

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/02/2019.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação
antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-
dihidroxi-4-metilcumarina

Botucatu
2017

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação
antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-
dihidroxi-4-metilcumarina

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Financiadoras:
FAPESP (Proc. 13/19138-2)
CAPES

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Co-orientadora:
Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tanimoto, Alexandre.

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina / Alexandre Tanimoto. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Coorientador: Fátima Pereira de Souza
Capes: 21001006

1. Intestinos - Inflamação. 2. Doenças inflamatórias intestinais. 3. Antioxidantes. 4. Stress oxidativo. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: 4-mestilescoletina;
6,7-dihidroxi-4-metilcumarina; Doença Inflamatória Intestinal; Estresse oxidativo; Inflamação intestinal.

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi
Professor Titular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Co-orientadora: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
Professora Adjunta do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi
Professor Titular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Prof. Dr. Marinonio Lopes Cornelio
Professor Livre Docente do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP

Profa. Dra. Tereza Pereira de Souza
Pesquisadora Associada do *Department of Earth and Planetary Sciences of Faculty of Arts and Sciences* – HARVARD

Prof. Dr. Ramon Kaneno
Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Professor Assistente do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Financiamento



Proc. 13/19138-2

(Bolsa de doutorado: Alexandre Tanimoto)

Proc. 11/50824-4

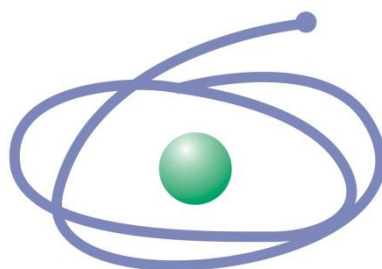
(Bolsa de pós-doutorado: Dra. Aline Witaicenis Fantinati)

Proc. 11/50512-2

(Auxílio à Pesquisa Regular: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi)

Proc. 09/53989-4

(Auxílio à Pesquisa - Programa Equipamentos Multiusuários: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni)



C A P E S

Agradecimentos

Agradeço

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e minha co-orientadora Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza por terem passado seus conhecimentos acadêmicos, científicos e, principalmente, suas histórias de vida através da convivência e de exemplos de conduta;

A todos os co-autores e demais colegas de laboratório pela colaboração científica e técnica para a realização do projeto de doutorado;

À FAPESP e à CAPES pelo auxílio financeiro e pela assessoria científica;

À banca examinadora por disponibilizar seu precioso tempo para colaborar e corrigir este trabalho.

Dedicatória

Esta tese de doutorado é fruto do árduo trabalho direto e indireto de inúmeras pessoas; no entanto, dedico este trabalho a todos os animais que deram suas vidas para que o que chamamos de ciência pudesse avançar um pouco mais.

Sou grato a todas as pessoas que cruzaram meu caminho antes e durante o doutoramento, pois nem eu conseguiria dizer o quão importante o exemplo que cada um ofereceu foi importante para o desenvolvimento do trabalho e para meu amadurecimento. Gostaria muito de poder citar todos os nomes que participaram da minha vida nestes últimos quatro anos, porém corro o enorme risco de me esquecer de vários nomes. Contudo, algumas pessoas merecem destaque pelas enormes colaborações pessoais e científicas que ofereceram.

Entre essas pessoas agradeço aos meus pais, Roberto e Luísa Tanimoto, que continuam a não medir esforços para que seus filhos possam ter as melhores oportunidades da vida, à minha irmã Marcela Tanimoto pela amizade fraterna e aos demais membros da minha família por sempre me mostrarem uma vida simples e feliz. Agradeço também ao meu namorado Wesley Rodrigues Venturin pelo apoio, companhia e imensurável ajuda; e à Júlia, Sílvia, Antônio, Zenaide e aos demais membros das famílias Rodrigues e Venturin que sempre me recebem com muito carinho.

Agradeço, imensamente, aos meus colegas e amigos do laboratório FitoFarmaTec Aline Witaicenis Fantinati, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Juliana Severi, Leonardo Noboru Seito, Adriano Cressoni Araujo, Ana Elisa Valencise Quaglio, Luiz Domingues de Almeida Júnior, Alexandre da Silveira Chagas, Tainan Freitas Salmeron Curimbaba, Lesvi Moya Dalmau, Cristiane Mori, Erika Ferreira Costa, Késsien Regina Sander Oliva, Vinícius Marques Da Cruz, Ellen Cristina Souza de Oliveira, Eduardo Razza, Fernanda Fagali Franchi, Mariana Machado, Patrícia Kubo Fontes, Priscila Helena dos Santos, Ramon César Botigelli, Andressa Carvalho e Raquel Bueno Rodrigues pela companhia e pela ajuda diária.

Sou muito grato aos colegas e amigos da UNESP de São José do Rio Preto Ícaro Putinhon Caruso, Fábio Rogério de Moraes, Hêmily Mutti Ruiz Piva, Gabriela de Campos Araújo, Fernanda Paulin Benzatti, Ana Karla Miranda Prado, Isabela Brunocci, Vitor Brassolatti Machado, Ernesto Tavares Neto, Giovana Cavaglia, Isabella Otonio Lourenço, Pedro Henrique Sobrinho, Paulo Henrique da Silva, Thiago Salem Peçonato Teixeira, Matheus Theodoro Semensatti, Giovani Tanzella, Karoline Sanches, Nayara Nathie Marques, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey, Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio e Prof. Dr. Fernando Alves de Melo por me introduzirem, pacientemente, a um novo mundo científico fascinante!

Gratidão eterna a meus amigos Bianca Barbosa Gregório, Daniel Gavira Cembranelli, Danilo Flávio Moraes Riboli, Evandro Katsui Utsunomia, Camila Mitiko Inohue, Marcos Antenor Storion Júnior, Patrícia Péroloa Dantas, Thaís Bassi Cardoso, Yoko Hayashi, Diego Ferreira Marques, Marina Marques, Carlos Capelasso, Priscila Prado e Neide H. Gottshalk por sempre torcerem pelo meu sucesso profissional e ao mesmo tempo serem corresponsáveis de postergações, que curiosamente deixam-me mais produtivo. Reservo um espaço deste parágrafo para agradecer ao Pedro Proença, pela amizade nova e por saber se expressar de maneira tão bela e didática, pois isso me mostra que há uma conexão entre áreas de conhecimento e entre as diferentes facetas que compõe um ser humano.

Agradeço também ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), ao IBB, ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia, ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), ao IBILCE, à Pós-graduação em Biofísica Molecular e às bibliotecas do IBB e do IBILCE pelo ensino e serviços de qualidade durante esses anos; sou muito grato a todos os docentes, discentes e aos demais funcionários por fazerem parte desta etapa de amadurecimento.

Prólogo

A tese a seguir é um dos frutos do encontro das mentes curiosas, insatisfeitas e pró-ativas dos Professores Doutores Luiz Claudio Di Stasi e Marinônio Lopes Cornelio em uma reunião de coordenadores de pós-graduação da área Ciências Biológicas II. O Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), que na época era Laboratório de Fitomedicamentos, enfrentava uma carência metodológica e de bons parceiros para responder às perguntas que foram geradas com os últimos projetos que, resumiam-se em esclarecer a relação estrutura-atividade de cumarinas para que assim, seus diferentes efeitos farmacológicos pudessem ser explicados com mais clareza. Por outro lado, o também ainda não nascido Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CEMIB) enfrentava dificuldades para encontrar substâncias com efeitos biológicos relevantes para estudar a interação molecular entre essas substâncias e alvos proteicos responsáveis pela saúde e doença dos organismos.

Quando assisti aos primeiros seminários e participei das reuniões dos dois grupos, nasceu em mim um fascínio para conhecer os limites dos novos horizontes que a junção das duas áreas proporcionou. Confesso que ainda parece que este horizonte é infinito e também admito que essa perspectiva ainda me encanta e me assusta; graças a minha ignorância que parece ser maior que os horizontes que estavam diante de mim, resolvi explorar os novos caminhos e aproveitar as oportunidades que estavam bem diante de mim.

Durante as disciplinas do Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular, comecei a me perguntar se seria capaz de terminar o doutoramento, pois o que estava na lousa não só parecia grego, mas era grego! Cheguei ao fim dos 48 meses e não sinto mais pânico ao estudar biofísica.

O desespero perante o imenso desconhecimento, os 10 mil quilômetros percorridos e as incontáveis horas que fiquei confinado dentro de um veículo nesses quatro anos foram ínfimos quando comparados ao crescimento pessoal e

profissional que nasceu da convivência em dois laboratórios de duas diferentes áreas do conhecimento. Na verdade, só tenho a capacidade para reconhecer o progresso realizado, as dificuldades que ainda precisam ser superadas e o valor do trabalho em equipe porque algumas dificuldades existiram.

Durante o período referente ao doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, pude desenvolver diversas atividades junto ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Instituto de Biociências de Botucatu, e ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, que enriqueceram minha formação como doutorando. Dentre elas, listo:

1. Disciplinas cursadas

- 1.1. Laboratório de Didática em Farmacologia;
- 1.2. Tópicos Especiais em Farmacologia: Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória (2 semestres);
- 1.3. Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia (3 semestres);
- 1.4. Prática de Ensino de Farmacologia;
- 1.5. Tópicos Especiais em Farmacologia: Conhecimento para aprimorar a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e biomarcadores;
- 1.6. Tópicos Especiais em Farmacologia: Reproductive Immunopharmacology;
- 1.7. Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina;
- 1.8. Análise de Dados Experimentais;
- 1.9. Tópicos Especiais: Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à Biofísica das Moléculas da Vida: Uma abordagem experimental, teórica e computacional.

2. Artigo publicado no período

- 2.1. COSTA, C.A.R.A.; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A.E.V.; ALMEIDA, L.D.; SEVERI, J.A.; DI STASI, L.C. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation: Experimental evidence. *International Immunopharmacology*, v. 28, p. 459-469, 2015.

3. Participação em eventos

- 3.1. II Semana Acadêmica da Biomedicina e II Semana Acadêmica da Farmácia, 2016.
- 3.2. Evento comemorativo do dia do Biomédico, 2016.
- 3.3. Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa, 2016.
- 3.4. XI FMR Legal: cidadania e meio ambiente, 2016.
- 3.5. XII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, 2016.
- 3.6. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016.
- 3.7. XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2016.
- 3.8. Evento comemorativo do dia do Biomédico, 2015.
- 3.9. I Semana Acadêmica da Biomedicina e I Semana Acadêmica da Farmácia, 2015.
- 3.10. Capacitação da plataforma Thomson Reuters Integrity, 2015.
- 3.11. V Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2015.
- 3.12. XII Congresso de Saúde e Espiritualidade de Botucatu, 2015.
- 3.13. XII Jornada de Plantas Medicinais, 2015.
- 3.14. XIV Workshop da Pós-Graduação, 2015.
- 3.15. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2015.
- 3.16. 2ª Escola de Biofísica Molecular: Ressonância Magnética Nuclear aplicada à Biofísica das moléculas da vida: uma abordagem experimental, teórica e computacional, 2014.

- 3.17. Ciclo de Palestras: Pesquisa e publicação Científica no Século XXI, 2014.
- 3.18. IV Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2014.
- 3.19. XIII Workshop da Pós-Graduação, 2014.
- 3.20. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2014.
- 3.21. I Curso de Inverno em Farmacologia, 2013.
- 3.22. II Simpósio Internacional: Plantas Medicinais em Psiquiatria, 2013.
- 3.23. X Congresso de Saúde e Espiritualidade de Botucatu, 2013.
- 3.24. III Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2013.

4. Trabalhos apresentados em congressos

- 4.1. TANIMOTO, A.; PIVA, H. R.; WITAICENIS, A.; FOSSEY, M. A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L.C. Molecular mechanisms involved in intestinal anti-inflammatory and antioxidant of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin. XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2016. (Painel)
- 4.2. TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L.C. Expressão de Ggt1, Gsr e Nef2l2 após tratamento com 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.3. COSTA, E. F.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da farinha dos frutos de *Musa spp* AAB. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.4. OLIVA, K. R. S.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Avaliação da atividade antioxidante e dos compostos secundários de *Hibiscus esculentus* L.. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).

- 4.5. CURIMBABA, T. F. S.; WITAICENIS, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como potencial protetor da inflamação intestinal. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2016. (Painel e apresentação oral).
- 4.6. MORI, C.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante do fruto verde de *Musa spp* AAA. XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.7. TANIMOTO, A. Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina. V Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2015. (Painel)
- 4.8. TANIMOTO, A.; MORAES, F. R.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L. C. Novel antioxidant mechanisms of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin in intestinal inflammation: involvement of glutathione and glutathione reductase. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2015. (Painel).
- 4.9. TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; SEVERI, J. A.; DI STASI, L. C. Comparação do perfil químico, determinação de polifenóis e análise da atividade antioxidante de extratos de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata*. XII Jornada de Plantas Mediciniais, 2015. (Painel).
- 4.10. MORI, C.; QUAGLIO, A. E. V.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato hidroalcoólico de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). Congresso de Iniciação Científica, 2015. (Painel).
- 4.11. CALABRESI, M. F. F.; MELLO, F. P. F.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C.; MIRANDA, J. R. A. AC biosusceptometry to assess colonic

- motility in rats with ulcerative colitis. IIIVIII Brazilian Physical Society Meeting, 2015. (Painel).
- 4.12. WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Evaluation of molecular markers and therapeutic targets in TNBS-model of intestinal inflammation. The 12th World Congress on Inflammation, 2015, v. 64. p. S145-S145.
- 4.13. TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; SEVERI, J. A.; WITAICENIS, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; QUAGLIO, A. E. V.; STASI, L. C. Avaliação da atividade curativa da *Pfaffia glomerata* na inflamação intestinal. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2014. (Painel).
- 4.14. COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; STASI, L. C. Apresentação oral: ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*): avaliação da atividade adaptogênica e dos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Simpósio de plantas medicinais e nutracêuticos, 2014. (Apresentação oral).
- 4.15. COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; STASI, L. C. Apresentação oral: ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*): avaliação da atividade adaptogênica e dos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Simpósio de plantas medicinais e nutracêuticos, 2014. (Painel).
- 4.16. TANIMOTO, A. Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina. IV Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2013. (Apresentação oral).
- 4.17. WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; FONTES, P. K.; CASTILHO, A.; STASI, L. C. Effect of esculetin in experimental model of Inflammatory Bowel Disease. LATINFARMA, 2013. (Painel)
- 4.18. COSTA, C. A. R. A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; Tanimoto, A.; WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C.

Differential preventive and curative effects of brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-incuded intestinal inflammation. LATINFARMA, 2013. (Apresentação oral).

- 4.19. TANIMOTO, A. Avaliação dos mecanismos de ação antioxidantes envolvidos no efeito anti-inflamatório intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilesculetina. III SIMFAR, 2013. (Apresentação oral)

5. Palestras e minicursos ministrados

- 5.1. Palestra: “Plantas Medicinais” para os cursos de Biomedicina e Farmácia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE, 2016.
- 5.2. Palestra: “Interações Medicamentosas” para os cursos de Biomedicina e Farmácia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE, 2016.
- 5.3. Palestra: “Fosfoetanolamina: essa droga funciona?” na XI FMR Legal, 2016.
- 5.4. Minicurso: “Farmacologia: mitos e verdades” no XIV Workshop da Pós-graduação, 2015.
- 5.5. Palestra: “Desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas medicinais” na I Semana Acadêmica da Biomedicina e I Semana Acadêmica da Farmácia, 2015.
- 5.6. Aula Prática: “Produtos naturais: métodos de estudo” para o curso de Biomedicina da UNIP Bauru, 2015.
- 5.7. Minicurso: “Métodos de seleção de Plantas Medicinais para ensaios biológicos” na XII Jornada de Plantas Medicinais, 2015.

6. Atividades didáticas

- 6.1. Estágio docência na disciplina Farmacodinâmica junto ao Curso de Ciências Biomédicas do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (30 horas);

- 6.2. Estágio docência na disciplina Farmacologia junto ao curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (30 horas);
- 6.3. Professor Assistente de Farmacologia I do curso de Fisioterapia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas);
- 6.4. Professor Assistente de Farmacologia II do curso de Fisioterapia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas);
- 6.5. Professor Assistente de Bioquímica do curso de Educação Física da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas).

7. Prêmios

- 7.1. Menção Honrosa, XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. TANIMOTO, A.; COSTA, C.A.R.A. SEVERI, J.A.; WITAICENIS, A.; ALMEIDA JÚNIOR, L.D.; CHAGAS, A.S.; QUAGLIO, A.E.V.; DI STASI, L.C. Avaliação da atividade curativa de *Pfaffia glomerata* na inflamação intestinal. 2014.
- 7.2. Menção Honrosa, XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. TANIMOTO, A.; MORAES, F.R.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F.P.; DI STASI, L.C. Novel antioxidante mechanisms of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin in intestinal inflammation: involvement of glutathione and glutathione reductase. 2015.
- 7.3. Menção Honrosa, XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. TANIMOTO, A.; PIVA, H.M.R.P.; FANTINATI, A.W.; FOSSEY, M.A.; SOUZA, F.P.; DI STASI, L.C. Molecular mechanisms involved in intestinal anti-inflammatory and antioxidant effects of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin. 2016.

RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal é uma doença crônica, cuja patogênese envolve uma interação complexa de fatores múltiplos. Entre os novos compostos estudados para o tratamento da inflamação intestinal, a 4-metilesculetina (4-ME) apresentou potentes atividades antioxidante e anti-inflamatória intestinal, porém estudos mais detalhados sobre o mecanismo de ação das cumarinas são necessários. Neste trabalho, foram verificados que os tratamentos com a 4-ME preveniram a depleção dos níveis de glutatona total, diminuíram a atividade de mieloperoxidase e glutatona peroxidase (GPX), preveniram a diminuição da atividade de glutatona redutase (GSR) e glutatona S-transferase. Além disso, os tratamentos com a 4-ME preveniram a redução da abundância relativa de RNAm de γ -glutamyl transferase 1, glutatona redutase e fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 causada pela inflamação intestinal. A investigação da interação entre a 4-ME e GSR, GPX ou proteína inibitória κ B (I κ B) mostrou que a 4-ME interage com a GSR e I κ B por um processo predominantemente estático, enquanto a interação entre a 4-ME e GPX ocorre por um processo dinâmico. As forças de van der Waals e as pontes de hidrogênio possuem papel fundamental na formação e na estabilização do complexo GSR/4-ME, por outro lado interações hidrofóbicas determinam as interações da 4-ME com a GPX e a I κ B. Adicionalmente, os resultados indicam que o grupo metila do carbono C-4 é o segundo epítipo mais próximo na interação GSR/4-ME. Portanto, esses dados mostram claramente que a 4-ME não é um simples sequestrador de radicais livres, mas um composto natural com mecanismos de ação específicos que envolvem a modulação da atividade enzimática e da expressão de genes chave no sistema antioxidante.

Palavras-chave: 4-metilesculetina; 6,7-dihidroxi 4-metilcumarina; Doença Inflamatória Intestinal; Estresse oxidativo; Inflamação intestinal.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disorder; its pathogenesis involves a complex interplay of multiple factors. Among new candidates to treat intestinal inflammation, 4-methylscutletin (4-ME) showed potent intestinal anti-inflammatory and antioxidant activity, however detailed research on the mechanisms of action of coumarins are needed. In this work, treatments with 4-ME prevented depletion of total glutathione content, decreased myeloperoxidase and glutathione peroxidase (GPX) enzyme activities, prevented diminishment of activity of glutathione reductase (GSR) and glutathione S-transferase. Furthermore, treatments with 4-ME prevented mRNA abundance downregulation caused by intestinal inflammation of γ - glutamyl transferase 1, glutathione reductase and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. Investigation of interactions between 4-ME and GSR, GPX or inhibitory protein κ B (I κ B) showed 4-ME interacts with GSR and I κ B through a static quenching mechanism, GPX/4-ME interactions occurs by a dynamic quenching mechanism. Van der Waal forces and hydrogen bonds are essential for formation and stabilization of GSR/4-ME complex, on the other hand hydrophobic interactions are responsible for interactions between 4-ME and GPX or I κ B. Additionally, results indicate C-4 methyl group is the second most buried epitope on the GSR/4-ME interaction. Therefore, these data clearly show 4-ME is not a simple free radical scavenger, but a natural compound with specific mechanisms of action involving modulation of enzyme activities and gene expression with key roles on antioxidant system.

Keywords: 4-methylscutletin; 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin; Inflammatory Bowel Disease; Oxidative stress; Intestinal Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

τ_0	Tempo de vida médio de emissão da fluorescência
[L]	Concentração de ligante
[L _f]	Concentração de ligante livre
[L _t]	Concentração de ligante total
[P]	Concentração de proteína
4-ME	6,7-dihidroxi-4-metilcumarina ou 4-metilesculetina
Actb	Gene da β -actina
ANOVA	Análise de variância de uma via
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-benzeno
COX	Ciclo-oxigenase
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
F	Intensidade de fluorescência na presença de ligante
F ₀	Intensidade de fluorescência na ausência de ligante
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
Gapdh	Gene do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGT	Gama-glutamil transferase (proteína)
Ggt1	Gene da γ -glutamiltransferase 1
GPX	Glutaciona peroxidase
Gpx1	Gene da glutaciona peroxidase 1
Gpx2	Gene da glutaciona peroxidase 2
GSH	Glutaciona reduzida
GSR	Glutaciona redutase
Gsr	Gene da glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
Gstm1	Gene da glutaciona S-transferase μ 1
Gstp1	Gene da glutaciona S-transferase π 1
Gstt1	Gene da glutaciona S-transferase θ 1
Hprt	Gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Proteína inibitória κ B
IL	Interleucina
I _{off}	Intensidade do sinal do espectro sem a saturação da proteína

I_{on}	Intensidade do sinal do espectro da proteína saturada
K_b	Constante de associação
K_D	Constante de dissociação
K_q	Constante de supressão da biomolécula
k_{sat}	Constante de saturação
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
LOX	Lipo-oxigenase
MPO	Mieloperoxidase
Mpo	Gene da mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nfe12	Gene do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NF- κ B	Fator nuclear κ B
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PDB	Protein Data Bank
RCU	Retocolite ulcerativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
STD-AF	Fator de amplificação do STD
STD-RMN	Diferença de transferência de saturação por RMN
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilenediamina
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 SUBSTÂNCIA DE ESTUDO, PROTEÍNAS E REAGENTES	6
3.2 ANIMAIS	6
ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	7
3.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO INTESTINAL INDUZIDO POR TNBS EM RATOS E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA 4-ME	7
3.3.1 <i>Avaliação do processo inflamatório intestinal</i>	8
3.3.1.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase	8
3.3.1.2 Determinação do conteúdo total de glutathiona	9
3.3.1.3 Determinação da atividade de glutathiona redutase	9
3.3.1.4 Determinação da atividade de glutathiona peroxidase	10
3.3.1.5 Determinação da atividade de glutathiona S-transferase	10
3.3.1.6 Determinação da atividade de superóxido dismutase	11
3.3.1.7 Determinação da atividade de catalase	11
3.3.1.8 Determinação da atividade de ciclo-oxigenase	11
3.3.1.9 Determinação da atividade de lipo-oxigenase	12
3.3.1.10 Expressão gênica relativa por PCR em tempo real	12
<i>Estudos in vitro</i>	16
3.3.2 <i>Investigação da formação do complexo proteína/ligante</i>	16
3.3.2.1 Espectroscopia de fluorescência	16
3.3.2.2 Medidas espectrofotométricas e equipamentos	16
3.3.2.3 Experimento de supressão de fluorescência para verificação da interação proteína-ligante	17
3.3.2.4 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear	19
3.3.2.5 <i>Docking</i> Molecular do complexo GSR/4-metilesculetina	21
3.3.3 <i>Análise estatística e análise dos resultados</i>	22

3.3.3.1	Processo inflamatório intestinal	22
3.3.3.2	Expressão gênica	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA E MACROSCÓPICA	23
4.1.1	<i>Análises bioquímicas</i>	<i>24</i>
4.1.2	<i>Análises de biologia molecular</i>	<i>33</i>
4.2	INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA/LIGANTE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	40
4.2.1	<i>Investigação da formação do complexo proteína/ligante por espectroscopia de fluorescência</i>	<i>41</i>
4.2.2	<i>Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear.....</i>	<i>48</i>
4.2.3	<i>Investigação da formação do complexo proteína/ligante por docking computacional.....</i>	<i>50</i>
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7	Anexos.....	62
7.1	ANEXO 1	62
7.2	ANEXO 2	63

1 INTRODUÇÃO

As duas formas principais da Doença Inflamatória Intestinal (DII), a Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), são caracterizadas por um processo inflamatório idiopático, crônico e recidivante do trato gastrointestinal, cuja patogênese envolve uma complexa interação de múltiplos fatores (Fiocchi, 2012; Di Stasi et al., 2015; Danese et al., 2016).

Até o momento, a etiologia da DII não é completamente compreendida e muitas teorias que envolvem desde infecções a mecanismos psicossomáticos, sociais, metabólicos, vasculares, genéticos, alérgicos ou autoimunes estão em discussão (Xavier e Podolsky, 2007; Fiocchi, 2013; Vezza et al., 2016). Apesar da etiologia não ser totalmente compreendida, há um consenso de que a DII ocorre em indivíduos com predisposição genética que exibem uma disfunção na barreira epitelial (Vezza et al., 2016), a qual pode ser afetada pelo estresse oxidativo e liberação excessiva de radicais livres formados (Pavlick et al., 2002; Moura et al., 2015; Souza e Fiocchi, 2015).

De fato, há inúmeras evidências clínicas e experimentais de que a inflamação intestinal crônica está diretamente associada a uma altíssima produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e diminuição de antioxidantes endógenos (Biasi et al., 2011; Zhu e Li, 2012), envolvendo a alteração da atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases, redutases e redoxinas (Sánchez de Medina et al., 2004; Zhu e Li, 2012; Biasi et al., 2013).

Um dos fatores mais agravantes da DII é que não existe uma cura definitiva, nem mesmo por processos cirúrgicos (Fiocchi, 2012). Portanto, os principais objetivos dos tratamentos farmacológicos disponíveis são induzir a remissão dos sintomas e mantê-la. A fim de alcançar os dois objetivos citados, aminossalicilatos (sulfassalazina e

mesalazina), corticosteroides (prednisona e prednisolona), imunomoduladores (azatioprina, metotrexato e ciclosporina) e anticorpos monoclonais (infliximab e adalimumab) são utilizados para interferir em vários estágios da cascata inflamatória (Bernstein, 2015). Contudo, o uso crônico dos tratamentos citados é limitado devido aos possíveis efeitos adversos graves e elevado custo (Siegel, 2011).

A literatura relata que aproximadamente 45%, 55%, 15% e 10% dos pacientes apresentaram efeitos adversos após início do tratamento com aminossalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e anticorpos monoclonais, respectivamente. Entre os efeitos adversos mais frequentes, podemos citar dor abdominal, náusea, vômitos, anorexia, cefaleia, hemólise, infertilidade masculina, agranulocitose, hepatite, pancreatite (Moum, 2008), aumento do apetite e do peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, osteonecrose, retardo de crescimento, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, infecções, miopatia, catarata, atrofia de pele, estrias, esquimose, esteatose, diabete, hipertensão, glaucoma, *rash* cutâneo, diarreia e depressão da medula óssea (Moum, 2008; Siegel, 2011; Dalal e Cohen, 2015). Além disso, cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento com corticosteroides (Siegel, 2011) com alto risco do desenvolvimento de dependência de corticosteroides e, 51% dos pacientes pode ter o tratamento com anticorpos anti-TNF α descontinuado por falta de resposta primária ou por perda secundária de resposta (Dalal e Cohen, 2015).

Desta maneira, há uma demanda de novas estratégias terapêuticas que sejam efetivas e mais seguras para a DII. Entre os novos compostos estudados para o tratamento de inflamação intestinal experimental, a utilização de compostos naturais antioxidantes poderia ser útil para minimizar os sinais e sintomas da DII (Luchini et al., 2008).

Diversos estudos propõe que os efeitos benéficos observados com o consumo de produtos naturais provêm da atividade antioxidante de alguns compostos, como os flavonoides (Medina et al., 1996; Sánchez de Medina et al., 2004; Romier et al., 2009) e as cumarinas e seus derivados (Di Stasi et al., 2004; Luchini et al., 2008; Witaicenis et al., 2010, 2012, 2013).

Em estudos anteriores, a 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina ou 4-metilesculetina (4-ME) produziu efeito anti-inflamatório intestinal pela inibição da atividade de mieloperoxidase (MPO), por evitar a depleção dos níveis de glutathione total, pela redução do conteúdo de malondialdeído *in vivo* e pela inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-8, IL-2 e interferon gama (IFN- γ) *in vitro* (Witaicenis et al., 2012), mostrando-se um interessante candidato para o tratamento da DII. De fato, a 4-ME (5 mg/Kg) apresentou atividade antioxidante e anti-inflamatória intestinal numa dose dez vezes menor que a da sulfassalazina (50 mg/Kg) e numa dose 2,5 vezes maior que a da prednisolona (2 mg/Kg) (Witaicenis et al., 2012).

Recentemente, as atividades antioxidante e anti-inflamatória da 4-ME foram atribuídas à presença do grupo metila no carbono C-4 (Witaicenis et al., 2012), visto que a 4-ME foi capaz de induzir a remissão do quadro inflamatório e prevenir recidivas induzidas por múltiplas administrações de TNBS e a esculetina, um derivado cumarínico que difere da 4-ME apenas pela ausência do grupo metila em sua estrutura (Figura 1), foi apenas capaz de induzir a remissão da inflamação (Witaicenis et al., 2012). Além disso, derivados cumarínicos que contêm *o*-dihidroxiilação e metilação em sua estrutura demonstraram atividade antioxidante maior que outros derivados cumarínicos (Hoult e Payá, 1996; Witaicenis et al., 2014), corroborando com os efeitos da 4-ME encontrados pelo nosso grupo de pesquisa. Porém estudos mais detalhados

sobre o mecanismo de ação da 4-ME que verificam a relação estrutura-atividade desta molécula são necessários.

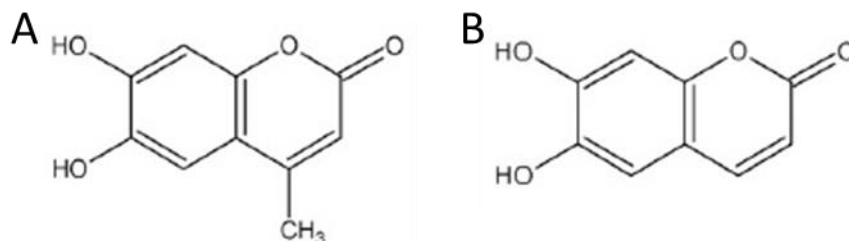


Figura 1: Fórmulas estruturais da (A) 4-metilesculetina e (B) esculetina.

No processo inflamatório intestinal, o estresse oxidativo é principalmente modulado pelas enzimas relacionadas à glutatona, como a glutatona redutase (GSR), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S-transferase (GST); fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe12 ou Nrf2), γ -glutamyl transferase (GGT) e MPO (Esworthy et al., 2001; Kruidenier e Verspaget, 2002; Khor et al., 2006). O estresse oxidativo e diversos mediadores inflamatórios estimulam a degradação da proteína inibitória κ B (I κ B) e aumentam a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B), que estimulará a produção de mediadores pró-inflamatórios que resultarão em dano tecidual e maior liberação de radicais livres; caracterizando um processo pró-oxidante e pró-inflamatório que se autoalimenta (Figura 2).

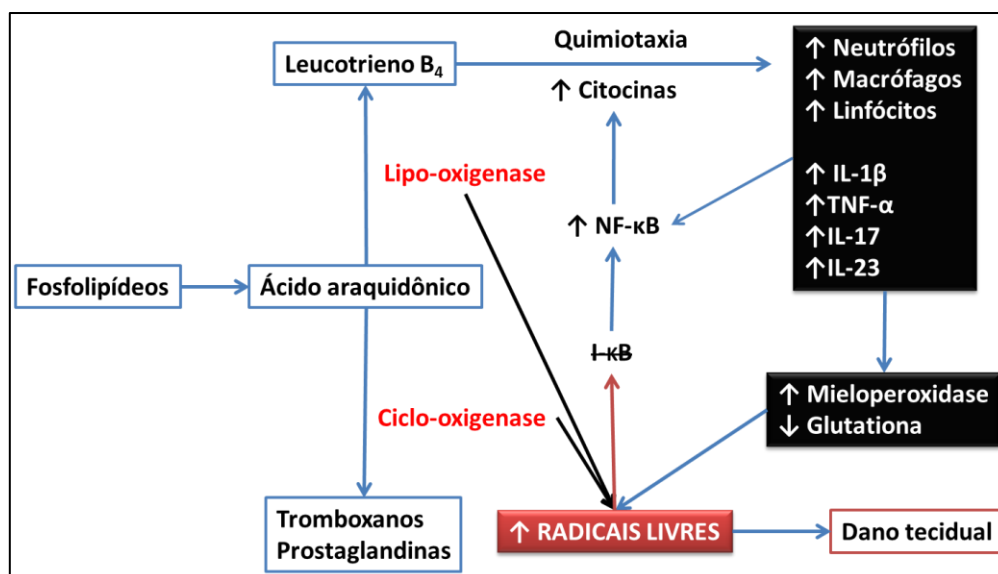


Figura 2: Esquema que ilustra, resumidamente, a interação entre mediadores inflamatórios e oxidantes na inflamação intestinal.

Baseado nas informações apresentadas, estudos são necessários para auxiliar a compreensão do mecanismo de ação de novos candidatos para o tratamento da DII. A 4-ME já demonstrou potente atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS (Witaicenis et al., 2010, 2012) e por sulfato de dextrano sódico (dados não publicados, FAPESP Proc. 13/01297-7), porém poucos estudos sobre seus mecanismos moleculares foram realizados. A elucidação dos mecanismos moleculares de ação da 4-ME e de suas interações intermoleculares pode ser a chave para o entendimento de diversos processos biológicos no organismo (Mayer e James, 2004), além do mais, modelos animais são essenciais para elucidar a patogênese da DII (Danese et al., 2016).

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos identificar os mecanismos de ação antioxidantes que participam da resposta anti-inflamatória intestinal produzida pela 4-ME no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos e caracterizar por