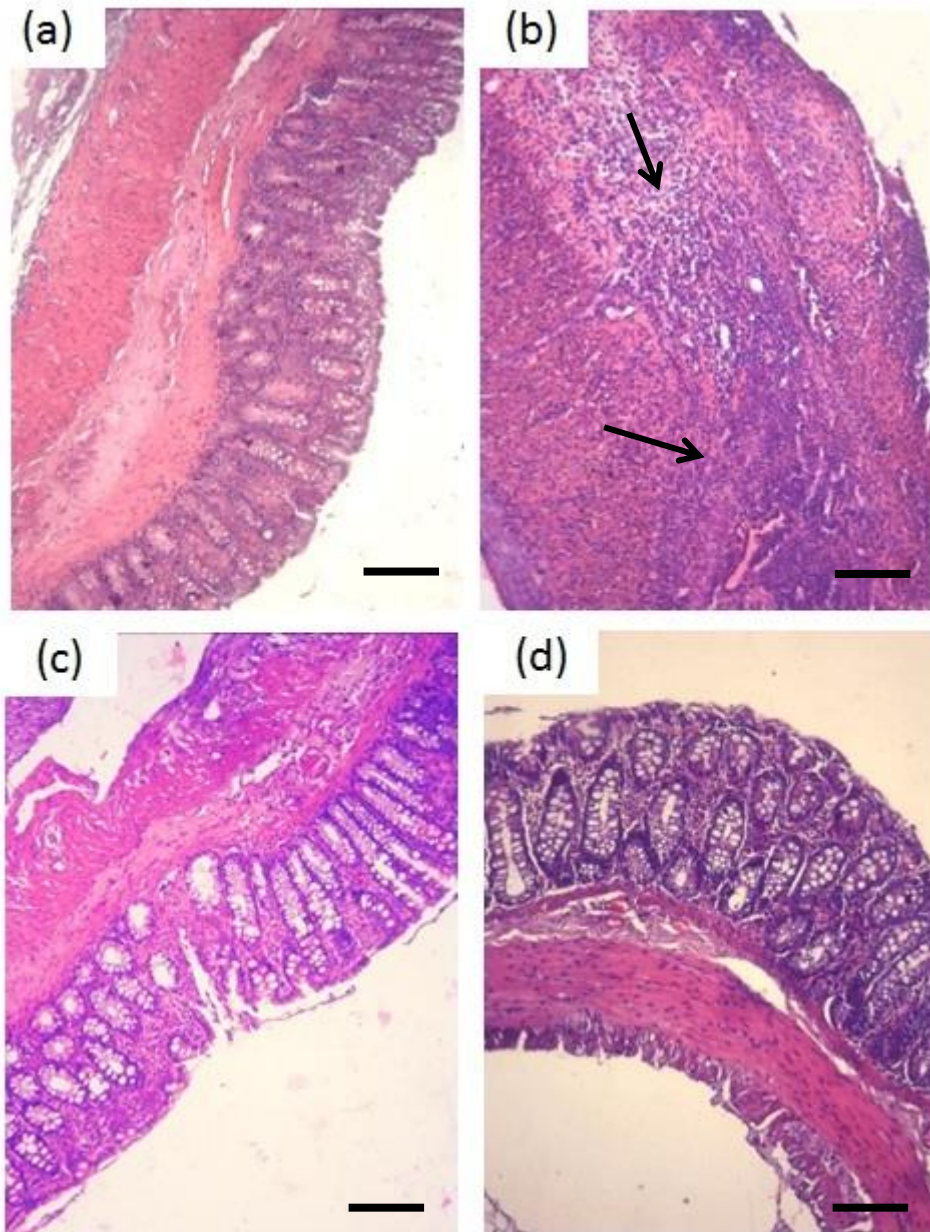
A administração intracolônica de TNBS causou danos extensivos na superfície do epitélio da mucosa, variando a severidade entre os grupos tratados. O grupo TNBS resultou em destruição severa da estrutura da mucosa intestinal, espessamento muscular e elevado infiltrado de células inflamatórias no epitélio intestinal, com leve abscesso da cripta e depleção de células caliciformes (Figura 9). No entanto, o tratamento com Episopiloturina 1,0 mg/kg, preveniu significativamente a destruição da arquitetura colônica ocasionada pelo TNBS e manteve o tecido do cólon com aspecto semelhante ao encontrado em animais do grupo controle como visto na figura 11.

Tabela 3. Avaliação histológica de lesões do intestino.

Critério	Média de escores			
	Salina	TNBS	TNBS + EP1	TNBS + Dexa
Perda da arquitetura da mucosa	0 (0-1)	3 (2-3) #	1 (0-2) *	1 (0-1) *
Infiltração celular	0 (0-1)	3 (2-3) #	1 (0-2) *	1 (0-1) *
Espessamento muscular	0 (0-1)	3 (2-3) #	1 (1-2) *	1 (0-1) *
Abscessos da cripta	0 (0-0)	1 (1-1) #	0 (0-1) *	0 (0-1) *
Depleção de células caliciformes	0 (0-0)	1 (1-1) #	0 (0-0) *	0 (0-1) *
Pontuação total de danos	0	11	3	3

EP, episopiloturina. TNBS, ácido trinitrobenzeno sulfônico. Escores de danos histológicos expressos como mediana (valores mínimo - máximos). #P <0,05 em relação grupo solução salina; \* P <0,05 em relação grupo TNBS (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações múltiplas das análises histológicas).

Figura 10- O tratamento com Epiisopiloturina melhora as alterações histopatológicas em colite induzida por TNBS.

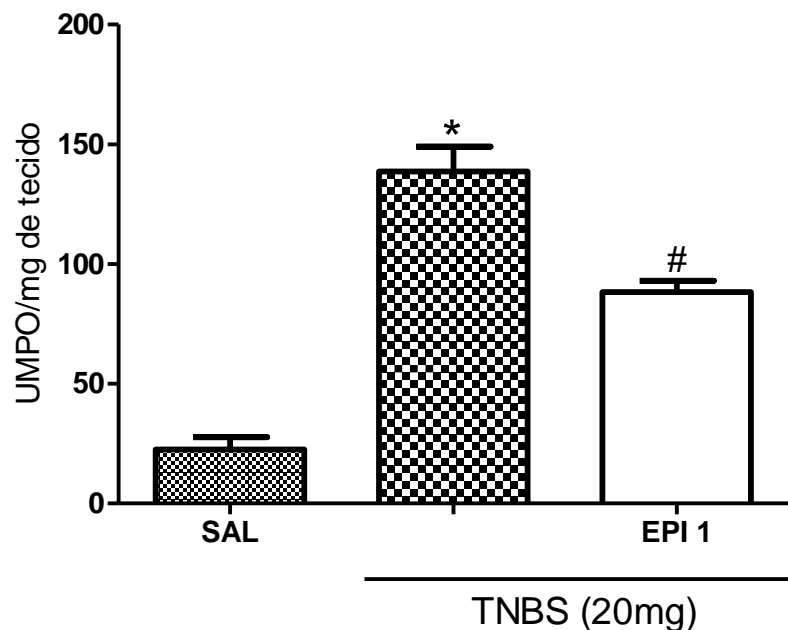


As fotomicrografias (150 ×, escala de 50 µm) de cólon de ratos controle (A), de TNBS (b), TNBS + Epiisopiloturina (1 mg / kg, i.p) (C) e de TNBS + dexametasona (1 mg / kg, sc) (d), respectivamente. Nota-se que há perda da arquitetura da mucosa induzida por TNBS, infiltração celular intensa (b, setas). O tratamento com epiisopiloturina foi capaz de reverter parcialmente estas alterações.

#### 4.4 Efeito da epiisopiloturina no cólon sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) de animais submetidos à colite induzida por TNBS

A avaliação da infiltração neutrofílica foi mensurada a partir da atividade da MPO. As amostras dos cólons foram submetidas a ensaio para determinação da atividade de MPO. Os animais submetidos à colite por TNBS apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na infiltração de neutrófilos no cólon ( $138,60 \pm 23,30$ ) em relação ao grupo salina ( $22,57 \pm 12,45$ ). Quando se comparou o grupo TNBS com o grupo dos animais com colite induzida por TNBS tratados com epiisopiloturina 1 mg/kg ( $88,30 \pm 9,35$ ) apresentou diferença estatística na infiltração neutrofílica no cólon. (Figura 11).

Figura 11- Atividade da MPO no cólon no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.

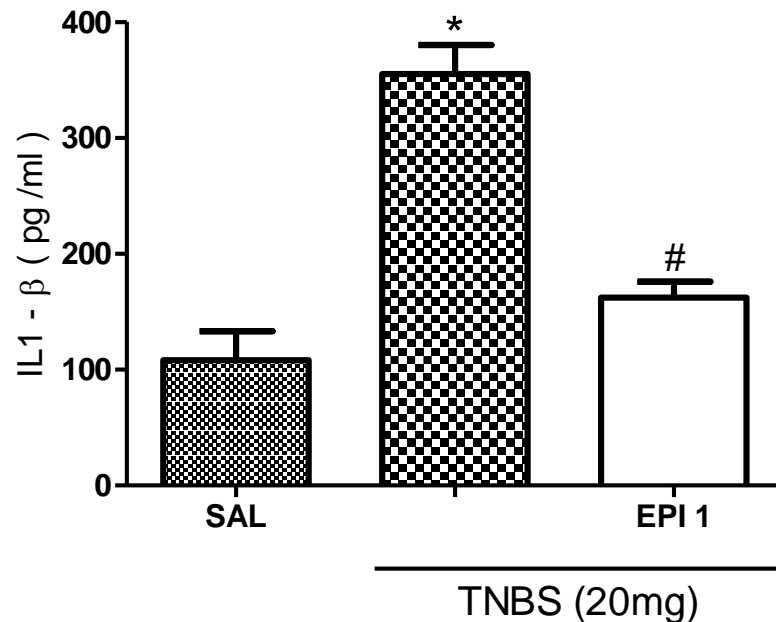


Solução salina ou TNBS foi administrado via retal na indução da colite. Uma hora antes e durante os três dias após a indução da colite, os animais foram tratados com Epiisopiloturina (1 mg/kg, i.p.). O grupo controle (salina) foi tratado apenas com solução salina a 0,9%. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi detectada no cólon após o terceiro dia. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM em UMPO/mg de tecido. \* $p < 0,05$  vs grupo salina; # $p < 0,05$  vs o grupo TNBS. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni.

#### 4.5 Efeito da epiisopiloturina nos níveis teciduais de IL-1 $\beta$ no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.

Conforme observado na figura 12, TNBS aumentou ( $p < 0,05$ ) os níveis de IL-1 $\beta$  no cólon ( $355,2 \pm 49,67$ ) quando comparado ao grupo controle ( $108,20 \pm 55,63$ ). Por outro lado, a epiisopiloturina diminuiu de forma estatisticamente significativa os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por TNBS ( $162,10 \pm 30,71$ ).

Figura 12 - Epiisopiloturina reduz os níveis de IL-1 $\beta$  no cólon de camundongos submetidos à colite intestinal induzida por TNBS.

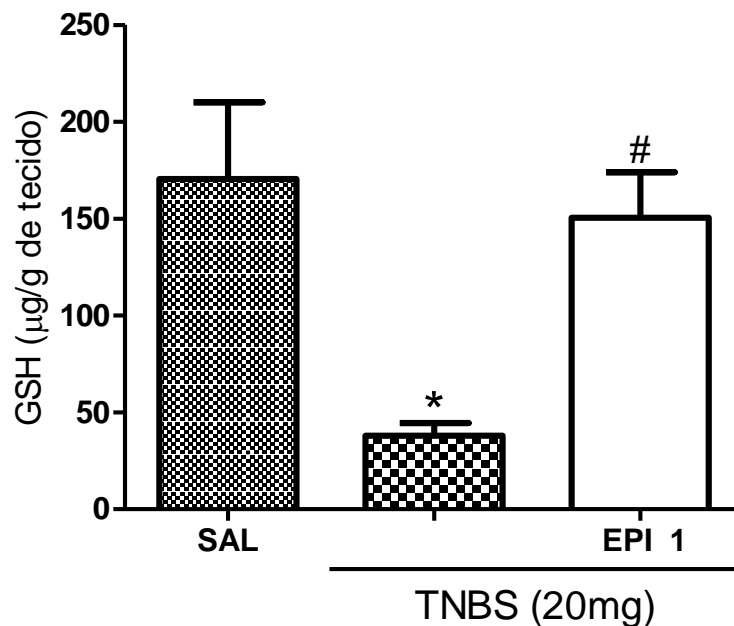


Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de IL-1 $\beta$ , citocina pró-inflamatória, por ELISA. Observa-se que TNBS aumenta os níveis de IL-1 $\beta$  no cólon quando comparado ao grupo controle. Epiisopiloturina nesses animais reduz os níveis dessa citocina pró-inflamatória no cólon. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de IL-1 $\beta$  expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde \* $p < 0,05$  vs grupo controle e # $p < 0,05$  vs grupo TNBS.

#### 4.6 Efeito da epiisopiloturina sobre a quantificação de glutathiona (GSH) no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS

Foi verificado que a indução da colite pelo TNBS diminuiu ( $p < 0,05$ ) a formação de GSH ( $37,98 \pm 14,62$ ) quando comparado ao grupo salina ( $170,50 \pm 88,48$ ). A epiisopiloturina utilizada no tratamento dos grupos que receberam a dose de 1 mg/kg foi eficaz em aumentar a formação de GSH ( $150,4 \pm 47,23$ ) de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo TNBS (Figura 13).

Figura 13 – Concentração de GSH no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.

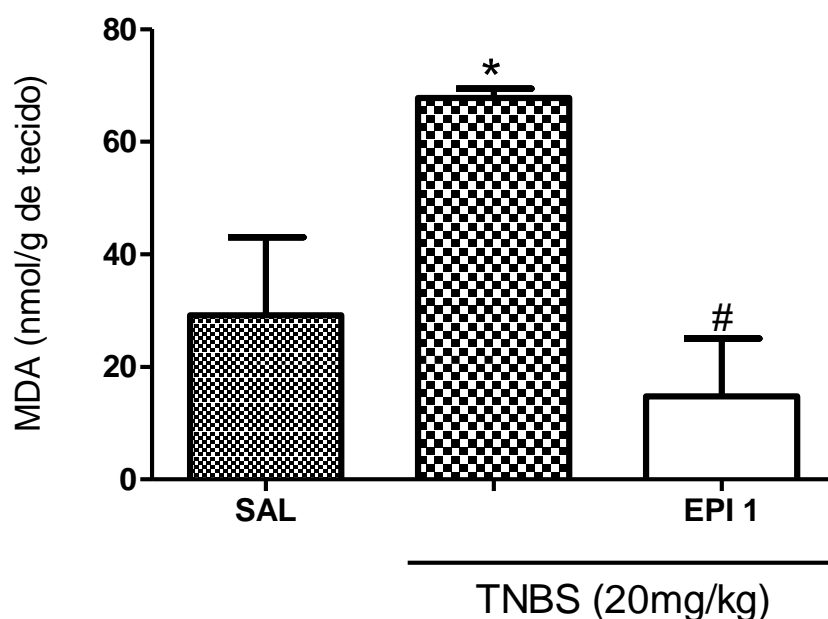


Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de GSH. Observa-se que TNBS diminuiu os níveis no cólon quando comparado ao grupo controle. Epiisopiloturina nesses animais aumenta os níveis de GSH no cólon. Os valores foram apresentados como média ± EPM dos níveis de GSH expressos em µg/g de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde \* $p < 0,05$  vs grupo controle e # $p < 0,05$  vs grupo TNBS.

#### 4.7 Efeito da epiisopiloturina sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS

Foi verificado que a indução da colite por TNBS aumentou ( $67,75 \pm 3,42$ ) a formação de MDA quando comparado ao grupo salina ( $29,14 \pm 2,779$ ), o que indica o aumento de peroxidação lipídica. A epiisopiloturina utilizada no tratamento dos grupos que receberam as doses de 1 mg/kg foi eficaz em reduzir de forma significativa a formação de MDA ( $14,73 \pm 2,298$ ), quando comparado ao grupo TNBS (Figura 14).

Figura 14 – Concentração de MDA no tecido intestinal no terceiro dia após a indução da colite por TNBS.



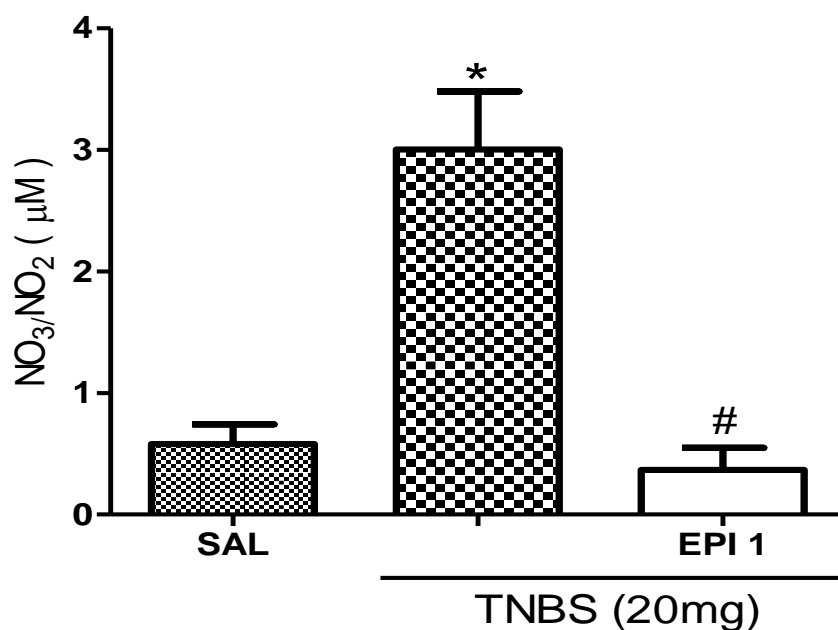
Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de MDA. Observa-se que TNBS aumentou os níveis no cólon quando comparado ao grupo controle. Epiisopiloturina nesses animais diminuiu os níveis de MDA no cólon. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de GSH expressos em  $\mu\text{g/g}$  de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde  $*p < 0,05$  vs grupo controle e  $\#p < 0,05$  vs grupo TNBS.



#### 4.8 Efeito da epiisopiloturina nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS.

Os níveis de óxido nítrico no intestino geralmente são mensurados indiretamente pela dosagem dos seus metabólitos nitrito/nitrato. No grupo controle, baixos níveis de nitrito/nitrato foram detectados no cólon ( $0,58 \pm 0,039$ ). Comparado a este grupo, TNBS ( $3,00 \pm 0,116$ ) aumentou ( $p < 0,05$ ) os níveis de nitrito/nitrato no intestino. Ao passo que a epiisopiloturina (1,0 mg/kg), em ratos submetidos à colite por TNBS, foi capaz de diminuir ( $p < 0,05$ ) os níveis desses metabólitos do óxido nítrico no cólon ( $0,36 \pm 0,048$ ) (figura 15).

Figura 15– Epiisopiloturina 1 mg/kg reduz os níveis de NOx no cólon de ratos submetidos à colite por TNBS.



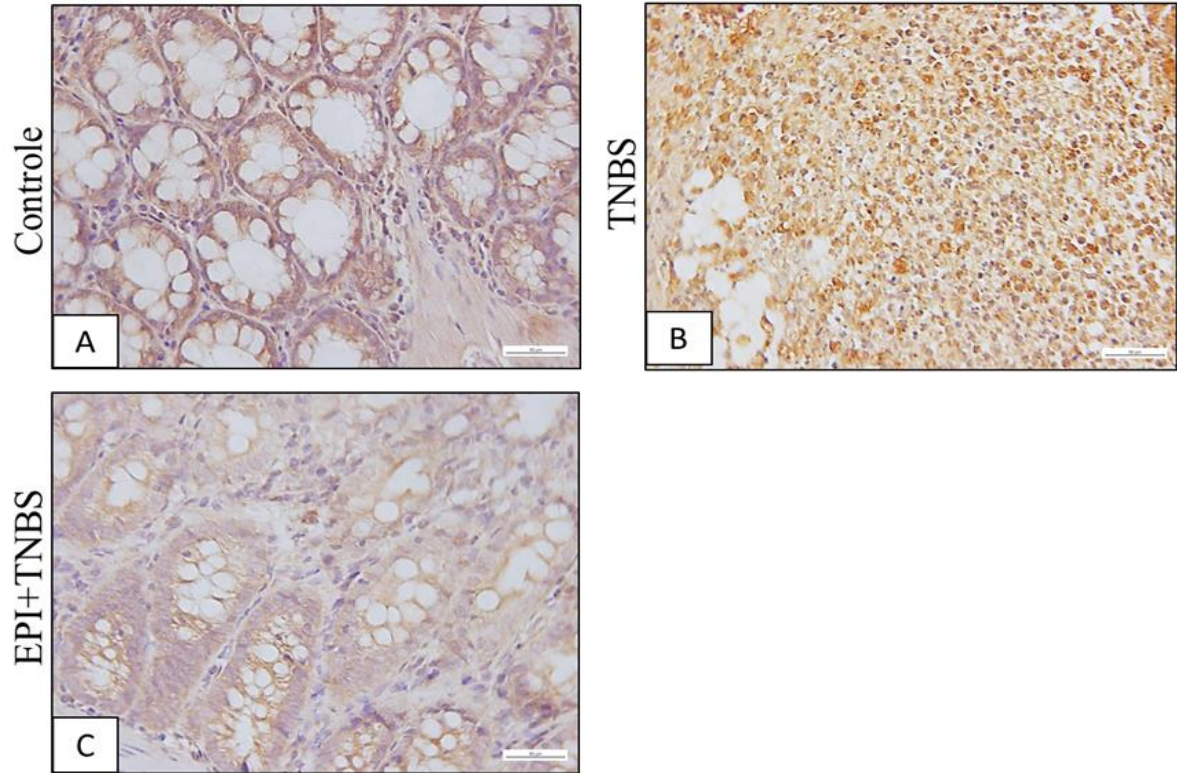
Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de NOx. Observa-se que o TNBS aumenta os níveis de nitrito e nitrato no cólon quando comparado ao grupo controle. A epiisopiloturina 1,0 mg/dl reduz os níveis de NOx no cólon de animais submetidos à colite por TNBS. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de nitrito/nitrato expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde \* $p < 0,05$  vs grupo controle e #  $p < 0,05$  vs grupo TNBS.

#### **4.9 Efeito da epiisopiloturina sobre a imunomarcção de iNOS, IL-1 $\beta$ e COX-2 no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS.**

A enzima iNOS catalisa a formação de óxido nítrico a partir da reação de L-arginina com oxigênio molecular. Observou-se expressivos números de células marcadas para iNOS nos animais submetidos a colite ulcerativa induzida por TNBS (Figura 16B) quando comparado ao grupo controle (Figura 16A). Enquanto que o tratamento com epiisopiloturina diminuiu a imunomarcção de iNOS no cólon de animais submetidos a colite ulcerativa induzida por TNBS (Figura 16C).

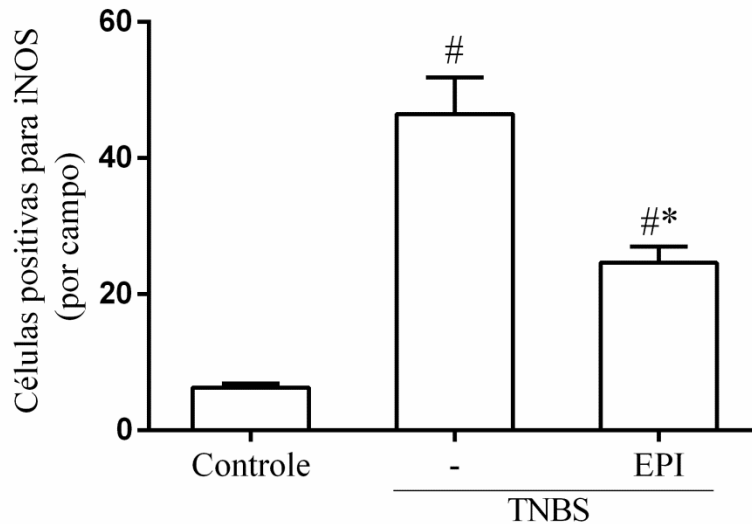
Para confirmar esses dados qualitativos apresentados na figura 16, realizou-se a contagem das células marcadas para iNOS. Conforme apresentado na figura 17, TNBS elevou ( $p < 0,05$ ) o número de células imunomarcadas para iNOS ( $46,45 \pm 25,18$ ) no cólon quando comparado ao grupo controle ( $6,250 \pm 2,770$ ). Ao passo que a epiisopiloturina reduziu ( $p < 0,05$ ) essa imunomarcção de iNOS ( $24,60 \pm 12,05$ ) nos cólon de animais submetidos a colite experimental.

Figura 16. Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de iNOS nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS. Controle (A); TNBS (B); epiisopiloturina e TNBS (C);.



Segmentos do cólon foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para iNOS. Nota-se aumento da imunomarcção para iNOS no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que o tratamento de animais submetidos à colite induzida por TNBS com epiisopiloturina (painel C) diminuiu a imunomarcção para iNOS. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50  $\mu$ m.

Figura 17. Epiisopiloturina diminui o número de células imunomarcadas para iNOS no cólon de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.

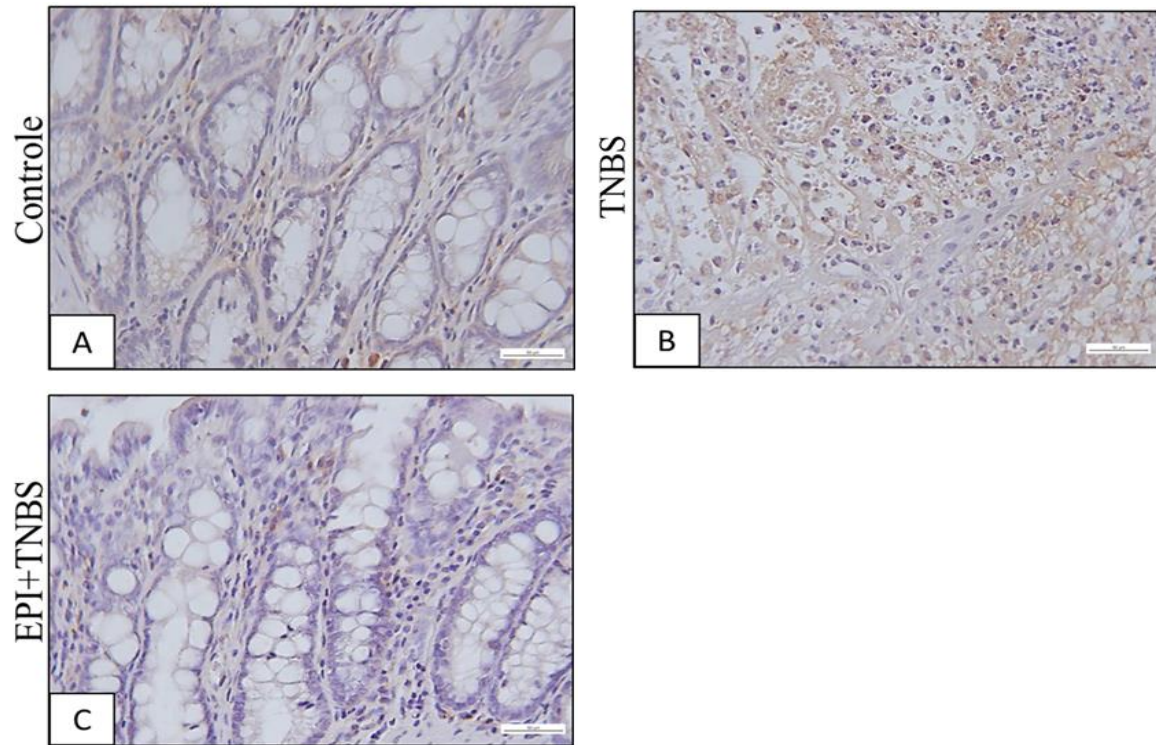


Os valores foram apresentados como média  $\pm$  DPM na contagem de células com imunomarcação positiva para iNOS por campo. Para análise estatística foi utilizado o teste Anova seguido por Newman Keuls, onde # $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo TNBS.

Em relação à imomarcação de IL-1 $\beta$ , uma citocina pró-inflamatória, a colite induzida por TNBS aumentou a imunomarcação de IL-1 $\beta$  (Figura 18B) quando comparado ao grupo controle (Figura 18A). Enquanto que a epiisopiloturina reduziu essa imunomarcação em animais submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS (Figura 18C).

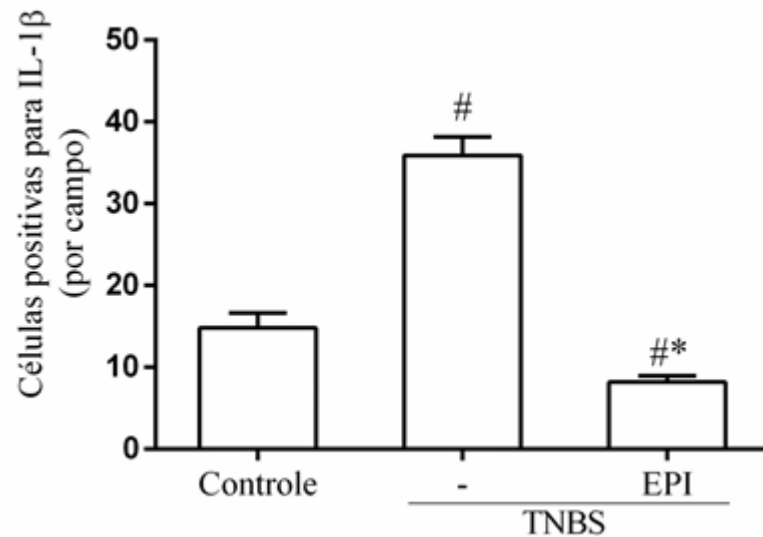
Conforme demonstrado na figura 19, TNBS aumentou ( $p < 0,05$ ) o número de células imunomarcadas para IL-1 $\beta$  ( $35,90 \pm 10,33$ ) em relação ao grupo controle ( $14,81 \pm 8,442$ ). Enquanto que a epiisopiloturina diminuiu ( $p < 0,05$ ) essa imunomarcação ( $8,200 \pm 3,503$ ) no cólon de animais submetidos a colite induzida por TNBS.

Figura 18. Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de IL-1 $\beta$  nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.



Segmentos do cólon foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ . Nota-se aumento da imunomarcação para IL-1 $\beta$  no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que o tratamento de animais submetidos à colite induzida por TNBS com epiisopiloturina (painel C) diminuiu a imunomarcação para IL-1 $\beta$ . Todos os painéis foram obtidos na escala de 50  $\mu$ m.

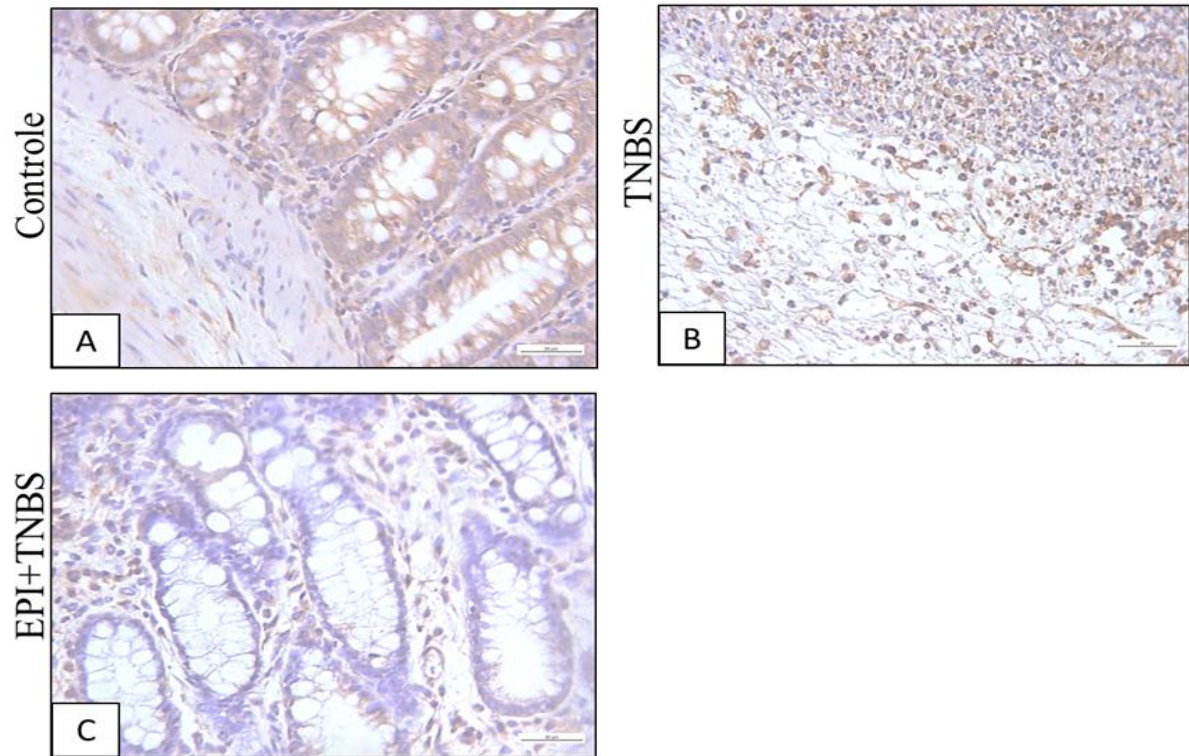
Figura 19. Epiisopiloturina diminui o número de células imunomarcadas para IL-1 $\beta$  no cólon de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.



Os valores foram apresentados como média  $\pm$  DPM na contagem de células com imunomarcção positiva para IL-1 $\beta$  por campo positiva. Para análise estatística foi utilizado o teste Newman Keuls, onde # $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo TNBS

A imunomarcção para COX-2 esteve aumentada no grupo TNBS enquanto que o grupo epiisopiloturina mostrou reduzida marcação (Figura 20) e essa diferença ( $12,81 \pm 5,389$ ) foi significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo TNBS ( $35,11 \pm 21,73$ ) na contagem de células por campo positivas para COX-2 (Figura 21).

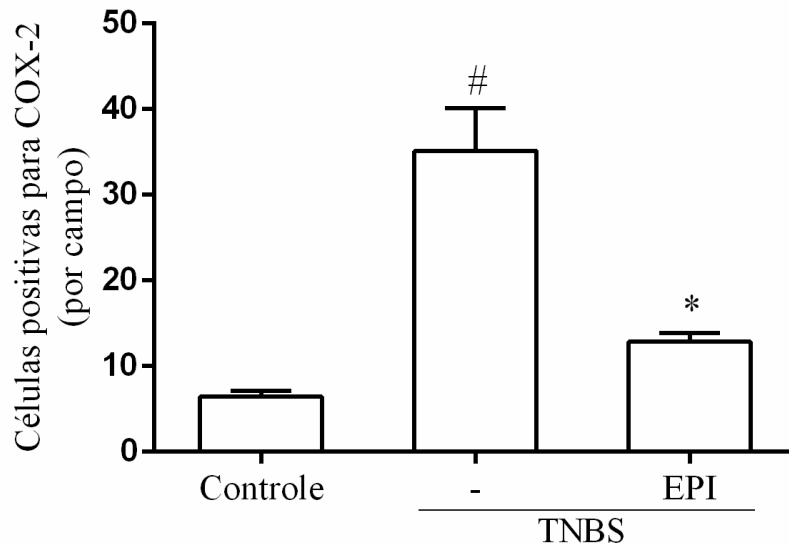
Figura 20. Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de COX-2 nos cortes histológicos dos cólons dos ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.



Segmentos do cólon foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para COX-2. Nota-se aumento da imunomarcação para COX-2 no cólon de animais submetidos à colite induzida por TNBS (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que o tratamento de animais submetidos à colite induzida por TNBS com epiisopiloturina (painel C) diminuiu a imunomarcação para COX-2. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50  $\mu$ m.



Figura 21 - Epiisopiloturina diminui o número de células imunomarcadas para COX-2 no cólon de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.



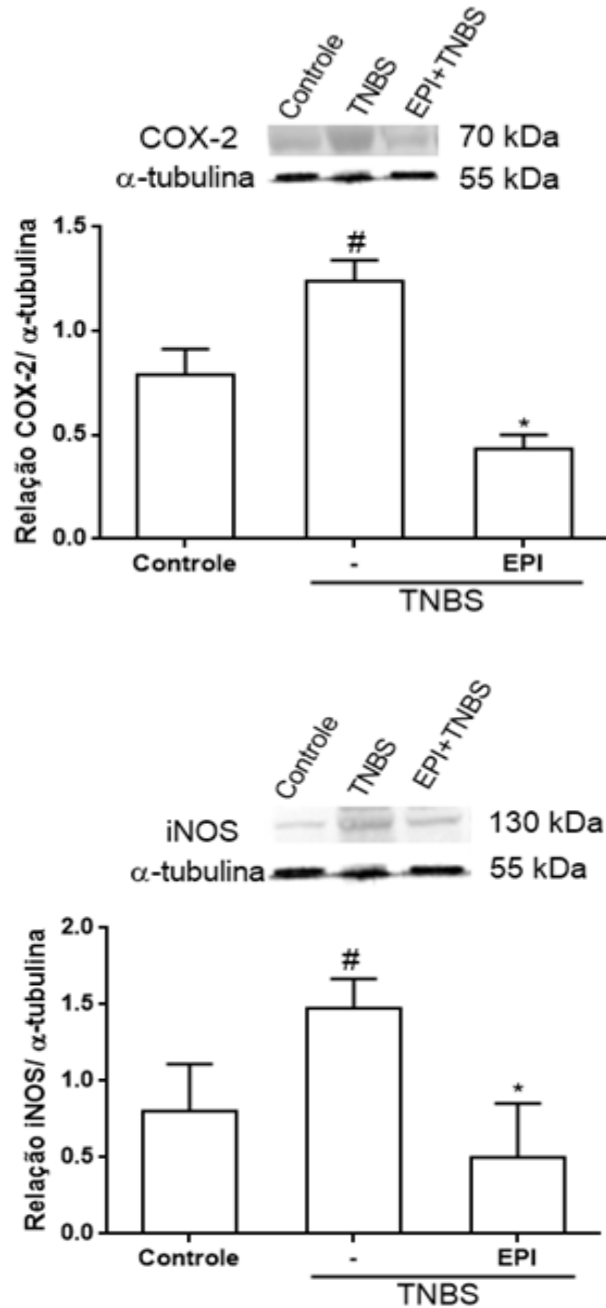
Os valores foram apresentados como média  $\pm$  DPM na contagem de células com imunomarcção positiva para iNOS por campo. Para análise estatística foi utilizado o teste Newman Keuls, onde # $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo TNBS

#### 4.10. Expressão protéica de iNOS e COX-2

Conforme apresentando na figura 22, observou-se que a indução da colite por TNBS aumentou ( $p < 0,05$ ) a expressão proteica de COX-2 ( $1,240 \pm 0,203$ ) (Figura 22A) e iNOS ( $1,476 \pm 0,192$ ) (Figura 22B) quando comparado ao grupo controle ( $0,709 \pm 0,214$ ) ( $0,803 \pm 0,308$ ), respectivamente. Enquanto que a epiisopiloturina diminuiu ( $p < 0,05$ ) a expressão proteica de COX-2 ( $0,434 \pm 0,117$ ) e INOS ( $0,501 \pm 0,350$ ) em animais submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS.



Figura 22. Epiisopiloturina reduz a expressão proteica de iNOS e COX-2 no cólon de ratos submetidos a colite induzida por TNBS. Mediante Western blot (n=6) #p < 0,05 versus grupo controle; e \*p < 0,05 versus grupo controle TNBS.



Segmentos do cólon foram coletados para avaliar a expressão proteica de COX-2 (A) e iNOS (B) por Western Blotting. Observa-se que TNBS eleva a expressão proteica de COX-2 (A) e iNOS (B) comparado ao grupo controle, enquanto que a epiisopiloturina reduz a expressão dessas proteínas. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  DPM da expressão proteica de COX-2 ou iNOS que resultou da relação da densidade dessas proteínas e de  $\alpha$ -tubulina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de teste de Newman Keuls, onde # p<0,05 vs grupo controle e \* p<0,05 vs grupo epiisopiloturina.

## 5 DISCUSSÃO

O potencial anti-inflamatório da epiisopiloturina foi avaliado usando uma gama de testes farmacológicos. O presente estudo revelou que a epiisopiloturina possui atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por TNBS. O grupo TNBS em etanol a 50% teve um aumento significativo dos escores macroscópicos de lesão quando comparados aos animais que receberam somente salina via retal três dias após a indução da colite experimental. Já a epiisopiloturina foi capaz de diminuir significativamente os escores macroscópicos de lesão no cólon, com uma maior significância na dose de 1,0 mg/kg.

Os resultados desse estudo e de outros (GOES, 2014) mostraram que os animais do grupo TNBS em etanol a 50% tiveram também um aumento significativo do peso úmido de seus cólons quando comparados com os animais que receberam somente salina, por enema, três dias após a indução das colites experimentais.

Corroborando a avaliação macroscópica, os mesmos grupos de animais (EPI 0,1; 0,3; 1,0 mg/Kg) tiveram também diminuição significativa no peso úmido dos cólons, sendo mais significativa a dose de 1,0 mg/kg.

O peso úmido do tecido do cólon inflamado é considerado um indicador macroscópico da gravidade e a da extensão da resposta inflamatória, refletindo a magnitude do edema e do infiltrado celular no tecido estudado (BUSSEROLLES *et al.*, 2005).

A ocorrência da inflamação intestinal na colite ulcerativa é caracterizada pela infiltração de numerosos linfócitos e granulócitos na mucosa e submucosa e por depleção de células caliciformes no cólon, em casos moderados a graves da doença (ASAKURA *et al.*, 2007).

A partir das análises histológicas do cólon dos animais submetidos à colite experimental, pôde-se constatar um processo inflamatório intestinal visível no grupo controle TNBS, com a infiltração de células inflamatórias nas camadas do cólon.

O aumento de células inflamatórias na mucosa e submucosa na DII promove a síntese e liberação de uma série de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo eicosanóides, citocinas e metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio, os quais são responsáveis pela perpetuação da resposta inflamatória (PAVLICK *et al.*, 2002).

Os neutrófilos e monócitos de pacientes com DII produzem altas concentrações de espécies reativas de oxigênio, comparados à pacientes sadios (D'ORICO, 2000). Segundo McKenzie (1996), há uma elevação das espécies reativas de oxigênio na inflamação da mucosa do cólon na colite ulcerativa, o que pode causar danos diretos na célula epitelial.

Em relação ao grupo TNBS em termos de parâmetros histopatológicos apresentou elevada arquitetura distorcida, infiltrados de células inflamatórias e leve redução das células caliciformes sendo estatisticamente significativa a diferença quando comparado ao grupo controle, resultados semelhantes foram apresentados na literatura por (WEISS *et al.*, 2015).

Já a epiisopiloturina na dose de 1,0 mg/kg mostrou-se eficaz na redução do dano tecidual microscópico observado no cólon de ratos com colite experimental induzida por TNBS, quando comparado ao grupo salina. Portanto, auxiliando na manutenção da estrutura epitelial, preservação das criptas intestinais, bem como redução massiva no infiltrado celular na mucosa intestinal.

A partir desses resultados iniciais foi possível confirmar a eficácia da epiisopiloturina como atividade anti-inflamatória no modelo de colite induzida por TNBS. Mediante os resultados apresentados, foi visto que a melhor dose em reduzir os parâmetros macroscópicos, microscópicos e o peso úmido foi a dose de 1,0 mg/kg, sendo a dose de escolha para a avaliação dos possíveis mecanismos de ação da epiisopiloturina.

Um evento inflamatório de grande importância é a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Esta resposta pode ser medida utilizando a enzima mieloperoxidase (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 resultados obtidos nesse estudo e em outros (ZHANG, 2006) mostraram que o TNBS produziu um aumento na atividade da mieloperoxidase. Este aumento foi reduzido pelo tratamento com a epiisopiloturina, resultados estes comprovados pelos dados microscópicos, onde ocorreu atenuação dos danos da mucosa e da

submucosa com redução da infiltração de neutrófilos, sugerindo que sua ação anti-inflamatória pode envolver inibição da migração de leucócitos e infiltração de neutrófilos.

Os leucócitos especialmente os neutrófilos, são algumas das células inflamatórias responsáveis pela produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), quando presente no tecido, sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio resultam em peroxidação lipídica culminando no dano tecidual, além disso a MPO catalisa a reação  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ , onde o ácido hipocloroso é altamente oxidante, de 100 a 1000 vezes mais tóxico que o  $\text{O}_2^-$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Com isso, a diminuição do MPO representa não só a diminuição do influxo de neutrofilos como também uma redução do estresse oxidativo. (MORET-TATAY et al., 2016).

Mecanismos relacionados ao estresse oxidativo também tem sido considerados potenciais fatores etiológicos da DC, mediante um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) oriundas do sistema imune hiperreativo e as enzimas antioxidantes. Os compostos  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $\text{HO}^\cdot$  secretados por fagócitos se acumulam em sítios de inflamação resultando em peroxidação lipídica e podem potencializar as reações imunes, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), além de causarem dano tecidual e dano ao DNA (BHATTACHARYYA et al., 2014; MORET-TATAY et al., 2016).

Outro fator ligado ao processo inflamatório, a IL-1 $\beta$ , um importante e potente mediador inflamatório, que atua ativando diferentes células através de sua ligação ao seu receptor específico (IL-1R). Esta citocina induz a síntese e a secreção de quimiocinas e outras citocinas, promovendo indiretamente a migração de macrófagos e granulócitos para o foco inflamatório (COCCIA, 2012).

Além disso, a citocina IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (YANG, 2014). Outros trabalhos têm verificado que a expressão da IL-1 $\beta$  está aumentada em pacientes com doença de chron (BENTO, 2012). Ela está envolvida em fases iniciais da resposta inflamatória, desempenhando um importante papel na patogênese da DC, colite ulcerativa e colite infecciosa mostrando-se mais expressa nesta patologia (BERTEVELLO ET AL., 2005; DINARELLO, 1996).

Nesse estudo, a indução da colite com TNBS em etanol a 50% foi capaz de induzir a liberação de forma significativa a citocina IL-1 $\beta$  quando comparado ao grupo que foi administrado salina por via retal. Já o grupo epiisopiloturina foi capaz

de diminuir significativamente a sua produção. Dados esses confirmados com a imunohistoquímica, onde o grupo com colite induzida por TNBS teve um aumento da marcação da citocina e quando comparado ao grupo epiisopiloturina teve diminuída marcação estatisticamente significante, resultados condizentes com a literatura, onde a citocina encontra-se mais expressa nesta patologia (BERTEVELLO ET AL., 2005; DINARELLO, 1996).

Assim, com base nos resultados, pode-se inferir que o efeito anti-inflamatório da epiisopiloturina é dependente, pelo menos em parte, da inibição da liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  com consequente diminuição da infiltração granulocítica.

No processo inflamatório, um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio debilita as defesas antioxidantes, como a glutathiona. A GSH é essencial para a integridade da função e estrutura do intestino, inibindo a produção de radicais livres ou sequestrando os que já foram produzidos, estando intimamente ligado com a patogênese das DII. (DRYDEN *et al.*, 2005).

A presença de estresse oxidativo na mucosa colônica no processo inflamatório intestinal leva a depleção nos níveis de glutathiona, como observado em humanos (SIDO, *et.al.* 1998) e em modelo experimental de colite induzido por TNBS (KARP E KOCH, 2006).

Considerando-se que a administração de um bloqueador de radicais sulfidríla em ratos promove inflamação colônica (LOGUERCIO *et al.*, 2003) e que a suplementação com GSH melhora o dano colônico em colite experimental (ARDITE *et al.*, 2000), novos compostos que impedem a redução dos níveis deste tripeptídeo caracterizam-se como potenciais no tratamento da DII.

Como previsto, os resultados obtidos no estudo mostraram que o TNBS levou a diminuição dos níveis de glutathiona no tecido colônico. Já a administração de epiisopiloturina foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GSH, comparáveis ao grupo salina.

Sabendo-se que o GSH está diminuído na presença de radicais livres, onde sua fonte predominante na mucosa inflamada são provavelmente de leucócitos ativados (PATRICIA ORSI, 2008), esses resultados corroboram com a atividade da MPO na mucosa intestinal. Ou seja, quanto maior o influxo de polimorfonucleares maior produção de EROs, consequentemente uma diminuição de GSH.

Outro fator que confirma a presença de estresse oxidativo na mucosa colônica no processo inflamatório intestinal é o aumento dos níveis de malondialdeído. MDA é um aldeído insaturado, produto secundário formado durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, sendo utilizado como indicador de peroxidação lipídica e do estresse oxidativo *in vivo*, o aumento de tais níveis causa alterações estruturais e respostas imunológicas (LIMA E ABDALLA, 2001).

O modelo experimental de colite induzido por TNBS promove o aumento dos níveis de MDA, isto foi observado neste estudo e em outros (WITAICENIS *et. al.* 2014) como indicativo do aumento de estresse oxidativo. A epiisopiloturina apresentou atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica, foi eficaz em reduzir os níveis de MDA, indicado como o principal marcador do dano oxidativo tecidual, o que demonstra sua ação antioxidante.

Como demonstrado nos estudos que tais níveis estão depletados no modelo experimental de colite induzido por TNBS (KARP E KOCH, 2006), o grupo tratado com a epiisopiloturina evitou a depleção dos níveis de glutathiona (GSH) o que indica que este atua sobre o sistema antioxidante, ao passo que interfere na produção de radicais livres por meio da interrupção da peroxidação lipídica, o que demonstra sua capacidade em reduzir ou até inibir a ação colônica do TNBS. Corroborando assim com (SOCCA *ET AL.*, 2014) no modelo de peroxidação lipídica em membranas de cólons, demonstrando a importância do aumento do GSH na redução dos níveis de MDA.

Um grande número de evidências revelaram que o aumento do estresse oxidativo juntamente com o aumento da atividade da iNOS resulta em uma cascata de produção de radicais livres, prejudicando a estrutura e função do tecido (FUKUMURA *et al.*, 2006; PARRA *et al.*, 2015).

Zingarelli, Szabó e Salzman (1999) propuseram que o aumento da produção de NO pela enzima iNOS parece ser responsável pelo surgimento de lesões no tecido colônico em vários modelos experimentais de colite. Em pacientes com RCUI, onde a atividade da iNOS é elevada, há aumento da concentração de nitrito detectada em lavado retal e em amostras de biópsia (ZINGARELLI, SZABÓ e SALZMAN, 1999) (FILLMANN *et al.*, 2007).

Devido ao papel importante desenvolvido pelo óxido nítrico na colite ulcerativa, foi avaliado os seus metabólitos por meio da técnica de nitrito/nitrato (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) observando um aumento significativo de NO do grupo TNBS comparado ao

grupo controle, este dado corrobora com Érces *et al.*, 2012 demonstrando que o aumento dos seus níveis participa no processo patológico, ao passo que a epiisopiloturina foi capaz de diminuir significativamente os níveis desses metabólitos do óxido nítrico no cólon.

Estudos relatam que na colite ulcerativa há um aumento da marcação de iNOS, e quando presente, causa danos na mucosa e submucosa do intestino (BLÁZOVICS *et al.*, 2004; ALKIM *et al.*, 2012). Mediante isso, a imunomarcação para iNOS foi avaliada por imunohistoquímica assim como realizado nos estudos (HARTMANN *et al.*, 2014; GRISHAM *et al.*, 2002), observando intensa marcação da enzima no grupo TNBS e ausência da mesma no grupo controle, diferente da epiisopiloturina com diminuição considerável nas marcações quando comparado ao grupo TNBS.

Foi visto neste estudo que a inflamação do cólon obtida por TNBS está implicada a um maior aumento da expressão da iNOS em comparação aos animais controle, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com modelos anteriores de colite e doenças inflamatórias intestinais (HOGABOAM *et al.*, 1995). Onde, a epiisopiloturina reduziu a expressão de iNOS quando comparado ao grupo TNBS, isto, deve-se possivelmente a um efeito anti-inflamatório.

Como já visto, o estresse oxidativo está definitivamente implicado como um fator etiológico da DII. A produção de espécies reativas de oxigênio oriundas de diversas fontes inicia uma cascata de eventos que culmina com a lesão celular. Além das já demonstradas neste trabalho, a oxidação do ácido araquidônico constitui outra fonte geradora de espécies reativas de oxigênio, sendo a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) a mais frequente envolvida no processo colite. O grau da expressão de COX-2 avalia o grau de inflamação no tecido (DEMARIA e WEIR, 2003; MOTILVA *et al.*, 2005).

Inúmeros trabalhos já demonstraram haver um importante aumento da expressão da COX-2 na colite experimental. Farias (2013) avaliou a atividade da COX-2 na colite experimental comparando com diferentes parâmetros inflamatórios tais como atividade da mieloperoxidase e infiltração leucocitária. Os resultados mostraram um importante aumento da atividade da COX-2 que se relacionou diretamente com um aumento dos parâmetros de inflamação. De acordo com estudos anteriores (SÁNCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2007; TALERO *et al.*, 2007) a expressão de COX-2 encontra-se aumentada no grupo TNBS quando comparada ao

grupo normal, o presente estudo, foi de acordo com esses dados, o grupo TNBS apresentou um aumento da expressão de COX-2, quando comparada ao grupo controle, já, o tratamento com a epiisopiloturina reduziu a expressão da COX-2 no cólon quando comparada ao TNBS, reduzindo assim a produção de prostanóides.

Na avaliação de imunohistoquímica, a imunomarcação para COX-2 encontra-se aumentada em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (SINGER *et al.*, 1998), no presente estudo o grupo com colite induzida por TNBS teve uma marcação aumentada corroborando com outros estudos (HALTER *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2014), onde a epiisopiloturina mostrou reduzida marcação com diferença significativa quando comparado ao grupo TNBS na contagem de células por campo positivas para COX-2. Portanto, o presente estudo demonstrou que a epiisopiloturina tem a capacidade de inibir os níveis de IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2, corroborando com (DUTRA *et al.*, 2011) que mostra que a marcação no tecido colônico destas estão aumentadas na DC.



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que episopiloturina demonstrou ter um melhor efeito antiinflamatório e antioxidante no modelo experimental de colite induzida por TNBS, pois foi capaz de reverter parâmetros inflamatórios, como critérios macroscópicos e microscópicos de lesão, MPO, liberação de IL-1 $\beta$  e também reduzir danos decorrentes da oxidação tecidual como MDA e a produção de radicais livres derivados do Oxido Nítrico assim como restaurar as concentrações endógenas de GSH. Além de atuar na inibição da iNOS, IL-1 $\beta$  e COX-2.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. AM. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 279,p. 238–244, 2000.

ALGIERI, F. et al. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 750–759, 2013.

ALKIM, C. et al. Thrombospondin-1 and VEGF in inflammatory bowel disease. **Libyan J Med**, v. 7, 2012.

AMIN, J. et. al.. Update 2014: advances to optimize 6-mercaptopurine and azathioprine to reduce toxicity and improve efficacy in the management of IBD. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 2, p. 445-452, 2015.

APPLEYARD, C.B; WALLACE, J.L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am J Physiol.** v. 269, p. 119-25, 1995.

ARDITE, E. et al. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 735-44, 2000.

ASAKURA, H.; SUZUKI, K.; HONMA, T. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? **World J. Gastroenterol.**, v.13, n.15, p.2145-2149, 2007.

ASSCHE, G. V. et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 4, p. 7–27, 2010.

ATREYA, I.; ATREYA, R.; NEURATH, M. F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. **J Intern Med**, v. 263, n. 6, p. 591-6, 2008.

BANDZAR, S.; GUPTA, S.; PLATT, M. O. Crohn's disease: A review of treatment options and current research. **Cellular Immunology**, v. 286, p. 45–52, 2013.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1590-1605, 2012.

BENTO, A.F. Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo dss: papel dos mediadores lipídicos derivados do omega-3 na resolução da colite experimental. **Tese** (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

BERTEVELLO, P. L. et al. Immunohistochemical assessment of mucosal cytokine profile in acetic acid experimental colitis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 60, n. 4, p. 277-86, 2005.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.

BLÁZOVICS, A.; HAGYMÁSI, K.; PRÓNAI, L. Cytokines, prostaglandins, nutritive and non-nutritive factors in inflammatory bowel diseases. **Orv Hetil**, v. 145, n. 50, p. 2523-9, 2004.

BÖCKER, U. et al. Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 16, p. 12207-13, 2000.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

BRASIL. Portaria nº 966, de 2 de outubro de 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Crohn.. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de outubro de 2014.

BRENNAN, Ø. et al. Relevance of TNBS-colitis in rats: a methodological study with endoscopic, histologic and Transcriptomic [corrected] characterization and correlation to IBD. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54543, 2013.

BUSSEROLLES, J; PAYÁ, M; D'AURIA, MV; GOMEZ-PALOMA, L; ALCARAZ, MJ; Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide M. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1433–40, 2005.

CAMBUI, Y. R. S.; NATALI, M. R. M. Doenças Inflamatórias Intestinais: Revisão Narrativa Da Literatura. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.** Sorocaba, v. 17, n. 3, p. 116 - 119, 2015.

CANTINI, F.; NICCOLI, L.; GOLETTI, D. Adalimumab, etanercept, infliximab, and the risk of tuberculosis: data from clinical trials, national registries, and postmarketing surveillance. **The Journal of Rheumatology**, v. 91, p. 47-55, 2014.

CHAMAILLARD, M.; RADULOVIC, K.. Defining dysbiosis threatens Koch's postulates and current dogma on the role of Paneth cells in Crohn's disease. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 190-191, 2016.

CHEIFETZ, A. S. Management of active Crohn disease. **Jama**, v. 309, n. 20, p. 2150-2158, 2013.

CHEIFETZ, A. S.; CULLEN, G. J. Sulfasalazine and 5-aminosalicylates in the treatment of inflammatory bowel disease. **UpToDate website**. Disponível em: [http://www.uptodate.com/contents/sulfasalazine-and-5-aminosalicylates-in-the-treatment-of-inflammatory-bowel-disease?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/sulfasalazine-and-5-aminosalicylates-in-the-treatment-of-inflammatory-bowel-disease?source=see_link), 2016.

CHO, J. H. et al. Enzymatic Extraction of Pilocarpine from *Pilocarpus jaborandi*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41(2), p. 236–241, 2013.

CHUNG, C. K. et al. Inhibitory effect of sodium salicylate on nitric oxide production from TM4 sertoli cells. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, n. 9, p. 685-92, 2000.

COCCIA, M. et. al. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. **JEM**. vol. 209 no. 9 1595-1609, 2012.

CRESPO, I. et al. Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50407, 2012.

D'ODORICO, A. et. al.. Influence of disease site and activity on peripheral neutrophil function in inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, p.1594-1600, 2000.

DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 203-36, 2001.

DEMARIA, A. N.; WEIR, M. R. Coxibs--beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. **J Pain Symptom Manage**, v. 25, n. 2 Suppl, p. S41-9, 2003.

DIAS, J. C. et al. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection. **J Pharm Biomed Anal**, v. 49, n. 4, p. 1128-32, 2009.

DOROFEYEV, A. E. et al. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterology research and practice**, v. 2013, 2013.

DRYDEN, G. W. et al. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 7, n. 4, p. 308-16, 2005.

DUTRA, R. C. et al. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27122, 2011.

ELSON, C.O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immunol Rev**. v. 206, p. 260-76, 2005.

ÉRCES, D. et al. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist therapy suppresses colon motility and inflammatory activation six days after the onset of experimental colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 691, n. 1-3, p. 225-34, 2012.

FARIAS, F.M. Avaliação da resposta anti-inflamatória intestinal de proantocianidinas de *Rhizophora mangle* L. no tratamento de colite experimental induzida por ácido tri-nitro-benzeno sulfônico (TNBS) em ratos e dextrana sal sódico (DSS) em camundongos. Faculdade de Ciências Médicas. **Tese** (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Estadual de Campinas, 2013.

FERRAZ, J. G. et al. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology**, v. 113, n. 1, p. 195-204, 1997.

FILLMANN, H. et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**, v. 236, n. 3, p. 217-26, 2007.

FILLMANN, H.; MARRONI, N. A. Papel do óxido nítrico na pressão anal esfinteriana de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. 96 p. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

FUJIMOTO, T. et al. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28, n. 4, p. 613-619, 2013.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521-34, 2006.

GERARD, R.; SENDID, B.; COLOMBEL, J. F.; POULAIN, D.; JOUAULT, T. An immunological link between *Candida albicans* colonization and Crohn's disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, ed. 2, p. 135-139, 2015.

GHIZZONI, M. et al. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF- $\kappa$ B mediated inflammation. **Drug Discov Today**, v. 16, n. 11-12, p. 504-11, 2011.

GOES, A.C.A.M. A eletroacupuntura atenua a colite experimental induzida por tns via ativação de interleucina 10 e inibição de óxido nítrico sintase induzida. **Tese** (Doutorado em Ciências Médico-cirúrgicas)-Universidade Federal do Ceará, 2014.

GRISHAM, M. B. et al. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. **J Investig Med**, v. 50, n. 4, p. 272-83, 2002.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 737-69, 1995.

GUIMARÃES, M. A. et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

GUIMARAES, M. A. et al. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: Preparation and in vitro schistosomicidal activity. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 4519-4528, 2014.

GUO, Z. et al. Altered microRNA expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active Crohn's disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 30, n. 1, p. 109-116, 2015.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v. 23 Suppl 1, p. 118-26, 1993.

HALTER, F. et al. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, n. 3, p. 443-53, 2001.

HALTER, F. et al. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, n. 3, p. 443-53, 2001.

HARTMANN, R. M. et al. *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. **Phytother Res**, v. 28, n. 9, p. 1392-8, 2014.

HE, J. et al. Protective effect of taurohyodeoxycholic acid from *Pulvis Fellis Suis* on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 670, p.:229-35, 2011.

HOGABOAM, C. M. et al. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. **Am J Physiol**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. G673-84, 1995.

HUEBER, W. et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. **Gut**, v. 61, n. 12, p. 1693-1700, 2012.

HUTFLESS, S. et al. Pharmacological Management of Crohn's Disease: Future Research Needs: Identification of Future Research Needs From Comparative Effectiveness **Review** No. 131. 2014.

IBORRA, M. et al. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 5, p. 305-314, 2012.

IBRAHIM, C. B.; ARONIADIS, O. C.; BRANDT, L. J. On the role of ischemia in the pathogenesis of IBD: a review. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 4, p. 696-702, 2010.

KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Dis Mon**, v. 52, n. 5, p. 199-207, 2006.

KAUR, R.; ARORA, S.. Alkaloids-Important Therapeutic Secondary Metabolites Of Plant Origin. **Journal of Critical Reviews**, v. 2, n. 3, 2015.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 4, p. 427-37, 2004.

KOSTIC, A. D.; XAVIER, R. J.; GEVERS, D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. **Gastroenterology**, v. 146, p. 1489–1499, 2014.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H. W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators Inflamm**, v. 7, n. 3, p. 157-62, 1998.

LAASS, M. W.; ROGGERBUCK, D.; CONRAD, K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 467–471, 2014.

LAKSHMANAN, J. et al. Glycogen synthase kinase 3 regulates IL-1 $\beta$  mediated iNOS expression in hepatocytes by down-regulating c-Jun. **J Cell Biochem**, v. 116, n. 1, p. 133-41, 2015.



LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. **Cell**, v. 58, n. 2, p. 227-9, 1989.

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Crit Care Med**, v. 28, n. 4 Suppl, p. N37-52, 2000.

LIMA, D. F. et al. Prospecção Tecnológica Do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): Espécie Economicamente Importante No Norte E Nordeste Do Brasil. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 1, p. 1626-1638, 2015.

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

LLORENS, S.; NAVA, E. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 335-46, 2003.

LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Dig Liver Dis**, v. 35, n. 9, p. 635-41, 2003.

MACDERMOTT, R. P. Immunomodulator therapy in Crohn disease. **UpToDate website**. Disponível em: [http://www.uptodate.com/contents/immunomodulator-therapy-in-crohn-disease?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/immunomodulator-therapy-in-crohn-disease?source=see_link), 2016.

MCKENZIE, S.J. et. al. Evidence of oxidantinduced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.136, 1996.

MEFFERT, M. K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF-kappaB. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 1, p. 37-43, 2005.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem.**, v. 86(1), p. 271-278,1978.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. **Gastroenterology**, v. 142, p. 46–54, 2012.

MONFORT, L. H. F. Estudo da morfologia e germinação de sementes de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes). **Dissertação** (Mestrado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

MORET-TATAY, I. et al. Possible Biomarkers in Blood for Crohn's Disease: Oxidative Stress and MicroRNAs—Current Evidences and Further Aspects to Unravel. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

MORRIS, G.P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**. v. 96, p. 795-803, 1989.

MOTILVA, V. et al. COX expression and PGE(2) and PGD(2) production in experimental acute and chronic gastric lesions. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 2, p. 369-79, 2005.

NAFTALI, T. et al. Cannabis induces a clinical response in patients with Crohn's disease: a prospective placebo-controlled study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 10, p. 1276-1280. e1, 2013.

NØRGÅRD, B. M. The incidence of ulcerative colitis (1995–2011) and Crohn's disease (1995–2012) — Based on nationwide Danish registry data. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, p. 1274–1280, 2014.

NOVACEK, G. et al. Adalimumab in der Behandlung der Colitis ulcerosa—ein Konsensus der Arbeitsgruppe Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen der Österreichischen Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 52, n. 02, p. 204-211, 2014.

OGINO, T. et al. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 145, n. 6, p. 1380-1391, 2013.

OH, S.Y. et al. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. **International journal of molecular medicine**, v. 33, n. 2, p. 333-340, 2014.

ONDERDONK, A. B. Experimental models for ulcerative colitis. **Dig Dis Sci**, v. 30, n. 12 Suppl, p. 40S-44S, 1985.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C.. *Hymenaea stigonocarpa* 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. 380-385, 2014.

PARRA, R. S. et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. **Med Gas Res**, v. 5, p. 6, 2015.

PATEL, D. D. et al. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. suppl 2, p. 116-123, 2013.

PAVLICK, K.P. et. al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.331, n.3, p.311-322, 2002.

PLANTAS MEDICINAIS-JABORANDI. Disponível em <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com> Acesso em 2 de abril de 2016.

PORTES, M. C. et al. Structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine-metal complexes, and anthelmintic activity vs. *S. mansoni*. *Journal of Coordination Chemistry*, n. just-accepted, p. 1-39, 2016.

RANDHAWA, P. K. et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279-288, 2014.

RANI, N.; SHARMA, A.; SINGH, R. Imidazoles as promising scaffolds for antibacterial activity: a review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1812-1835, 2013.

ROUSSEAU C.; LEFEBVRE B.; DUBUQUOY L. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **J Exp Med**, v. 201, n. 1205, 2005.

SALEM, M. et al. Species-specific engagement of human nucleotide oligomerization domain 2 (NOD) 2 and Toll-like receptor (TLR) signalling upon intracellular bacterial

infection: role of Crohn's associated NOD2 gene variants. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 179, n. 3, p. 426-434, 2015.

SALKIC, N. N. et al. NOD2/CARD15 mutations in Polish and Bosnian populations with and without Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype analysis. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 67, 2015.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 216-23, 2007.

SANTOS, A.P.; MORENO, P. R. H. Pilocarpus spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Braz J Pharm Sci**, v. 40, p. 115–137, 2004.

SARTOR, R. B. Antibiotics for treatment of inflammatory bowel diseases. **UpToDate website**. Disponível em: [http://www.uptodate.com/contents/antibiotics-for-treatment-of-inflammatory-bowel-diseases?source=see link](http://www.uptodate.com/contents/antibiotics-for-treatment-of-inflammatory-bowel-diseases?source=see_link), 2016.

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

SAWAYA, A. C.; COSTA, Y. D.; MAZZAFERA, P. Unraveling the biosynthesis of pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus*. **Natural product communications**, v. 10, n. 5, p. 721-724, 2015.

SIDO, B.; HACK, V.; HOCHLEHNERT, A.; LIPPS, H.; HERFART, C.; DROGE, W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v.42, p 485-492, 1998.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SINGER, I. I. et al. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p. 297-306, 1998.

SOCCA, E. A. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: a molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. **Chem Biol Interact**, v. 209, p. 48-55, 2014.

SOH, J. S. et al. Concomitant Use of Azathioprine/6-Mercaptopurine Decreases the Risk of Anti-TNF–Induced Skin Lesions. **Inflammatory bowel diseases**, v. 21, n. 4, p. 832-839, 2015.

SPEHLMANN, M. E.; ECKMANN, L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 92-9, 2009.

SPEHLMANN, M. E.; ECKMANN, L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 92-9, 2009.

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

SU, L. et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 145, n. 2, p. 407-415, 2013.

SUMMERS, R. et al. National Cooperative Crohn's Disease Study: Results of Drug Treatment. **Gastroenterology**. v.77, p.847-69,1979.

SZABO, C.; LIAUDET, L.; SORIANO, F. G. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**. 28.: 37-52 p. 2000.

TALERO, E. et al. Chronic administration of galanin attenuates the TNBS-induced colitis in rats. **Regul Pept**, v. 141, n. 1-3, p. 96-104, 2007.

TEIXEIRA, A. et al. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 9, p. 15638-78, 2014

TILLACK, C. et al. Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon- $\gamma$ -expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment . **Inflammatory bowel disease**, v. 3, p. 567–577, 2014.

TOMAR, D. et al. TRIM4; a novel mitochondrial interacting RING E3 ligase, sensitizes the cells to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 89, p. 1036-48, 2015.

TSAMPALIEROS, A. et al. Long-term inflammation and glucocorticoid therapy impair skeletal modeling during growth in childhood Crohn disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 8, p. 3438-3445, 2013.

VÉRAS, L. M. C. et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* stapf leaves: a promising alkaloid against Schistosomiasis. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66702, 2013.

VERAS, M. L. et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

WAKEFIELD, A. J. et al. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. **The Lancet**, v. 334, n. 8671, p. 1057-1062, 1989.

WEISS, C. R. et al. The potential protective role of caveolin-1 in intestinal inflammation in TNBS-induced murine colitis. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119004, 2015.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data International statistical classification of diseases and related health problems. - **10th revision, World Health Organization**, Fifth edition, 3 v. I, 2016.

WILSON, T. J. Estudo do polimorfismo do gene *defb1* em pacientes com doença inflamatória intestinal e controles no sul do Brasil. 2015. **Tese** (Doutorado em Ciência Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc**, v. 2, p. 541-546, 2007.

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

WU, L. H. et al. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, 2011.

YAN, J; ZHANG, H; CHEN, CT; YANG, QY; LIAO, WF; CHEN, PG.  $\beta$  Effects of

Electroacupuncture at Shangjuxu ( ST 37 ) on Interleukin-1 and Interleukin-4 in the Ulcerative Colitis Model Rats. **J Tradit Chin Med.** v. 29, n. 1, p. 60–63, 2009.

YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 10, p. 493-500, 2014.

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.

Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis.** 12(5):382-8, 2006.

ZHANG, H. et al. Cathelicidin-BF, a Novel Antimicrobial Peptide from *Bungarus fasciatus*, Attenuates Disease in a Dextran Sulfate Sodium Model of Colitis. **Mol Pharm**, v. 12, n. 5, p. 1648-61, 2015.

ZINGARELLI, B.; SZABÓ, C.; SALZMAN, A L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 199–209, 1999.

## ANEXO 1- DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE PROJETO EM COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)



**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: cesapi@ufpi.edu.br

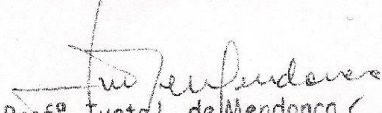


### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da utilização da episopiloturina como terapia alternativa para o tratamento da Doença de Crohn experimental induzida por TNBS em ratos", protocolo nº 056/15, sob a responsabilidade de **ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da 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 23/10/2015.

Vigência do Projeto	Novembro/ 2015 à Abril/ 2016
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de Animais	228
Peso/ Idade	150-200g
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal do Piauí-UFPI.

Teresina, 23 de Outubro de 2015.

  
 Prof.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora