

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS BOTUCATU**

Avaliação dos efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina e de diferentes associações com a sulfassalazina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.

Ana Carolina Luchini

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Farmacologia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

Botucatu/SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Luchini, Ana Carolina.

Avaliação dos efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina e de diferentes associações com a sulfassalazina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos / Ana Carolina Luchini. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Assunto CAPES: 2100000

1. Colite - Tratamento - Estudos experimentais 2. Farmacologia

CDD615.1.

Palavras-chave: Colite; Cumarina; Doença inflamatória intestinal; 4-Hidroxi-cumarina; TNBS.

Para aprender é preciso passar por situações emocionantes. Para isso é preciso tirar as pessoas de suas rotinas mentais e físicas. Não aprendemos nada dentro de nossas "zonas de conforto", sentados todos os dias no mesmo lugar, na mesma mesa, fazendo sempre a mesma coisa, onde tudo é previsível. Na "zona de aprendizado" há uma dose de desconforto e as emoções são intensificadas.

Ernest Shackleton

Dedicatória

A DEUS

*Obrigado pelas dádivas e pelas
oportunidades de crescimento concedidas
a cada dia.*

*Por seres o colo que me consola nos
momentos mais difíceis.*

*Por seres a luz que me guia quando
parece não haver saída.*

*Pelos inúmeros amigos que tens colocado
em meu caminho.*

*E, sobretudo, por seres o amor de todos
os que me apóiam para chegar até aqui.*

*Aos meus pais, Valdete e João Roberto e
ao meu irmão João Daniel*

*Pelo apoio e incentivos constantes para a
realização dos meus sonhos.*

*Pela orientação espiritual e pelos
ensinamentos, que tem sido essências para
guiar-me ao longo de minha caminhada.
Por tudo que vocês representam na minha
vida e que não é possível expressar em
palavras.*

Muito Obrigada!

Ao meu futuro marido Justulin

*Por estar sempre ao meu lado nos momentos importantes da minha vida.
Por sempre me incentivar e me apoiar nas minhas decisões.*

Ao professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi

*Obrigado pela oportunidade de crescer
profissionalmente e pessoalmente.*

*“O Mestre se for verdadeiramente
sábio, não vos convidará a entrar na
mansão de seu saber, mas vos conduzirá
antes ao luminar de vossa própria
mente.”*

(Autor desconhecido)

Aos amigos

*"Amigos são pessoas comuns até os encontrarmos.
Tornam-se importantes pelos momentos divididos,
pelo tempo compartilhado, pelos sorrisos, pelos
dias comuns e especiais, pelas alegrias vividas a
cada dia, e pelas lágrimas compreendidas e até
amenizadas..."*

E amigos são tão preciosos, tão necessários!

Preenchem os espaços, enfeitam, ensinam.

*São inimigos da solidão, com seu barulho, seus
passos e abraços.*

*Tornam-nos seres mais felizes pelo simples fato de
existirem e serem nossos amigos."*

Agradecimentos

Aos meus companheiros de trabalho Patrícia, Ana, Aline, Leonardo, Andréia, Tarina, Silvia e Viviane, pela amizade, carinho, mão-de-obra e conhecimentos.

À Glória, pelos caminhos apontados, principalmente no final desta etapa.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cristina, Janete, Luis, Paulão, pela amizade e auxílio.

Ao pessoal da Pós Graduação, Luciene, Maria Helena, Sérgio e Erivaldo pela competência e simpatia.

À Selma Maria de Jesus pela conferência das referências bibliográficas.

À FAPESP pela bolsa de apoio financeiro (Processo: 06/55209-8).

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para esta realização.

Muito obrigada!

Atividades realizadas durante o meu doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas área de concentração Farmacologia.

1. Disciplinas Cursadas

2^o semestre 2006:

1) Tópicos em Atualização em Ciências

Número de créditos: 01- 15 horas/aula

Professor responsável: Prof. Dr André Sampaio Pupo

Conceito: A

2) Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada (aluna especial, pelo curso de pós graduação em Biologia geral e aplicada).

Número de créditos: 02-30 horas/aula

Professor responsável: Prof. Dr Luiz Claudio Di Stasi

Conceito: A

1^o semestre 2007:

Bioquímica Aplicada

Número de créditos: 03 – 45 horas/aula.

Professor responsável: Prof. Dra. Ethel Lourenzi B. Novelli

Conceito: A

Tópicos em Atualização em Ciências

Número de créditos: 01- 15 horas/aula

Professor responsável: Prof. Dr André Sampaio Pupo

Conceito: A

2^o semestre 2007:

5) Tópicos em Atualização em Ciências

Número de créditos: 01- 15 horas/aula

Professor responsável: Prof. Dr Ciro Moraes Barros

Conceito: A

Métodos Aplicados à Avaliação Toxicológica

Número de créditos: 04-60 horas/aula

Professor responsável: Prof. Dr Antonio Francisco Godinho

Conceito: A

Métodos de Validação de Novos Fármacos e Tópicos de Atualização em Plantas Medicinais

Número de créditos: 04-60 horas/aula.

Professor responsável: Prof. Dra Clélia Akiko Hiruma Lima
Conceito: A

1^o semestre 2008:

8) Tópicos em Atualização em Ciências
Número de créditos: 01- 15 horas/aula
Professor responsável: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
Conceito: A

Classificação de Receptores Farmacológicos
Número de créditos: 04-60 horas/aula
Professor responsável: Prof. Dr. André Sampaio Pupo
Conceito: A

2. Aulas e Cursos Ministrados

1) Aula expositiva: Linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório de fitomedicamentos ministrada aos alunos do 4º ano de Ciências Biológicas – Licenciatura, na disciplina de Farmacologia, no dia 11 de novembro de 2006.

2) Aula expositiva: Linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório de fitomedicamentos ministrada aos alunos do 3º ano de Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado, na disciplina de Farmacologia, no dia 19 de abril de 2007.

3) Ministrou curso intitulado: Métodos de estudo fitoquímico e farmacológico de plantas medicinais, juntamente com Aline Witaicenis, Patricia Rodrigues Orsi e Silvia Helena Cestari, com 8 horas de duração, durante o VI Workshop da Pós-graduação em Ciências Biológicas: “Ciência com consciência” nos dias 30,31 de março e 1 de abril.

4) Ministrou o curso “A importância do estudo de plantas medicinais”, juntamente com Aline Witaicenis, Patricia Rodrigues Orsi e Silvia Helena Cestari, durante o VII Workshop da Pós-Graduação em Ciências Biológicas, realizado nos dias 06 e 07 de junho de 2008.

3. Participação em Eventos Científicos

1) Participou do XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, no Bahia Othon Palace Hotel, no período de 19 a 22 de setembro de 2006-Salvador Bahia, sendo co-autora no resumo apresentado: Efeito do extrato bruto de folhas de *Cordia curassavica* sobre a liberação de histamina de mastócitos de diferentes animais.

2) Participou do 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, no período de 18 a 21 de outubro de 2006 em Ribeirão Preto, sendo co-autora no resumo apresentado: Efeito de *Cordia curassavica* sobre a liberação de histamina de mastócitos em diferentes espécies animais.

- 3) Participou do 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, no período de 18 a 21 de outubro de 2006 em Ribeirão Preto, sendo autora no resumo apresentado: Efeito de inibidores da secreção de mastócitos e sulfassalazina sobre colite ulcerativa (C.U.) com recidiva em Ratos Wistar.
- 4) Participou do I Encontro Nacional sobre ética na experimentação animal, realizado pelo Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, no período de 25 a 27 de outubro de 2006.
- 5) Participou do Workshop Pesquisa Clínica na Faculdade de Medicina de Botucatu, realizado no dia 05 de setembro de 2007.
- 6) Participou da oficina Workshop Pesquisa Clínica na Faculdade de Medicina de Botucatu, realizado no dia 05 de setembro de 2007.
- 7) Participou do 9 Seminário sobre Ciências Básicas em Homeopatia realizado na Fazenda Experimental Lageado, FEA-Unesp, nos dias 28 e 29 de setembro de 2007.
- 8) Realizou curso de Extensão universitária em Toxicologia Aplicada, no Instituto de Biociências, IBB/UNESP, Botucatu, realizado no período de 11 a 16 de fevereiro de 2008.
- 9) Participou do VII Workshop da Pós- Graduação em Ciências Biológicas, realizado na cidade de Botucatu-SP, no período de 24 a 26 de abril de 2008.
- 10) Participou do VIII Workshop de plantas medicinais de Botucatu, realizado nos dias 06 e 07 de junho de 2008.
- 11) Participou do mini-curso “Alimentos funcionais e doenças crônicas” durante o VIII Workshop de plantas medicinais de Botucatu, realizado nos dias 06 e 07 de junho de 2008.
- 12) Participação no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 13) Participação no X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 14) Participação no 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental que será realizado nos dias 16 a 19 de Outubro de 2008.
- 15) Participação no Mini-curso “Produtos Naturais e doenças do trato gastrointestinal”, realizado no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

16) Participação no Mini-curso “Modelos Experimentais de Inflamação alérgica voltados para a triagem modo de ação de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios e antiasmáticos”, realizado no 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental que será realizado nos dias 16 a 19 de Outubro de 2008.

4. Colaboração em outros projetos de pesquisa

- 1) Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de escoparona no modelo crônico de colite ulcerativa;
- 2) Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de esculetina e 4-metil-esculetina no modelo crônico de colite ulcerativa;
- 3) Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de cumarina e 4-hidroxi-cumarina no modelo crônico de colite ulcerativa;
- 4) Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de dafnetina no modelo crônico de colite ulcerativa;
- 5) Efeitos sinérgicos da pepalantina, uma isocumarina isolada dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*, sobre a atividade da sulfassalazina no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos;
- 6) Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia* DC na prevenção e tratamento de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.

5. Artigos publicados

- 1) **LUCHINI, A. C.**, RODRIGUES-ORSI, P., CESTARI, S. H., SEITO, L. N., WITAICENIS, A., PELLIZZON, C. H., DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. , v.31(7), p.1343-1350, 2008.
- 2) **LUCHINI, A. C.**, OLIVEIRA, D.M.C., DI STASI, L. C., PELLIZZON, C. H., GOMES, J. C. Relationship between mast cells and the ulcerative colitis with relapse induced by trinitrobenzene sulphononic acid (TNBS) in Wistar rats. **Mediators of Inflammation**, 2009, in press.

6. Estágio de Docência

- 1) Realizou estágio de docência na disciplina de Farmacodinâmica lecionada aos alunos de Biomedicina da Unesp de Botucatu durante o primeiro semestre de 2008.

7. Trabalhos apresentados em Congressos

- 1) Evaluation of esculetin and 4-methyl-esculetin in acute and chronic models of rat colitis. Witaicenis, A.; Cestari, S.H.; Orsi, P.R.; **Luchini, A.C.**; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 2) Protective effects of scoparone (6,7 – dimethoxycoumarin) in acute and chronic experimental models of rat colitis. Witaicenis, A.; Cestari, S.H.; Orsi, P.R.; **Luchini, A.C.**; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 3) Preventative effects of natural coumarins fraxetin, scopoletin, esculin and 4-methylumbelliferone on trinitrobenzenesulphonic (TNBS) rat colitis model. Seito, L.N.; Witaicenis, A.; **Luchini, A.C.**; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4) Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin on acute and chronic experimental rat colitis model. **Luchini, A.C.**; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Seito, L.N.; Witaicenis, A.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 5) Paepalantine synergistic effect on sulfasalazine intestinal anti-inflammatory activity in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Witaicenis, A.; **Luchini, A.C.**; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 6) Intestinal anti-inflammatory activity of Daphnetin (7,8- dihydroxycoumarin) on acute and chronic experimental model of rat colitis. Orsi, P.R.; **Luchini, A.C.**; Cestari, S.H.; Witaicenis, A.; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 7) Synergic effects of the coumarin and 4-hydroxycoumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine in the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) rat colitis model. **Luchini, A.C.**; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Seito, L.N.; Witaicenis, A.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congresso of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 8) Synergic effect of the coumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. **Luchini AC**, Cestari SH, Rodrigues-Orsi P, Seito L.N, Witaicenis A, Di Stasi L. 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Águas de Lindóia-SP, de 16 a 19 de Outubro de 2008.

8. Estágio no Exterior

Realizou estágio na Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada, Campus Universitario de La Cartuja, Granada-Espanha, do dia 28 de fevereiro ao dia 31 de março de 2009, sob orientação do Professor Dr. Júlio Gálvez.

Neste estágio, foram estudados os efeitos das cumarinas (cumarina, 4-hidroxi-cumarina, esculetina e 4-metilesculetina) em cultivos celulares, com o objetivo de verificar se estas cumarinas diminuem a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo inflamatório intestinal.

9. Resumos enviados para 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia

1) A comparative study of esculetin, 4-methyl-esculetin, prednisolone and sulfasalazine in acute model of rats colitis. Witaicenis, A.; Seito, L.N.; Orsi, P.R.; **Luchini, A.C.**; Justulin Jr, L.A.; Felisbino, S.; Di Stasi, L.C., que será apresentado no 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, de 8 a 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal.

2) *In vitro* effects of esculetin and 4-methyl-esculetin on inflammatory cytokine secretion. Witaicenis, A.; Seito, L.N.; **Luchini, A.C.**; Rodriguez-Cabeza, M., Comalada, M.; Di Stasi, L.C.; Gálvez, J., que será apresentado no 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, de 8 a 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal.

Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
Capítulo1:	
Introdução.....	01
Capítulo2:	
Caracterização da Doença Inflamatória Intestinal (DII).....	06
1. Aspectos Gerais.....	06
1.1. Epidemiologia.....	07
1.2. Etiologia.....	08
1.2.1. Fatores genéticos.....	08
1.2.2. Fatores Ambientais.....	09
1.2.3. Fatores Imunológicos.....	10
2.Tratamento.....	11
Capítulo 3:	
Atividade Antiinflamatória Intestinal da Cumarina e da 4-hidroxi-cumarina no modelo de colite induzida por Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.....	18
1. Artigo.....	19
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Cultivos Celulares.....	26
2.1.1. Célula de adenocarcinoma de cólon humano (Caco2).....	26
2.1.2. 2.2.2 Macrófago de camundongo (RAW 264.7.).....	27
2.1.3. Linfócito de baço (cultivo primário).....	27
2.2. Viabilidade celular.....	27
2.2.1. Caco2 e RAW 264.7.....	27
2.2.2. Linfócitos de baço.....	28
2.3. Determinação da secreção de citocinas Pró-inflamatórias.....	28
2.3.1. Determinação da secreção de IL-8 pela Caco2.....	28
2.3.2. Determinação da secreção de IL-1 β pela RAW 264.7.....	28
2.3.3. Determinação da secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos.....	29
3. Resultados.....	29
3.1. Efeitos da cumarina e de seu derivado 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias.....	29
3.1.1. Efeitos da Cumarina e 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IL-8 pela Caco2.....	29
3.1.2. Efeitos da Cumarina e 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IL-1 β pela RAW 264.7.....	30
3.1.3. Efeitos da Cumarina e 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos.....	32
Capítulo 4:	
Metodologia e resultados das associações da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina na colite induzida por TNBS em ratos.....	34
1. Material e Métodos.....	37
1.1. Animais.....	37
1.2. Compostos-testes e desenho experimental.....	37
1.2.1. Avaliação dos efeitos da associação da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina na fase aguda do processo inflamatório intestinal.....	38
1.2.2. Efeitos da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal.....	39
1.3. Estudos da atividade antiinflamatória intestinal <i>in vivo</i>	40
1.4. Análise estatística.....	41
2. Resultados.....	42
2.1. Fase aguda do processo Inflamatório Intestinal.....	42
2.1.1. Parâmetros macroscópicos da lesão e clínicos gerais.....	42

2.1.1.1.	Avaliação Macroscópica da lesão.....	42
2.1.1.2.	Relação peso/comprimento colônico.....	42
2.1.1.3.	Incidência de diarreia.....	43
2.1.1.4.	Incidência de aderência.....	43
2.1.1.5.	Avaliação do peso corpóreo e do consumo de alimento.....	45
2.1.2.	Parâmetros Bioquímicos.....	48
2.1.2.1.	Conteúdo de glutatona (GSH) no cólon.....	48
2.1.2.2.	Atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon.....	50
2.1.2.3.	Atividade da fosfatase alcalina (FA) no cólon.....	52
2.1.3.	Análise microscópica do cólon.....	54
2.2.	Fase crônica do processo Inflamatório Intestinal com recidiva.....	57
2.2.1.	Parâmetros macroscópicos e clínicos gerais.....	57
2.2.1.1.	Avaliação Macroscópica da lesão.....	57
2.2.1.2.	Relação peso/comprimento colônico.....	58
2.2.1.3.	Incidência de diarreia.....	58
2.2.1.4.	Incidência de aderência.....	59
2.2.1.5.	Avaliação do peso corpóreo e do consumo de alimento.....	61
2.2.2.	Parâmetros Bioquímicos.....	68
2.2.2.1.	Conteúdo de glutatona (GSH) no cólon.....	68
2.2.2.2.	Atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon.....	70
2.2.2.3.	Atividade da fosfatase alcalina (FA) no cólon.....	72
2.2.2.4.	Atividade da malonildialdeído (MDA) no cólon.....	74
2.2.3.	Análise microscópica do cólon.....	76
Capítulo 5: Discussão e conclusão.....		85
1. Discussão.....		85
2. Conclusão.....		96
Capítulo 6:		
Referência.....		97

As cumarinas representam uma importante classe de compostos fenólicos com inúmeras propriedades farmacológicas que incluem inibição da peroxidação lipídica, da geração de ânion superóxido dependente de neutrófilos, da citotoxicidade induzida por hidroperóxido de ácido linoleico, da atividade de lipooxigenases e ciclooxigenases, além de agirem como agentes imunossupressores e antiinflamatórios. Todas estas propriedades são essenciais para que um produto seja potencialmente ativo para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII). A sulfassalazina (primeira opção terapêutica no tratamento das DII) possui vários efeitos colaterais, especialmente quando usada em altas doses ou em períodos longos de tratamento. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se cumarina e 4-hidroxi-cumarina possuem efeitos preventivos e/ou curativos no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos e também se as associações de cumarina ou 4-hidroxi-cumarina com doses menores de sulfassalazina produzem efeitos antiinflamatórios com menor incidência de efeitos colaterais decorrentes da administração da sulfassalazina. Além disso, foram feitos estudos complementares para verificar se tais cumarinas modulam a produção de citocinas próinflamatórias em cultivos celulares *in vitro* e *ex vivo*. Este estudo testou a atividade antiinflamatória dos compostos-testes cumarina (2,5 a 50mg/Kg) e 4-hidroxycumarina (5 a 50mg/Kg) e das associações de cumarina com a sulfassalazina (C5+S5; C5+S15 e C5+S25) ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina (4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25) em duas condições experimentais distintas: quando a mucosa colônica está intacta (efeito preventivo); quando a mucosa colônica está afetada por um processo inflamatório intestinal (efeito curativo) assim como preventivo da recidiva do processo inflamatório, similar ao que ocorre com a colite em humanos. O dano colônico foi avaliado macroscopicamente, bioquimicamente e histologicamente. Para o estudo *in vitro* foram utilizadas as células Caco2 e RAW 264.7 e para o estudo *ex vivo* foi utilizado linfócitos de camundongo Balb’c. Os compostos-testes cumarina e 4-hidroxi-cumarina, nas doses de 5 e 25mg/Kg, previnem parcialmente o dano colônico induzido por TNBS/etanol em ratos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica com recidiva. Este efeito pode estar associado a uma melhora do estresse oxidativo intestinal, pois ambos os tratamentos foram capazes de inibir a depleção de glutathiona colônica. A presença do radical hidroxila no carbono 4 na molécula de cumarina melhora os efeitos antiinflamatórios, evidenciado pelo tratamento de ratos colíticos com 4-hidroxi-cumarina, os quais demonstraram efeitos benéficos quando a mucosa colônica estava intacta (efeito preventivo) e quando estava recuperando-se após a primeira administração de TNBS/etanol, assim como previnem os animais colíticos da recidiva do processo inflamatório intestinal. Os testes *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que a presença de hidroxila no carbono 4 na molécula original de cumarina (4-hidroxi-cumarina) proporcionou maior atividade biológica a cumarina, ou seja, a 4-hidroxi-cumarina diminuiu os níveis de IL-8, IL-1 β e IL-2, enquanto que a cumarina diminuiu apenas os níveis de IFN- γ . O tratamento com as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 promoveu tanto efeito preventivo (fases aguda e crônica com recidiva) quanto efeito curativo (fase crônica) na mucosa colônica afetada pela administração de TNBS/etanol, utilizando doses 3 e 5 vezes menor que a dose da sulfassalazina. Estes efeitos observados indicam que estas associações podem ser uma nova opção terapêutica para o tratamento da colite, possibilitando a redução dos efeitos adversos da sulfassalazina com a redução da sua dose.

Palavras-chave: cumarina, 4-hidroxi-cumarina, colite, doença inflamatória intestinal, TNBS.

Coumarins comprise an important class of phenolic compounds with many pharmacological properties that includes inhibition of membrane lipid peroxidation, inhibition on neutrophil-dependent superoxide anion generation, inhibition on the linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity, and inhibition on cyclooxygenase and lipoxygenase activities, which could result in antiinflammatory and immunosuppressant effect. Those are some desired features for a candidate compound in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). On the other hand, the IBD are life persisting diseases with unpredictable episodic reactivations and difficult treatment in severe cases. Sulfasalazine, the first choice drug in the treatment of mild to moderately active IBD cases, presents serious side effects when used in high doses or in long-term treatment. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of coumarin and 4-hydroxy-coumarin in rat experimental intestinal inflammation. Additionally, we evaluated the possibility of coumarins association to sulfasalazine in rat intestinal inflammatory conditions. For this purpose, the antiinflammatory activity of test compounds, coumarin (2.5 to 50mg/kg) and 4-hydroxy-coumarin (5 to 50mg/kg) and associations of coumarin with sulfasalazine (C5 plus S5, C5 plus S15, C5 plus S25) or 4-hydroxy-coumarin with sulfasalazine (4-OHC25 plus S5, 4-OHC25 plus S15 and 4-OHC25 plus S25) were tested in the model of trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) induced rat colitis in two different experimental conditions: when the colonic mucosa is intact (preventive effect), and when a previous inflammatory damage is caused to the colonic mucosa (curative effect), additionally to a reactivation of the inflammatory process (relapse prevention). The colonic damage was evaluated macroscopically, histologically and biochemically. For cell cultures evaluation of cytokine secretion we used Caco2, RAW 264.7 and lymphocytes from Balb/c mice. Coumarin and 4-hydroxy-coumarin at doses of 5 and 25 mg/kg prevented the colonic damage induced by TNBS in rats, in the acute phase and in the chronic phase with relapse. This effect may be associated with an improvement on intestinal oxidative stress, because both treatments were able to inhibit the colonic glutathione depletion, but other pharmacological effects of these compounds maybe involved. The presence of one hydroxyl radical in position 4 of the benzopyrone structure seems to improve the anti-inflammatory effect, as evidenced by the beneficial effects of 4-hydroxy-coumarin in preventing the acute TNBS-induced damage, and by the mucosa recovery after the initial administration of the TNBS, as well as in preventing the relapse induced after the second TNBS administration. It was also observed that 4-hydroxy-coumarin is more effective in decreasing the secretion of IL-8, IL-1 β and IL-2 than coumarin decreased only the secretion of IFN- γ . Treatment with the associations C5 plus S5 or 4-OHC25 plus S15 prevented from the acute and relapsed damages, and presented a curative effect in the colon at doses 3 and 5 times lower than only sulfasalazine. These effects indicate that those associations could be new options in the management of the IBD as complementary therapy, since the main goal of this approach is the possible reduction of sulfasalazine dose and the consequent attenuation of its adverse effects.

Key words: coumarin, 4-hydroxy-coumarin, colitis, inflammatory bowel diseases, TNBS.

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo geral para um grupo de doenças inflamatórias crônicas envolvendo o trato gastrointestinal e freqüentemente refere-se à colite ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC) (Podolsky, 2002).

Embora a patogênese da DII seja pouco conhecida, se reconhece que esta doença crônica decorre de uma complexa interação entre fatores de predisposição genéticos, agentes exógenos e/ou alterações endógenas, cujo resultado final é um processo inflamatório, possivelmente mediado por uma resposta do tipo imune (Gitnick, 1996).

Os agentes próinflamatórios promovem, em primeiro lugar, a aderência dos fagócitos no endotélio vascular e o extravazamento destas células para a mucosa intestinal e, em segundo lugar, a ativação destes fagócitos originam a liberação de radicais livres, assim como de enzimas proteolíticas no espaço intersticial intestinal. Tanto os radicais livres como as enzimas proteolíticas dão lugar à formação de mais mediadores inflamatórios, incrementando a permeabilidade da mucosa e, em última instância, favorecendo a entrada de produtos bacterianos prejudiciais, tais como o lipopolissacarídeo (LPS). A introdução destes produtos promove o recrutamento e ativação adicional de leucócitos do intestino, estabelecendo-se um círculo vicioso responsável pela instauração do prejuízo intestinal crônico (Shanahan e Targan, 1994).

De acordo com estas informações, pode-se deduzir claramente que os radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção da DII. Em alguns estudos comprovou-se a existência de alterações nos níveis oxidativos de biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade (Lih-Brody *et al.*, 1996). Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (Loguercio, 1996). O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana celular e a conseqüente morte da célula. Também os radicais livres podem reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da célula. Finalmente, quando os ácidos nucleicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese proteica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento de processos

do tipo tumoral. Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com colite ulcerativa (Gitnick, 1996; Obrador, 1994).

Desta forma, a inibição ou neutralização destes radicais livres, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, poderia ser benéfico no tratamento da DII (Nielsen e Rask-Madsen, 1996). De fato, fármacos eficazes usados correntemente no tratamento da DII, tais como os derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), possuem propriedades antioxidantes que contribuem para seus efeitos benéficos no processo inflamatório colônico (Pavlick *et al.*, 2002). Infelizmente, a sulfassalazina e os derivados do 5-ASA que representam a primeira opção terapêutica para o tratamento da DII, apresentam sérios efeitos colaterais, especialmente quando usados em altas doses ou durante longos períodos de tratamento, aspecto que limita seu uso, visto que a DII é um processo crônico que requer tratamento prolongado (Randford e Langman, 2002). Segundo Sellin e Parisha, 2006 os efeitos tóxicos e colaterais dos 5-aminosalicilatos (5-ASA), especialmente da sulfassalazina, podem ser minimizados pela diminuição da dose.

No entanto, a garantia do efeito antiinflamatório destes compostos deve ser compensada por procedimentos terapêuticos complementares que garantam a eficácia destes compostos em doses menores. Isto pode ser obtido pela administração de probióticos e prebióticos nos pacientes, o que permitiria a modificação da microflora local e uma melhor resposta da célula colônica ao processo inflamatório (Fernandez-Bañares *et al.*, 1999; Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Kanauchi *et al.*, 2003; Videla *et al.*, 2001) ou pela utilização de outros compostos que em associação possam produzir efeitos que garantam a eficácia do tratamento com conseqüente redução dos efeitos colaterais do fármaco de escolha. Considerando-se ainda que a sulfassalazina e os derivados 5-ASA não têm sido efetivos no controle da recidiva do processo inflamatório colônico (Sellin e Parisha, 2006), o uso combinado de outros compostos ativos na DII pode ser uma importante alternativa no controle dos sintomas da recidiva, assim como na prevenção do processo inflamatório intestinal em pacientes com esta doença.

Por esta razão, a avaliação de novos compostos com atividade antioxidante é uma importante abordagem para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DII, o que é comprovado por inúmeros estudos que mostram os efeitos benéficos de diferentes compostos com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de colite ulcerativa, incluindo flavonóides como a quercetrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002), rutosídeo (Gálvez *et al.*, 1997),

silimarina (Cruz *et al.*, 2001), morina (Ocete *et al.*, 1998; Gálvez *et al.*, 2001), diosmina (Crespo *et al.*, 1999) e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), vitamina E (Gonzalez *et al.*, 2001) e tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

Os flavonóides constituem um importante grupo de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos na natureza e consumidos na dieta normal de países desenvolvidos em quantidades que oscilam entre 1 e 2 gramas. São compostos que manifestam uma importante atividade antioxidante (Cook e Saman, 1995; Formica e Regelson, 1995), além de terem a capacidade de inibir distintas enzimas cuja atividade se encontra aumentada em processos inflamatórios, assim como de modular a atividade de distintas células do sistema imune (Middleton e Kandaswami, 1993). Em definitivo, os flavonóides são capazes de afetar três dos fatores chaves do processo de inflamação intestinal: geração de radicais livres, metabolismo de eicosanóides e o sistema imune intestinal. A atividade apresentada por estes flavonóides está intimamente ligada com a capacidade antioxidante que caracteriza os flavonóides, assim como a sua potencialidade em restaurar a capacidade absorviva colônica, que também se encontra profundamente afetada na inflamação intestinal.

As cumarinas representam uma grande classe de compostos fenólicos encontrados principalmente em plantas, mas com ocorrência em fungos e bactérias. Também denominadas de benzopironas, as cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidróxicinâmico, sendo que o principal representante é a 1,2-benzopirona, denominada simplesmente de cumarina. Estes constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxicinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias. Vários estudos de relação estrutura-atividade de cumarinas referem à inibição da peroxidação lipídica, da geração de anion superóxido dependente de neutrófilos, da citotoxicidade induzida por hidroperóxido de ácido linoléico e interação com espécies reativas de oxigênio por esta classe de substâncias, caracterizando-se como um grupo de compostos com potentes propriedades antioxidantes (Kaneko *et al.*, 2003; Hoult e Payá, 1996; Payá *et al.*, 1994). Outros estudos mostram ainda que várias cumarinas são inibidoras de lipooxigenases e ciclooxigenases e reduzem conseqüentemente a produção de leucotrienos, tromboxanos e do ácido hidróxi-eicosanóico (Kaneko *et al.*, 2003). Outras importantes atividades farmacológicas descritas para as cumarinas incluem redução de edema em humanos, atividade

imunossupressora, hipolipidêmica e antiinflamatória indicando a importância destas substâncias como compostos terapêuticos potenciais para a DII.

Apesar da importante e comprovada atividade antioxidante e antiinflamatória das cumarinas, assim como de outras propriedades farmacológicas, não há estudos sistematizados destes compostos sobre doenças que afetam o sistema gastrointestinal. Um único composto, a paepalantina, uma isocumarina isolada da espécie *Paepalanthus bromelioides* (Família Euriocaulaceae) foi estudada quanto a seus efeitos sobre a colite experimental. Neste estudo, foi demonstrado um importante efeito preventivo da colite aguda e crônica induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico. A paepalantina possui efeito no tratamento das recidivas da inflamação intestinal em ratos agindo por mecanismos que reduzem o estresse oxidativo, aumentando os níveis colônicos de glutathione e reduzindo a atividade das enzimas óxido nítrico sintase, fosfatase alcalina e mieloperoxidase, sendo que em doses cinco vezes menores, a paepalantina protegeu os animais da inflamação intestinal de forma similar ao tratamento com sulfassalazina (Di Stasi *et al.*, 2004).

Estudos demonstram que a cumarina (1,2-benzopirona) e seu derivado a 4-hidroxi-cumarina estimulam de forma concentração-dependente a liberação de interleucina-1 beta (IL-1 β) em culturas de células mononucleares humanas (Stuhlmeier *et al.*, 1991), além de apresentarem atividade antitumoral (Lacy e O'Kennedy, 2004). Fylaktakidou *et al.* (2004) reportam que a cumarina e alguns de seus derivados reduzem o edema e atuam como antiinflamatório por inibirem a síntese de prostaglandinas. Em adição, tais compostos são considerados seguros para uso e não oferecem risco à saúde humana quando usados em pequenas doses (Felter *et al.*, 2006; Lake, 1997), como aquelas que foram usadas no presente projeto.

Por estas informações, o objetivo principal deste projeto foi avaliar a atividade farmacológica da cumarina e de seu derivado a 4-hidroxi-cumarina nas fases aguda (efeito preventivo) e crônica com recidiva (efeitos preventivos e/ou curativos) do processo inflamatório intestinal induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, assim como avaliar os efeitos destes compostos sobre a atividade antiinflamatória intestinal da sulfassalazina, um dos fármacos de escolha para o tratamento da DII em humanos.

CAPÍTULO 2:

CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)

1. Aspectos gerais

Sob a denominação de DII estão englobadas, fundamentalmente, duas distintas doenças: DC e a CU. Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcada pela ulceração da mucosa, infiltração de neutrófilos na mesma, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação (Singh *et al.*, 2003).

A anatomia patológica e a manifestação clínica são diferentes na DC e na CU (Tabela 1). A DC pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus, com maior frequência na região ileocecal (Gasche, 2000). Esta inflamação tem aspecto transmural, ou seja, propaga-se através da parede intestinal, favorecendo a formação de perfurações, estenoses e fístulas (Levine, 1994; Gasche, 2000). As lesões podem ser focais ou difusas, e com frequência afetam de formas descontínuas distintas áreas do aparelho digestivo, separadas entre si por segmentos intactos (Levine, 1994). A CU afeta somente o cólon, principalmente a região distal (reto-ânus). A inflamação ocorre predominantemente na camada superficial da parede intestinal, normalmente na mucosa e na submucosa e caracteriza-se por infiltração de neutrófilos, eosinófilos e células plasmáticas, além disso, é comum ocorrer formação de abscessos nas criptas, necrose epitelial, presença de edema e hemorragia. A mucosa apresenta aspecto granuloso, como consequência da irregularidade da inflamação (Obrador e Riera, 1994). Os pacientes com CU apresentam diarreia geralmente com sangue, acompanhada ou não de sintomas sistêmicos, como febre, mal-estar e falta de apetite (Gray *et al.*, 2009).

Para 10-15% dos pacientes com DII é impossível estabelecer um diagnóstico definitivo entre a DC e a CU (Geboes, 1994). Em ambas as doenças podem ocorrer complicações do tipo autoimune e afetar as articulações, o olho e a pele (Lichtman e Balfour Sartor, 1994). Entre as complicações não autoimunes estão os episódios tromboembólicos, anemia e osteoporose (Gasche, 2000). Além disso, pacientes com DII possuem maior propensão de desenvolver câncer de cólon. O aparecimento do câncer de cólon depende da duração e da extensão da doença, de complicações extra-intestinais e do desenvolvimento da doença no indivíduo jovem. O risco de aparecimento do câncer

de cólon é maior nos pacientes com CU do que nos pacientes com DC (Pohl *et al.*, 2000).

Tabela 1: Diferenças entre a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa

Doença de Crohn (DC)	Colite Ulcerativa (CU)
Pode ocorrer desde a boca até ao ânus	Reto +/- Cólon
Incidência descontínua	Incidência contínua
Inflamação transmural	Inflamação ocorre somente na mucosa
Diarréia pastosa	Diarréia líquida com sangue, pus e muco
Presença de granulomas e fibroses	Formação de abscessos nas criptas, depleção de muco e distorção glandular

1.1. Epidemiologia

Aproximadamente 2,2 e 1,4 milhões de pessoas na Europa e nos EUA, respectivamente, possuem DII. As taxas mais altas de incidência e prevalência de DC e de CU são descritas no norte da Europa, Reino Unido e no norte da América, que são regiões geográficas associadas historicamente as DII (Sonnenberg *et al.*, 1991).

A incidência da doença depende de fatores demográficos como o sexo, idade e as diferenças étnicas. A incidência da DII é diferente entre homens e mulheres. De maneira geral, há um predomínio de DC em mulheres, principalmente com 14 e 50 anos de idade, o que sugere que os fatores hormonais possuem um papel importante no desenvolvimento desta doença (Loftus Junior *et al.*, 2000).

A DII possui um pico de aparecimento na segunda e na terceira década de vida, seguido de um pico menor nas demais décadas. A CU e a DC são diagnosticadas principalmente no final da adolescência e no início da idade adulta (Loftus Junior *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da DII em crianças é muito raro. Recentes estudos epidemiológicos de DII na América do Norte e na Europa sugerem que menos de 1% de crianças manifestam DII durante os primeiros 12 meses de vida (Kugathasan *et al.*, 2003; Ruemmele *et al.*, 2006).

No Brasil, como em outros países em desenvolvimento (Farrokyar *et al.*, 2001), a determinação da prevalência e da incidência das DII é difícil em função das deficiências dos sistemas de registro de dados, bem como da impossibilidade do acesso às informações de fora do sistema público de saúde (Souza *et al.*, 2002). Além disso, a prevalência elevada das doenças infectoparasitárias, as quais podem manifestar-se com

colite, é uma dificuldade a mais para o diagnóstico da CU, sobretudo se há resistência em se pensar nessa afecção em crianças (Spivak *et al.*, 1995).

1.2. Etiologia

Embora a patogênese da DII seja pouco conhecida, sabe-se que esta doença crônica decorre de uma complexa interação entre fatores genéticos, agentes exógenos e/ou alterações endógenas, cujo resultado final é um processo inflamatório, possivelmente mediado por uma resposta do tipo imune (Gitnick, 1996).

1.2.1. Fatores genéticos

De maneira geral, os familiares de pacientes com DII possuem maior probabilidade de desenvolver esta doença do que indivíduos que não possuem nenhum caso na família. Membros da mesma família que possuem DII apresentam normalmente características comuns da doença. Isto sugere que fatores genéticos e ambientais comuns a membros da mesma família determinam a evolução da doença (Halme *et al.*, 2006).

Ogura *et al.* (2001) determinaram o primeiro gene relacionado ao desenvolvimento da DC, o NOD2 (nucleotide oligomerization domain). NOD2 pertence à grande família de proteínas intracelulares relacionadas à regulação da apoptose e a resposta imune do organismo frente à patógenos. Hoje se sabe que diferentes partes da proteína NOD2 têm funções específicas que de maneira geral determina a capacidade da proteína frente à resposta a bactérias, uma vez que estas tenham invadido a célula. O NOD2 participa na detecção de produtos bacterianos, como o muramil dipeptido, que induz a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB). As mutações no NOD2 induzem a apoptose anormal e a ativação deficiente do fator de transcrição NFκB, o que influencia na patogênese da DII. A ativação do NFκB induz a liberação de citocinas proinflamatórias (Inohara *et al.*, 2002).

Recentemente foram identificados dois genes o OCTN (organic cation transporter) e DLG5 (discs large homolog 5), ambos estão envolvidos na permeabilidade epitelial. O funcionamento inadequado destes genes pode levar a uma resposta inadequada do sistema imune da mucosa frente a produtos bacterianos (Lacatos, 2006).

1.2.2. Fatores ambientais

São inúmeros os fatores ambientais de risco para a CU, entre eles: o tabaco, a dieta, o estresse e microorganismos (Danese *et al.*, 2004).

O melhor exemplo da influência do ambiente no desenvolvimento da DII é o tabaco. O tabaco tem-se mostrado um fator protetor para a CU e um fator de risco para a DC, sendo a associação entre DC e tabaco mais frequente em mulheres. Os mecanismos pelo qual fumar afeta a frequência e a evolução da CU e da DC permanecem desconhecidos, entretanto sugerem-se que a nicotina tem atividade antiinflamatória (Sykes *et al.*, 2000). O tabaco está associado com o desenvolvimento da DC em pacientes com 40 anos de idade e protege contra o desenvolvimento da CU em qualquer idade (Regueiro *et al.*, 2005). Estudos mostram que a administração de nicotina melhora a CU coincidindo com uma diminuição local da concentração de várias citocinas próinflamatórias (Agrawal e Rhodes, 2003).

Por se tratar de uma doença do trato digestório, a possibilidade de produtos da dieta estarem implicados em sua patogenia é lógica. Levando em consideração que a maior incidência das DII pode ser associada a mudanças nos hábitos de vida nos países ocidentais e que o intestino é o principal local do processo inflamatório, seria provável que alguns nutrientes presentes na luz intestinal pudessem atuar como antígenos, inclusive influenciando os mecanismos imunes e reparadores da mucosa intestinal (Danese *et al.*, 2004).

Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que mudanças na composição da dieta alimentar podem influenciar na resposta imunológica. Concretamente, os lipídeos são um dos substratos nutricionais que mais afetam a modulação da imunidade. A composição dos lipídeos das membranas celulares pode variar segundo a dieta e isto influencia a síntese de eicosanóides e a resposta celular (Gassull, 2004; Gassull *et al.*, 2005). O consumo de gordura tem sido associado positivamente com a CU, e o consumo de frutas, vegetais e fibras estão associadas à diminuição de risco das DII (Reif *et al.*, 1997).

O estresse também está associado a DII, mais como um agente modificador do que indutor, e seu papel é mais claro em modelos experimentais do que em humanos. O estresse tem sido considerado como um desencadeante potencial em cerca de 40% dos

pacientes com CU (Theis e Boyko, 1994). Importantes evidências relacionam o estresse com a doença, provavelmente, devido a um aumento na suscetibilidade à infecção como consequência do deterioramento das respostas imunes funcionais (Herbert e Cohen, 1993). Observações clínicas, modelos experimentais de colite e estudos de interações neuroimunes em animais de laboratório têm demonstrado que o estresse pode agravar o curso das DII (Collins, 2001). A duração do estresse também pode ser importante já que o risco de exacerbação da atividade clínica da doença parece estar associado com um estado de estresse prolongado (Levenstein *et al.*, 2000).

Durante muitos anos buscou-se estabelecer uma relação entre um agente infeccioso específico e a DII, contudo até o momento não se obteve resultados conclusivos. Vários agentes infecciosos têm sido propostos como responsáveis pelas DII como *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (Danese *et al.*, 2004). A relação entre o desenvolvimento das DII e a microbiota intestinal comensal começou a se estabelecer através de observações clínicas. Diversos autores têm proposto uma alteração na ecologia microbiana em pacientes com DII ativa, tendo encontrado um decréscimo significativo no número de bactérias anaeróbicas e lactobacilos (Fabia *et al.*, 1993). Além disso, o epitélio destes pacientes apresenta um maior número e concentração de bactérias, tanto intracelulares como nos biofilmes que o cobrem em relação a indivíduos saudáveis (Swidsinski *et al.*, 2002).

1.2.3. Fatores Imunológicos

O processo inflamatório intestinal começa com a resposta inflamatória inata, ao produzir o recrutamento dos leucócitos da corrente sanguínea até o tecido lesionado. Uma vez no local inflamado, os leucócitos produzem peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam dano tecidual e participam do recrutamento de outras células do sistema imune. Entre estas células estão os macrófagos que uma vez ativados, produzem citocinas próinflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), EROs e óxido nítrico (NO) amplificando a resposta imunitária da mucosa intestinal (Kurtovick e Segal, 2004).

Esta inflamação aguda evolui para inflamação crônica, que se caracteriza pela presença de um infiltrado celular, composto por macrófagos, linfócitos e células

plasmáticas. Os macrófagos desempenham um papel chave neste processo pela quantidade de substâncias biologicamente ativas que podem produzir, se esta produção torna-se descontrolada podem produzir efeitos destrutivos. Os linfócitos também migram para o tecido, atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelos macrófagos. Na DC os linfócitos secretam principalmente citocinas do tipo Th1 (IL-6, interleucina -2 (IL-2), TNF- α e interferon-gama (INF- γ)) e na CU os linfócitos produzem citocinas do tipo Th2 (interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13)). Nas duas doenças, esses mediadores contribuem ativamente na cascata patogênica que inicia e perpetua a resposta inflamatória no intestino (Sartor, 1997).

Na inflamação crônica ocorre aumento da atividade proliferativa das células, que pode dar origem à situação de metaplasia e a mudanças irreversíveis na diferenciação celular. A inflamação atuando diretamente como um agente genotóxico, favorece o aparecimento de mutações e ao mesmo tempo é capaz de romper o controle celular, permitindo a divisão do DNA danificado (Griffiths *et al.*, 1997).

Isto pode ser a explicação para o fato de pacientes com DII possuírem maior propensão para o desenvolvimento de câncer de cólon. Estima-se que a incidência de câncer de cólon em pacientes com DII é de 3,7% aproximadamente. O risco de câncer de cólon aumenta com a duração da DII. Assim, indivíduos com 10 anos de DII têm 2%, com 20 anos têm 9% e com 30 anos têm 19% de desenvolver câncer de cólon. O desenvolvimento deste tipo de câncer é responsável por 1/3 das mortes associadas a CU (Krok e Lichteinstein, 2004).

2. Tratamento

Os objetivos principais do tratamento das DII são de promover a remissão do ataque agudo e reduzir a incidência de recidivas. São utilizados fármacos clássicos como os aminossalicilatos, corticóides, imunossupressores e antibióticos, além das novas terapias biológicas desenvolvidas nos últimos anos.

Os aminossalicilatos são fármacos que contém em sua estrutura a molécula do ácido 5-aminossalicílico (5-ASA). O primeiro fármaco utilizado foi a sulfassalazina, que constitui na associação da molécula de sulfapiridina através da ligação tipo azo com o 5-ASA. A sulfapiridina atua como molécula transportadora (promovendo a disponibilidade do 5-ASA no cólon, prevenindo sua absorção e seu metabolismo no

intestino delgado). Assim, o 5-ASA é liberado no cólon devido à ação das azobactérias que rompem a ligação “azo” (Svartz, 1942). A sulfassalazina apresenta dois problemas: em primeiro lugar, a molécula de sulfapiridina é responsável pela maioria dos efeitos adversos que ocorrem com a administração deste fármaco, e em segundo lugar não é ativa na DC que afeta o intestino delgado. Por isso, Beltrán *et al.* (1997) tem sugerido novas formas de transportar a molécula de 5-ASA:

- a) Liberação controlada: a molécula de 5-ASA é recoberta por uma resina acrílica que se dissolve em valores de pH superiores a 6 e 7.
- b) Dímero composto por duas moléculas de 5-ASA unidas por uma ligação azo (olsalazina) que requer a redução bacteriana para romper-se e liberar o princípio ativo.
- c) Administração de 5-ASA em forma tópica intrarectal (enemas, supositórios ou gel).

O mecanismo de ação da sulfassalazina não está totalmente elucidado, porém diferentes estudos *in vitro* têm demonstrado seu efeito modulador sobre a síntese e liberação de leucotrienos (LTB₄) e prostaglandinas (PGE₂), sobre a produção de determinadas citocinas próinflamatórias (TNF- α , interleucina-1 (IL-1) e interleucina (IL-2)) e sobre a produção de EROs (Nikolaus *et al.*, 2000). São necessárias concentrações elevadas do fármaco na luz intestinal para poder exercer seu efeito terapêutico, por isso são preferíveis formas farmacêuticas que liberem localmente o 5-ASA na mucosa intestinal.

Os aminossalicilatos são indicados no caso de inflamação intestinal leve, tanto na CU quanto na DC (Stein e Hanauer *et al.*, 2000) e na manutenção da remissão da CU (Sutherland *et al.*, 2000). Seu papel na manutenção da DC é questionável (Lochs *et al.*, 2000; Sutherland *et al.*, 2000). Possui como efeitos colaterais anemia hemolítica, agranulocitose, reações na pele, hepatite, artrite, pericardite, pancreatite, pleurite, febre, pancitopenia, infertilidade masculina reversível, intolerância gástrica e cefaléia (Ransford e Langman, 2002).

Os corticóides atuam através da inibição da transcrição de interleucinas, da supressão do metabolismo do ácido araquidônico e da estimulação da apoptose dos linfócitos da lâmina própria do intestino (Franchimont *et al.*, 2003).

A prednisona, prednisolona e a metilprednisolona, são os fármacos utilizados nos casos moderados a grave da DII e nos casos de pacientes que não respondem a terapia com os aminossalicilatos (Hanauer e Sandbord, 2001). Os corticóides, devido

aos seus efeitos secundários, não constituem o tratamento adequado para manter a remissão da DII. De forma geral, cerca de 20% dos pacientes com DII se tornam dependentes de seu uso contínuo, e outros 20% refratários aos mesmos (Munkholm *et al.*, 1994). A dependência aos esteróides usualmente se aplica a pacientes que não toleram a redução de doses ou que rapidamente exacerbam a doença após a suspensão dos mesmos.

Consequentemente, a dependência aos corticosteróides em pacientes com DII é um grande problema clínico. A maioria dos efeitos adversos dos esteróides estão relacionados à dose e a duração da terapia. Geralmente terapias com corticosteróides são bem toleradas durante pouco tempo. Quando a terapia se prolonga por um período de tempo maior e/ou é dada em altas doses, podem aparecer complicações cutâneas, oculares, endocrinológicas, musculoesqueléticas, gastrointestinais e infecciosas (Ardizzone *et al.*, 2002). Felizmente, um novo grupo de corticosteróides oferece uma alternativa terapêutica viável aos corticóides tradicionais, com efeitos adversos menos graves e menos frequentes. A budenosida é o único glicocorticóide não sistêmico disponível para o tratamento da DC, sendo seu efeito superior aos salicilatos (Gomollón *et al.*, 1999). Comparado as preparações convencionais este fármaco sofre metabolismo hepático de primeira passagem o que leva a uma menor biodisponibilidade sistêmica e a uma melhora na segurança e no perfil de tolerabilidade. No entanto, não tem demonstrado eficácia na manutenção da DC por períodos superiores há um ano (Ferguson *et al.*, 1998). Todavia já foi comprovado sua eficácia na CU ativa (Kokman *et al.*, 2004).

A justificativa da utilização dos imunossupressores nos últimos anos é baseada no fato de ocorrer inúmeras alterações imunológicas na DII. É indicada nos casos de corticodependência e doença fistulosa. Azatioprina (AZA), metotrexato e ciclosporina são exemplos de fármacos imunossupressores.

A AZA é metabolizada *in vivo* formando 6-mercaptopurina (6-MP), a qual pode sofrer duas vias metabólicas distintas: degradação em metabólitos inativos ou geração de ácido tioinosínico, nucleotídeo derivado da 6-tioguanina (Lennard, 2002). O ácido tioinosínico se acumula intracelularmente e é considerado o metabólito ativo responsável pelos efeitos citotóxicos destes fármacos, o qual que inibe a síntese células de purinas, a síntese de RNA e DNA, assim como a replicação cromossômica.

Tanto a AZA quanto 6-MP são eficazes na indução da remissão e na manutenção da DC e da CU (Pearson *et al.*, 1995). O efeito secundário mais preocupante a longo prazo é o aparecimento de neoplasias.

O metotrexato é utilizado na DC ativa e na manutenção da remissão em caso de intolerância ou falta de resposta ao tratamento com AZA e com 6-MP (Feagan *et al.*, 1995). Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, sabe-se que inibe a síntese de citocinas e de eicosanóides (Fraser, 2003).

A ciclosporina é utilizada em pacientes com DC que possuem fístulas, inibindo de forma seletiva as células CD4⁺ e a liberação de citocinas (Present e Lichtiger, 1994).

O termo terapia biológica engloba diferentes atuações terapêuticas que tem em comum atuar em pontos isolados do processo inflamatório intestinal. Podem bloquear a atuação de citocinas próinflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-6 ou interleucina-7 (IL-7) e inibir molécula de adesão.

O infliximab é um anticorpo monoclonal anti-TNF quimérico (camundongo-homem). O CDP571 e o adalimumab (o CDP870) são anticorpos monoclonais anti-TNF α com maior proporção humanizada. Os três são usados na remissão da DC ativa (Targan *et al.*, 1997; Sandborn *et al.*, 2004), além disso o infliximab tem demonstrado ser eficaz na manutenção da remissão a curto prazo (Hanauer *et al.*, 2002).

O TNF- α exerce seus efeitos próinflamatórios através de sua união com receptores transmembrana específicos, p55 e o p75. Etanercept é uma proteína formada da união da porção Fc de uma imunoglobulina humana com os receptores p75 solúveis e onercept é uma forma recombinante humana do receptor p55 solúvel. Ambos neutralizam a atividade biológica do TNF- α por união tanto a sua forma solúvel como a ligada à membrana, e evitam a união do TNF- α a seus receptores ativos. Entretanto, o etanercept não é efetivo na indução da remissão em pacientes com DC ativa (Sandborn *et al.*, 2001).

Os pesquisadores estão desenvolvendo anticorpos contra outras citocinas próinflamatórias, como por exemplo, o MRA, um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor solúvel IL-6 (IL-6R). Os pacientes com DC tem elevada concentração de IL-6R (Reinecker *et al.*, 1993), e o tratamento com MRA tem demonstrado bons resultados (Ito *et al.*, 2004).

O INF- γ e a interleucina (IL-12) são também citocinas importantes no desenvolvimento da resposta imune Th1 (Lim e Hanauer, 2004). Tanto o fontolizumab, anticorpo monoclonal humanizado anti-INF- γ (Reinisch *et al.*, 2006), como o J695

(ABT-874) anticorpo monoclonal humanizado anti-IL-12 (Mannon *et al.*, 2004) tem sido efetivos na DC ativa.

Muitos agentes são desenvolvidos para inibir os processos de ativação e proliferação dos linfócitos. Neste sentido, a terapia anti-CD4 com o uso de anticorpos monoclonais como cM-T412, MAX. 16H5 e BF-5, tem induzido a remissão da DC e da CU (Ardizzone *et al.*, 2002). Com o objetivo de inibir a proliferação de linfócitos T foi desenvolvido um anticorpo contra o receptor solúvel IL-2 (IL-2R), daclizumab ou basiliximab, tendo bons resultados na CU (Van Assche *et al.*, 2003).

Outro mecanismo de ação da terapia biológica é a inibição de moléculas de adesão. O recrutamento de células inflamatórias da circulação sistêmica é considerado uma etapa crítica da amplificação da resposta inflamatória. O natalizumab é um anticorpo monoclonal de camundongo humanizado contra a α 4-integrina, que inibe, portanto, a migração endotelial. Este tratamento tem sido usado para a indução da remissão, tanto na DC (Gordon *et al.*, 2001) quanto na CU (Gordon *et al.*, 2002).

Dada a importância do equilíbrio na microbiota intestinal no controle da resposta imunológica local e sistêmica, pode-se justificar a utilização de bactérias em pacientes com DII, este tipo de tratamento é denominado probiótico. Este tratamento faz referência a um suplemento alimentar com microorganismos vivos que afeta de forma benéfica o hospedeiro melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal (Macfarlane e Cummings, 2002). Este tipo de tratamento também tem demonstrado a importância da composição da flora presente no lúmen intestinal, porque certos probióticos são capazes de modular o sistema imune, proporcionando ao hospedeiro um aumento de sua resistência frente a microorganismos patogênicos (Borruel, 2003).

Os *Lactobacillus* têm sido estudados em vários modelos experimentais e também na clínica para estudar suas ações na colite. *Lactobacillus casei* inibe a produção de IL-6 em culturas de células da lamina própria intestinal estimulada com LPS (Matsumoto *et al.*, 2005). *Lactobacillus GG* melhora a função da barreira intestinal pela inibição da apoptose das células epiteliais intestinais (Gotteland *et al.*, 2001) e previnem a recidiva da colite em camundongos transgênicos (HLA-B27) após tratamento com antibiótico (Dieleman *et al.*, 2003).

Várias cepas de *Bifidobacterium* (*breve*, *catenulatum*, *longum* e *infantis*) resultou na melhora da inflamação intestinal induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos (Setoyama *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2004).

Os antibióticos são utilizados no tratamento dos abscessos que complicam a DC, no tratamento das fístulas, no desenvolvimento bacteriano e no tratamento das inflamações inespecíficas das bolsas ileais (“bolsites”) (Shen *et al.*, 2008). O metronidazol e o ciprofloxacino são os antibióticos mais comumente usados, o metronidazol é útil como terapia primária no tratamento de pacientes com DC (Sutherland *et al.*, 1991) e o ciprofloxacino é efetivo também na DC ativa (Arnold *et al.*, 2002).

Outro tipo de tratamento utilizado nas DII são os prebióticos. Define-se prebiótico como “um ingrediente não digerível que afeta de forma benéfica o hospedeiro mediante a estimulação do crescimento de um número limitado de bactérias no cólon” (Schrezenneir e de Vrese, 2001). Neste sentido, os critérios para definir um prebiótico são: resistência à digestão no intestino delgado, hidrólise e fermentação pela flora colônica e estimulação seletiva do crescimento de bactérias no cólon. Os prebióticos podem ter diferentes atividades como antiinflamatórias, anticarcinogênicas, antiosteoporóticas, antimicrobianas e hipolipidêmicas (Swennen *et al.*, 2006).

O efeito prebiótico de um carboidrato está relacionado à sua capacidade de estimular a proliferação de bactérias “saudáveis” (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) e não estimular a proliferação de bactérias “não-saudáveis” (*Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli*). As bifidobactérias são bactérias presentes em grande número na população bacteriana intestinal adulta. Este grupo de bactérias tem mostrado efeitos benéficos, como a síntese da vitamina B, inibição de bactérias patogênicas, diminuição do pH intestinal, diminuição do colesterol, proteção de infecções intestinais, estimulação da função intestinal e melhora da resposta imune (Rastall, 2004).

Desta forma, vários pesquisadores demonstram os efeitos das fibras dietéticas no processo inflamatório intestinal. A maioria dos estudos experimentais com fibras dietéticas associa o seu efeito terapêutico a uma maior produção de ácidos graxos na luz intestinal (Videla *et al.*, 2001).

A ingestão de fibra dietética pode exercer outras ações que também podem contribuir para o efeito antiinflamatório intestinal. Diferentes estudos *in vitro* mostram a capacidade de fibras dietéticas atenuarem a produção de citocinas próinflamatórias, incluindo IL-6, IL-8 e TNF- α (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002, 2003, Kaunauchi *et al.*, 1999).

A lactulose foi estudada no modelo de colite induzida por TNBS em ratos, demonstrando efeito antiinflamatório intestinal. Este efeito foi associado à redução da

atividade da mieloperoxidase, a diminuição da produção de TNF- α e de leucotrieno B e também por ter aumentado o número de bifidobactérias e de *lactobacillus* no cólon (Camuesco *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA INTESTINAL DA CUMARINA E DA 4-HIDROXI-CUMARINA NO MODELO DE COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO TRINITROBENZENOSULFÔNICO (TNBS) EM RATOS.

A cumarina e a 4-hidroxi-cumarina foram testadas no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos em duas condições experimentais: aguda e crônica com recidiva. Este estudo originou o artigo “Intestinal Anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis”. Biological Pharmaceutical Bulletin. v.31(7), p.1343-1350, 2008.

Intestinal Anti-inflammatory Activity of Coumarin and 4-Hydroxycoumarin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis

Ana Carolina LUCHINI,^a Patrícia RODRIGUES-ORSI,^a Sílvia Helena CESTARI,^a Leonardo Noboru SEITO,^a Aline WITAICENIS,^a Claudia Helena PELLIZZON,^b and Luiz Cláudio Di STASI^{a,*}

^aLaboratory of Phytomedicines, Department of Pharmacology, Instituto de Biociências, São Paulo State University (UNESP); and ^bDepartment of Morphology, Instituto de Biociências, São Paulo State University (UNESP); Botucatu, 18618-000, SP, Brazil. Received December 6, 2007; accepted April 2, 2008; published online April 4, 2008

Coumarins represent an important class of phenolic compounds with multiple biological activities, including inhibition of lipid peroxidation and neutrophil-dependent anion superoxide generation, anti-inflammatory and immunosuppressor actions. All of these properties are essential for that a drug may be used in the treatment of inflammatory bowel disease. The present study examined intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and its derivative, the 4-hydroxycoumarin on experimental ulcerative colitis in rats. This was performed in two different experimental settings, *i.e.* when the colonic mucosa is intact or when the mucosa is in process of recovery after an initial insult. The results obtained revealed that the coumarin and 4-hydroxycoumarin, at doses of 5 and 25 mg/kg, significantly attenuated the colonic damage induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) in both situations, as evidenced macroscopically, microscopically and biochemically. This effect was related to an improvement in the colonic oxidative status, since coumarin and 4-hydroxycoumarin prevented the glutathione depletion that occurred as a consequence of the colonic inflammation.

Key words coumarin; 4-hydroxycoumarin; rat colitis; colitis relapse

Inflammatory bowel diseases (IBD) refer essentially two different but closely related conditions, ulcerative colitis and Crohn's disease. These disorders are characterized by increase influx of neutrophils and increased production of inflammatory mediators.¹⁾ Although IBD etiology is poorly understood, there is evidence that it involves immune, genetic and environmental factors, which is related to the initiation and progression of colitis.^{2,3)} These are probably related to an abnormal exacerbated immune response to otherwise innocuous stimuli which is not properly abrogated by the feedback system that normally downregulates the mucosa response to luminal factors.⁴⁾ As a consequence, increased numbers of inflammatory cells are found in areas of intestine with chronic inflammation, resulting in an overproduction of variety of proinflammatory mediators, such as eicosanoids, platelet activating factor, cytokines and reactive oxygen and nitrogen metabolites.^{1–3)} The oxidative stress through an excessive release of reactive oxygen species (ROS) has been proposed to play a key role in IBD pathogenesis.^{6,7)} Considering this, the use of antioxidant compounds may be useful in limiting damage in IBD. In fact, it has been proposed that antioxidant activity may be responsible for the beneficial effects showed by 5-aminosalicylate derivatives in human IBD.⁸⁾

The actual therapeutic treatments of IBD include drugs, such as 5-aminosalicylic acid derivatives, systemic or local glucocorticoids and anti-TNF agents that exert beneficial effects through a combination of different mechanisms which result in the down-regulation of the exacerbated immune response that characterizes these diseases. However, the characteristics of this inflammatory process imply the use of these drugs during prolonged time periods, and unfortunately, these drugs are not devoid of potentially serious side effects which limit their use.⁹⁾ For this reason, the development of new drug treatments that combine efficacy and safety is an important goal in IBD therapy.

Previous studies have shown the beneficial effects of different antioxidant compounds in experimental models of rat colitis, including flavonoids like quercitrin, rutoside, morin, diosmin and hesperidin,¹⁰⁾ vitamin E¹¹⁾ and tempol.¹²⁾ Recently, a natural antioxidant isocoumarin displaying chemical features similar those of flavonoids has been its protective effects described in a model of rat colitis.¹³⁾ In fact, similarly to flavonoids and isocoumarin, several coumarins showed antioxidant activity and represents a potential active compounds class for IBD prevention or treatment, but none studies with these compounds were performed in experimental models of colitis. The coumarins (also known as benzopyrones) consist of fused benzene and α -pyrone rings and form a large class of phenolic compounds. It is present in plants, fungi and bacteria,¹⁴⁾ and has been reported to have many biological activities without evidence of toxicity,¹⁵⁾ including reduction of tissue oedema and inflammation.¹⁶⁾ In addition, coumarin and two of its mono-hydroxylated derivatives (4-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin) inhibit prostaglandin biosynthesis.¹⁷⁾

Considering the data above, it is plausible that the coumarin and its derivative, the 4-hydroxycoumarin, may be helpful in intestinal diseases treatment due its anti-inflammatory action. This prompted us to investigate the effects of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the experimental model of rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS), a rat model of intestinal inflammation that has some histological and biochemical features of the human disease.¹⁸⁾ For this purpose, we assayed the effects of coumarin and its derivative 4-hydroxycoumarin in preventing the acute inflammatory response induced by TNBS in two different experimental setting, *i.e.* when the colonic mucosa is intact or when the mucosa is healing after an initial insult.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: ldistasi@ibb.unesp.br

MATERIALS AND METHODS

Drugs Preparation Coumarin and 4-hydroxycoumarin (Fig. 1) and sulphasalazine were provided by Sigma Chemical and suspended in sunflower oil. It was prepared freshly each time for animal administration.

Animals Male Wistar rats (180–200 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the São Paulo State University (UNESP-Botucatu) were housed in makrolon cages (4 rats per cage) and maintained in air-conditioned animal quarters with a 12 h light–dark cycle and air-filtration. Animals had free access to water and food (Bio Base). The study was carried out in accordance with “Guide for the care and use of laboratory animals” as promulgated by the Animal Experimental Committee of the São Paulo State University.

Experimental Design Colitis was induced by the method originally described by Morris *et al.*¹⁸ Animals were fasted overnight and anaesthetized with halothane. Under anesthesia, they were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. Rats from the non-colitic (normal) group received 0.25 ml of phosphate buffered saline. Two different protocols were followed:

Acute Colitis: Rats were given 2.5, 5, 10, 25 and 50 mg/kg per day of coumarin, 5, 10, 25 and 50 mg/kg per day of 4-hydroxycoumarin orally and 25 mg/kg per day of sulphasalazine for 3 d before colitis induction as well as 2 and 24 h thereafter. Coumarin, 4-hydroxycoumarin and sulphasalazine were administered by means of an esophageal catheter (volume: 5 ml/kg). Rats from non-colitic and non-treated colitic groups (TNBS-control group) were orally administered with vehicle. Animals from all groups ($n=8$) were killed 48 h after colitis induction by an overdose of halothane.

Colitis Relapse: In this protocol, colitis was firstly induced with 10 mg of TNBS in 50% ethanol, as described previously, and after 14 d animals were given a second dose of 10 mg of TNBS in an attempt to mimic the relapses common in human IBD. The animals were divided in six groups; four groups were daily orally treated with 5 or 25 mg/kg of coumarin or 4-hydroxycoumarin dissolved in sunflower oil, one group received instead 25 mg/kg of sulphasalazine sus-

pended in the same vehicle, where as the remaining group received vehicle (5 ml/kg sunflower oil). Treatments started 2 h after the first administration of TNBS and continued until the day before the animals were killed. Two additional groups were included for reference: a non-colitic group and a colitic group, receiving the latter only the first dose of TNBS (TNBS-control group without relapse), both groups were given the vehicle (5 ml/kg sunflower oil) orally. Animals from each group ($n=8$) were sacrificed after 1, 2 or 3 weeks of the colitis induction, whereas all animals from the colitic control group without relapse were sacrificed after 3 weeks.

Assessment of Colonic Damage Animal body weights, occurrence of diarrhea (as detected by perianal fur soiling) and total food intake for each group were recorded daily. The animals were euthanized by an overdose of halothane, the colonic segments were obtained after laparotomy and the eventual occurrence of adhesions between the colon and adjacent organs was noted. They were placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper, and the colon was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The colon was longitudinally opened and scored for macroscopically visible damage on a 0–10 scale by two observers unaware of the treatment, according to the criteria described by Bell *et al.*¹⁹ (Table 1). The colon was subsequently divided longitudinally into different pieces to be used for the biochemical determinations: myeloperoxidase (MPO) activity, alkaline phosphatase (AP) activity and total glutathione (GSH) content.

MPO activity was measured according to the technique described by Krawisz *et al.*²⁰ Samples were suspended in 1 ml of 50 mM phosphate buffer incorporating 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (pH=6.0), and minced with scissors for 15 s on ice-cold plate. The resultant suspension was subsequently diluted to a final 1:20 w/v ratio and homogenized for 1 min with an automatic Heidolph homogenizer, sonicated for 10 s and subjected to three freeze-thaw cycles. The homogenates were then centrifuged at 7000 *g* and 4 °C for 10 min, and the supernatants were assayed for MPO activity. The results are expressed as MPO units per gram of wet tissue.

AP activity was measured spectrophotometrically, using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mM) as substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mM $MgCl_2$ (pH=10.5).²¹ Results are expressed as mU per milligram of protein.

Total GSH content was quantified with the recycling assay described by Anderson.²² Samples were thawed, minced, diluted 1:20 (w/v) in ice-cold 5% (w/v) trichloroacetic acid and homogenized. The homogenates were centrifuged at 7000 *g* for 15 min at 4 °C, and the supernatants were used to quantify glutathione content. The results are expressed as

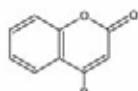


Fig. 1. Chemical Structure of Coumarin (R=H) and 4-Hydroxycoumarin, R=OH

Table 1. Criteria for Assessment of Macroscopic Colonic Damage

Score	Criteria
0	No damage
1	Hyperemia, no ulcers
2	Linear ulcer with no significant inflammation
3	Linear ulcer with inflammation at one site
4	≥2 sites of ulceration/inflammation
5	≥2 major sites of ulceration and inflammation or one site of ulceration/inflammation extending >1 cm along the length of the colon
6–10	If damage covers >2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional centimeter of involvement

Table 2. Effects of Coumarin (2.5, 5, 10, 25, 50 mg/kg), 4-Hydroxycoumarin (5, 10, 25, 50 mg/kg) and Sulphasalazine (25 mg/kg) Treatment on Damage Score, Extension of Lesion, Changes in Colonic Weight and Incidence of Diarrhoea in Acute TNBS Colitis

Group	Damage score ^{a)} (0–10)	Extension of lesion ^{b)} (cm)	Colonic weight ^{b)} (mg/cm)	Diarrhoea (%)
Non-colic	0***	0**	74.33±3.29**	0.0
TNBS-Control	8 (7–10)	4.90±0.18	144.00±6.45	80**
Coumarin, 2.5 mg/kg	7 (6–8)**	3.87±0.33**	150.96±9.20**	100.0**
Coumarin, 5 mg/kg	6.5 (5–8)**	3.30±0.56**	129.71±4.15**	17.0*
Coumarin, 10 mg/kg	7.5 (6–9)**	4.15±0.50**	153.34±12.90**	83.0**
Coumarin, 25 mg/kg	6 (2–8)**	2.30±0.81**	116.71±10.95**	50.0**
Coumarin, 50 mg/kg	7 (6–9)**	3.92±0.39**	143.28±6.27**	83.0**
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	7 (1–8)**	3.08±0.64**	128.01±7.38**	83.0**
4-Hydroxycoumarin, 10 mg/kg	6 (3–9)**	3.02±0.80**	124.20±6.27**	67.0**
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	4.5 (0–7)**	1.98±0.72**	97.44±10.10**	67.0**
4-Hydroxycoumarin, 50 mg/kg	6.5 (2–9)**	3.25±0.80**	129.30±11.97**	34.0*
Sulphasalazine, 25 mg/kg	6 (2–10)**	2.39±0.36**	130.10±8.57**	80**

a) Score data are expressed as median (range). b) Colonic weight data are expressed as mean±S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. TNBS control group, + $p<0.05$, ++ $p<0.01$ vs. non-colic group.

Table 3. Effects of Coumarin (2.5, 5, 10, 25, 50 mg/kg), 4-Hydroxycoumarin (5, 10, 25, 50 mg/kg) and Sulphasalazine (25 mg/kg) Treatment on Glutathione (GSH) Content, Myeloperoxidase (MPO) Activity and Alkaline Phosphatase (AP) Activity in Acute TNBS Colitis

Group	GSH content (nmol/g tissue)	MPO activity (U/g tissue)	AP activity (mU/mg protein)
Non-colic	2120.79±92.82**	93.37±5.83**	6.24±0.64**
TNBS-Control	1177.25±40.49	653.49±80.99	17.03±1.31
Coumarin, 2.5 mg/kg	1234.65±60.60**	600.02±121.50*	15.28±1.14**
Coumarin, 5 mg/kg	2006.76±170.56**	386.39±69.31*	8.19±0.89**
Coumarin, 10 mg/kg	1155.14±30.89**	772.42±186.60**	12.09±1.87
Coumarin, 25 mg/kg	1354.85±82.21**	532.32±178.54*	13.59±3.52*
Coumarin, 50 mg/kg	1272.26±63.27**	624.96±153.08**	10.33±0.82*
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	1727.90±189.25**	397.00±94.97	9.54±1.14**
4-Hydroxycoumarin, 10 mg/kg	1604.39±135.40**	437.83±98.23*	11.40±2.43*
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	1727.98±154.86**	284.03±78.19*	9.60±1.71**
4-Hydroxycoumarin, 50 mg/kg	1314.05±107.75**	549.52±180.5**	11.93±1.34*
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1594.57±63.96**	391.34±59.29**	13.87±1.23**

Data are expressed as mean±S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. TNBS control group, + $p<0.05$, ++ $p<0.01$ vs. non-colic group.

nanomoles per gram wet tissue.

Additional *in vitro* experiments were performed in order to test the antioxidant activity of different concentrations of coumarin and 4-hydroxycoumarin (1–100 μ M). This was evaluated by inhibition of induced lipid peroxidation in rat brain membrane, as described previously by Gálvez *et al.* (23) with some modifications. The flavonoid quercetin was used as reference and tested in the same assay system.

Histological Analysis In the acute colitis protocol, representative whole gut specimens were taken from a region 2 cm above the inflamed region of the colon. The samples were fixed in ALFAC solution (80% alcohol, acetic acid and formaldehyde) for 24 h at 4 °C. Then the samples were routinely processed for embedding in paraplast, cut into 7 μ m-thick sections and put into histological slides. These sections were stained with Hematoxylin–Eosin (HE). After staining, slides were analyzed and photomicrography with a Leica microscope, associated with Leica Qwin Software (Leica-England).

Statistics Analysis Results are expressed as mean±S.E.M. differences between means were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* least significance tests. Nonparametric data (score) are expressed as median (range) and were analyzed with the Mann–Whitney *U* test. Differences between proportions were analyzed with χ^2 test. Statistical significance was

set at $p<0.05$.

RESULTS

Acute Colitis Intracolonic administration of TNBS resulted in colonic inflammation, which was evidenced after 48 h with severe necrosis of the mucosa, typically extending 1.98–4.90 cm along the colon, bowel wall thickening and hyperaemia (Table 2). This inflammatory process was associated to an increase of colonic weight/length ratio and to a reduction in food intake (data not shown) when compared to non-colic rats and to signs of diarrhea in 80% of the colitic animals (Table 2). In consequence, a significant reduction in body weight was observed in colitic animals (12.2±3.1% weight loss vs. 5.2±0.7% weight gain in non-colic rats, $p<0.05$). The colonic damage was biochemically characterized by a 7-fold increase in colonic MPO activity, as an index of neutrophil infiltration, and by a 3-fold increase in phosphatase alkaline (AP) activity and significant colonic glutathione depletion (Table 3), both as consequence of the oxidative stress that place in the inflamed colon.

Coumarin showed a beneficial preventative effect in colitic rats, as evidenced by reduction in the macroscopic damage score value in comparison with non treated colitic group at dose of 25 mg/kg (Table 2), but these effect was not related to counteract GSH content and, MPO and AP activities

(Table 3). However, it is important to note that coumarin at dose of 5 mg/kg was able to reduced extension of lesion and counteracted GSH content, as well as to reduced MPO and AP activities. In the same set of acute experiments, pre-treatment with 4-hydroxycoumarin at dose of 10 and 25 mg/kg reduced damage score and extension of lesion (Table 2), as well as counteracted GSH content and reduced AP activity. In addition, pre-treatment with 5 mg/kg of 4-hydroxycoumarin produced significant effects on biochemical parameters, particularly reducing AP activity and counteracting GSH content (Table 3). These results prompt us to select both doses for test in the chronic with relapse protocol. Coumarin (2.5, 50 mg/kg) and 4-hydroxycoumarin (50 mg/kg) was ineffective.

The histological studies confirmed the beneficial effect of coumarin and 4-hydroxycoumarin (Fig. 2). In this effect, samples from colitic animals treated with 5 and 25 mg/kg of coumarin and 4-hydroxycoumarin showed an good recovery of the intestinal cytoarchitecture, characterized by a restoration of the epithelial cell layer accompanied by the presence of goblet cells in straight tubular gland and normal quantity number of cells.

Sulphasalazine treatment of colitic rats, at the dose of 25 mg/kg, showed a preventative effect in acute colitis evidenced by reduction of damage score and extension of lesion (Table 2). This effect was associated to a reduction in MPO and AP activities (Table 3). In addition, sulphasalazine treatment was able to counteract the glutathione depletion that occurs subsequently to the inflammation process (Table 3).

Chronic Colitis The inflammatory process induced by intracolonic instillation of 10 mg of TNBS in 50% ethanol (v/v) progressed in time with similar characteristics those previously reported by Di Stasi *et al.*¹³⁾ Thus, the colonic damage was maximal at first week and decreased gradually over time during the following two weeks, although the colonic segments still appeared macroscopically ulcerated and inflamed, with a concomitant increase in the colonic weight/length ratio and extension of lesion (Table 4). The progress of the inflammatory process was also observed biochemically since MPO and AP activities were maximally increased 7 d after first TNBS instillation compared to non-colitic animals and decreased with the time (Table 5). These results were also associated by a significant reduction in colonic glutathione content evidenced in all weeks of evaluation (Table 5).

Colitic relapse was induced with a second dose of 10 mg of TNBS in 50% ethanol intracolonic administered two weeks after first administration. One week after this second instillation of TNBS, a reactivation of the colonic inflammatory process was observed, as evidenced by a significant increase of the macroscopic damage score, extension of lesion and weight/length ratio (Table 4) when compared to the normal evolution of colonic damage in those animals that did not receive the second dose of TNBS (control without relapse). Indeed, an alteration of the colonic absorptive function was noted since 75% of rats displayed evident signs of diarrhea, as opposed to those without relapse that had no diarrhea (Table 4). Similarly, reactivation of the intestinal inflammatory process was associated with a colonic oxidative insult because glutathione content was also depleted in these animals when compared with animals without relapse (Table

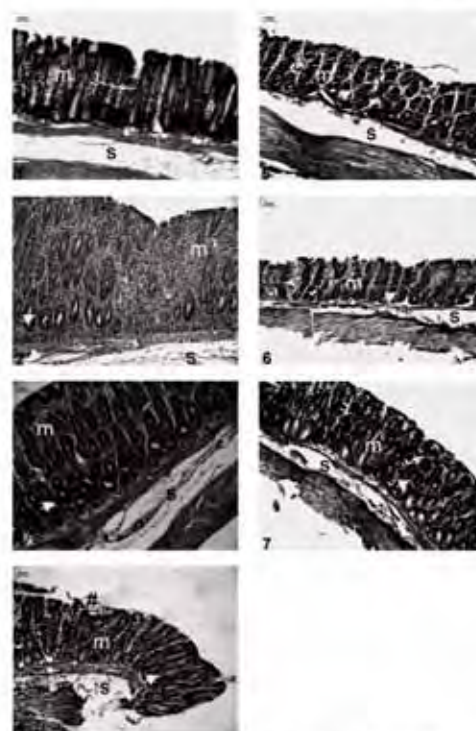


Fig. 2. Photomicrography of Colon of Different Groups: (1) Non-colitic; (2) TNBS-Control; (3) Sulphasalazine; (4) Coumarin, 5 mg/kg; (5) Coumarin, 25 mg/kg; (6) 4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg; (7) 4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg

In (1) observed numerous straight tubular gland (arrow) with a lot numbers of goblet cells, the lumen epithelium was intact at typical morphology. In (2) the tubular gland were minor with the narrowing of lumen and the goblets cells was not frequently in wall of gland, the mucosa of colon was dilated and there were many lymphocytes in lamina propria (arrow). In (3) the tubular gland (arrow) with normal dilation of lumen and the low numbers of goblets cells, and there were lymphocytes cells in lamina propria, but this area was small than compared with TNBS-control group. In (4) the showed the little scale of lumen (H), the tubular glands (arrow) was intact with goblet cells, the lamina propria was normal. In (5) showed the intact epithelium, but the tubular glands (arrow) were disorganized and the absent of goblet cells. In (6) the mucosa showed the disrupt lumen epithelium and the thickness were reduced, the glands (arrow) were the straight but the goblets cells not occurs, submucosa was reduction of thickness. In (7) showed the conserved epithelium, with goblet cells in straight tubular gland (arrow) and normal quantity number of cells, the submucosa showed the severe edema. m=mucosa and s=submucosa.

5).

Administration of 5 mg/kg of coumarin to colitic animals reduced damage score and extension of lesion at the first and second weeks, but this treatment did not prevent the colitic animals from impact of the colitic relapse as evidenced macroscopically (Table 4). On the other hand, both doses of coumarin were able to counteract GSH content at the third week (Table 5). In the same set of experiments, administration of 5 and 25 mg/kg of 4-hydroxycoumarin was able to reduce damage score and extension of lesion at the first and second week, as well as prevents colitic animals from impact of the colitic relapse (Table 4). These effects were accompanied by counteraction of GSH content at the second and third weeks (Table 5).

Table 4. Effects of Coumarin (5, 25 mg/kg), 4-Hydroxycoumarin (5, 25 mg/kg) and Sulphasalazine (25 mg/kg) Treatment on Damage Score, Extension of Lesion, Changes in Colonic Weight and Incidence of Diarrhoea in Reactivated TNBS Colitis

Group	Damage score ^a (0–10)	Extension of lesion ^b (cm)	Colonic weight ^b (mg/cm)	Diarrhoea (%)
1 week				
Non colitic	0***	0**	84.14±1.22**	0
TNBS-Control	6 (5–7)	2.98±0.49	180.04±7.63	75 ⁺⁺
Coumarin, 5 mg/kg	1 (0–6)*	0.93±0.42**	160.95±14.8 ⁺⁺	83 ⁺⁺
Coumarin, 25 mg/kg	5.5 (1–6) ⁺⁺	1.65±0.37* ⁺⁺	190.31±34.7 ⁺⁺	83 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	0.5 (0–2)**	0.35±0.16**	140.00±7.99	83 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	3 (1–7)**	1.77±0.73 ⁺	292.91±71.5 ^{***,++}	83 ⁺⁺
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1 (0–3)**	0.56±0.20**	130.17±4.72 ^{***,++}	50 ⁺
2 weeks				
Non colitic	0***	0**	86.32±3.85**	0
TNBS-Control	4.5 (4–6)	1.16±0.17	132.49±6.81	25 ⁺
Coumarin, 5 mg/kg	1 (0–4)*	0.33±0.33*	121.38±7.50 ⁺⁺	33 ⁺
Coumarin, 25 mg/kg	1 (0–4)*	0.25±0.25*	138.51±10.9 ⁺⁺	33 ⁺
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	0.5 (0–1)***	0**	124.56±6.22	33 ⁺
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	0 (0–4)*	0.41±0.26**	165.98±34.4 ⁺⁺	50 ⁺
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1.5 (0–3)**	0.73±0.29	136.73±3.23 ⁺⁺	0 ⁺
3 weeks				
Non colitic	0***	0** [#]	78.99±3.40**	0
TNBS-Control with relapse	4 (3–9)	1.60±0.29	137.89±6.70	75 ⁺
TNBS-Control without relapse	1 (1–1)*	0.60±0.23**	106.98±3.45 ^{***,++}	0
Coumarin, 5 mg/kg	4 (1–5) ⁺⁺	1.72±0.30 ^{++,#}	135.15±8.42 ⁺⁺	83 ⁺⁺
Coumarin, 25 mg/kg	2.5 (1–5) ⁺⁺	1.05±0.32 ⁺	176.95±28.7 ^{++,#}	100 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	0.5 (0–1)***	0.67±0.33*	143.30±7.73 ⁺⁺	83 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	0.5 (0–6)**	0.50±0.50*	152.42±28.1 ^{++,#}	83 ⁺⁺
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1 (0–3)*	0.26±0.15**	131.68±5.38 ^{++,#}	50 ⁺

a) Score data are expressed as median (range). b) Colonic weight data are expressed as mean±S.E.M. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 vs. control group; +*p*<0.05, ++*p*<0.01, +++*p*<0.001 vs. non-colitic group; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs. control without relapse group.

Table 5. Effects of Coumarin (5, 25 mg/kg), 4-Hydroxycoumarin (5, 25 mg/kg) and Sulphasalazine (25 mg/kg) Treatment on Glutathione (GSH) Content, Mieloperoxidase (MPO) Activity and Alkaline Phosphatase (AP) Activity in Reactivated TNBS Colitis

Group	GSH content (nmol/g tissue)	MPO activity (U/g tissue)	AP activity (mU/mg protein)
1 week			
Non colitic	1714.10±62.14**	67.05±5.82**	4.77±0.43**
TNBS-Control	1141.04±75.21	815.50±159.6	15.94±2.43
Coumarin, 5 mg/kg	939.54±108.9 ⁺⁺	812.99±213.3 ⁺⁺	12.95±2.09 ⁺
Coumarin, 25 mg/kg	1441.81±108.9 ⁺⁺	1093.19±183.6 ⁺⁺	19.37±2.33 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	1378.22±109.7	379.09±39.79*	14.32±0.78 ⁺⁺
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	1097.92±144.1 ⁺⁺	969.22±201.7 ⁺⁺	16.89±2.62 ⁺⁺
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1783.03±172.2**	457.23±71.57* ⁺	11.01±0.87 ⁺
2 weeks			
Non colitic	2123.19±96.81**	56.48±2.90**	3.76±0.29**
TNBS-Control	1547.65±33.42	85.70±3.73	7.14±0.33
Coumarin, 5 mg/kg	1764.99±188.8	81.13±11.1	6.35±1.95
Coumarin, 25 mg/kg	1835.32±166.1	66.47±9.30	6.68±1.06
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	2416.25±209.8**	66.60±12.78	5.76±1.10
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	2320.77±148.4**	119.04±33.19 ⁺⁺	6.97±1.55
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1933.06±111.3*	68.55±10.2	5.65±0.46* ⁺
3 weeks			
Non colitic	2136.99±37.45**	60.43±4.20**	3.66±0.29**
TNBS-Control with relapse	1634.57±84.07	195.33±37.8	6.66±0.41
TNBS-Control without relapse	2121.66±38.82**	100.94±6.83	4.52±0.24
Coumarin, 5 mg/kg	2080.03±154.7**	230.02±41.6 ^{++,#}	5.13±0.46
Coumarin, 25 mg/kg	2001.74±90.04*	201.21±37.8 ⁺⁺	5.74±0.70 ⁺
4-Hydroxycoumarin, 5 mg/kg	2082.88±186.3**	127.44±17.78	6.60±0.62
4-Hydroxycoumarin, 25 mg/kg	2153.19±114.5**	135.43±21.58	6.68±1.61 ⁺
Sulphasalazine, 25 mg/kg	1906.81±47.99* ⁺	136.95±16.13	5.06±0.64

Data are expressed as mean±S.E.M. **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. control group; +*p*<0.05, ++*p*<0.01 vs. non-colitic group; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs. control without relapse.

Sulphasalazine treatment of colitic rats, at the dose of 25 mg/kg, also showed a preventative effect in the colitis relapse induced by the second administration of TNBS, evidenced by reduction of damage score and extension of lesion (Table 4). Biochemically, sulphasalazine treatment was able

to counteract the glutathione depletion that occurred one week after the second administration of TNBS; however, no significant modifications were observed on MPO and AP activities in comparison with the corresponding control animals (Table 5).

The *in vitro* antioxidant experiments performed showed that coumarin and 4-hydroxycoumarin did not exert a concentration-dependent inhibitory effect on the lipid peroxidation induced in rat liver membranes.

DISCUSSION

Colitis induced by intracolonic instillation of TNBS manifests many of the histological and clinical features of colonic inflammatory bowel disease.¹⁸⁾ This model of colonic ulceration and transmural inflammation of the mucosa²⁴⁾ has been employed to study the pathogenesis of colonic inflammation and to investigate potential treatments of IBD.

The present study shows the preventative effect exerted by coumarin and 4-hydroxycoumarin in ameliorating the colonic insult induced after intracolonic administration of TNBS/ethanol to rats in two different experimental conditions. In the first approach, the preventative intestinal anti-inflammatory activity of coumarin (5, 25 mg/kg), 4-hydroxycoumarin (5, 10, 25 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) was evidenced macroscopically by reducing the extent and severity of the colonic lesions in the acute phase of the inflammatory process induced by TNBS/ethanol. Oral administration of sulphasalazine and of coumarin did not decrease the colonic weight/length ratio. The lack of an effect on this ratio can be explained based on the severe and too extensive colonic damage induced by TNBS/ethanol, which is difficult to overcome by pharmacological treatment as has been previously suggested.²⁵⁾ On the other hand, the preventative effect of 4-hydroxycoumarin (25 mg/kg) in the acute colitis was associated with decrease of the colonic weight/length ratio. The anti-inflammatory activity of coumarin (5, 25 mg/kg) and 4-hydroxycoumarin (50 mg/kg) in the acute colitis was also related to decrease of the incidence of diarrhoea, thus indicating a restoration of the absorptive ability of the colon which is profoundly altered as a consequence of the inflammatory process.²⁶⁾ The sulphasalazine (25 mg/kg) did not decrease the incidence of diarrhoea from colitic animals, as demonstrated by Gálvez *et al.*²⁷⁾ These beneficial effects of coumarin (5 mg/kg) and 4-hydroxycoumarin (25 mg/kg) were also confirmed biochemically by measurement of MPO activity in the damaged colon. MPO, an enzyme predominantly found in the azurophilic granules of neutrophils, is a biochemical marker of neutrophil infiltration, and its activity measurement has been widely used to detect intestinal inflammatory process.^{28,29)} Reduction of this enzyme activity can be interpreted as a manifestation of the anti-inflammatory property of a given compound.²⁵⁾ Colonic tissue MPO activity, markedly elevated in TNBS control animals, was significantly decreased in rats pretreated with coumarin (5 mg/kg) and 4-hydroxycoumarin (25 mg/kg), suggesting an anti-inflammatory activity of these coumarins.

Human IBD is characterized by an increased expression of markers of differentiation³⁰⁾ and AP has been considered a phenotypic marker of differentiation, which is up-regulated, in experimental chronic diarrhea.²³⁾ Moreover, the colonic tissue AP activity has been used to differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis, because their AP enzymatic activity to be higher than Crohn's disease.³¹⁾ In the present study it was observed a higher AP activity in the colon from colitic animals compared to the non-colitic animals from

acute intestinal inflammation model induced by TNBS/ethanol, as well as demonstrated by Cruz *et al.*³²⁾ The intestinal anti-inflammatory effect of coumarin (5, 50 mg/kg), 4-hydroxycoumarin (5, 10, 25 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) was evidenced also by the significant reduction of the AP enzymatic activity compared to control animals.

Oxygen reactive species (ROS) have been proposed to play a key role in the pathophysiology of intestinal inflammation.³³⁾ The main sources of reactive oxygen metabolites in the inflamed mucosa are activated phagocytic leukocytes, capable of producing superoxide and a cascade of various species leading to a very reactive hydroxyl radical and peroxide. The xanthine oxidase pathway in colonocytes also produces superoxide anion by conversion of xanthine/hypoxanthine to uric acid. A third possible source is the oxidation of arachidonic acid either through the lipoxygenase reaction, producing leukotrienes, or the prostaglandin generating cyclooxygenase reaction.³⁴⁾ GSH plays a key role in controlling the redox state of the cell through several mechanisms, including scavenging of ROS and keeping the enzyme GSH peroxidase in a reduced state.³⁵⁾ Decreased GSH levels, which are indicative of oxidant stress, have been detected in human³⁶⁾ and experimental colitis.^{13,37,38)} Indeed, it has been reported that GSH supplementation improved oxidative damage in TNBS colitis.³⁹⁾ Pretreatment with coumarin (5 mg/kg) and 4-hydroxycoumarin (5, 10, 25 mg/kg) in the acute phase of the inflammatory process induced by TNBS/ethanol, protected against colonic GSH depletion and restored the levels toward the normal value. This counteraction on colonic GSH depletion may be related to the action of these compounds as inhibitors of prostaglandin biosynthesis,¹⁷⁾ since one of the sources of production of free radicals is the oxidation of arachidonic acid either through the lipoxygenase or cyclooxygenase reactions.³⁴⁾ The intestinal anti-inflammatory effect was evidenced microscopically, since treated rats showed a good preservation in the colonic cytoarchitecture compared to the corresponding control group.

In the acute phase of colonic inflammatory process, the protective effects of coumarin and 4-hydroxycoumarin were not dose-dependent. Several polyphenolic compounds, particularly flavonoids, also shown non dose-dependent response in TNBS model of rat colitis, probably due to produce in lower doses antioxidant effects and higher doses pro-oxidant effects.^{13,37,40–42)} In addition, several phenols have a dual effect on prostaglandin H synthase, with low concentrations stimulating and high concentrations inhibiting this enzyme.⁴³⁾ Phenols stimulate prostaglandin H synthase by acting as reducing substrates for the oxidized intermediates of prostaglandin biosynthesis, thereby accelerating the peroxidase cycle and by functioning as electron-donating co-substrates for the peroxidase component of prostaglandin synthase. Phenols inhibit the cyclooxygenase-2 activity by competing for the arachidonic acid-binding site and by competitive reduction of prostaglandin H synthase.⁴⁴⁾ Since coumarins are polyphenolic compounds with important effects on oxidative stress and ulcerative colitis is mediated by reactive oxygen species, it is possible that these class of natural substances produces dual effects. On the other hand, inflammation is a multicomponent system that involves a network of cellular crosstalk and control. However, the anti-inflammatory effect produced by both coumarins will be re-

lated to distinct mechanisms of action of these compounds on distinct inflammatory mediators.

The model of colitis by intracolonic instillation of TNBS has some limitations given that once TNBS has been administered intracolonic the inflammatory status resolves spontaneously with time until complete healing of the colonic mucosa, and this is not the situation in human IBD. However, Gálvez *et al.*⁴⁵ has reported a model of reactivated colitis similar to the protocol used in the present study.

The second intracolonic administration of TNBS effectively resulted in a reactivation of the colonic inflammatory response, as evidenced by the alteration in all the macroscopic and biochemical parameters of inflammation evaluated when compared with animals without relapse. The results demonstrated that oral administration of coumarin (5 mg/kg) after colitis induction significantly reduced macroscopic colonic damage score and extension of lesion at one and two weeks when compared to the corresponding TNBS-control groups. Moreover, the treatment with 4-hydroxycoumarin was more effective than coumarin, since both the doses studied, reduced the macroscopic colonic damage score and the extension of lesion at one and two weeks and prevented the macroscopic damage caused by the second dose of TNBS, similar to oral administration of sulphasalazine. The oral administration of coumarin (5 mg/kg) did not prevent the macroscopic damage in the relapse induced by second dose of TNBS. These beneficial effects of 4-hydroxycoumarin (25 mg/kg) and sulphasalazine were associated with decreasing of the colonic weight/length ratio at one week. In addition, these compounds were able to alter the extent of neutrophil infiltration into the colon one week after TNBS administration, as determined by tissue MPO activity reduction. The reduction of neutrophil infiltration seemed to be a consequence of the accelerated healing of colonic ulcers, facilitating the elimination of neutrophil accumulation from the inflamed colon.

Similarly to the acute experimental setting, the anti-inflammatory effect exerted by coumarin and 4-hydroxycoumarin at doses of 5 and 25 mg/kg in chronic colitis was related to protective effect against GSH depletion, including in rats that undergo relapse. These results demonstrate that protection against oxidative insult may play a key role in the chronic anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin.

In conclusion, coumarin and 4-hydroxycoumarin treatment partially prevents the colonic damage induced by TNBS in rats, both when the mucosa is intact and when the mucosa has been previously damaged and is in progress of recovery. This effect may be associated to an improvement on intestinal oxidative stress since treatments were able to inhibit glutathione depletion, but other pharmacological effects of coumarin and its derivative 4-hydroxycoumarin may be involved in this effect. Indeed, the presence of hydroxyl radical at C-4 in molecules of coumarin improves anti-inflammatory effect as evidenced by treatment of colitic animals with 4-hydroxycoumarin, in which produced beneficial effects when colonic mucosa was intact and when the mucosa is healing after initial insult, as well as prevented colitic animals from the impact of the colitic relapse.

Acknowledgements This work was supported by

FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant 03/09324-1 and 06/55209-8) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazilian Ministry of Education, Brazil. We thank the CNPq (Science and Technology Ministry, Brazil) for a fellowship to L.C.Di Stasi.

REFERENCES

- Podolsky D. K., *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **16**, 295–296 (2000).
- Elson C. O., Sartor R. B., Tennyson G. S., *Gastroenterology*, **109**, 1344–1367 (1995).
- Stober W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **859**, 37–45 (1998).
- Fiocchi C., *Gastroenterology*, **115**, 182–205 (1998).
- Katz J. A., Itoh J., Fiocchi C., *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **15**, 291–297 (1999).
- Buffinton G. D., Doe W. F., *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 911–918 (1995).
- Pavlick K. P., Laroux F. S., Fuseler J., Wolf R. E., Gray L., Hoffman J., Grisham M. B., *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 311–322 (2002).
- Grisham M. B., Specian R. D., Zimmerman T. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1114–1121 (1994).
- Stein R. B., Hanauer S. B., *Drug Saf.*, **23**, 429–448 (2000).
- Gálvez J., Sánchez de Medina F., Jimenez J., Zarzuelo A., *Stud. Nat. Prod. Chem.*, **25**, 607–649 (2001).
- González R., Sánchez de Medina F., Gálvez J., Rodríguez-Cabeza M. E., Duarte J., Zarzuelo A., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **71**, 243–250 (2001).
- Cuzzocrea S., McDonald M. C., Mazzon E., Dugo L., Lepore V., Fonti M. T., Ciccolo A., Terranova M. L., Caputi A. P., Thiemermann C., *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 127–137 (2000).
- Di Stasi L. C., Camuesco D., Nieto A., Vilegas W., Zarzuelo A., Gálvez J., *Planta Med.*, **70**, 315–320 (2004).
- Murray R. D. H., Méndez J., Brown R. A., "The Natural Coumarins," John Wiley and Sons, New York, 1982.
- Ergan D., O'Kennedy R., Moran E., Cox D., Prosser E., Thornes R. D., *Drug Metab. Rev.*, **22**, 503–529 (1990).
- Piller N. B., *Br. J. Exp. Pathol.*, **56**, 554–559 (1975).
- Lee R. E., Bykadi G., Ritschel W. A., *Arzneim.-Forsch./Drug*, **31**, 640–642 (1981).
- Morris G. P., Beck P. L., Herridge W., Depew W., Szczeczek M. R., Wallace J. L., *Gastroenterology*, **96**, 795–803 (1989).
- Bell C. J., Gall D. G., Wallace J. L., *Am. J. Physiol.*, **268**, G622–G630 (1995).
- Krawisz J. E., Sharon P., Stenson W. F., *Gastroenterology*, **87**, 1344–1350 (1984).
- Bessey O. A., Lowry O. H., Brook M. J., *J. Biol. Chem.*, **164**, 321–329 (1946).
- Anderson M. E., *Methods Enzymol.*, **113**, 548–555 (1985).
- Gálvez J., de la Cruz J. P., Zarzuelo A., Sánchez de la Cuesta F., *Pharmacology*, **51**, 127–133 (1995).
- Wallace J. L., McKnight W., Asfaha S., *Am. J. Physiol.*, **274**, 802–808, (1988).
- Veljaca M., Lesch C. A., Pllana R., Sanches B., Chan K., Guglietta A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 417–422 (1995).
- Sánchez de Medina F., Gálvez J., Romero J. A., Zarzuelo A., *Life Sci.*, **70**, 3097–3108 (2002).
- Gálvez J., Garrido M., Merlos M., Torres M. I., Zarzuelo A., *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1949–1959 (2000).
- Yamada T., Marshall S., Specian R. D., Grisham M. B., *Gastroenterology*, **102**, 1524–1534 (1992).
- Vilegas I., La Casa C., Orjales A., Alarcón de la Lastra C., *Eur. J. Pharmacol.*, **460**, 209–218 (2003).
- Cooper H. S., Stepelwski Z., *Gastroenterology*, **95**, 686–693 (1989).
- Torres M. I., Lorite P., López-Casado M. A., Rios A., *Pathol. Res. Pract.*, **203**, 485–487 (2007).
- Cruz T., Gálvez J., Crespo E., Ocete M. A., Zarzuelo A., *Planta Med.*, **67**, 94–96 (2001).
- Yamada T., Grisham M. B., Targan S. R., Shanahan F., "Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside," Williams & Wilkins, Baltimore, 1994, pp. 133–150.
- Loguercio C., D'Argenio G., Delle Cave M., Cosenza V., Della Valle

Considerando os efeitos antiinflamatórios intestinais da cumarina e da 4-hidroxicumarina citadas no artigo acima (Luchini *et al.*, 2008), nosso grupo de pesquisa,

posteriormente estudou novos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiinflamatória intestinal destas cumarinas. Foi analisado se a cumarina e a 4-hidroxi-cumarina interferem na síntese de citocinas próinflamatórias envolvidas na colite experimental e humana. Neste sentido foram feitos testes *in vitro* e *ex vivo* utilizando três linhagens de células: Caco2, RAW 264.7 e linfócitos de camundongos, onde foram dosadas IL-8, IL-1 β , IL-2 e INF- γ no sobrenadante destas culturas celulares.

A metodologia e os resultados destes ensaios estão descritos abaixo.

2. Material e Métodos

2.1. Cultivos Celulares

Foram utilizados três tipos de linhagens de células: célula de adenocarcinoma de cólon humano (Caco2), macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e célula de cultivo primário (linfócitos de baço de camundongo Balb'C).

2.1.1. Célula de Adenocarcinoma de Cólon Humano (Caco2)

Como modelo de epitélio intestinal, foi utilizada a linhagem de célula Caco2, que é uma linhagem de célula de adenocarcinoma de cólon humano, a qual foi obtida do Serviço de Cultivos Celulares da Universidade de Granada-Espanha. Estas células foram mantidas a 37° C, com 5 % de CO₂ atmosférico, e cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com L-glutamina (2 Mm), penicilina/estreptomicina (50000 U/L), anfotericina B (2,5 mg/L) e 10% de Soro Fetal Bovino inativado (40 minutos, 56° C). Este meio de cultura foi denominado de DMEM completo.

2.1.2. Macrófago de Camundongo (RAW 264.7)

A linhagem celular RAW 264.7 foi obtida do Serviço de Cultivos Celulares da Universidade de Granada-Espanha. Estas células foram mantidas a 37° C, com 5 % de CO₂ atmosférico, e cultivadas em meio DMEM completo.

2.1.3. Linfócitos de baço (Cultivo Primário)

Após a morte de camundongo Balb'C, o baço foi retirado com cuidado para não remover a membrana externa que o envolve. Em condições estéreis, o baço foi colocado em uma placa de cultivo de 10 cm com 5 ml de meio DMEM suplementado com 1% da mistura de antibióticos (penicilina/estreptomicina), com ajuda de pinças o baço foi pressionado na placa até ficar transparente e todas as células dissolverem no meio. Em seguida, esta solução (meio+células) foi homogeneizada com a ajuda de uma seringa com agulha e colocada em um tubo de 15 ml. Este tudo foi centrifugado 5 minutos a 1500 rpm. O precipitado resultante foi ressuspensionado em 5 ml de tampão (NH₄ Cl 1,7 mol/L, KHCO₃ 0,12mol/L, etilenediamina- tetracético 9mmol/L) por 30 minutos a 4° C, com o objetivo de lisar os eritrócitos. Transcorrido este tempo, a suspensão que contém principalmente linfócitos e macrófagos foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, e em seguida foi adicionado ao precipitado 5 ml de DMEM completo.

2.2. Viabilidade Celular

2.2.1. Caco2 e RAW 264.7

A viabilidade celular da Caco2 e da RAW 264.7 foi testada pela coloração de cristal violeta (Xaus *et al.*, 2001) com algumas modificações. As células foram coradas e fixadas com cristal violeta (0,2%) em etanol (2%) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após 4 lavagens com PBS, as células foram desprendidas com dodecil sulfato de sódio (DSS 1%) durante 30 minutos, posteriormente foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, a intensidade da cor foi quantificada por ELISA a 540 nm. As células não viáveis não são capazes de incorporar o corante em suas membranas (Ishiyama *et al.*, 1996). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

2.2.2. Linfócitos de baço

A viabilidade das células T foi determinada usando o Reagente WST-1 (Roche Diagnostics). Esta técnica consiste em uma determinação colorimétrica da atividade metabólica e da proliferação celular. O sal solúvel (WST-1) forma uma coloração a partir da desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Quanto maior a proliferação, maior a atividade mitocondrial, que implica em uma maior hidrólise do reativo WST-1, resultando em uma coloração que é detectada a 450nm.

Os linfócitos derivados de baço foram cultivados em placas de 24 poços ($1,5 \times 10^6$ célula/poço) em 0,5 ml de célula e estimulados com concanavalina A (Con A) ($5\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas. Transcorrido este tempo foi colocado $5\mu\text{l/poço}$ do reativo WST-1 (Roche) durante 2 horas a 37°C . Em seguida a placa foi agitada por 1 minuto e a intensidade da cor foi quantificada por ELISA a 540 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

2.3. Determinação da Secreção de Citocinas Pró-Inflamatórias

2.3.1. Determinação da secreção de IL-8 pela Caco2

As células foram pré-incubadas durante 24 horas com as cumarinas (cumarina e 4-hidroxi-cumarina) nas concentrações de $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ e em seguida estimuladas com IL- 1β (1 ng/ml). Após 20 horas, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 7000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram acondicionadas no -80°C para determinação dos níveis de IL-8 por ELISA (Biosource International, Nivilles, Belgium). Os resultados foram expressos em concentração de IL-8 (pg/ml).

2.3.2 Determinação da secreção de IL- 1β pela RAW 264.7

A RAW 264.7 (1×10^5 células) foi cultivada em placas de 24 poços na presença ou na ausência de diferentes concentrações das cumarinas ($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$) por 30 minutos antes de serem estimulados com lipopolissacarídeo (LPS 50ng/ml). Após 36 horas, o sobrenadante foi coletado e mantido a -80°C até o momento

de ser realizada a determinação dos níveis de IL-1 β por Kit de ELISA murino (Biosource). Os resultados foram expressos em concentração de IL-1 β (pg/ml).

2.3.3 Determinação da secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos

Os linfócitos (1,5 milhões de células por ml) foram cultivados em placas de 24 poços na presença ou na ausência de diferentes concentrações das cumarinas (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M) por 1 hora antes de serem estimulados com concanavalina A (5 μ g/ml). Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e mantido a -80° C até o momento de ser realizada a determinação dos níveis de IFN- γ e IL-2 por Kit de ELISA murino (Biosource). Os resultados foram expressos em concentração de IFN- γ e IL-2 (pg/ml).

3. Resultados

3.1. Efeitos da cumarina e de seu derivado 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias

O objetivo principal destes ensaios constituiu em analisar os efeitos da cumarina e de seu derivado 4-hidroxi-cumarina sobre a produção de distintos marcadores inflamatórios utilizando diferentes linhagens de células.

Foi analisado também o efeito da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a viabilidade celular, com o objetivo de verificar se os efeitos das cumarinas sobre as citocinas se devem a um efeito antiinflamatório ou a um efeito lesivo (tóxico) sobre as células.

3.1.1 Efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IL-8 pela Caco2

A IL-8 é uma citocina quimiotática que tem um importante papel na resposta inflamatória e é comprovado que as células epiteliais intestinais constituem uma fonte importante desta citocina (McGee, 1999), desta forma foi estudado o papel da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção deste mediador em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco2), a qual foi utilizada como modelo de epitélio intestinal.

A cumarina e a 4-hidroxi-cumarina não são tóxicas para a linhagem celular Caco2 (Figura 1).

A cumarina em todas as concentrações estudadas (1, 10, 50 e 100 μ M) não diminuiu os níveis de IL-8, enquanto a 4-hidroxi-cumarina na concentração de 100 μ M diminui a secreção de IL-8 (35,95% comparado com as células estimuladas com IL-1 β + DMSO) (Figura 2).

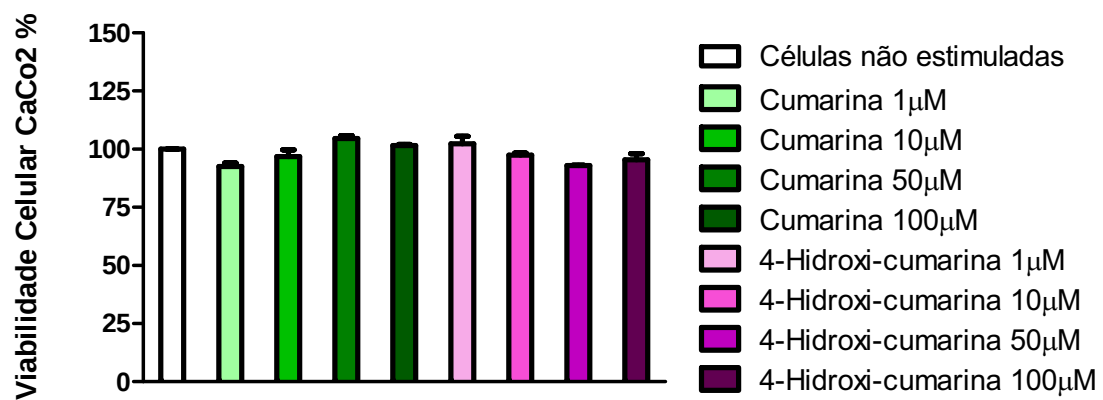


Figura 1: Efeitos da coumarina e da 4-hidroxi-coumarina sobre a viabilidade das células Caco2.

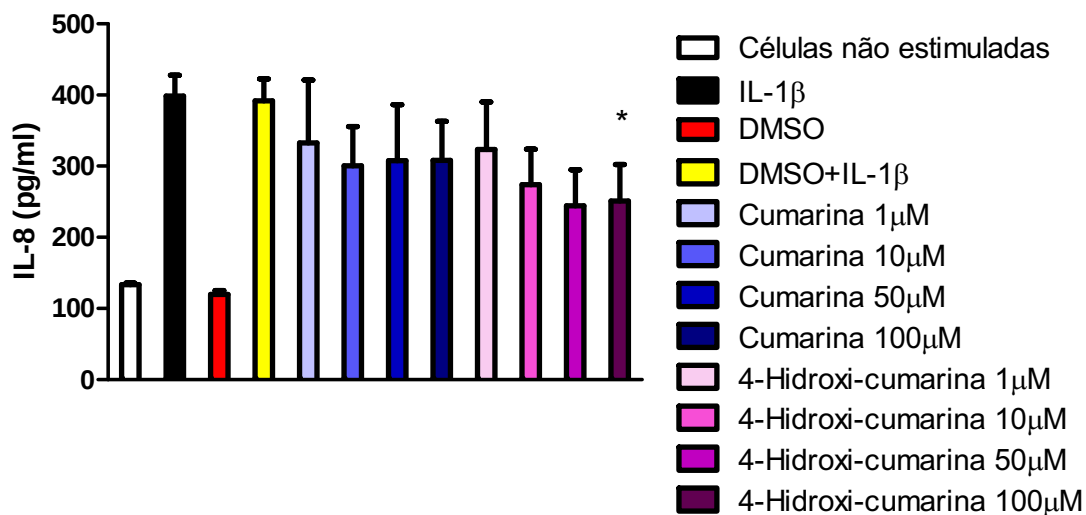


Figura 2: Efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IL-8 pela Caco2 estimulada com IL-1 β (1 ng/ml) durante 20 horas. As concentrações de IL-8 do sobrenadante da cultura de Caco2 foram analisadas por ELISA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle DMSO+IL-1 β (N = 3 experimentos).

3.1.2. Efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IL-1 β pela RAW 264.7

Os macrófagos são importantes na fisiopatologia da DII (Leon *et al.*, 2006). Estas células secretam várias citocinas próinflamatórias, como por exemplo, a IL-1 β . No processo inflamatório intestinal esta citocina encontra-se elevada (Sartor, 1997).

A estimulação de RAW 264.7 com LPS (50 ng/ml) induziu a secreção de IL-1 β .

As cumarinas em todas as concentrações estudadas não foram tóxicas para os macrófagos (Figura 3).

A 4-hidroxi-cumarina na concentração de 100 μ M diminuiu a secreção de IL-1 β pelos macrófagos (38,72% comparado com as células estimuladas com LPS+DMSO), todavia a cumarina não diminuiu a secreção de IL-1 β (Figura 4).

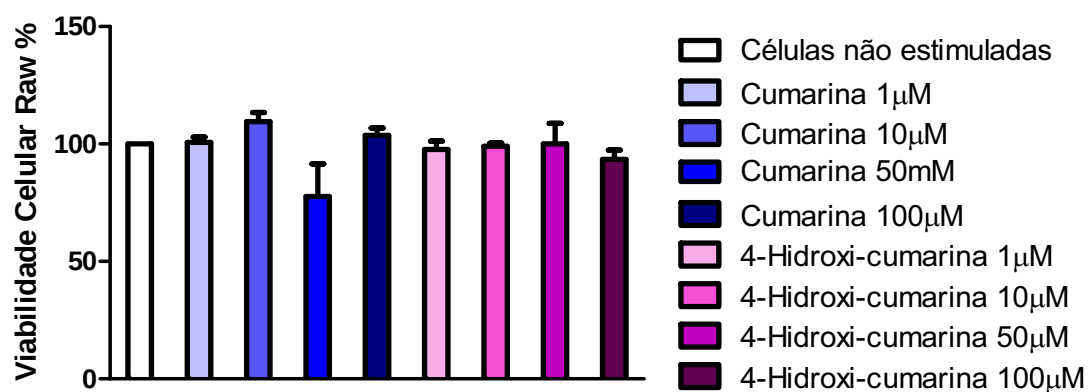


Figura 3: Efeitos da coumarina e da 4-hidroxi-coumarina sobre a viabilidade de RAW 264.7.

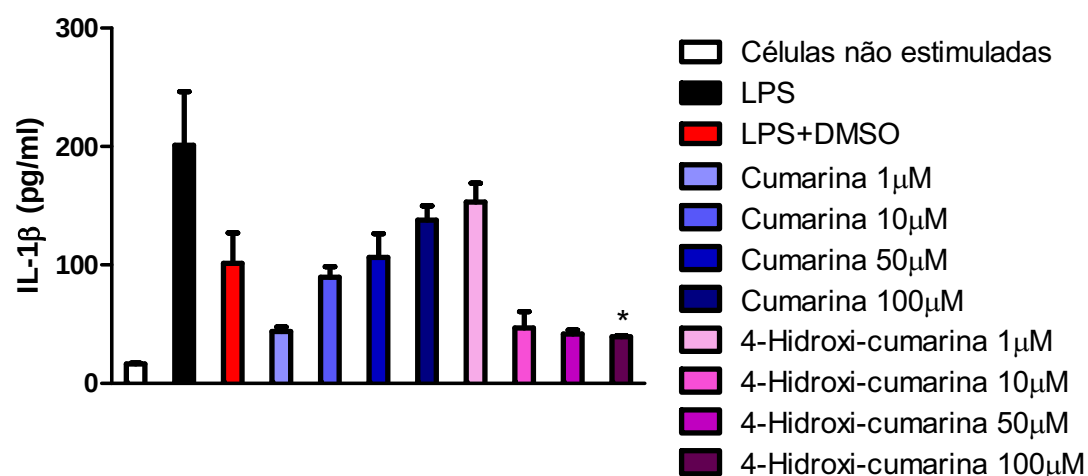


Figura 4: Efeitos da coumarina e da 4-hidroxi-coumarina sobre a secreção de IL-1 β pelas células RAW 264.7 estimuladas com LPS (50 ng/ml) durante 36 horas. As concentrações de IL-1 β do sobrenadante da cultura de RAW 264.7 foram analisadas por ELISA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle LPS + DMSO (N = 3 experimentos).

3.1.3. Efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos

A estimulação de esplenócitos com concanavalina A (Con A) induziu a secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos T. Estas citocinas são secretadas após ativação de linfócitos Th1. O modelo de colite induzida por TNBS em ratos é também caracterizado pela produção alta de citocinas Th1 (Fuss *et al.*, 1996; Monteleone *et al.*, 1997).

As cumarinas em todas as concentrações testadas não foram tóxicas para os esplenócitos (Figura 5).

A cumarina nas concentrações de 1 e 100 μ M diminuiu os níveis de IFN- γ (20,62% e 26,71% comparado com as células estimuladas com ConA + DMSO). A 4-hidroxi-cumarina não diminuiu a secreção de IFN- γ pelos linfócitos T (Figura 6 A).

A 4-hidroxi-cumarina nas concentrações de 10 e 100 μ M diminuiu a secreção de IL-2 pelos linfócitos T (29,31% e 29,56% comparado com as células estimuladas com Con A+DMSO). Enquanto, a cumarina não diminuiu a secreção de IL-2 pelos linfócitos T (Figura 6 B).

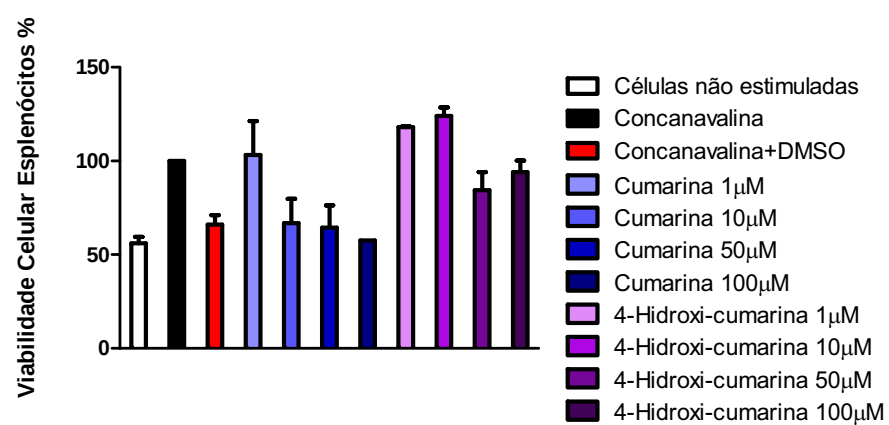
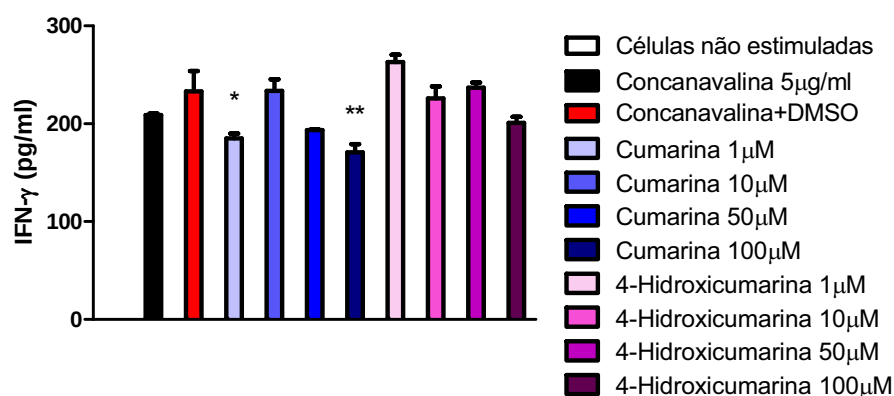


Figura 5: Efeitos da cumarina e 4-hidroxi-cumarina sobre a viabilidade de esplenócitos.

A



B

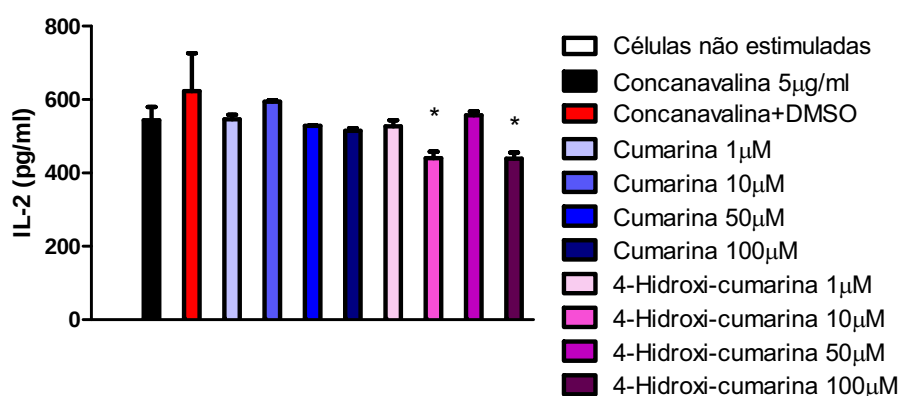


Figura 6: Efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina sobre a secreção de IFN-γ (A) e IL-2 (B) pelos esplenócitos estimulados com concanavalina A (5μg/ml) durante 48 horas. As concentrações de IFN-γ e IL-2 do sobrenadante da cultura de esplenócitos foram analisadas por ELISA. Os resultados foram expressos em média ± EPM. *p<0,05 comparado com o grupo controle Concanavalina + DMSO (N=3 experimentos).

Capítulo 4

METODOLOGIA E RESULTADOS DAS ASSOCIAÇÕES DA CUMARINA OU DA 4-HIDROXI-CUMARINA COM A SULFASSALAZINA NA COLITE INDUZIDA POR TNBS EM RATOS.

1. Material e Métodos

1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos albinos da Cepa Wistar de 180 a 220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Unesp-Botucatu/SP) para os testes de atividade antiinflamatória intestinal.

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo 7 animais por caixa e foram alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

1.2. Compostos-testes e desenho experimental

Cumarina (1,2-benzopirona) e 4-hidroxi-cumarina, ilustradas na Figura 1, e sulfassalazina foram obtidas da Sigma e usadas neste estudo conforme protocolo experimental descrito abaixo.

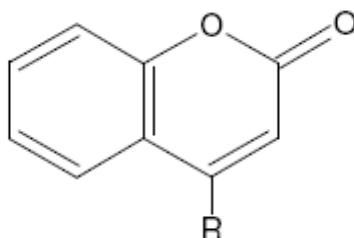


Figura 1. Estrutura química da cumarina (R=H) e da 4-hidroxi-cumarina (R=OH)

1.2.1. Avaliação dos efeitos da associação da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina na fase aguda do processo inflamatório intestinal.

Conforme estabelecido por Slinker 1998, a associação entre drogas deverá incluir no mínimo 4 grupos experimentais (A. controle, B. grupo com um composto-teste, C. grupo com o fármaco, D. grupo com o composto-teste e fármaco associado). Assim sendo, na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

A. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento

B. Grupo com um composto-teste:

B1. Animais tratados apenas com cumarina 5mg/Kg (C5)

B2. Animais tratados apenas com 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25)

C. Grupo com o fármaco: animais tratados com sulfassalazina 25mg/Kg (S25)

D. Grupo de animais tratados com as diferentes associações usando sulfassalazina na progressão aritmética de 10 a partir de 5mg/Kg:

D1. cumarina 5mg/Kg + sulfassalazina 5mg/Kg (C5+S5)

D2. cumarina 5mg/Kg + sulfassalazina 15mg/Kg (C5+S15)

D3. cumarina 5mg/Kg + sulfassalazina 25mg/Kg (C5+S25)

D4. 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg + sulfassalazina 5mg/Kg (4-OHC25+S5)

D5. 4-hidroxi-cumarina 25 mg/Kg + sulfassalazina 15 mg/Kg (4-OHC25+S15)

D6. 4-hidroxi-cumarina 25 mg/Kg + sulfassalazina 25 mg/Kg (4-OHC25+S25)

Em adição foi realizado no mesmo estudo um grupo Branco que compreende animais sem colite e sem tratamento.

A indução da colite foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.*, 1989, com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com éter. Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25 ml de uma solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição supina desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia.

A solução de TNBS foi preparada a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v). Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS. Tanto os compostos-testes isolados quanto as associações foram diluídas em óleo de girassol.

Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foram realizados às 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite, assim como 24 horas depois. Como padrão de comparação foi utilizado um grupo controle, ao qual se induziu a colite, mas sem tratamento farmacológico e o grupo Branco, ao qual não se induziu colite nem tratamento farmacológico. Os animais dos grupos controle e branco receberam salina por via oral. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite.

1.2.2. Efeitos da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal.

As associações de cumarina + sulfassalazina (C5+S5, C5+S15 e C5+S25) e 4-hidroxi-cumarina + sulfassalazina (4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25) foram estudadas também no protocolo experimental crônico de colite com recidiva (Figura 2).

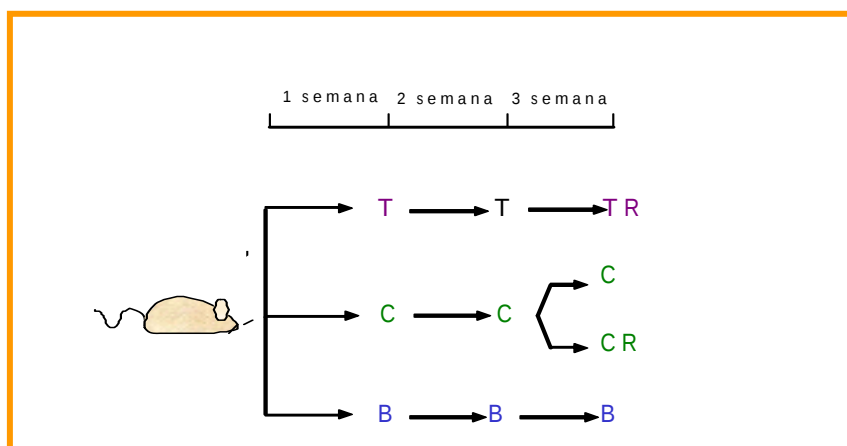


Figura 2. Desenho experimental. B (grupo branco; ratos não colíticos); C (grupo controle; ratos colíticos); CR (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que receberão uma segunda administração de TNBS); T (grupo tratado; ratos colíticos tratados com as associações de cumarina-sulfassalazina ou 4-hidroxi-cumarina-sulfassalazina); TR (grupo tratado e com recidiva; ratos colíticos que receberam uma segunda administração de TNBS).

Na fase crônica com recidiva, os tratamentos (todos por via oral) foram iniciados 2 horas após a primeira administração de TNBS e continuaram até o dia da morte dos animais. A recidiva foi realizada no 14º dia após a primeira administração de TNBS. Foram avaliados no experimento crônico os mesmos grupos experimentais da fase aguda. Foi incluído como padrão de comparação um grupo controle na qual não se induziu a recidiva da colite e também não recebeu nenhum tratamento farmacológico, denominado de grupo controle sem recidiva (Controle S/Rec.). Para a avaliação do efeito das associações, a sulfassalazina foi administrada primeiramente e após 1 hora administrou-se cumarina ou 4-hidroxi-cumarina. Esta espera de 1 hora foi devido ao tempo de meia vida da sulfassalazina em ratos (Chungi *et al.*, 1989). Seis animais dos grupos colíticos (controle, compostos-testes, sulfassalazina e compostos-testes-sulfassalazina) e seis do grupo branco foram mortos após 7, 14 e 21 dias a partir da primeira indução da colite, enquanto todos os animais do grupo colítico sem recidiva foram mortos apenas após 21 dias.

1.3. Estudos da atividade antiinflamatória intestinal *in vivo*.

Para o estudo das associações das cumarinas com a sulfassalazina foram avaliados parâmetros clínicos gerais da colite (consumo de alimento, peso corpóreo e aparecimento de fezes diarréicas), parâmetros macroscópicos (relação peso/comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, (1995), parâmetros microscópicos (as amostras de cólon da fase crônica foram analisadas através do índice de lesão microscópica de acordo com método descrito por Stucchi *et al.* (2000), (Tabela 1), parâmetros bioquímicos (atividade da MPO no cólon de acordo com o método descrito por Krawisz *et al.*, (1984), conteúdo de GSH no cólon de acordo o método descrito por Anderson, (1985), conteúdo de proteínas no cólon de acordo com a técnica descrita por Smith *et al.* (1985), atividade da FA no cólon de acordo com Bessey *et al.* (1946).

Na fase crônica foi determinado também o conteúdo de malonaldeído (MDA) no cólon de acordo com o método descrito por Zingarelli *et al.* (1999), com algumas modificações. As amostras de tecido foram homogenizadas em solução de KCl 1.15% na proporção de 1:5. O homogenato foi centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Foram utilizados 400µl do sobrenadante, que foi adicionado em tubo de vidro com

tampa de rosca, onde também foram adicionados 200 µl de lauril sulfato de sódio 8,1%, 1500 µl de ácido acético 20% pH 3,5, 1500 µl de ácido tiobarbitúrico 0,8% diluído em ácido acético e 400 µl de água destilada. Para curva padrão foi utilizado malonildialdeído em diferentes concentrações, adicionando 100 µl de cada concentração e para completar o volume de total de 4 ml, 700µl de água destilada foram adicionados aos demais reagentes. Os frascos contendo essa mistura foram colocados em banho-maria a 95°C durante uma hora. Após isso as amostras foram transferidas para ependorfs e centrifugadas à 4000 rpm durante 10 minutos. 200 µl do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532nm. O valor da concentração de MDA foi multiplicado por 50 e os resultados foram expressos em nanomoles/grama de tecido.

A descrição completa destas metodologias encontra-se no artigo 1 “Atividade anti-inflamatória intestinal da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos”.

Tabela 1. Critério de avaliação microscópico da lesão colônica.

Local do Dano	Crítérios para Avaliação
Mucosa	1. Ulceração: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
Criptas	2. Atividade Mitótica: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 3. Depleção de Muco: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
Lâmina Própria	4. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 5. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 6. Vascularidade: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
Submucosa	7. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 8. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 9. Edema: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)

Escore Máximo: 27, modificado de Stucchi *et al.*, 2000

1.4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida

por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e analisados pelo teste U de Kruskal-Wallis. O peso corporal dos animais foi expresso em porcentagem, mas foi transformada para arcosseno para análise estatística. Dados descontínuos foram analisados pelo teste X^2 . Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. A análise estatística para avaliar o sinergismo entre os compostos-testes foi realizada de acordo com metodologia descrita por Slinker, 1998.

2. Resultados

2.1. Fase Aguda do processo inflamatório intestinal

2.1.1. Parâmetros macroscópicos da lesão e clínicos gerais

A administração intracolônica de TNBS/etanol provocou inflamação colônica, a qual foi evidenciada 48 horas após a indução da colite, sendo caracterizada pela presença de necrose na mucosa (afetando aproximadamente 2 - 4,9cm do cólon), espessamento da parede do cólon, região de hiperemia, aderência do cólon a órgãos adjacentes (50%), presença de diarreia (80%), incidência de obstrução (27%) e maior relação peso/comprimento colônico comparado com animais normais (grupo branco, Tabela 2).

2.1.1.1. Avaliação macroscópica da lesão

O pré-tratamento oral com as associações de C5+S25 e 4-OHC25+S15 reduziu a extensão da necrose colônica e/ou da inflamação induzida por TNBS/etanol (Tabela 2).

2.1.1.2. Relação peso/comprimento colônico

A C5 diminuiu a relação peso-comprimento colônico, a qual foi significativamente aumentada como consequência do processo inflamatório, enquanto que a 4-OHC25, a S25 e as associações da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com as diferentes doses de sulfassalazina não apresentaram o mesmo efeito (Tabela 2).

2.1.1.3. Incidência de diarreia

A incidência de diarreia, sintoma comum decorrente do processo inflamatório foi menor nos animais com colite aguda tratados com a C5, 4-OHC25 e com as associações de C5+S25 e 4-OHC25+S15. O pré-tratamento oral com a S25 e com as associações C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S5 e 4-OHC25+S25 não diminuiu a incidência de diarreia comparada ao grupo controle (Tabela 2).

2.1.1.4. Incidência de aderência

A administração dos compostos isolados C5, 4-OHC25 e S25 e das associações C5+S5 e C5+S15 não diminuiu a incidência de aderência comparado ao grupo controle. Entretanto, as associações de C5+S25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 diminuíram significativamente a incidência de aderência do cólon a órgãos adjacentes (intestino delgado, estômago, etc) (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25) e de seus efeitos associados com diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) sobre o dano tecidual, relação peso-comprimento colônico, incidência de diarreia e aderência a órgãos adjacentes na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore ^a (0-10)	Relação P/C colônico ^b (mg/cm)	Incidência de diarreia (%)	Incidência de aderência (%)
Branco (Não-Colítico)	0(0-0) ***	101,03 ± 6,9**	0***	0***
Controle (TNBS)	7,0(6-8)	143,24 ± 6,14	80,0	50,0
C5	6,0(3-7)	124,09 ± 5,60*	34,0*	17,0
C5+S5	6,0(5-7)	134,42 ± 6,18	50,0	17,0
C5+S15	6,0(0-8)	149,02 ± 5,65	50,0	34,0
C5+S25	5,0(2-6) **	149,04 ± 2,39	34,0*	0*
4-OHC25	6,0(6-7)	136,19 ± 5,37	34,0*	34,0
4-OHC25+S5	7,0(6-7)	142,30 ± 6,9	50,0	0*
4-OHC25+S15	6,0(3-7)*	149,61 ± 8,53	34,0*	0*
4-OHC25+S25	6,5(1-8)	134,09 ± 6,70	50,0	0*
S25	6,5(5-7)	163,47 ± 8,83	50,0	17,0

^a escore são expressos em mediana (intervalo), ^b relação peso-comprimento colônico são expressos em média ± E.P.M. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 comparado ao grupo controle TNBS. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco p < 0,01 (significância não demonstrada na tabela).

2.1.1.5. Avaliação do peso corpóreo e do consumo de alimento

Após a indução da colite por TNBS/etanol, os animais do grupo controle apresentaram redução do consumo de alimento e conseqüentemente perda de peso corpóreo, parâmetros que indicam a instalação do processo inflamatório. Os animais com colite aguda tratados com os compostos isolados C5, 4-OHC25 e S25 e com as cumarinas associadas com as diferentes doses de sulfassalazina apresentaram índices semelhantes de peso corpóreo e consumo de alimento comparado ao grupo controle (Figuras 3 e 4).

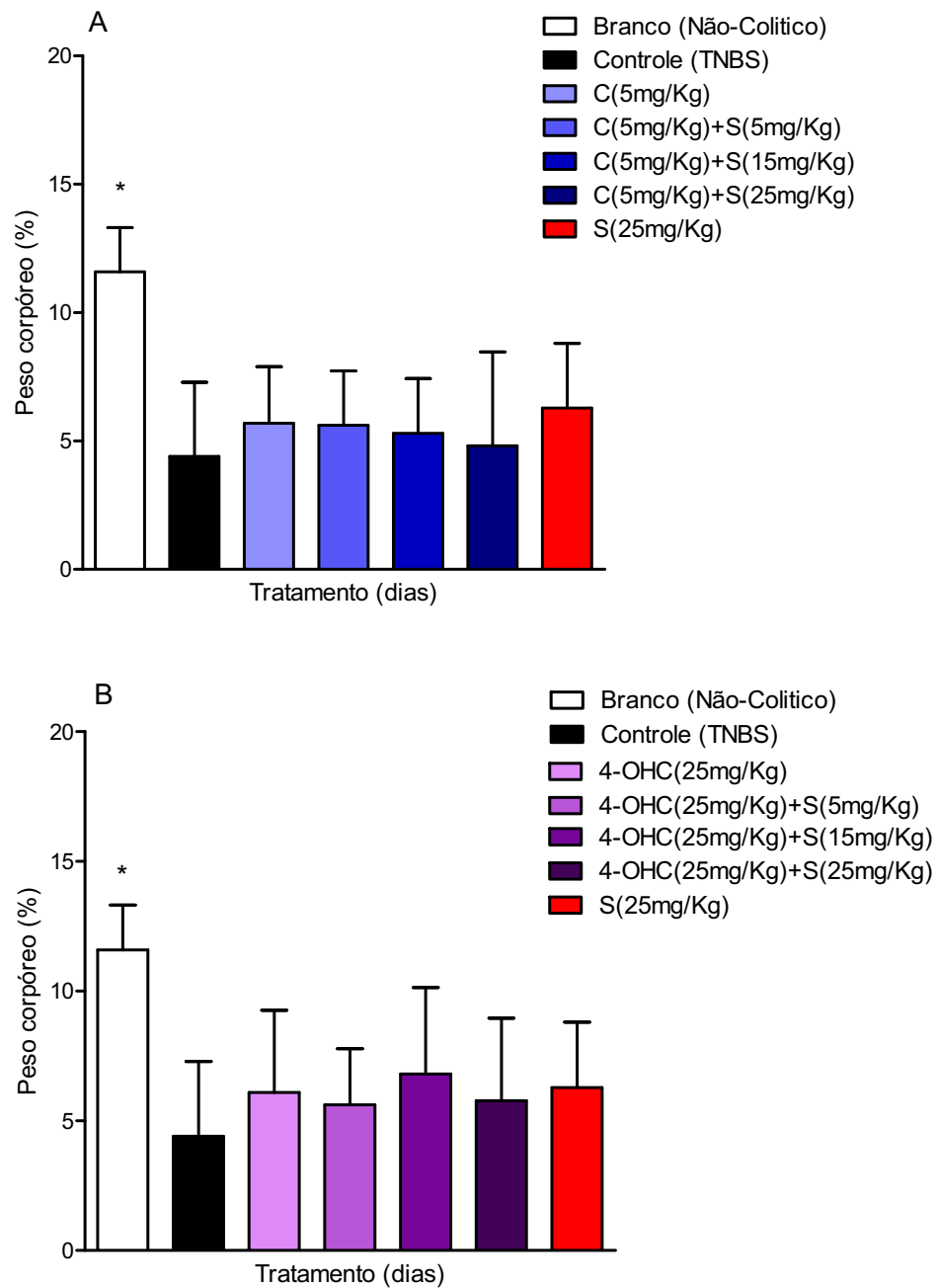


Figura 3: Peso corpóreo. (A) Animais com colite aguda tratados com cumarina e com as associações de cumarina + sulfassalazina. (B) Animais com colite aguda tratados com 4-hidroxi-cumarina e com as associações de 4-hidroxi-cumarina+sulfassalazina. Os resultados foram expressos em média.

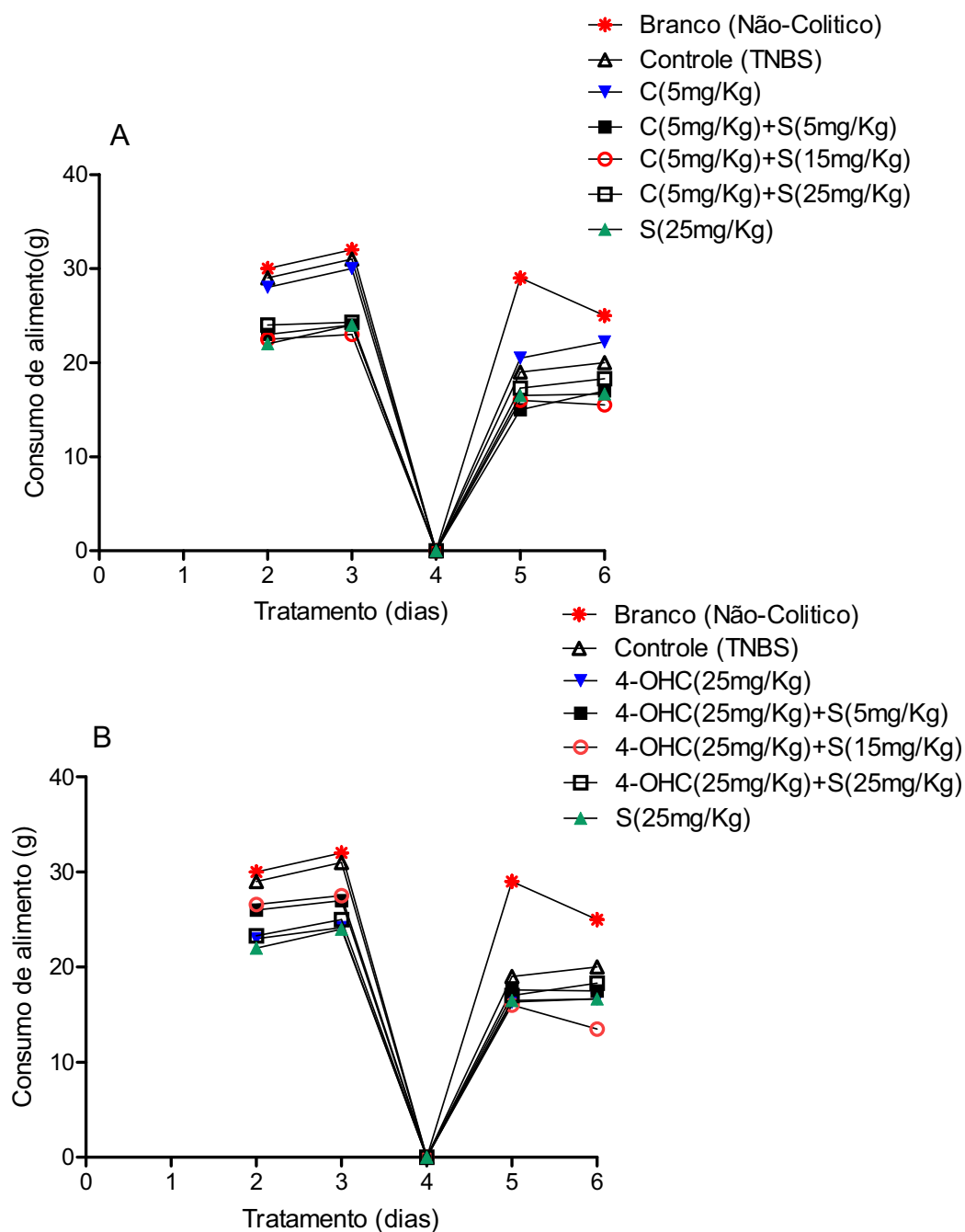


Figura 4: Consumo de alimento. (A) Animais com colite aguda tratados com cumarina e com as associações de cumarina+sulfassalazina. (B) Animais com colite aguda tratados com 4-hidroxi-cumarina e com as associações de 4-hidroxi-cumarina+sulfassalazina. O 4º dia é referente ao período de jejum alimentar (24 horas) para posterior indução de colite. Os resultados foram expressos em média de consumo de alimento por animal.

2.1.2. Parâmetros bioquímicos

2.1.2.1. Conteúdo de glutathiona (GSH) no cólon

Após a indução da colite aguda por TNBS/etanol, os níveis de GSH colônica foram depletados, como consequência do estresse oxidativo presente no cólon inflamado. O pré-tratamento oral com os compostos isolados C5, 4-OHC25 e com as associações de C5+S25 e 4-OHC25+S15 evitou a depleção dos níveis de GSH colônica comparado ao grupo controle. Contudo, a S25 não evitou a depleção dos níveis de GSH colônica de forma significativa comparado ao grupo controle. Adicionalmente, a associação de C5+S25 evitou a depleção de GSH colônica de forma semelhante à administração da cumarina isolada. Assim como a associação de 4-OHC25+S15 evitou a depleção de GSH colônica de forma semelhante à administração da 4-OHC25 (Figura 5A e 5B).

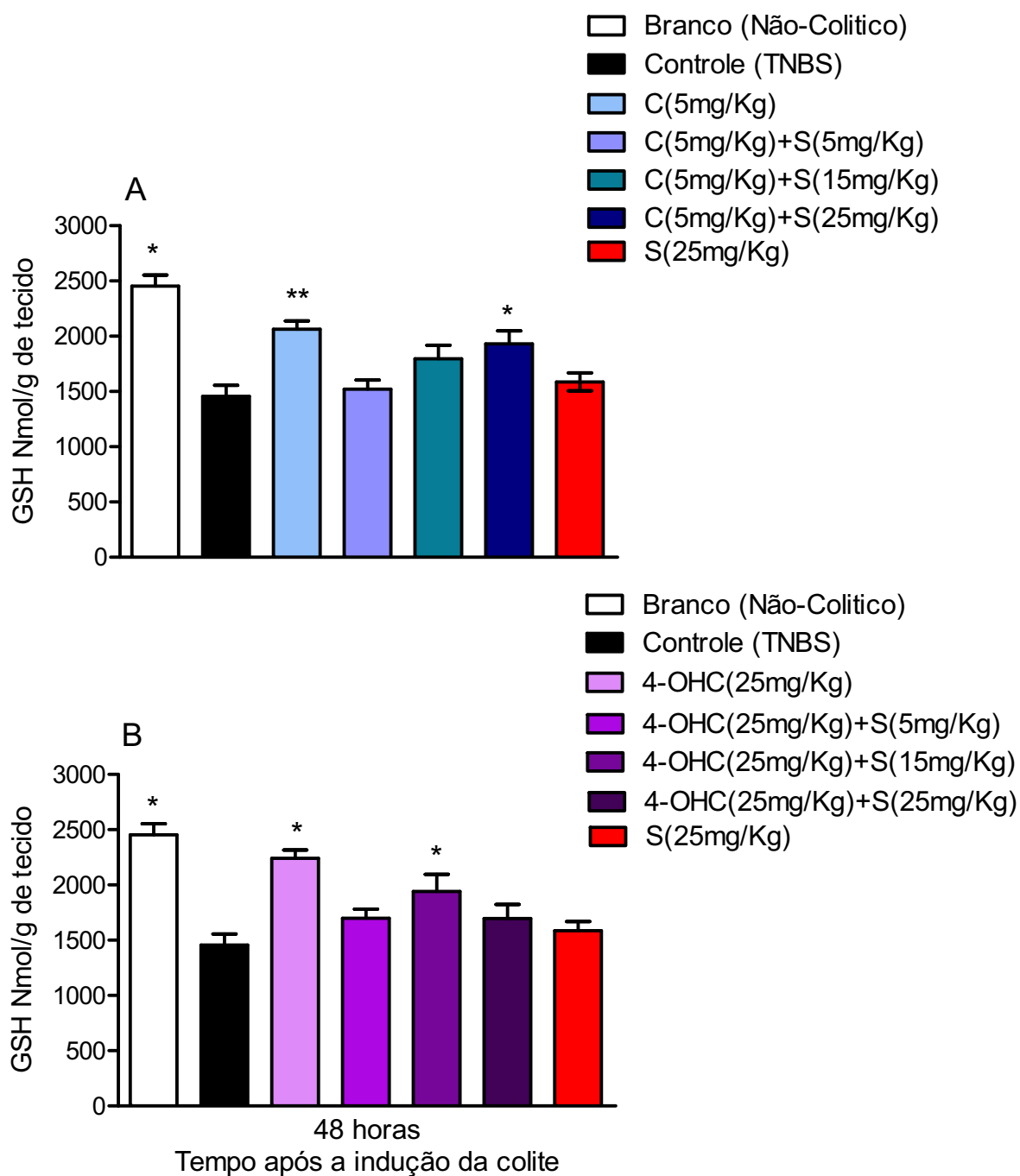


Figura 5: Conteúdo de glutathiona colônica (GSH) em animais com colite aguda induzida por TNBS/etanol. (A) Efeito da cumarina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B) Efeito da 4-hidroxycumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n= 5 a 6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco $p < 0,05$ (significância não demonstrada na figura).

2.1.2.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon

A MPO é uma enzima sintetizada pelos neutrófilos e sua atividade no cólon está relacionada à infiltração de neutrófilos. Os animais do grupo controle foram caracterizados pelo aumento da atividade da MPO em comparação aos animais do grupo branco. A C5 e a 4-OHC25 reduziram significativamente a infiltração de neutrófilos no cólon inflamado. Entretanto, quando as cumarinas foram associadas com a sulfassalazina não inibiram a atividade da MPO colônica. Além disso, a associação de 4-OHC25+S5 aumentou a atividade da MPO colônica em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, o tratamento com a 4-OHC25 foi mais efetivo em inibir a atividade da MPO do que o tratamento com a associação de 4-OHC25+S5 (Figura 6A e B).

O pré-tratamento com a S25 também não inibiu de forma significativa a atividade da MPO colônica comparado ao grupo controle (Figura 6A e B).

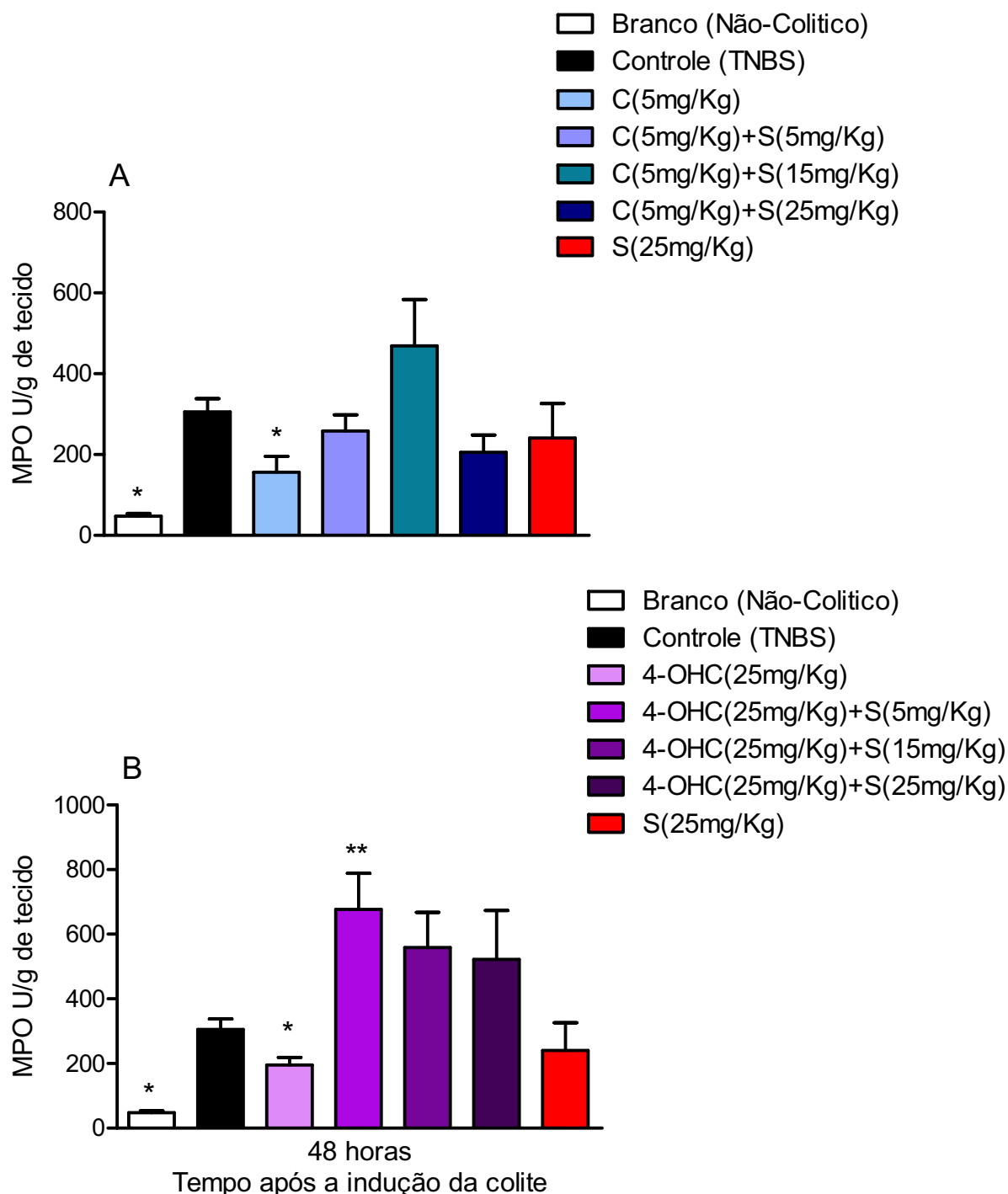


Figura 6: Atividade da mieloperoxidase colônica (MPO) em animais com colite aguda induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da cumarina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxycumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n= 5 a 6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco $p < 0,05$ (significância não demonstrada na figura).

2.1.2.3. Atividade da fosfatase alcalina (FA) no cólon

A atividade da FA apresentou-se elevada no cólon inflamado. Os animais com colite aguda tratados com os compostos isolados C5, 4-OHC25 e S25 e com as associações de C5+S5 e 4-OHC25+S15 apresentaram inibição da atividade da FA colônica comparado ao grupo controle. Além disso, a associação de C5+S5 inibiu a atividade da FA de forma semelhante à cumarina e a sulfassalazina administradas isoladamente. Assim como a associação 4-OHC25+S15 inibiu a atividade da FA de forma semelhante a 4-hidroxi-cumarina e a sulfassalazina administradas isoladamente (Figura 7A e 7B)

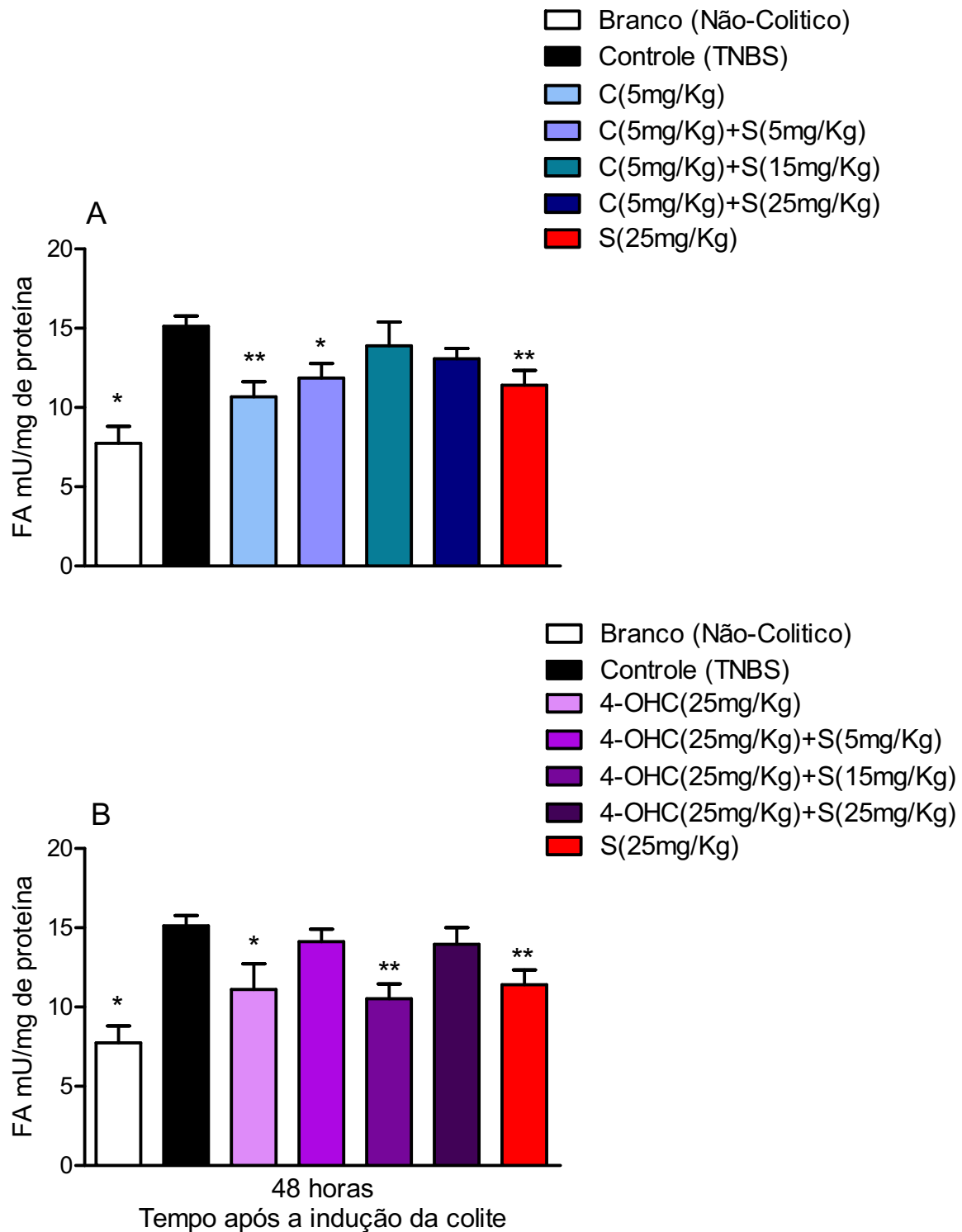


Figura 7: Atividade da fosfatase alcalina colônica (FA) de animais com colite aguda induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da curcumina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxicurcumina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=5 a 6). *p<0,05; **p<0,01 comparado ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco p<0,05 (significância não demonstrada na figura).

2.1.3. Análise microscópica do cólon

A análise microscópica demonstrou que o cólon dos animais do grupo branco (não-colítico) apresentou estrutura normal, com a parede dividida em mucosa com as glândulas tubulares retas compostas por enterócitos e células caliciformes; muscular da mucosa (músculo liso); submucosa (tecido conjuntivo denso) e muscular externa (músculo liso). (Figuras 8A). A colite induzida por TNBS promoveu processo inflamatório intestinal intenso, com desorganização severa na histoarquitetura normal do cólon com hiperplasia e dilatação das criptas e aparente diminuição na quantidade de células caliciformes (Figura 8B).

O pré-tratamento com C5 e 4-OHC25 atenuou a extensão e a severidade do dano tecidual colônico induzido por TNBS/etanol. Este efeito benéfico foi caracterizado pela redução do infiltrado inflamatório e pelo evidente restabelecimento da quantidade de células caliciformes (Figuras 8C e 9A).

O tratamento farmacológico com a S25 atenuou a presença das células inflamatórias na lâmina própria e na submucosa, comparado com os animais do grupo controle (Figura 9E).

Com as associações de C5+S5 e C5+S25 foi possível observar um infiltrado inflamatório leve na camada mucosa (Fig 8D e 8F). Já, o tratamento com as associações de C5+S15, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 mostrou infiltrado inflamatório moderado, porém este infiltrado inflamatório foi menor comparado ao grupo controle (TNBS) (Figuras 8E, 9B, 9C e 9D).

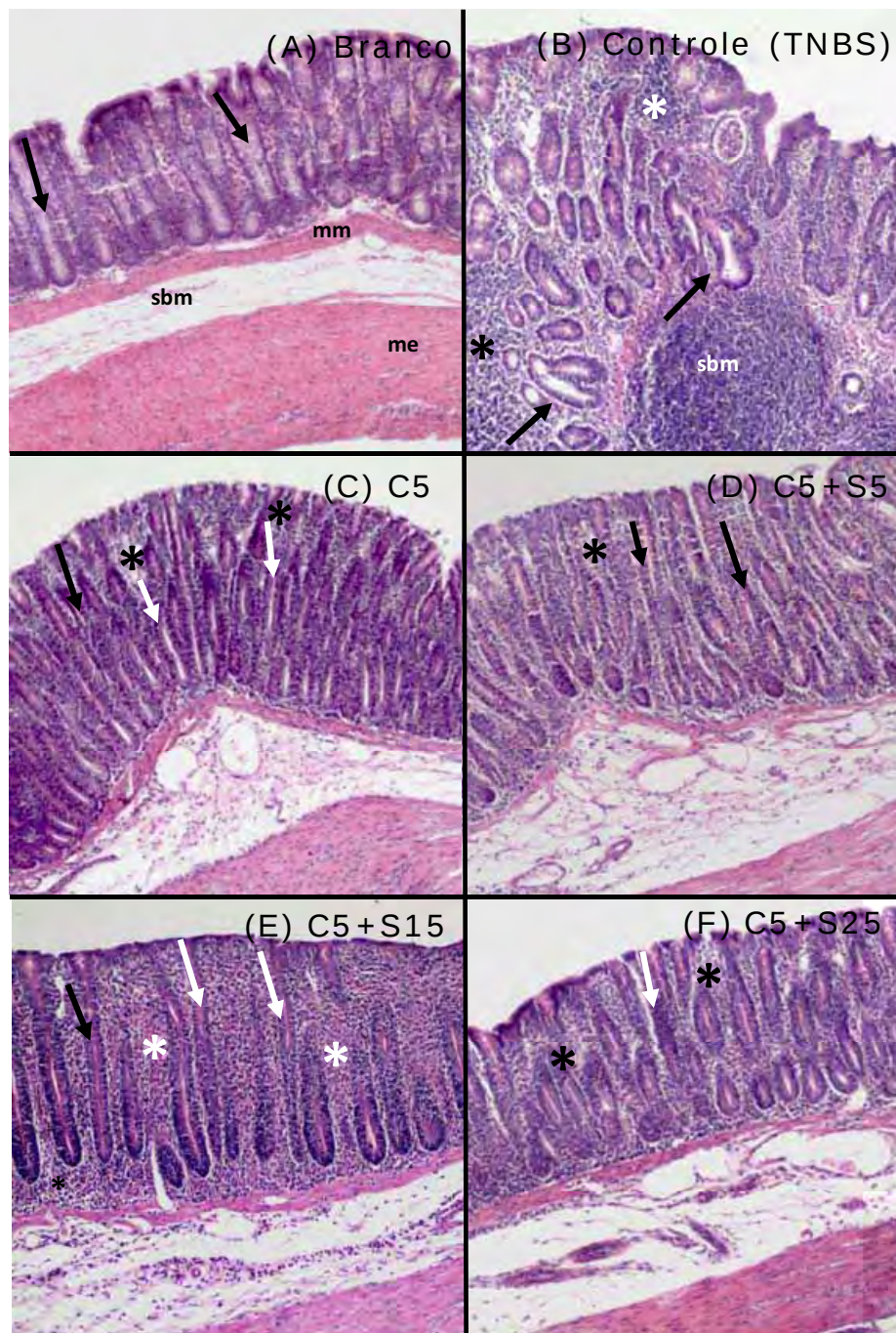


Figura 8: Fotomicrografias do cólon de ratos na fase aguda da colite induzida por TNBS/etanol. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e fotografados em aumento de 100 e 200X. (A) Grupo normal (branco) evidenciando a organização normal da parede do cólon. Lâmina própria constituída de tecido conjuntivo frouxo entremeado por glândulas tubulosas retas (setas), muscular da mucosa (mm), submucosa (sbm) e muscular externa (me). (Aumento 100X); (B) Grupo controle com inflamação severa na mucosa (asterisco), submucosa (sbm) e desorganização das glândulas com dilatação das criptas (setas) (Aumento 200X); (C) Grupo C5 com redução de células inflamatórias (asteriscos) na lâmina própria e restabelecimento da organização das glândulas (setas) (Aumento 100X). (D) Grupo C5+S5 com infiltrado inflamatório leve (asteriscos) entre as glândulas (setas) (Aumento 100X). (E) Grupo C5+S15 com infiltração moderada de células inflamatórias (asterisco) entre as glândulas (setas) na mucosa (Aumento 100X). (F) Grupo C5+S25, com células inflamatórias (asteriscos) entre as glândulas (setas) na mucosa (Aumento 100X).

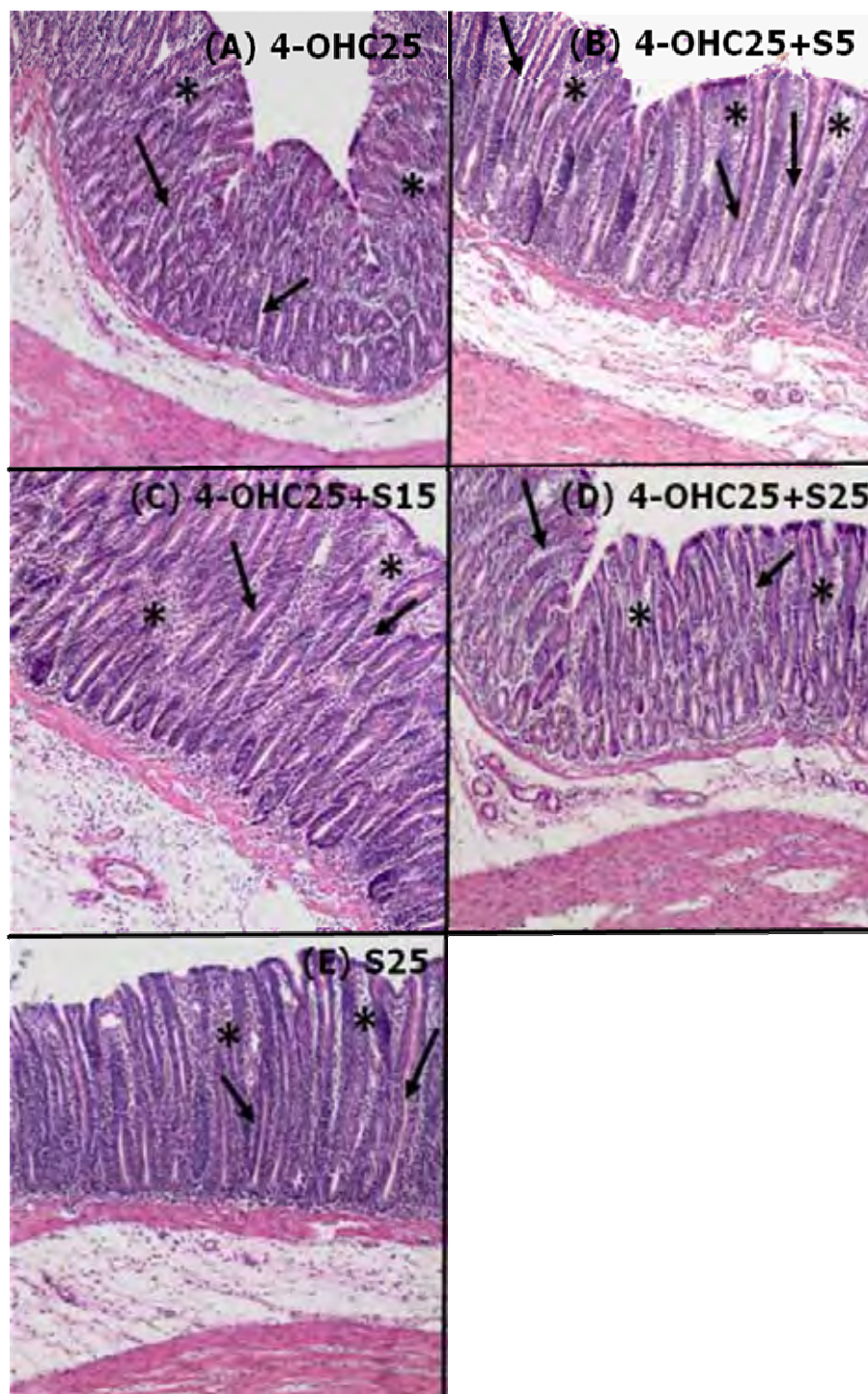


Figura 9: Fotomicrografias do cólon de ratos na fase aguda da colite induzida por TNBS/etanol. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) (Aumento de 100 e 200X). (A) Grupo tratado com a 4-OHC25 com redução de células inflamatórias (asteriscos) e restabelecimento da organização glandular (setas) (Aumento 200X); (B), (C) e (D) Grupos 4-OHC+S5, 4-OHC+S15 e 4-OHC+S25 com infiltração moderada de células inflamatórias na mucosa (asteriscos) e glândulas normais (setas) (Aumento 100X, 200X e 100X, respectivamente); (E) Grupo S25 com infiltração moderada de células inflamatórias na lâmina própria (asteriscos) entre as glândulas (setas) (Aumento 100X).

2.2. Fase Crônica do Processo Inflamatório Intestinal com recidiva

2.2.1. Parâmetros macroscópicos e clínicos gerais

A administração intracolônica de 10mg de TNBS em 50% de etanol (v/v) provocou inflamação colônica, a qual foi persistente durante as três semanas estudadas, com características semelhantes a estudos anteriores (Gálvez *et al.*, 2000; Di Stasi *et al.*, 2004).

A segunda dose de 10mg de TNBS em 50% de etanol foi administrada intracolonicamente nos animais na segunda semana após a primeira administração, reproduzindo assim a recidiva da colite. Este processo resultou na reativação da resposta inflamatória colônica, a qual foi evidenciada pelas alterações de parâmetros macroscópicos e bioquímicos da inflamação avaliados quando comparados com animais que não receberam a segunda dose de TNBS (grupo controle sem recidiva) (Tabela 3 e Figuras 12, 13, 14 e 15).

2.2.1.1. Avaliação macroscópica da lesão

Na primeira semana após a indução da colite, o dano tecidual afetou aproximadamente 2-6,9 cm do cólon e foi gradualmente reduzido durante a segunda semana afetando aproximadamente 1-1,9 cm do cólon. Após a recidiva da colite, o dano inflamatório foi novamente instalado acometendo aproximadamente 1-3,9 cm do cólon (Tabela 3).

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento oral com os compostos-testes isolados C5 e 4-OHC25 e com as associações de C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 demonstrou efeito curativo sobre o dano tecidual comparado com o grupo controle, identificado macroscopicamente pela redução da extensão da necrose colônica e/ou da inflamação (Tabela 3).

Segunda semana após a indução da colite

Nenhum dos tratamentos reduziu o escore macroscópico comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia.

O composto-teste isolado C5 e as associações de C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 preveniram o impacto da recidiva colônica, evidenciada pela redução do dano tecidual comparado com animais do grupo controle com recidiva (Tabela 3).

O tratamento com a S25 na fase crônica da colite não demonstrou efeito curativo sobre o dano tecidual (Tabela 3).

2.2.1.2. Relação peso/comprimento colônico

O processo inflamatório intestinal induzido por TNBS/etanol foi associado ao aumento da relação peso/comprimento colônico nas três semanas de experimento quando comparado ao grupo branco (animais não colíticos).

Primeira semana após a indução da colite

Apenas, a associação 4-OHC25+S15 diminuiu a relação peso/comprimento colônico comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Segunda e Terceira semana após a indução da colite

Nenhum dos tratamentos reduziu a relação peso/comprimento colônico comparado com o grupo controle (Tabela 3).

2.2.1.3. Incidência de diarreia

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento oral com os compostos-testes C5 e 4-OHC25 e com as associações C5+S15, C5+S25, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 diminuiu a incidência de diarreia comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Segunda semana após a indução da colite

Todos os tratamentos estudados não diminuíram a incidência de diarreia comparada ao grupo controle (Tabela 3).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

O processo inflamatório foi novamente instalado, após a recidiva da colite, o qual foi evidenciado pela incidência de diarreia quando se faz a comparação de animais que receberam a segunda dose de TNBS (grupo controle com recidiva) com animais que não receberam a segunda dose de TNBS (grupo controle sem recidiva) (Tabela 3).

O composto-teste C5 e a associação C5+S25 diminuíram a incidência de diarreia comparado com o grupo controle com recidiva (Tabela 3).

Nas três semanas, a S25 não evitou o aparecimento de diarreia (Tabela 3).

2.2.1.4. Incidência de aderência

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento com o composto-teste C5 e com a associação 4-OHC25+S15 evitou o aparecimento de aderência do cólon a órgãos adjacentes (intestino delgado, estômago, etc) comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Segunda semana após a indução da colite

O composto-teste 4-OHC25, a S25 e as associações (C5+S5, C5+S25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 evitaram o aparecimento de aderências comparadas com o grupo controle (Tabela 3).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 15º dia

Os tratamentos estudados não evitaram o aparecimento de aderência comparado com o grupo controle com recidiva (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação dos compostos-testes cumarina 5mg/kg (C5) e 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25) e das suas associações com diferentes doses de sulfassalazina 5, 15 e 25) sobre o dano tecidual, relação peso-comprimento colônico, incidência de diarreia, aderência a órgãos adjacentes e obstrução intestinal na fase crônica e na reativação da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore ^{a)} (0-10)	Extensão de lesão ^{b)} (cm)	Relação peso/comprimento colônico ^{b)} (mg/cm)	Incidência de Diarreia (%)	Incidência de Aderência (%)
1 Semana					
Branco (Não-Colítico)	0 ^{***}	0 ^{**}	84,75 ± 2,06 ^{**}	0 ^{***}	0 [*]
Controle (TNBS)	6,5 (6-10)	3,57 ± 0,61	227,11 ± 26,33	83,33	33,3
C5	3 (1-5) [*]	1,31 ± 0,37 [*]	140,32 ± 9,62	0 [*]	0 [*]
C5+S5	2 (0-7) [*]	0,96 ± 0,33 [*]	163,98 ± 28,45	33,33	33,33
C5+S15	3,5 (0-6) [*]	1,30 ± 0,40 [*]	148,23 ± 13,74	16,66 [*]	16,66
C5+S25	6,5 (0-9)	2,41 ± 0,71	200,69 ± 48,81	33,33	50
4-OHC25	3 (0-6) [*]	0,96 ± 0,46 [*]	179,85 ± 16,70	16,66 [*]	50
4-OHC+S5	4,5 (1-7)	1,80 ± 0,42	179,94 ± 25,66	33,33	33,33
4-OHC+S15	3,5 (0-6) [*]	1,71 ± 0,66	135,83 ± 9,54	16,66 [*]	0 [*]
4-OHC+S25	2 (1-6) [*]	1,26 ± 0,32	141,27 ± 8,40	16,66 [*]	16,66
S25	3 (1-9)	1,80 ± 0,94	210,82 ± 70,81	50	16,66
2 Semana					
Branco (Não-Colítico)	0 ^{***}	0 ^{**}	95,04 ± 5,20 ^{**}	0 [*]	0 ^{**}
Controle (TNBS)	2 (0-5)	1,88 ± 0,37	136,38 ± 6,25	33,33	80
C5	1,5 (0-2)	0,46 ± 0,20	122,27 ± 14,32	16,66	33,33
C5+S5	1 (0-2)	0,50 ± 0,28	100,05 ± 7,43	33,33	0 [*]
C5+S15	1,5 (1-3)	0,68 ± 0,18	136,28 ± 7,91	16,66	33,33
C5+S25	1 (0-2)	0,36 ± 0,13	128,62 ± 9,79	16,66	0 [*]
4-OHC25	1,5 (0-2)	0,78 ± 0,18	123,12 ± 8,58	16,66	0 [*]
4-OHC25+S5	2,5 (0-4)	0,73 ± 0,21	124,75 ± 15,74	16,66	0 [*]
4-OHC25+S15	1,5 (1-2)	0,63 ± 0,20	122,28 ± 10,53	16,66	0 [*]
4-OHC25+S25	2 (1-2)	1,46 ± 0,37	114,96 ± 4,91	16,66	0 [*]
S25	2 (0-4)	1,36 ± 0,60	168,72 ± 23,74	50	16,66 [*]
3 Semana					
Branco (Não-Colítico)	0 ^{***}	0 ^{**##}	103,96 ± 3,72 ^{**}	0 [*]	0 [*]
Controle com recidiva (C/Rec.)	6 (4-7) ^{##}	1,93 ± 0,19 ^{##}	153,86 ± 6,42	50	33,33
Controle sem recidiva (S/Rec.)	1 (0-3) ^{***}	0,52 ± 0,12 ^{**}	126,67 ± 2,60	0 [*]	33,33
C5	2 (1-4) [*]	0,9 ± 0,39 [*]	140,11 ± 5,89	0 [*]	33,33
C5+S5	1 (1-4) ^{**}	0,9 ± 0,24 [*]	163,55 ± 12,12	16,66	33,33
C5+S15	1,5 (1-3) [*]	0,8 ± 0,23 [*]	132,81 ± 6,05	50	33,33
C5+S25	3 (1-4)	1,55 ± 0,31	122,09 ± 10,51	66,66	33,33
4-OHC25	2,5 (1-4)	1,11 ± 0,32 [#]	147,74 ± 8,17	50	16,66
4-OHC25+S5	2 (0-2) ^{**}	1,10 ± 0,34 [*]	147,31 ± 20,29	40	33,33
4-OHC25+S15	2 (1-4) [*]	0,90 ± 0,21 [*]	128,50 ± 7,33	60	16,66
4-OHC25+S25	1 (1-2) ^{**}	1,66 ± 0,37	162,69 ± 16,94	40	33,33
S25	3 (1-5)	1,53 ± 0,33 [#]	141,84 ± 10,91	16,66	16,66

^a Dados de escore foram expressos como mediana (range). ^b Dados de extensão de lesão e relação peso colônico foram expressos como média ± S.E.M. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05 vs. grupo controle; # p<0,05; ## p<0,01 vs. grupo controle S/Rec. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco p < 0,05 (significância não demonstrada na tabela).

2.2.1.5. Avaliação do peso corporal e do consumo de alimento

O processo inflamatório intestinal foi associado à redução do consumo alimentar e a perda de peso corpóreo do animal. O consumo médio alimentar dos animais foi anotado diariamente após a indução de colite por TNBS/etanol.

Primeira semana após a indução da colite.

O tratamento com a associação C5+S5 aumentou o consumo de alimento e o peso corpóreo de animais com colite comparado com animais do grupo controle. Os demais tratamentos não evitaram a perda de peso corpóreo comparado com animais do grupo controle (Figuras 10A e 11A).

Segunda semana após a indução da colite.

Após o 7º dia, todos os animais restabeleceram o consumo de alimento. Além disso, o peso corpóreo dos animais de todos os tratamentos estudados não diferiu significativamente do grupo controle (Figuras 10B e 11B).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 15º dia.

Após a recidiva da colite, o peso corpóreo dos animais de todos os tratamentos estudados não diferiu estatisticamente do grupo controle com recidiva (Figuras 10C e 11C).

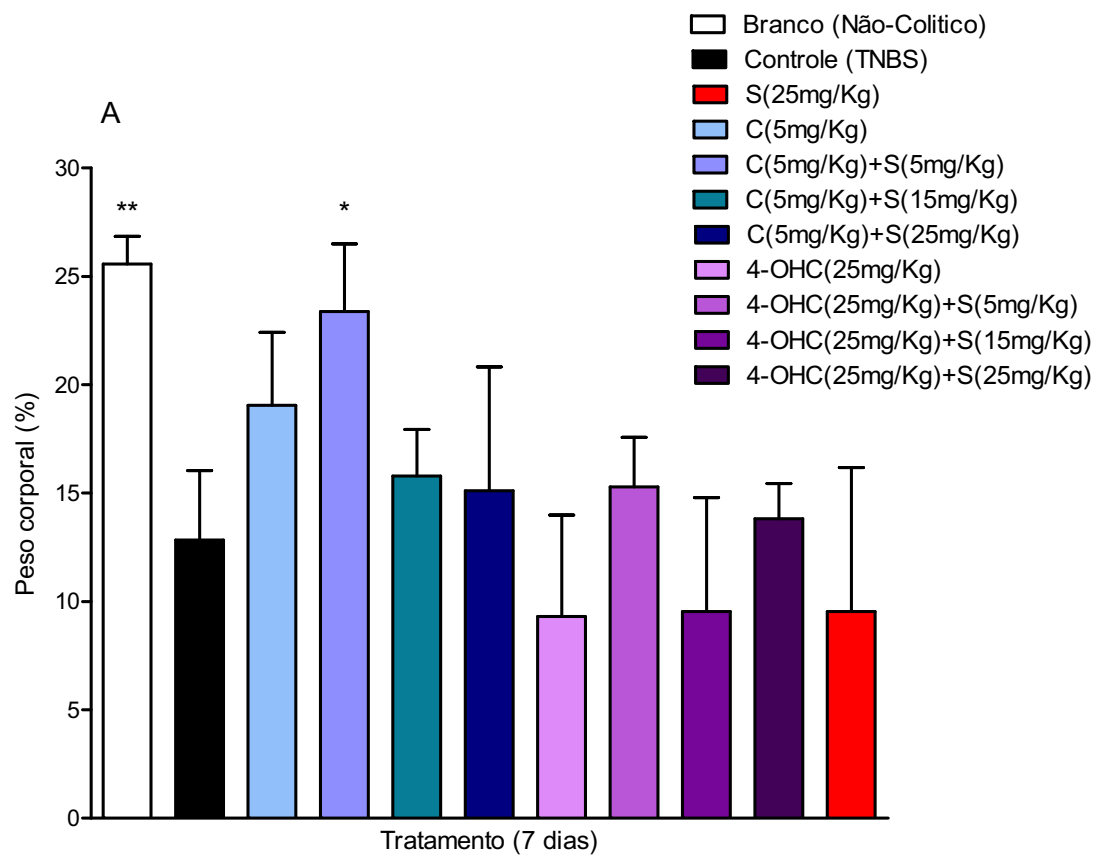


Figura 10A: Peso corporal (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com os compostos-testes cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 7 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM.

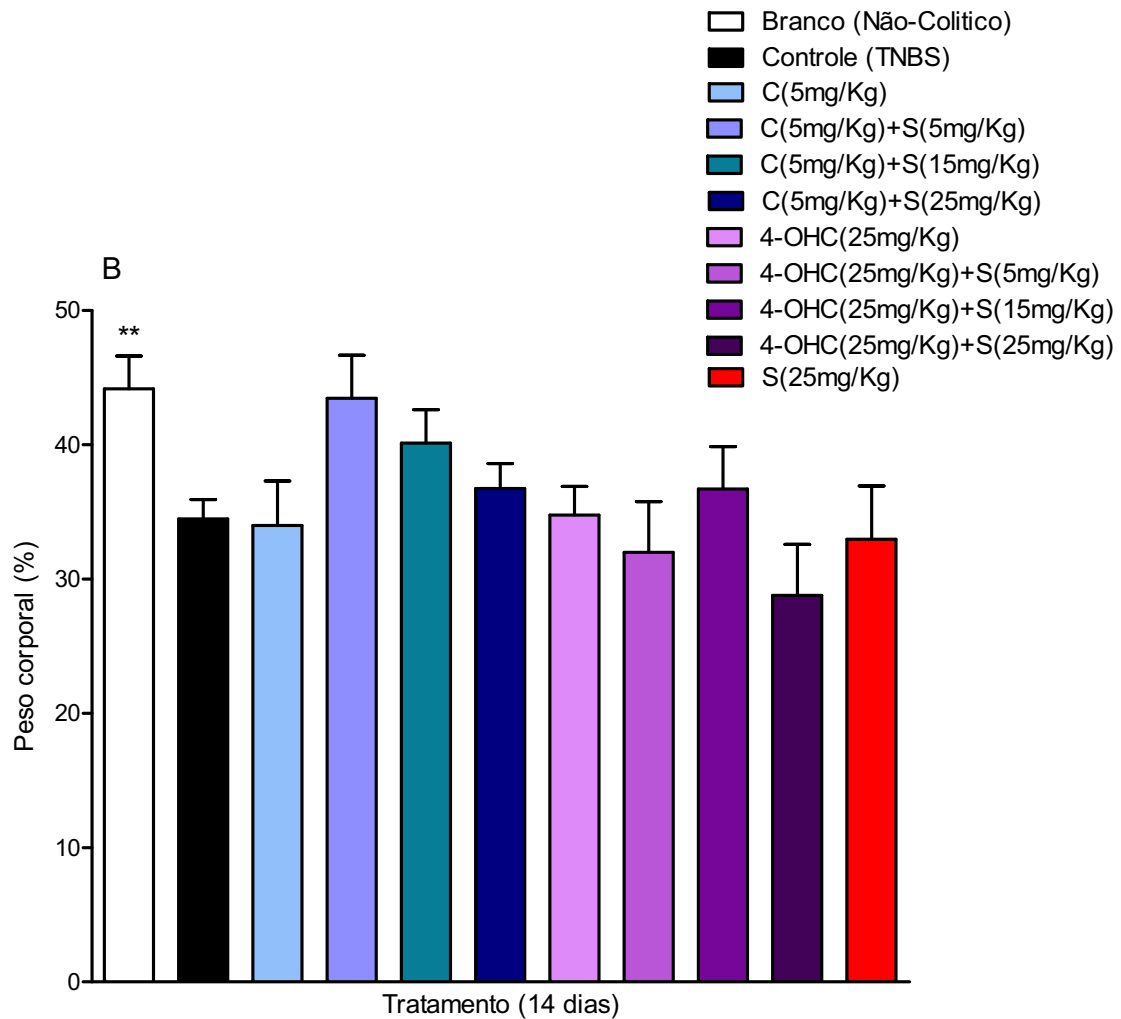


Figura 10B: Peso corporal (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com os compostos-testes cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 14 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM.

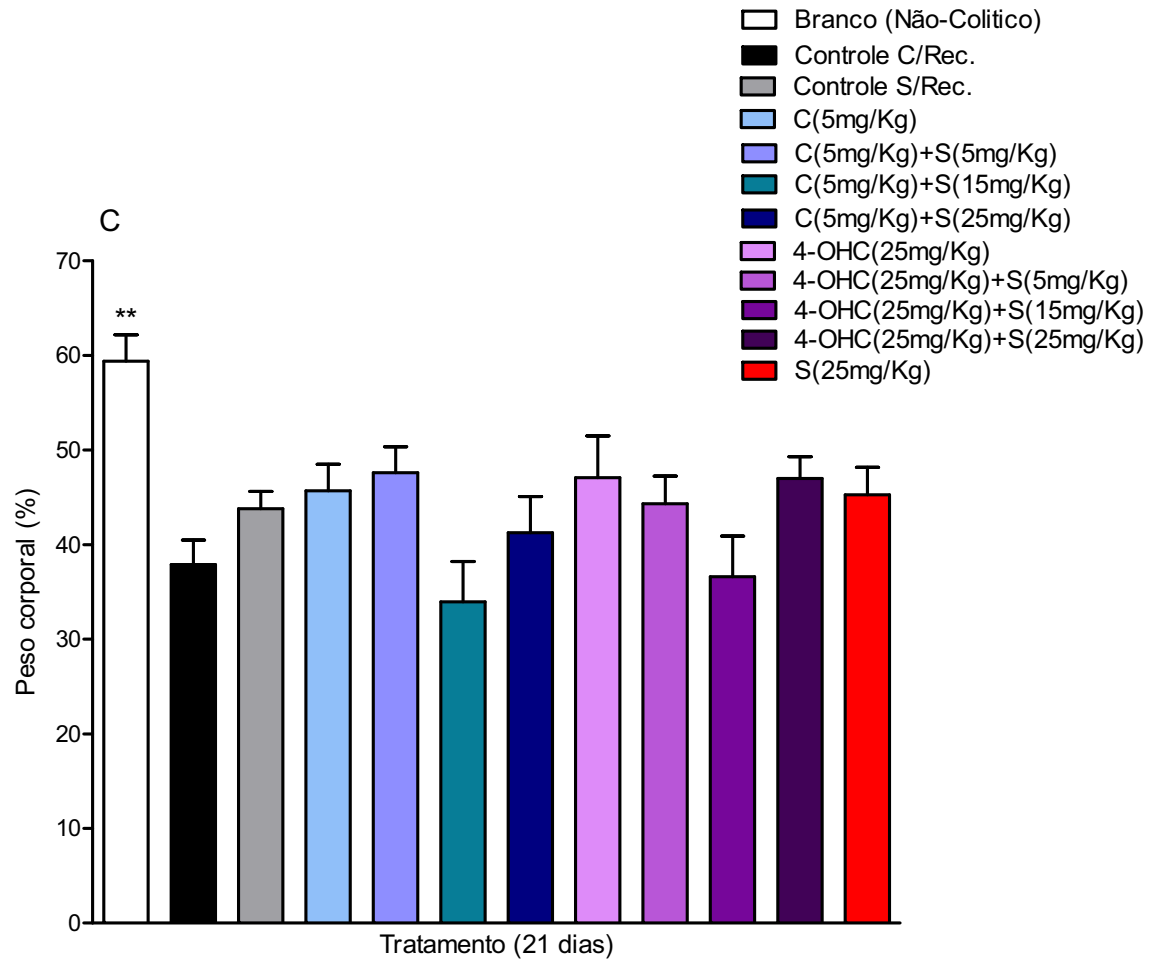


Figura 10C: Peso corporal (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com os compostos-testes cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 21 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM.

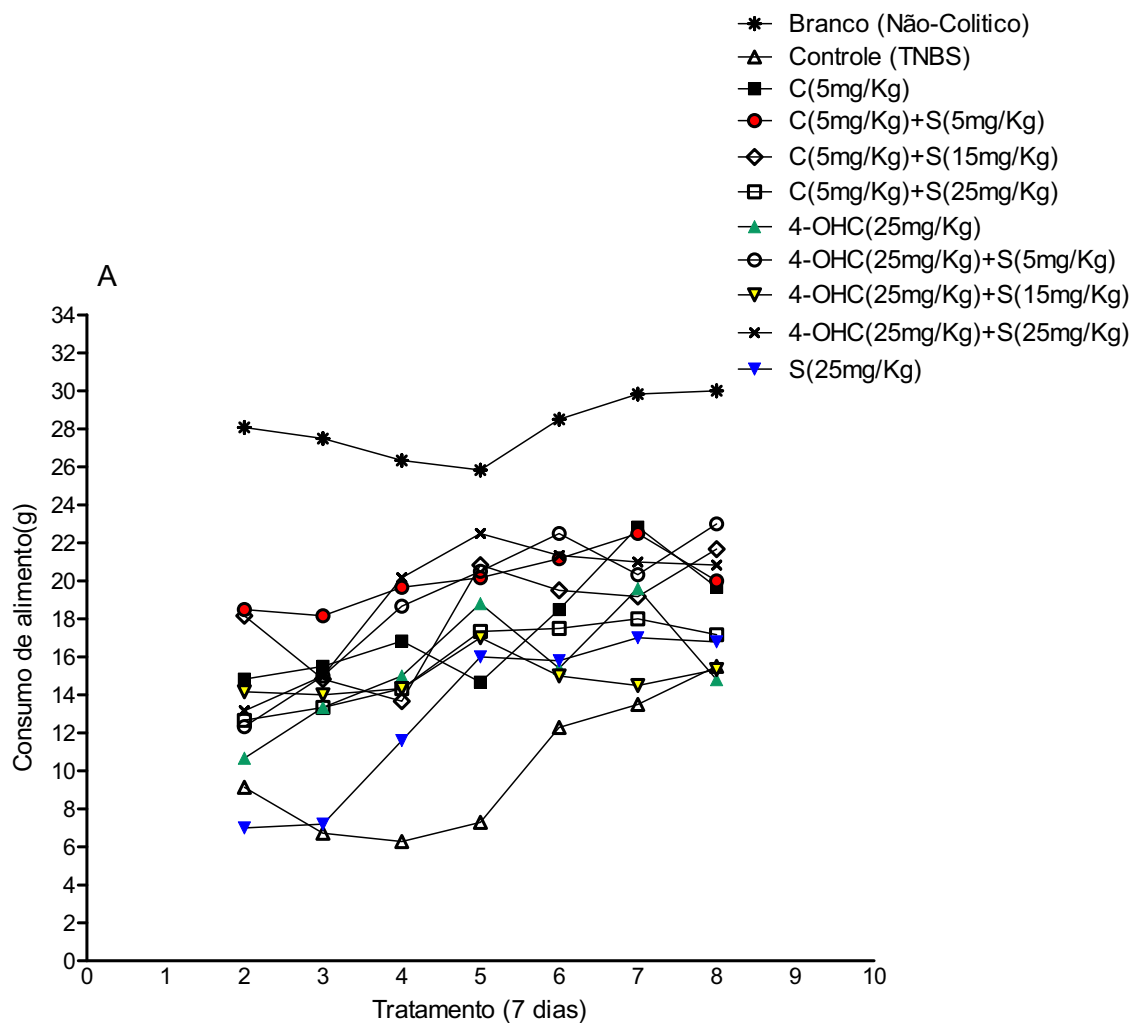


Figura 11A: Consumo de alimento (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com os compostos-testes cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 7 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média de consumo de alimento por animal.

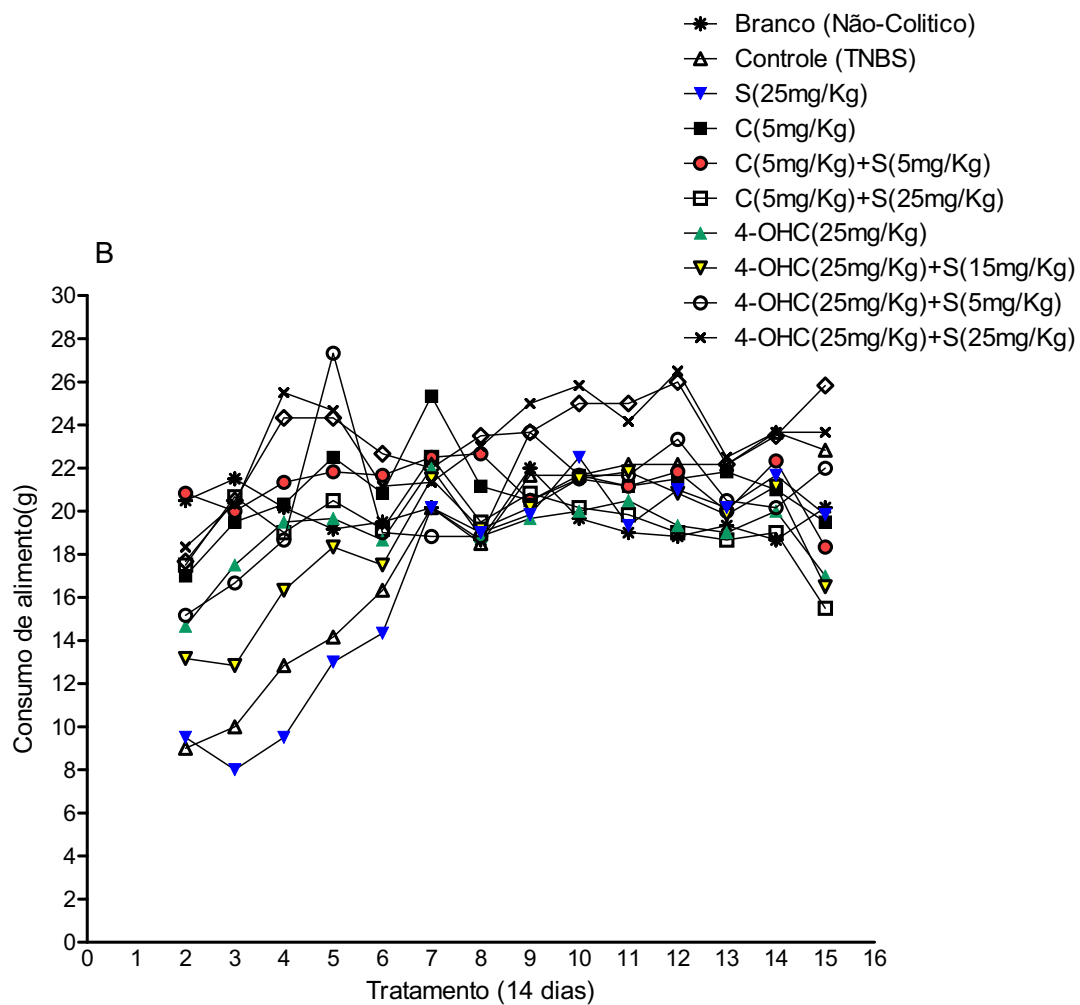


Figura 11B: Consumo de alimento (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com os compostos-testes cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 14 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média de consumo de alimento por animal.

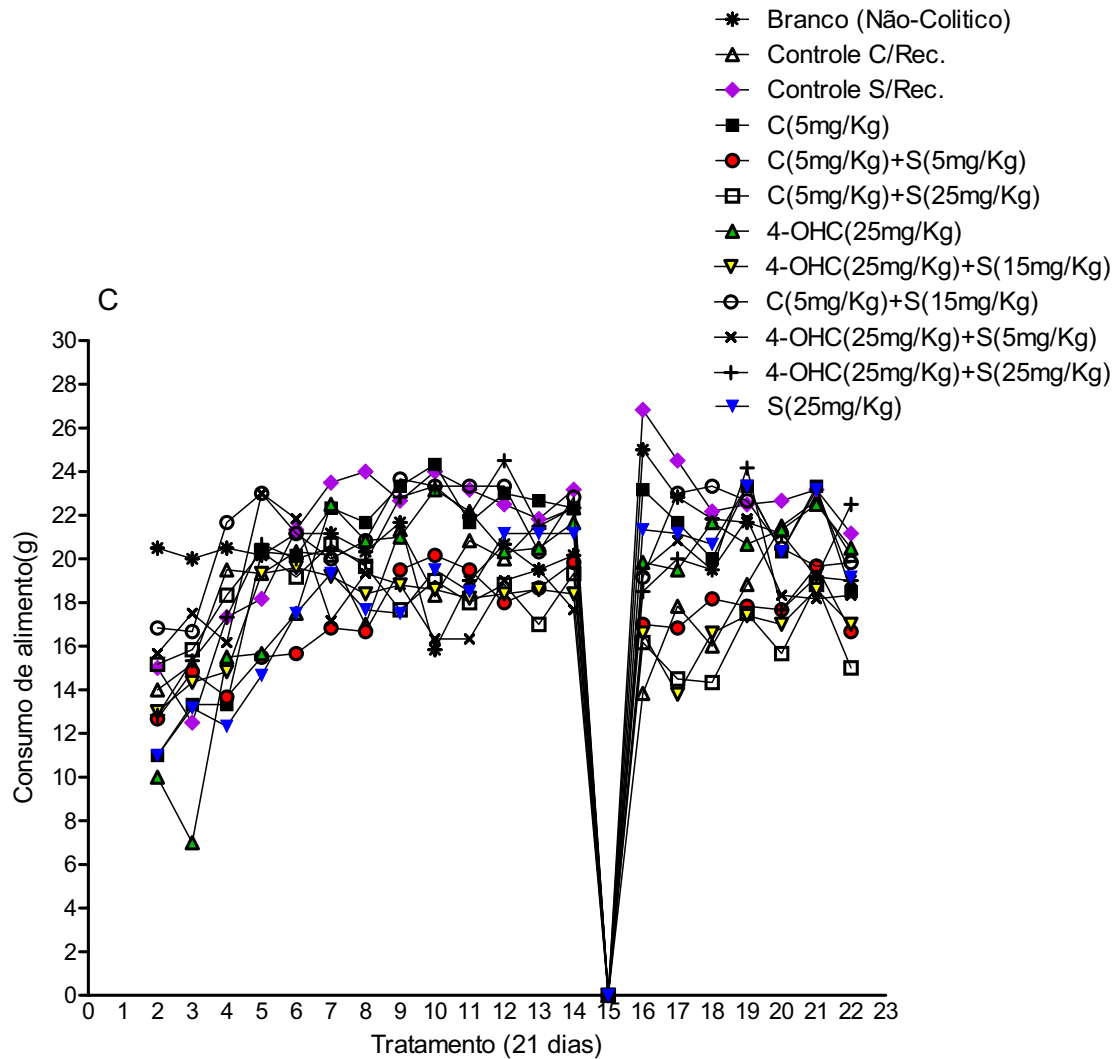


Figura 11C: Consumo de alimento (n=6-12). Animais com colite crônica tratados com cumarina 5mg/Kg (C5), 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25), sulfassalazina 25mg/Kg (S25) e com as associações das cumarinas com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg) durante 21 dias após a indução da colite. Os resultados foram expressos em média de consumo de alimento por animal.

2.2.2. Parâmetros bioquímicos

2.2.2.1. Conteúdo de glutathiona (GSH) total no cólon

Os níveis de GSH do cólon foram depletados, após a indução da colite crônica por TNBS/etanol, como consequência do estresse oxidativo presente no cólon inflamado. Após a recidiva da colite, os níveis de GSH foram novamente depletados, em virtude da reinstalação do processo inflamatório colônico (Figura 12).

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento oral com C5, 4-OHC25 e S25 e com as associações C5+S5, C5+S15, C5+S25 e 4-OHC25+S15 evitou a depleção dos níveis de GSH no cólon comparado com o grupo controle (Figuras 12A e 12B).

Segunda semana após a indução da colite

O composto-teste isolado 4-OHC25 e as associações das cumarinas com a sulfassalazina evitaram a depleção dos níveis de GSH no cólon comparado com o grupo controle (Figuras 12A e 12B).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

Os compostos-testes isolados C5, 4-OHC25 e S25 e as associações C5+S5 e C5+S15 evitaram a depleção dos níveis de GSH no cólon comparado com grupo controle com recidiva (Figuras 12A e 12B).

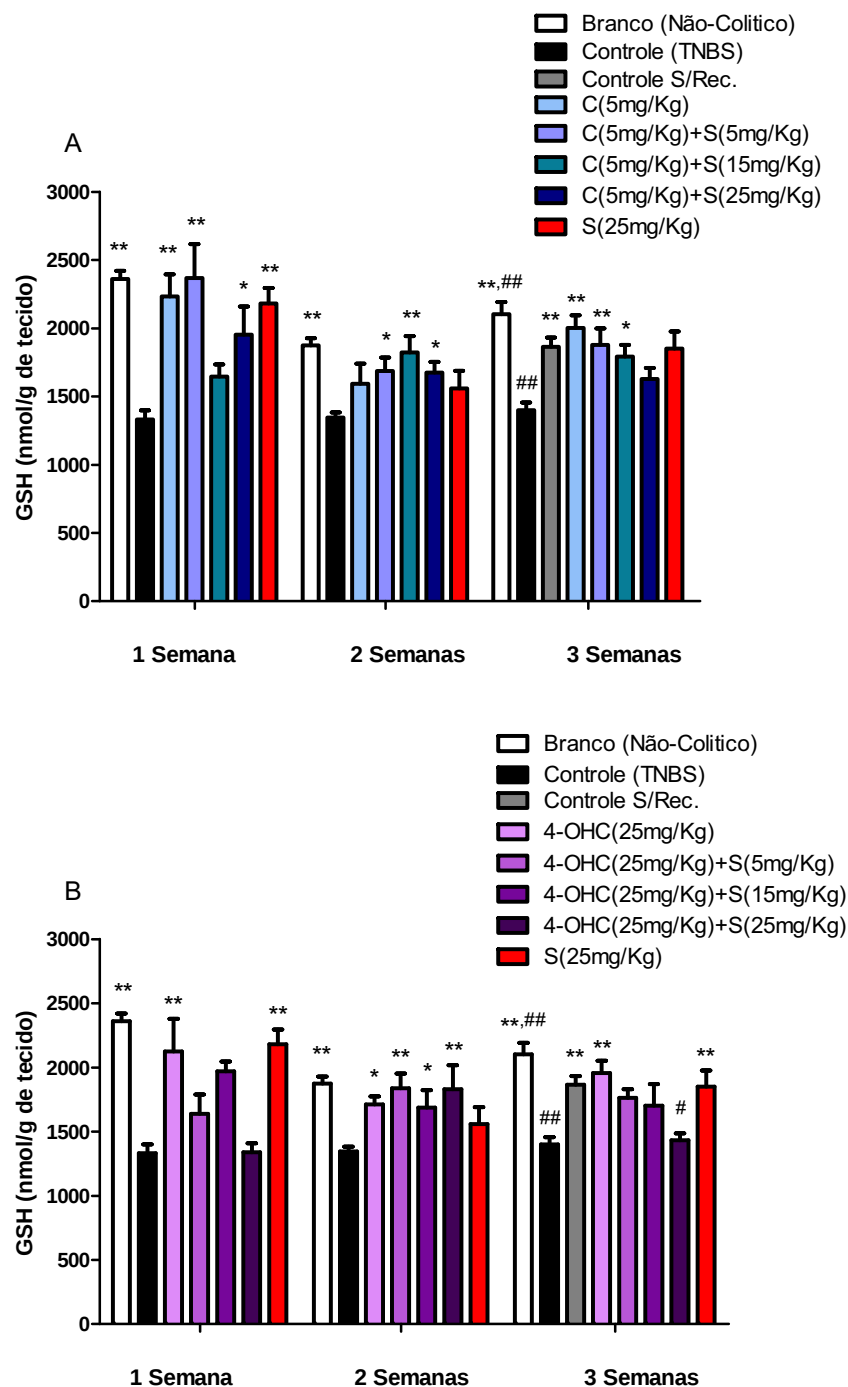


Figura 12: Conteúdo de glutathione (GSH) colônica de animais com colite crônica induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da curcumina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxicumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6 a 12). *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao grupo controle. # p<0,05 e ## p<0,01 comparado com o grupo controle sem recidiva.

2.2.2.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no cólon

A MPO é uma enzima encontrada nos neutrófilos e sua atividade no cólon está relacionada à infiltração de neutrófilos. Após a indução da colite crônica os animais do grupo controle tiveram aumento da atividade da MPO colônica em comparação aos animais do grupo branco (animais que não tem colite). Entretanto, após a recidiva da colite, não houve diferença estatística entre os animais que receberam a segunda dose de TNBS (grupo controle com recidiva) e animais que não receberam a segunda dose de TNBS (grupo controle sem recidiva) com relação à atividade da MPO colônica (Figura 13).

Primeira semana após a indução da colite

O composto-teste isolado C5 e as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 reduziram significativamente a infiltração de neutrófilos no cólon inflamado comparado ao grupo controle (Figuras 13A e 13B).

Segunda semana após a indução da colite

A associação C5+S15 diminuiu a atividade da MPO colônica comparado com o grupo controle. Os demais tratamentos estudados não reduziram a atividade da MPO colônica (Figura 13A).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

Os tratamentos estudados não reduziram significativamente os níveis de MPO colônico (Figuras 13A e 13B).

Nas três semanas, o tratamento com a S25 não inibiu de forma significativa a atividade da MPO colônica (Figuras 13A e 13B).

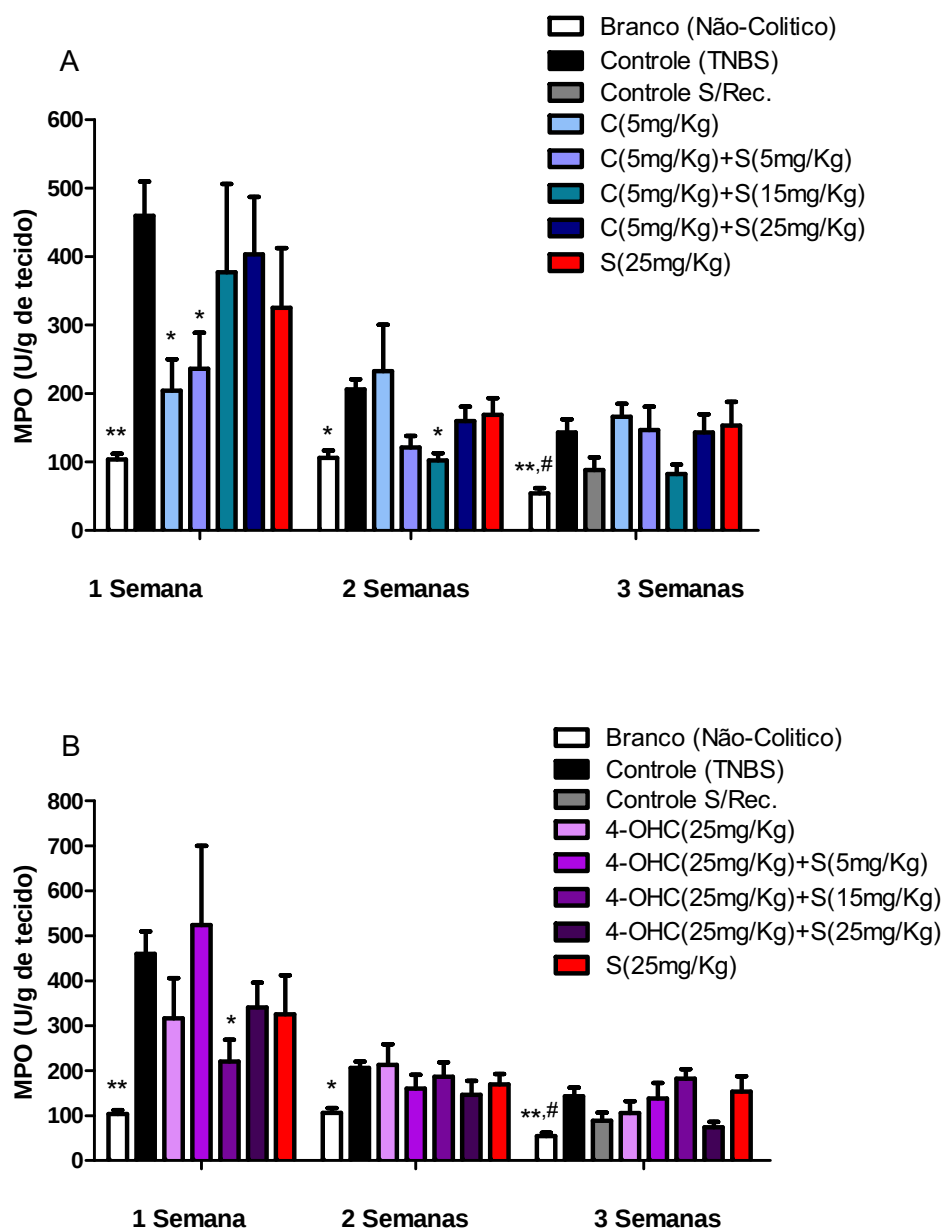


Figura 13: Atividade de mieloperoxidase (MPO) colônica de animais com colite crônica induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da cumarina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6 a 12). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle sem recidiva.

2.2.2.3. Atividade da fosfatase alcalina (FA) no cólon

A atividade da FA foi elevada no cólon dos animais, após a indução da colite crônica por TNBS/etanol. E ainda, após a recidiva da colite, os níveis de FA foram mais elevados no cólon dos animais do grupo controle com recidiva do que no cólon dos animais do grupo controle sem recidiva, o que indica que o processo inflamatório foi novamente instalado (Figura 14).

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento oral com os compostos-testes C5 e 4-OHC25 e com as associações C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 diminuiu a atividade da FA comparado com o grupo controle (Figuras 14A e 14B).

Segunda semana após a indução da colite

As associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 e o composto-teste 4-OHC25 diminuíram a atividade da FA comparado ao grupo controle (Figuras 14A e 14B).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

Os compostos-testes C5 e 4-OHC25 e a associação C5+S25 diminuíram a atividade da FA comparado com o grupo controle com recidiva (Figuras 14A e 14B).

Nas três semanas, o tratamento com a S25 não inibiu de forma significativa a atividade da FA colônica (Figuras 14A e 14B).

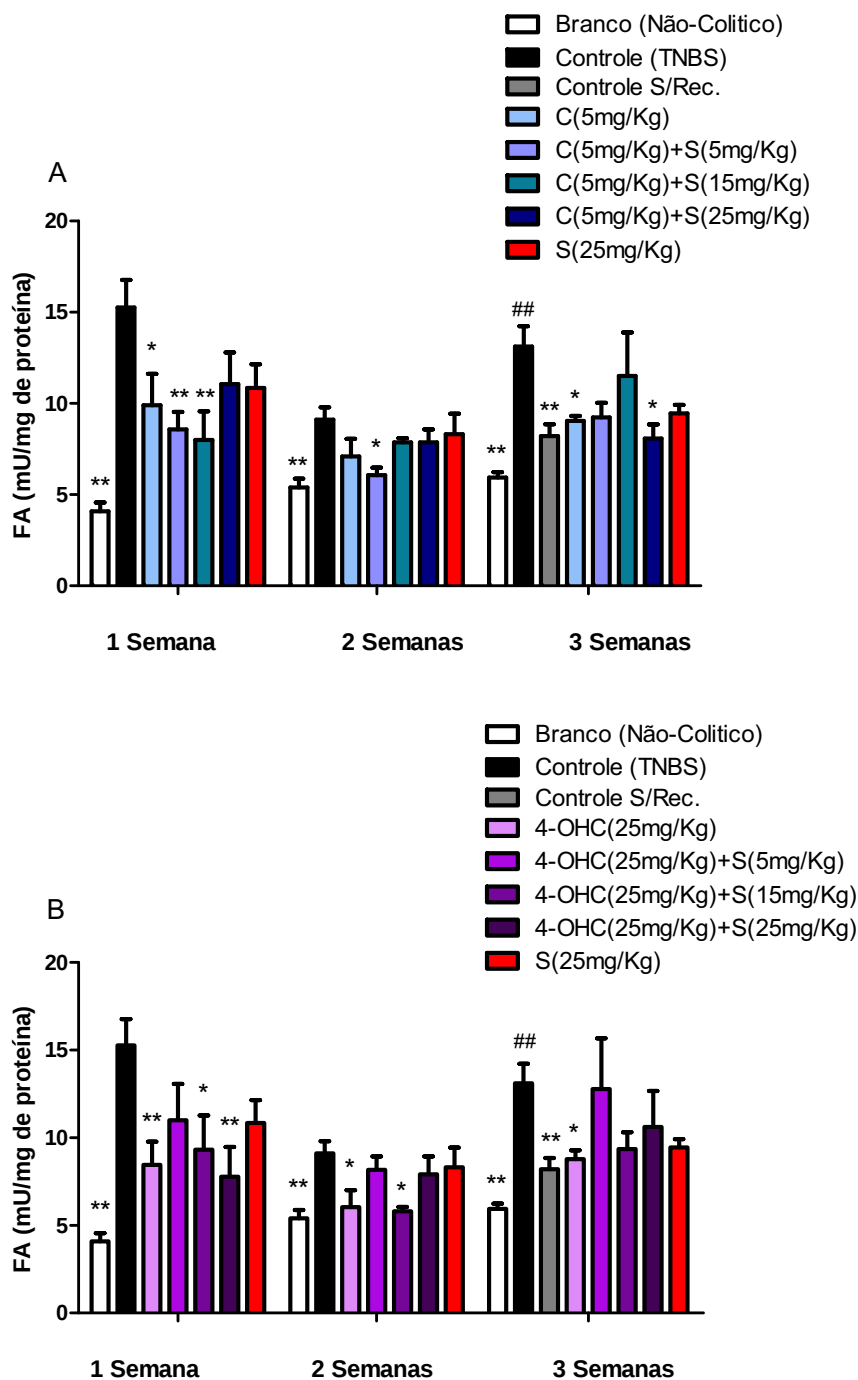


Figura 14: Atividade da fosfatase alcalina (FA) colônica de animais com colite crônica induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da cumarina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxicumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6 a 12). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$ comparado com o grupo controle sem recidiva.

2.2.2.4. Conteúdo de malonaldeído (MDA) no cólon

Os níveis de MDA foram aumentados, após a indução da colite por TNBS/etanol, como consequência do estresse oxidativo presente no cólon inflamado. Após a recidiva da colite, os níveis de MDA foram novamente aumentados, devido à reinstalação do processo inflamatório intestinal (Figura 15).

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento oral com os compostos-testes C5, 4-OHC25 e S25 e com as associações das cumarinas com a sulfassalazina diminuíram os níveis de MDA no cólon inflamado comparado com o grupo controle (Figuras 15A e 15B).

Segunda semana após a indução da colite

O composto-teste C5 e as associações C5+S25 e 4-OHC25+S5 diminuíram os níveis de MDA no cólon inflamado (Figuras 15A e 15B).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

O composto-teste 4-OHC25 e a associação 4-OHC25+S15 diminuíram os níveis de MDA no cólon comparado com o grupo controle com recidiva (Figura 15B).

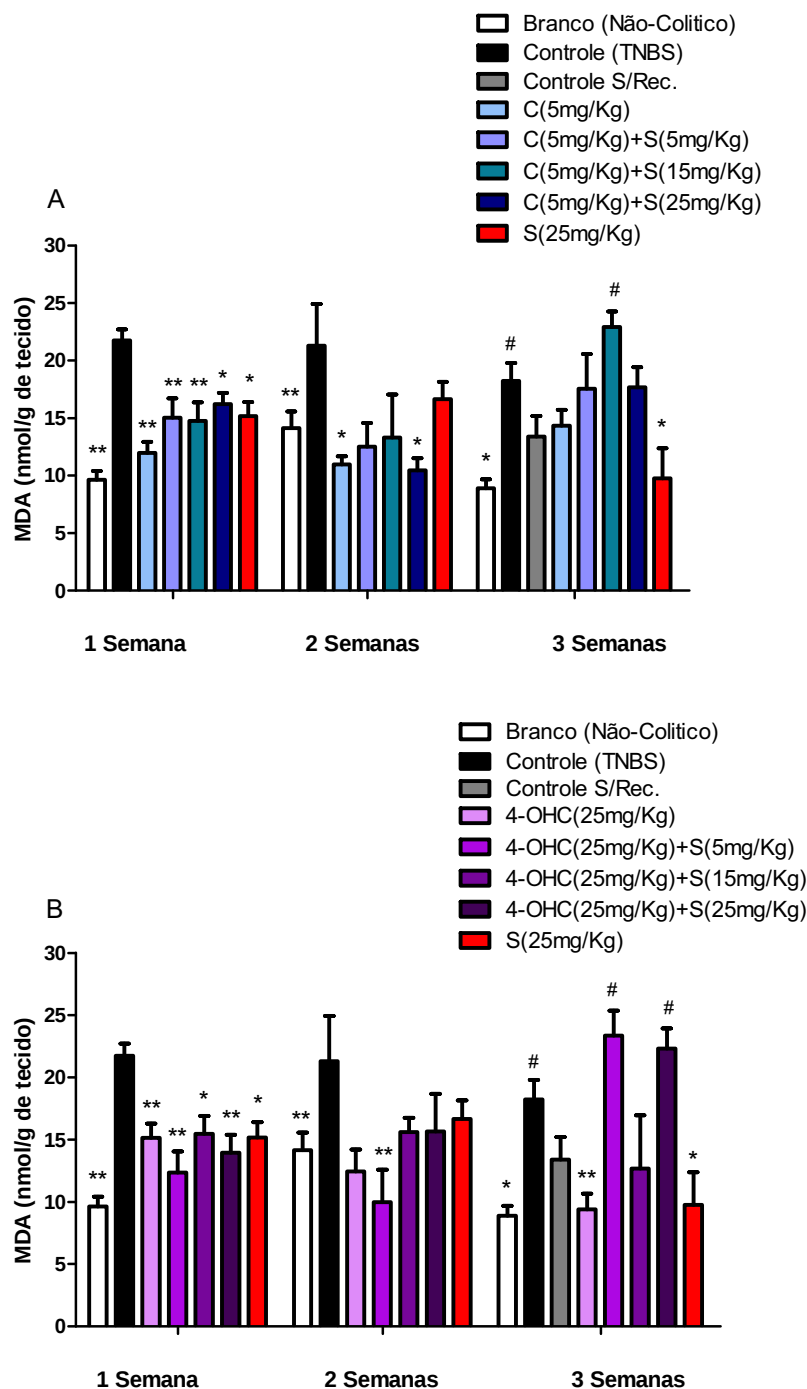


Figura 15: Conteúdo de malonaldeído (MDA) colônico de animais com colite crônica induzida por TNBS/etanol. (A): Efeito da curcumina (5mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). (B): Efeito da 4-hidroxycumarina (25mg/Kg) e da sua associação com as diferentes doses de sulfassalazina (5, 15 e 25mg/Kg). Resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. (n=6 a 12). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com o grupo controle sem recidiva.

2.2.3. Análise microscópica do cólon

O cólon dos animais do grupo branco (não-colítico) apresentou estrutura normal, onde pode-se observar a mucosa com as glândulas tubulares retas com células caliciformes e lâmina própria não edemaciada e, a submucosa com tecido conjuntivo levemente denso e também não edemaciada (Figuras 17A, 19A e 21A, Tabela 5).

Os animais do grupo controle apresentaram desorganização severa na histoarquitetura do cólon, ulceração e inflamação envolvendo todas as camadas do cólon durante as três semanas de experimentos (Figuras 17B, 19B e 21B, Tabela 5).

As amostras de cólon de animais com colite não tratados foram também caracterizadas por edema severo e infiltração difusa de leucócitos, composto principalmente por neutrófilos na camada mucosa e por linfócitos na submucosa. O processo inflamatório foi associado também à hiperplasia e dilatação das criptas.

Primeira semana após a indução da colite

O tratamento com C5, 4-OHC25 e S25 demonstrou mucosa recuperada sem ulceração e infiltração leve de células inflamatórias comparado com animais do grupo controle. Além disso, o envolvimento transmural das lesões foi reduzido (Figuras 17C, 17D e 17E, Tabela 5).

A associação C5+S5 apresentou menor infiltrado mononuclear e granulocítico nas camadas mucosa e submucosa comparado com o grupo controle (Figura 17F). O tratamento com as associações 4-OHC25+S5 e 4-OHC25+S15 diminuiu a infiltração de células inflamatórias na submucosa comparado com o grupo controle (Figuras 18C e 18D, Tabela 5).

As demais associações C5+S15, C5+S25 e 4-OHC25+S25 não diminuíram estatisticamente o processo inflamatório intestinal induzido por TNBS/etanol comparado com o grupo controle (Figuras 18A, 18B e 18E, Tabela 5).

Segunda semana após a indução da colite

Os tratamentos estudados não reduziram de forma significativa o processo inflamatório intestinal induzido por TNBS/etanol em ratos comparado com o grupo controle (Figuras 19C, 19D, 19E, 19F, 20A, 20B, 20C, 20D e 20E, Tabela 5).

Terceira semana após a indução da colite com recidiva no 14º dia

Após a recidiva, o processo inflamatório intestinal foi novamente instalado, o que pode ser comprovado quando comparados os grupos controle com recidiva e sem recidiva da colite (Figuras 21B e 21C, Tabela 5).

Os compostos-testes C5 e 4-OHC25 preveniram a recidiva do processo inflamatório intestinal, evidenciada por um menor infiltrado de células inflamatórias nas camadas mucosa e submucosa, e também evitaram a ulceração no epitélio comparado com o grupo controle com recidiva (Figuras 21D e 21E, Tabela 5).

As associações C5+S5 e C5+S15 também preveniram a recidiva do processo inflamatório intestinal, diminuindo o infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa e também reduziram o edema (Figuras 22A e 22B, Tabela 5).

O tratamento com as associações C5+S25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 e com S25 apresentou infiltrado inflamatório moderado a severo nas camadas mucosa e submucosa (Figuras 22C, 22D, 22E, 22F e 21F, Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação microscópica da cumarina, 4-hidroxi-cumarina e de suas associações com a sulfassalazina na fase crônica da colite induzida por TNBS/etanol em ratos.

Grupo	Escore microscópico (0-27)		
	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas
Branco	0(0-0) ***	0(0-0) ***	0(0-0) ***
Controle C/Rec.	21,5(19-24)	11(9-17)	18(15-24)
Controle S/Rec.	-	-	6,5(5-11) ***
C5	9,5(7-10) **	8,5(7-11)	9,5(8-14) *
C5+S5	11(6-15) *	10(7-13)	10(8-13) *
C5+S15	11(10-13)	11,5(9-16)	10(9-15) *
C5+S25	10(9-15)	11,5(7-16)	10(10-16)
4-OHC25	9(6-13) **	10(8-12)	9(5-10) **
4-OHC25+S5	9,5(8-12) **	10,5(7-10)	13(10-16)
4-OHC25+S15	10(8-13) *	11(9-14)	11(7-14)
4-OHC25+S25	14(9-16)	11,5(7-15)	10,5(9-15)
S25	8(6-16) **	11(7-14)	10,5(8-15)

Os dados foram expressos em mediana e range. * p<0,05; ** p<0,01 comparado com o grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco p < 0,01 (significância não demonstrada na tabela).

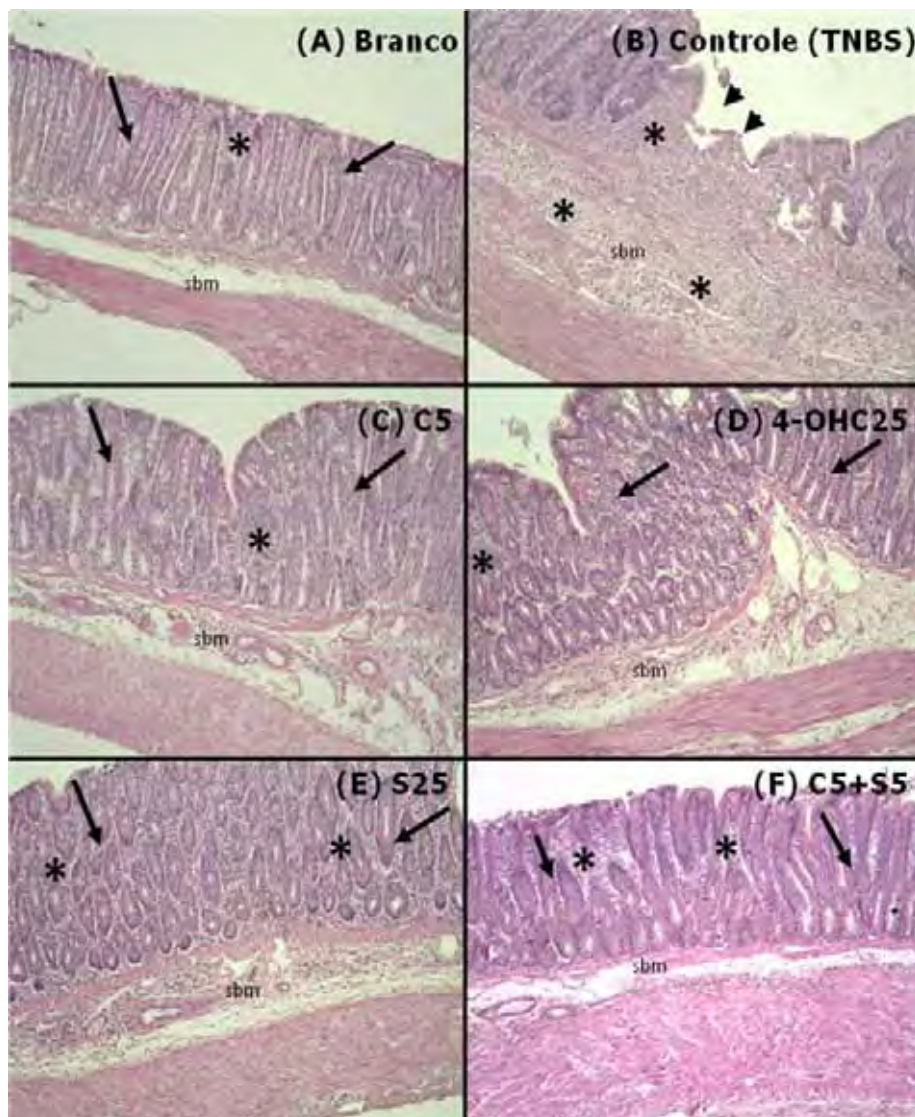


Figura 17: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, primeira semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Aumento 100X). (A) Branco (animal não colítico) com histologia normal do cólon de rato. Lâmina própria com esparsas células inflamatórias (asteriscos) entre as glândulas mucosa (setas). Submucosa (sbm); (B) Controle (TNBS) com ulceração (cabeça de setas) e infiltração severa de células inflamatórias (asteriscos) na lamina própria e na sbm; (C) C5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) com restabelecimento da organização do cólon e leve infiltração de células inflamatórias (asteriscos) entre as glândulas (setas); (D) 4-OHC25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) evidenciando leve processo inflamatório (asteriscos) entre as glândulas (setas) na lâmina própria; (E) S25 animais com colite tratados com sulfassalazina (25mg/Kg) demonstrando leve infiltrado inflamatório (asteriscos) entre as glândulas (setas) e na submucosa (sbm) e (F) C5+S5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg) evidenciando pouco infiltrado inflamatório (asterisco) entre as glândulas na lâmina própria (setas).

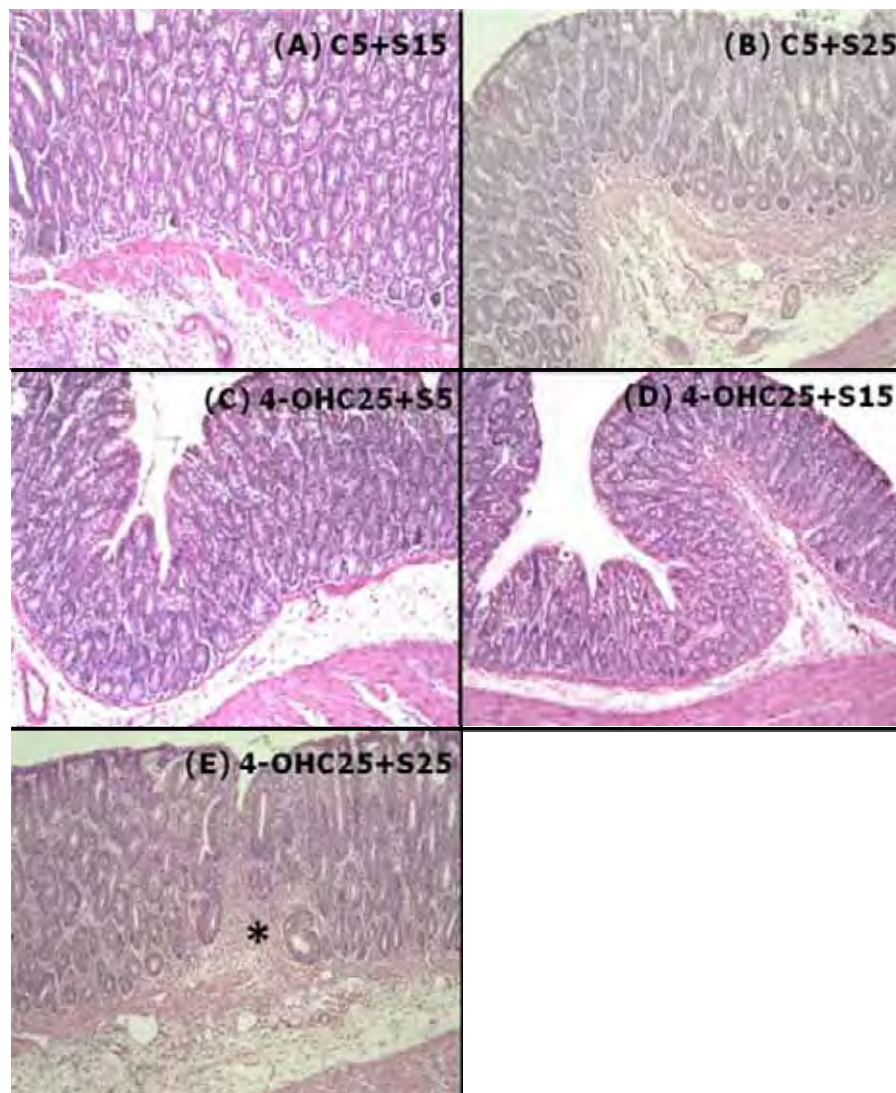


Figura 18: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, primeira semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Aumento 100X). (A) C5+S15 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg); (B) C5+S25 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg); (C) 4-OHC25+S5 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg); (D) 4-OHC25+S15 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg) e (E) 4-OHC25+S25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg) com leve infiltração de células inflamatórias (asterisco).

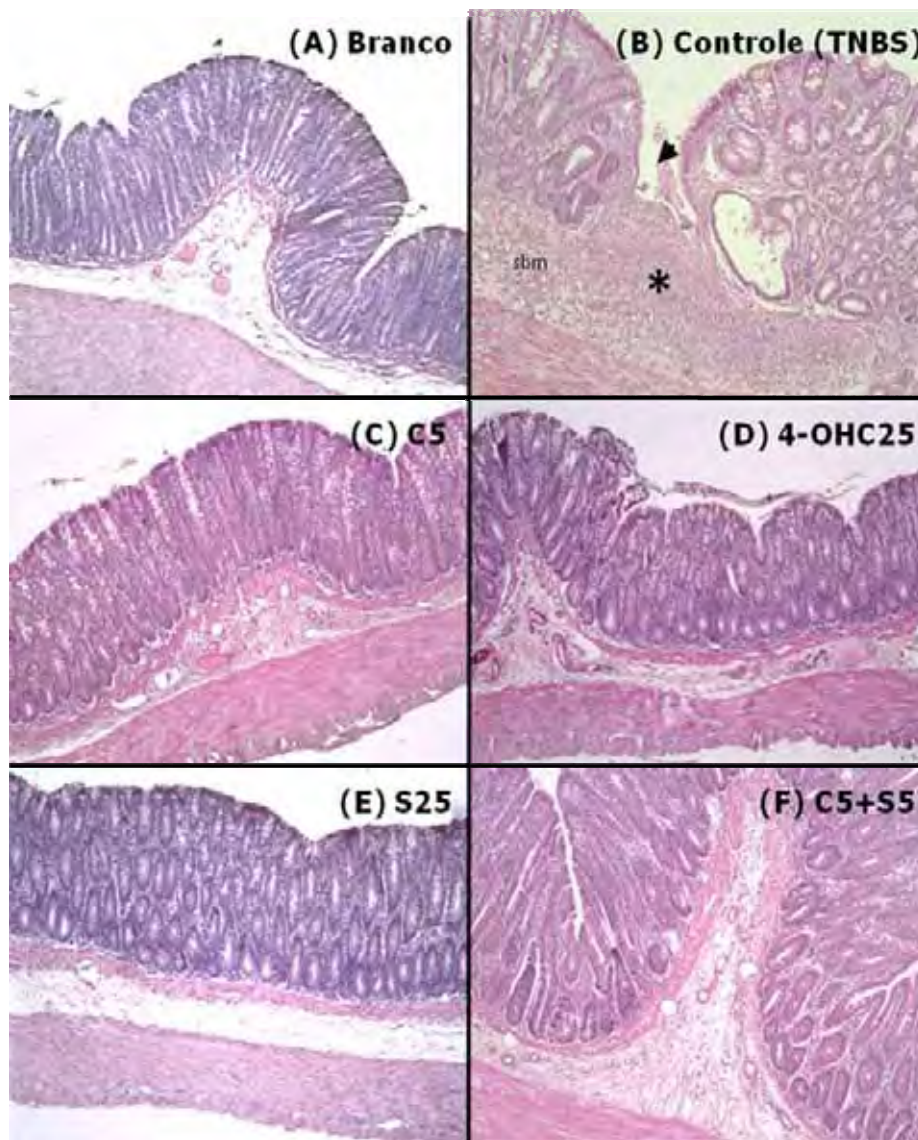


Figura 19: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, segunda semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). (A) Branco (animal não colítico) com histologia normal do cólon de rato; (B) Controle (TNBS) com ulceração (cabeça de setas) e infiltração severa de células inflamatórias (asterisco) na lamina própria e na submucosa (sbm); (C) C5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg); (D) 4-OHC25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg); (E) S25 animais com colite tratados com sulfassalazina (25mg/Kg) e (F) C5+S5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg).

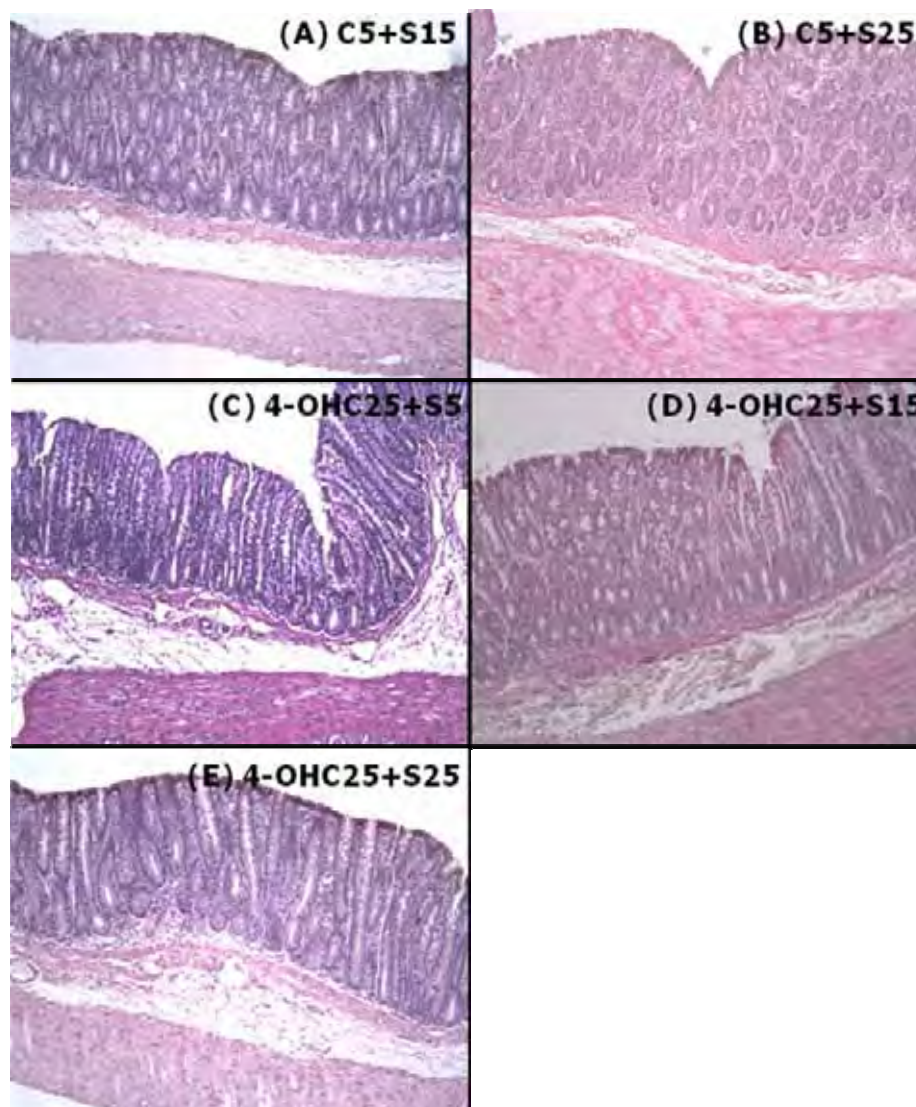


Figura 20: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, segunda semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Aumento 100X). (A) C5+S15 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg); (B) C5+S25 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg); (C) 4-OHC25+S5 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg); (D) 4-OHC25+S15 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg) e (E) 4-OHC25+S25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg).

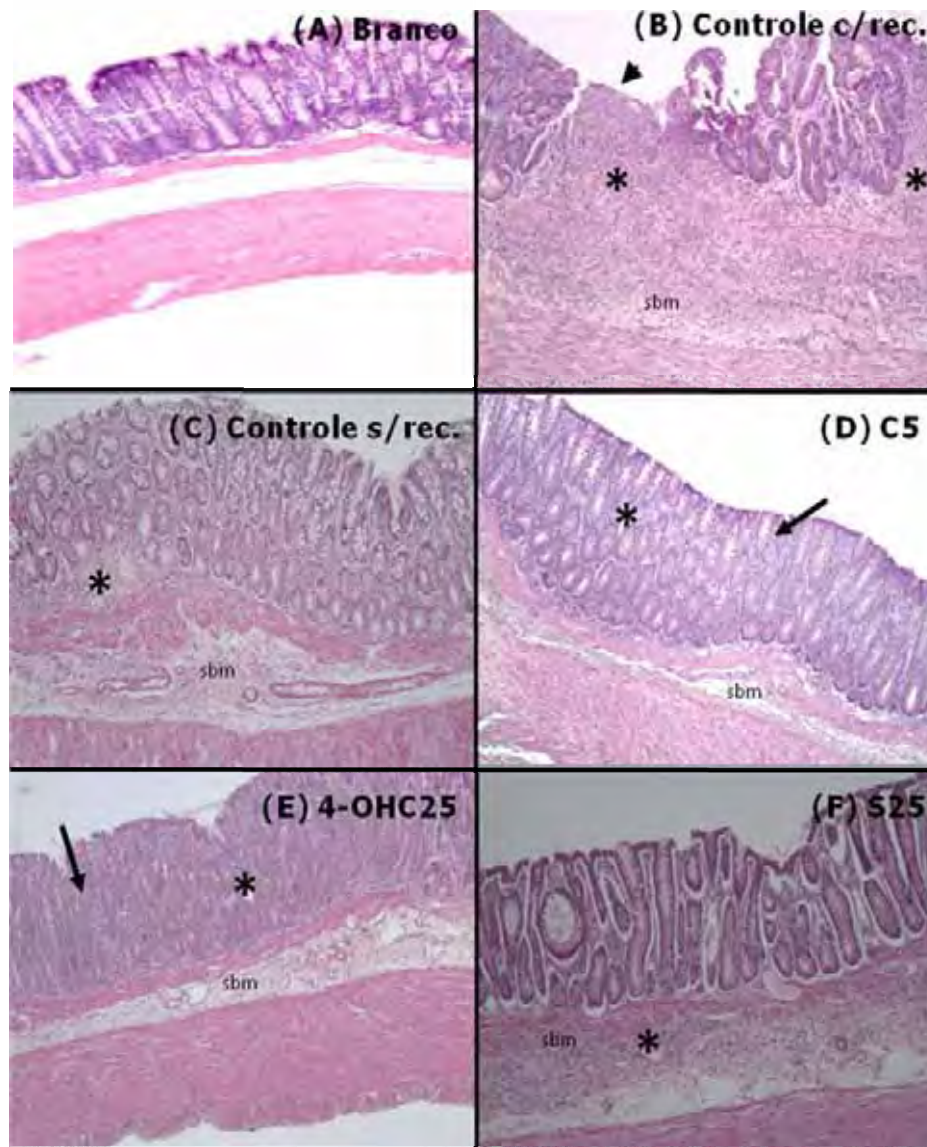


Figura 21: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, terceira semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Aumento 100X). (A) Branco (animal não colítico) com histologia normal do cólon de rato; (B) Controle c/rec. animais que receberam a segunda dose de TNBS, mostrando ulceração na mucosa (cabeça da seta), infiltração severa de células inflamatórias na lâmina própria e submucosa (sbm) e presença de edema; (C) Controle s/rec. animais que não receberam a segunda dose de TNBS, mostrando infiltrado inflamatório leve (asterisco); (D) C5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) com restabelecimento da organização do cólon e leve infiltração de células inflamatórias (asterisco) entre as glândulas (seta); (E) 4-OHC25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) com restabelecimento da organização do cólon e leve infiltração de células inflamatórias (asterisco) entre as glândulas (seta); (F) S25 animais com colite tratados com sulfassalazina (25mg/Kg), demonstrando moderada infiltração de células inflamatórias na sbm (asterisco).

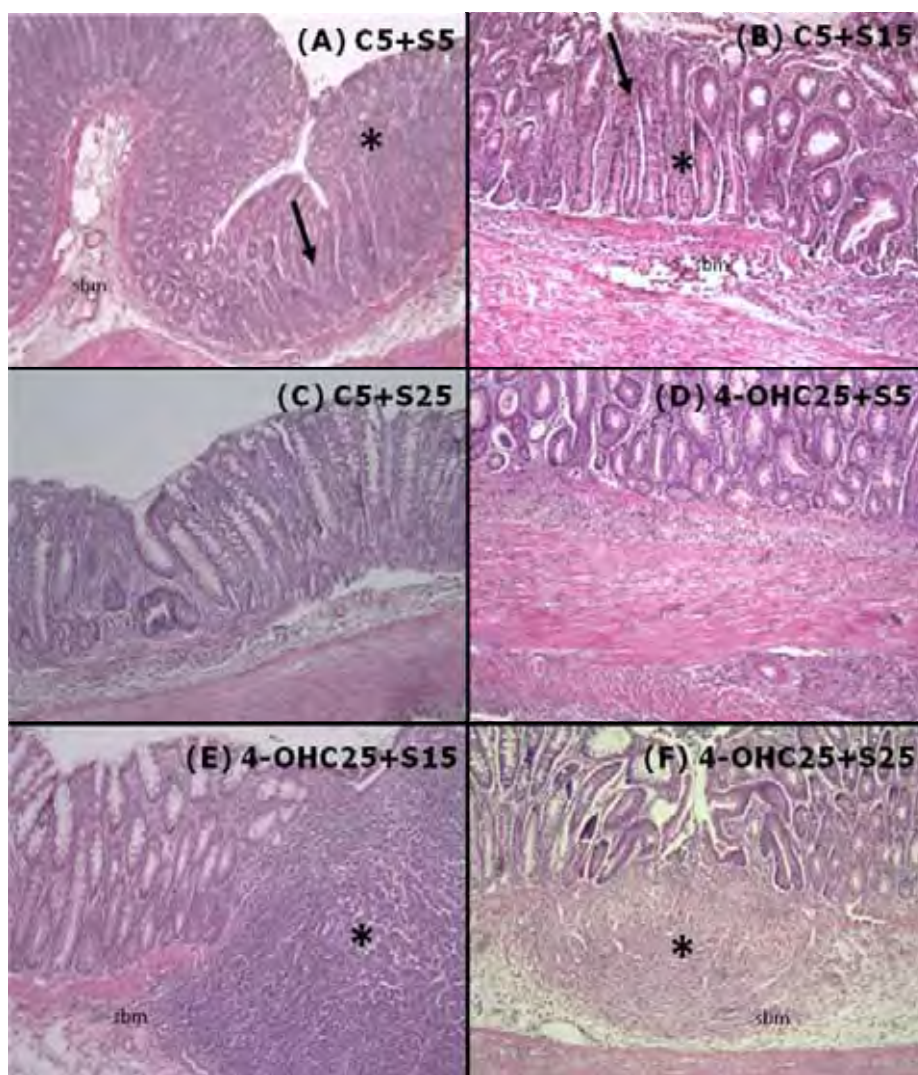


Figura 22: Fotomicografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, terceira semana de tratamento. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Aumento 100X). (A) C5+S5 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg) com restabelecimento da organização do cólon e leve infiltração de células inflamatórias (asterisco) entre as glândulas (seta); (B) C5+S15 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg) com restabelecimento da organização do cólon e leve infiltração de células inflamatórias (asterisco) entre as glândulas (seta); (C) C5+S25 animais com colite tratados com cumarina (5mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg); (D) 4-OHC25+S5 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (5mg/Kg); (E) 4-OHC25+S15 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (15mg/Kg) com severa infiltração de células inflamatórias na submucosa (sbm) e na lâmina própria (asterisco) e (F) 4-OHC25+S25 animais com colite tratados com 4-hidroxi-cumarina (25mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg) com moderada infiltração de células inflamatórias na submucosa e na lâmina própria (asterisco).

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1. Discussão

O termo Doença Inflamatória Intestinal (DII) refere-se a doenças crônicas do trato gastrointestinal e compreende fundamentalmente a Colite Ulcerativa (CU) e a Doença de Crohn (DC), ambas com etiologia desconhecida (Katz *et al.*, 1999). Os tratamentos existentes até o momento são para combater os sintomas destas doenças. Embora estes tratamentos sejam geralmente efetivos, eles apresentam significantes efeitos colaterais.

A primeira opção terapêutica utilizada no tratamento da DII é o fármaco sulfassalazina. Apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente conhecido, sabe-se que estes fármacos sequestram radicais livres, protegendo as células da mucosa intestinal da ação destes que são citotóxicos, além de inibirem a síntese de prostaglandinas, por inibirem a via da ciclooxigenase (Peppercorn, 1994). Apesar de seu efeito benéfico, a sulfassalazina induz diversos efeitos colaterais como dores de cabeça, náuseas, anorexia, dispepsia, reações alérgicas, febre, hemólise, neutropenia e anemia (Ransford e Langman, 2002), principalmente devido ao uso prolongado no tratamento das DII. A maioria destes efeitos pode ser revertida com a diminuição da dose utilizada. Entretanto, esse procedimento diminui a eficácia do tratamento. Por esta razão, a comunidade científica vem buscando novas estratégias de tratamentos para combater as DII (Di Stasi *et al.*, 2004; Bailón *et al.*, 2008), especialmente com o uso de probióticos e prebióticos (Osman *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2005; Camuesco *et al.*, 2005; Perán *et al.*, 2005; Damaskos e Kolios, 2008) e de compostos polifenólicos, especialmente flavonóides e cumarinas (Cruz *et al.*, 1998, Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Gálvez *et al.*, 2001; Di Stasi *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006). Entre as cumarinas destacam-se os efeitos descritos em nosso estudo com a cumarina e a 4-hidroxi-cumarina, ambas com atividade antiinflamatória intestinal (Luchini *et al.*, 2008). Com base nestes resultados preliminares, considerou-se que o uso combinado da cumarina ou da 4-hidroxi-cumarina com a sulfassalazina poderia representar uma estratégia terapêutica para o tratamento da colite, especialmente considerando-se a possibilidade de manutenção e/o aumento da eficácia com redução dos efeitos colaterais decorrentes da administração de sulfassalazina.

Para avaliar os efeitos antiinflamatórios destes compostos, foi utilizado o modelo de colite induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Trata-se de um dos modelos mais utilizados para a avaliação da atividade de novos produtos e por mimetizar várias das características histopatológicas, bioquímicas e clínicas da DII em humanos. Este modelo é facilmente reproduzível e apresenta baixo custo. A administração intracolônica de TNBS em uma solução alcoólica (etanol 50%) rompe as membranas celulares e o TNBS age como um hapteno, promovendo uma resposta imunológica (Morris *et al.*, 1989). O TNBS também provoca efeito citotóxico direto sobre o epitélio intestinal, por produzir espécies reativas de oxigênio (Grisham *et al.*, 1991) e depletar os níveis de glutathione (Ardite *et al.*, 2000). Estes eventos induzem o surgimento de lesões na parede do cólon, aumento a permeabilidade intestinal e produção de mediadores inflamatórios (Yamada *et al.*, 1992).

Em nosso estudo foram testadas várias doses de cumarina e de 4-hidroxi-cumarina nas fases aguda e crônica com recidiva, no modelo de colite induzida por TNBS/etanol em ratos. Os resultados demonstraram que ambas as cumarinas apresentaram atividade antiinflamatória intestinal, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da colite com recidiva. Este efeito foi associado à diminuição do estresse oxidativo colônico, devido à inibição da depleção da GSH colônica com os tratamentos (Luchini *et al.*, 2008), no entanto, outras ações farmacológicas destes compostos devem estar envolvidas na produção deste efeito. Neste sentido, buscou-se avaliar os efeitos destes compostos sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na colite experimental e humana, utilizando diferentes linhagens celulares (Caco2, RAW 264.7. e linfócitos de camundongos). Os resultados mostram que a cumarina foi capaz de diminuir os níveis de IFN- γ pelos linfócitos enquanto que a 4-hidroxi-cumarina foi hábil em diminuir os níveis de IL-8 pela Caco2, IL-1 β pela RAW 264.7. e IL-2 pelos linfócitos.

A IL-8 é um importante agente quimiotático para neutrófilos, mas também pode ser para outros leucócitos, como basófilos e células T. Esta citocina pode ser produzida tanto por células leucocitárias, como por células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (Podolsky e Fiocchi, 2000). Numerosos ensaios *in vitro* revelam que no intestino inflamado a migração de neutrófilos pelos vasos depende da secreção de IL-8 pelas células epiteliais. A IL-8 é uma citocina induzível, desta maneira é dificilmente encontrada em células não estimuladas. Seus níveis se elevam em resposta a citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e estímulos como o LPS (Van Deventer, 1997).

No presente estudo, como modelo de células epiteliais colônicas foi utilizado células de adenocarcinoma de cólon humano Caco2, a qual produziu quantidade elevada de IL-8 em resposta a IL-1 β . A 4-hidroxi-cumarina diminuiu os níveis de IL-8 no sobrenadante das células Caco2, o que sugere que este mecanismo de ação pode estar envolvido no seu efeito antiinflamatório intestinal. Este efeito não se deve a uma ação tóxica sobre as células, pois não apresentou efeito algum sobre a viabilidade celular. Compostos com atividade antiinflamatória intestinal tais como o gel de aloe vera extraído das folhas de *Aloe barbadensis* (Langmead *et al.*, 2004) e a berberina (Zhow e Mineshita, 2000) também diminuem os níveis de IL-8 no sobrenadante da cultura de Caco2.

Os monócitos e os macrófagos constituem a fonte principal de TNF- α e IL-1 β , ambas envolvidas no início e na manutenção da resposta inflamatória. Entre os estímulos que regulam a síntese de TNF- α e IL-1 β encontram-se os ligados aos receptores tipo “Toll” (TLRs), como o LPS, que se une ao TLR4 (Beck e Wallace, 1997). Existem relatos na literatura que a concentração de IL-1 β no intestino está aumentada nos pacientes com CU e DC (Ligumsky *et al.*, 1990; Mahida *et al.*, 1999) assim como em modelos experimentais de inflamação intestinal (Rachmilewitz *et al.*, 1989; Morteau *et al.*, 1993). A IL-1 β é considerada um marcador da inflamação mais sensível que a atividade da MPO na fase crônica do processo inflamatório intestinal (Sánchez de Medina *et al.*, 1996). Neste estudo, os macrófagos de camundongo RAW 264.7 foram estimulados com LPS a produzir IL-1 β . Neste estudo, a 4-hidroxi-cumarina diminuiu os níveis de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos de camundongo RAW 264.7, o que sugere que este mecanismo de ação pode estar envolvido no seu efeito antiinflamatório intestinal. Este efeito também não se deve a uma ação tóxica sobre as células, pois não apresentou efeito algum sobre a viabilidade celular. Resultado semelhante foi obtido por Blonska *et al.* (2003), os quais demonstraram que os flavonóides crisina, galangina, kaempferol e quercetina diminuem, *in vitro*, os níveis de IL-1 β no sobrenadante das células RAW 264.7.

As citocinas IL-2 e IFN- γ são produzidas por linfócitos ativados. A IL-2 interage com o seu receptor específico na superfície do linfócito induzindo a expansão clonal de linfócitos T efetores. Os níveis plasmáticos de IL-2 como de seu receptor encontram-se aumentados em pacientes com DII, o que sugere que a diminuição da secreção de IL-2 pode ser benéfica no processo inflamatório intestinal (Ardizzone, 2009). Isto tem sido demonstrado pelo uso de ciclosporina A em pacientes com CU resistentes aos corticóides (Hanauer, 2004). A ciclosporina A é um fármaco imunomodulador que

diminuiu a secreção de IL-2 pelos linfócitos. O IFN- γ promove a apresentação de antígenos pelos macrófagos, suprime a atividade da célula Th2, causa a expressão do complexo de histocompatibilidade maior de classe II nas células epiteliais, promove adesão e a ligação necessária para a migração de leucócitos e promove a ativação das células natural killer (Rutgeersts, *et al.*, 2009). Estudos têm reportado aumento na produção de IFN- γ no cólon de pacientes com DII (Niessner *et al.*, 1995; Desreumaux *et al.*, 1997). Atualmente tem-se usado fontolizumab (anticorpo monoclonal humanizado IgG1 contra IFN- γ) no tratamento de casos moderados a severo de pacientes com DC (Reinisch, 2006). Assim, drogas que promovam a diminuição da secreção de IFN- γ e IL-2 por linfócitos podem ser benéficas para o tratamento das DII.

Para avaliar o papel das cumarinas sobre a secreção destes mediadores, foi utilizado o baço de camundongos da cepa Balb/c. Os linfócitos se ativam com concanavalina A, que se unem diretamente a um receptor antigênico e levam aproximadamente umas 24 horas para começar a proliferar. Como resultado produz altas quantidades de IL-2 e IFN- γ , além de outras citocinas. Neste estudo, a 4-hidroxi-cumarina diminuiu os níveis de IL-2 e a cumarina diminuiu os níveis de IFN- γ no sobrenadante dos linfócitos, o que sugere que estes mecanismos de ação podem estar envolvidos nos seus efeitos antiinflamatórios intestinais. Estes efeitos também não se devem a uma ação tóxica sobre as células, pois as cumarinas não apresentaram efeito algum sobre a viabilidade celular. Compostos com atividade antiinflamatória intestinal tais como o changtai (Liu *et al.*, 2008) e 1,25 diidroxivitamina D3 (Ardizzone *et al.*, 2009) também diminuiriam os níveis de IL-2 e IFN- γ de linfócitos.

As cumarinas são compostos extremamente variáveis em sua estrutura química, com vários tipos de substituição na sua estrutura básica, que podem influenciar sua atividade biológica (Kostova, 2005). Neste estudo, os resultados dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* demonstraram que a presença de hidroxila no carbono 4 na molécula original de cumarina (4-hidroxi-cumarina) proporcionou maior atividade biológica a cumarina, ou seja, a 4-hidroxi-cumarina diminuiu os níveis de IL-8 na Caco2, IL-1 β na Raw 264.7 e IL-2 nos linfócitos, enquanto que a cumarina diminuiu apenas os níveis de IFN- γ pelos linfócitos.

O presente estudo mostrou também o efeito exercido por diferentes associações de cumarina 5mg/Kg (C5) ou 4-hidroxi-cumarina 25mg/Kg (4-OHC25) com a sulfassalazina 5, 15 e 25mg/Kg (C5+S5, C5+S15, C5+25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25) na melhora do insulto provocado pela instalação

intracolônica de TNBS/etanol em ratos em duas condições experimentais: aguda e crônica com recidiva.

Na avaliação dos efeitos da associação entre as cumarinas e a sulfassalazina, destacaram-se em prevenir a colite, em ambas as fases aguda e crônica, as associações de C5+S5 e 4-OHC25+S15, as quais também preveniram os efeitos causados pela recidiva da colite. Pode-se considerar que estes resultados são importantes, uma vez que os objetivos principais da terapia contra a DII são o de induzir a remissão da doença quando está ativa e prolongar o período de remissão quando está quiescente, já que a duração da remissão é importante para a determinação da severidade da doença e a qualidade de vida dos pacientes (Gálvez *et al.*, 2003).

Neste estudo, a colite foi caracterizada pelo espessamento da parede do intestino, evidenciado por um significativo aumento da relação peso/comprimento, aparecimento de fezes diarréicas, incidência de aderência, depleção dos níveis de GSH e aumento da atividade das enzimas FA e MPO nas duas condições experimentais (aguda e crônica com recidiva). Além disso, a inflamação da fase crônica foi associada também com aumento dos níveis de MDA colônico. Todos estes resultados confirmam que em ambas as condições experimentais ocorrem uma resposta inflamatória ativa derivada da atividade exarcebada das células imunes presentes no infiltrado inflamatório intestinal. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por outros autores estudando compostos como a morina e a paepalantina (Galvéz *et al.*, 2001; Di Stasi *et al.*, 2004).

Na fase aguda da colite, a administração oral de C5 ou 4-OHC25 ou S25 não reduziu de forma significativa a extensão e a severidade das lesões colônicas no processo inflamatório induzido por TNBS/etanol em ratos. Quando as cumarinas foram associadas com a sulfassalazina C5+S25 e 4-OHC25+S15 ocorreu ação conjunta verificada pela redução do índice de lesão. Na fase crônica da colite, o tratamento oral com C5 ou S25 e com as associações C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 preveniu macroscopicamente a extensão e a severidade da lesão induzida pela segunda dose de TNBS/etanol comparado com o grupo controle com recidiva. Esta avaliação macroscópica sugere que, após 21 dias de tratamento, estas estratégias farmacológicas promoveram efeitos preventivos sobre o dano colônico. Além disso, as associações C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25, assim como os compostos-testes C5 e 4-OHC25 também reduziram o escore e/ou a extensão das lesões na primeira semana após a indução da colite, indicando que estes tratamentos possuem efeito curativo neste modelo experimental.

Exceto para C5 na fase aguda, todos os tratamentos estudados em ambas as fases não foram efetivos na redução da relação peso/comprimento colônico. Este parâmetro, relação peso/comprimento colônico, é de difícil recuperação devido à severa e extensiva lesão induzida no cólon pelo TNBS/etanol, o qual é difícil ser superado por tratamentos farmacológicos (Veljaca *et al.*, 1995).

Os efeitos preventivos (fase aguda) dos compostos-testes C5 e 4-OHC25 bem como das associações C5+S25 e 4-OHC25+S15 foram relacionados à redução significativa da incidência de diarreia, indicando restauração da capacidade de absorção do cólon, a qual é profundamente alterada como consequência do processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 2002). Os efeitos curativos (fase crônica) dos compostos-testes C5 e 4-OHC25 bem como das associações C5+S15, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 foram também relacionados à redução da incidência de diarreia no cólon na primeira semana após a indução da colite.

A presença de aderência entre o cólon e órgãos adjacentes, a qual resulta na inflamação transmural, é um aspecto comum da DC (Levine, 1994) e da colite experimental induzida por TNBS/etanol (Yamada *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1995). As associações C5+S25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 diminuíram a incidência de aderência, indicando efeito protetor destas associações. Na fase crônica, o composto-teste C5 e a associação 4-OHC25+S15 evitaram o aparecimento de aderência na primeira semana após a indução da colite. Além disso, as associações C5+S5, C5+S25, 4-OHC25+S5, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25 e os compostos isolados 4-OHC25 e S25 evitaram o aparecimento de aderência na segunda semana após a indução da colite, sugerindo efeito curativo destes tratamentos.

O processo inflamatório intestinal agudo e crônico induzido por TNBS/etanol provocou nos animais redução do consumo de alimento e conseqüentemente perda de peso corpóreo, conforme já reportado por outros autores (Gálvez *et al.*, 2000; Di Stasi *et al.*, 2004). Na fase aguda, foi verificado que todos os grupos tratados tiveram índices semelhantes de peso corpóreo e consumo de alimento comparado a animais do grupo controle. O efeito curativo (fase crônica) da associação C5+S5 foi também associado ao aumento do consumo de alimento e ao ganho de peso corpóreo na primeira semana após a indução da colite.

A atividade antiinflamatória dos compostos-testes C5 e 4-OHC25, na fase aguda da colite, foi também confirmada bioquimicamente pela mensuração dos níveis de MPO no cólon inflamado. A MPO é uma enzima predominantemente encontrada nos

grânulos azurófilos dos neutrófilos, e é um marcador bioquímico de neutrófilos (Yamada *et al.*, 1992; Villegas *et al.*, 2003) e sua mensuração tem sido amplamente utilizada para acompanhar o processo inflamatório (Camuesco *et al.*, 2005). A redução da atividade desta enzima pode ser interpretada como manifestação da propriedade antiinflamatória de um dado composto (Veljaca *et al.*, 1995). Ao associar as cumarinas com a sulfassalazina na fase aguda da colite, a atividade da MPO colônica não foi inibida significativamente. Verificou-se também que a associação de 4-OHC25+S5 aumentou a atividade da MPO colônica. Este efeito próinflamatório indesejável pode ser devido a interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas decorrente da associação destes compostos, mas para a explicação destes efeitos novos estudos são necessários. Um efeito dual tem sido descrito para vários flavonóides, como diosmina e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996) e silimarina (Cruz *et al.*, 2001), e para a paepalantina (Di Stasi *et al.*, 2004); em baixas doses esses compostos se comportam como antioxidantes e antiinflamatórios em cólon de ratos e em altas doses, como prooxidantes e proinflamatórios.

Diferentemente do que ocorreu na fase aguda, o tratamento com as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 na fase crônica foram capazes de reduzir a extensão do infiltrado neutrofilico no cólon na primeira semana após a administração de TNBS, a qual foi determinada pela redução da atividade da MPO colônica, assim como o tratamento com o composto-teste C5. Compostos com atividade antiinflamatória intestinal tais como rutosídeo (Cruz *et al.*, 1998), quercitrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Camuesco *et al.*, 2004), morina (Gálvez *et al.*, 2001) e curcumina (Jiang *et al.*, 2006), também foram capazes de reduzir a atividade enzimática da MPO colônica.

Microscopicamente, a DII é caracterizada pela infiltração de um grande número de células como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos na camada mucosa e lâmina própria e o infiltrado inflamatório é acompanhado de lesão na mucosa, aumento da permeabilidade vascular, rompimento da matriz extracelular, edema, dano nas células epiteliais e ulceração (Asakura *et al.*, 2007). 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). O efeito antiinflamatório dos compostos-testes C5 e 4-OHC25 e das associações C5+S5 e C5+S25 na fase aguda foi também confirmado microscopicamente pela redução da proliferação de células inflamatórias na mucosa e

na submucosa. Na fase crônica, os animais tratados com os compostos-testes C5 e 4-OHC25 apresentaram menor dano tecidual com menor presença de infiltrado inflamatório, o que pode ser observado pela diminuição do escore microscópico tanto na primeira, quanto na terceira semana após a indução da colite, reforçando que estes tratamentos apresentam tanto efeitos curativos como preventivos no modelo crônico de colite induzido por TNBS/etanol. Dentre as associações testadas no presente estudo, a associação de C5+S5 foi mais efetiva em reduzir o dano histológico que as demais associações, porque reduziram o infiltrado inflamatório tanto na primeira, quanto na terceira semana após a indução da colite, demonstrando efeitos curativos e preventivos. As demais associações testadas tiveram apenas efeito ou curativo ou preventivo.

Os radicais livres de oxigênio e nitrogênio possuem papel chave na fisiopatologia da inflamação intestinal (Yamada e Grisham, 1994). Loguercio *et al.*, (1996) propuseram que o dano causado inicialmente pelo modelo de colite induzido por TNBS/etanol, é devido à produção elevada de radicais livres, sem a participação de componentes derivados do processo inflamatório. Inicialmente o aumento da produção de radicais livres induz a lipoperoxidação que termina com a liberação de mediadores quimiotáticos, que por sua vez, recrutam células inflamatórias (neutrófilos) a infiltrarem a mucosa danificada. O infiltrado neutrofílico induz uma alta produção de radicais livres. O estresse oxidativo resultante, depleta as defesas antioxidante endógena na mucosa colônica inflamada (Lih-Brody *et al.*, 1996). Desta forma, compostos que promovam a inibição ou neutralização de radicais livres, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, pode ser benéfico no tratamento das DII (Nielsen e Rask-Madsen, 1996).

A GSH é considerada um importante sequestrador de radicais livres, pela sua capacidade antioxidante direta e pela sua propriedade em ser substrato para ação da glutathione peroxidase e da glutathione transferase (Beutler, 1989). A depleção dos níveis de glutathione, os quais são indicativo do estresse oxidativo, tem sido detectado no cólon inflamado de humanos (Lauterburg *et al.*, 1988; D'Odorico *et al.*, 2001) e em modelos experimentais de inflamação colônica (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Di Stasi *et al.*, 2004; Camuesco *et al.*, 2005; Luchini *et al.*, 2008). Loguercio *et al.*, (2003) reportaram que a suplementação com GSH melhora o dano oxidativo de ratos com colite induzida por TNBS/etanol.

Neste estudo foi mensurado o nível de GSH colônica para verificar se este mecanismo está envolvido no efeito antiinflamatório das cumarinas administradas

isoladamente e em associação com a sulfassalazina. A inflamação colônica aguda e crônica induzida por TNBS/etanol causou estresse oxidativo intenso, uma vez que animais do grupo controle apresentaram depleção dos níveis de GSH em comparação com animais normais. Na fase aguda, o pré-tratamento oral com as cumarinas C5 e 4-OHC25 ou em associação com a sulfassalazina C5+25 e 4-OHC25+S15 foi capaz de prevenir a depleção de GSH colônica, o que caracteriza uma diminuição no estresse oxidativo colônico.

Na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS/etanol em ratos, além da dosagem de GSH colônica foi avaliado também os níveis de MDA colônico. O MDA é um produto derivado do processo de lipoperoxidação que ocorre em consequência ao processo inflamatório (Loguercio *et al.*, 1996). Os tratamentos com C5 ou 4-OHC25 ou S25 evitaram a depleção de GSH e diminuíram os níveis de MDA, demonstrando tanto efeito curativo quanto preventivo. As associações C5+S5 e C5+S5 evitaram a depleção de GSH, demonstrando tanto efeito preventivo quanto curativo e diminuíram os níveis de MDA na primeira semana após a indução da colite, indicando apenas efeito curativo. As demais associações apresentaram apenas efeito curativo tanto na inibição da depleção de GSH quanto nos níveis de MDA colônico. De fato, vários estudos mostram que compostos com atividade antiinflamatória impedem a depleção de GSH colônica (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Ocete *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001; Di Stasi *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2006; Cestari *et al.*, 2009) e também diminuem os níveis de MDA na colite experimental (Ocete *et al.*, 1998; Gálvez *et al.*, 2001).

A DII também é caracterizada pelo aumento da expressão de marcadores de diferenciação (Cooper e Steplewski, 1989), tais como a FA que é considerada um marcador fenotípico de diferenciação e que se encontra aumentada na colite experimental (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Di Stasi *et al.*, 2004; Sánchez de Medina *et al.*, 2004). Além disso, a atividade da FA tem sido usada para diferenciar a DC da CU, devido a sua atividade enzimática ser maior na DC (Torres *et al.*, 2007). O fato de uma droga da atividade diminuir a atividade da FA indica seu potencial antiinflamatório. Na fase aguda da colite, a atividade antiinflamatória intestinal dos compostos isolados C5, 4-OHC25 e S25 e das associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 foi associada também à redução significativa da atividade enzimática da FA colônica. Na fase crônica, os compostos-testes C5 e 4-OHC25 demonstraram tanto efeito curativo quanto preventivo e as associações C5+S5, C5+S15, 4-OHC25+S15 e 4-OHC25+S25

demonstram apenas efeito curativo. A atividade antiinflamatória de vários compostos foi também atribuída à capacidade de reduzir a atividade da FA colônica (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Di Stasi *et al.*, 2004).

Em resumo, na fase aguda da colite, a atividade preventiva dos compostos-testes C5 e 4-OHC25 foi associada à inibição da depleção de GSH e à diminuição da atividade das enzimas FA e MPO colônica, enquanto que o efeito preventivo da S25 foi associado apenas à diminuição da atividade da FA. Os efeitos das associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 foram relacionados à diminuição da atividade da FA. Além disso, a associação 4-OHC25+S15 inibiu a depleção de GSH. Na fase crônica da colite com recidiva, os compostos-testes C5 e 4-OHC25 demonstraram efeitos curativos e preventivos, evidenciados pela inibição da depleção de GSH, pela diminuição da atividade da FA e pela diminuição nos níveis de MDA. E ainda, a C5 demonstrou também efeito curativo em diminuir a atividade da MPO. O tratamento com S25 também demonstrou efeitos curativos e preventivos, evidenciados pela inibição da depleção de GSH e pela diminuição dos níveis de MDA. Os efeitos curativos e preventivos da associação C5+S5 foram relacionados à redução do escore macroscópico e à inibição da depleção de GSH. Esta associação também apresentou efeito curativo em diminuir a atividade das enzimas FA e MPO e em diminuir os níveis de MDA. A associação 4-OHC25+S15 demonstrou efeito curativo, o qual foi evidenciado pela inibição da depleção de GSH, diminuição da atividade das enzimas FA e MPO e diminuição dos níveis de MDA colônico.

Outros autores também estudaram a estratégia terapêutica de associar a sulfassalazina ou seu metabólito ativo 5-ASA com compostos com atividade contra a colite. Pacientes colíticos tratados com a associação de sulfassalazina (2g/d) e rosiglitazone (4mg/d) tiveram melhores efeitos terapêuticos do que pacientes tratados somente com sulfassalazina (Liang e Ouvang, 2006). Diculescu *et al.* (2003) verificaram o efeito protetor da suplementação de ácido fólico e sulfassalazina em pacientes com colite na prevenção do câncer de cólon retal. Barbosa *et al.* (2003) concluíram que o estresse oxidativo no plasma de pacientes com colite diminuiu com o uso combinado de sulfassalazina e óleo de peixe rico em ômega-3, devido à redução na produção de radicais livres. Além disso, Siddiqui *et al.*, (2006) concluíram que a administração intracolônica de 5-ASA com N-acetilcisteína promoveu efeito superior na redução da inflamação colônica do que a administração das drogas isoladas em ratos com colite induzida por TNBS. Dados recentes mostram que a associação de 5-ASA

com N-acetilcisteína também diminuem os efeitos deletérios causados pela prostaglandina E2 (Ancha *et al.*, 2009).

Frente aos resultados apresentados, os compostos-testes C5 e 4OHC25 e as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 promoveram efeitos semelhantes aos obtidos pela S25. Este efeito benéfico das associações na inflamação intestinal crônica foi obtido usando doses cinco e três vezes menor que a dose da sulfassalazina (primeira opção terapêutica no tratamento de colite). Desta forma, estes resultados observados indicam que as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 promovem efeitos protetores utilizando-se doses inferiores de sulfassalazina, podendo representar uma alternativa para a redução dos efeitos adversos da sulfassalazina com manutenção dos mesmos níveis de eficácia.

1.1. Conclusões

Após a finalização deste trabalho de pesquisa os resultados aqui descritos permitem concluir que:

1) O tratamento com os compostos-testes cumarina e 4-hidroxi-cumarina promoveu efeito preventivo (fases aguda e crônica) e curativo (fase crônica) na mucosa colônica afetada pelo TNBS/etanol, facilitando a recuperação do tecido inflamado. Este efeito está associado à inibição da depleção de GSH colônica e a redução da atividade das enzimas MPO e FA colônica nas fases aguda e crônica da doença. Além disso, ambas cumarinas reduziram os níveis de MDA colônico na fase crônica com recidiva. Nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*, a 4-hidroxi-cumarina diminuiu a secreção de IL-8 pela Caco2, IL-1 β pela RAW 264.7 e IL-2 pelos linfócitos e a cumarina diminuiu a secreção de IFN- γ pelos linfócitos. Estes resultados *in vitro* e *ex vivo* sugerem que a diminuição dos níveis destas citocinas no sobrenadante destas células contribuem para o efeito antiinflamatório das cumarinas nas fases aguda e crônica da colite induzida em ratos.

2) A presença de hidroxila no carbono 4 proporciona maior atividade biológica a molécula de cumarina *in vitro*. Visto que a 4-hidroxi-cumarina diminuiu a produção de IL-8 pela Caco2, IL-1 β pela RAW 264.7 e IL-2 pelos linfócitos, enquanto a cumarina (1,2 benzopirona) diminuiu apenas o IFN- γ pelos linfócitos.

3) O tratamento com as associações C5+S5 e 4-OHC25+S15 promoveu tanto efeito preventivo (fases aguda e crônica) quanto efeito curativo (fase crônica) na mucosa colônica afetada pela administração de TNBS/etanol, utilizando doses 3 e 5

vezes menor que a dose da sulfassalazina (primeira opção terapêutica no tratamento de colite). Estes efeitos indicam que estas associações podem ser uma nova opção terapêutica para o tratamento da colite, possibilitando a redução dos efeitos adversos da sulfassalazina com a redução da sua dose.

Referências

- AGRAWAL, A.; RHODES, J.M. Smoking and IBD. **IBD Monitor**, v.4, p.114-119, 2003.
- ANCHA, H.R.; KURELLA, R.R.; MCKIMMEY, C.C.; LIGHTFOOT, S.; HARTY, R.F. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v.54, p.758-766, 2009.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, v.113, p. 548-555, 1985.
- ARDITE, E.; SANS, M.; PANES, J.; ROMERO, F.J.; PIQUE, J.M.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Replenishment of glutathione levels improve mucosal function in experimental acute colitis. **Lab. Invest.**, v.80, p.735-744, 2000.
- ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Inflammatory bowel disease: new insights pathogenesis and treatment. **J. Intern. Med.**, v.252, p.475-496, 2002.
- ARDIZZONE, S.; CASSINOTTI, A.; TRABATTONI, D.; MANZIONNA, G.; RAINONE, V.; BEVILACQUA, M.; MASSARI, A.; MANES, G.; MACONI, G.; CLERICI, M.; BIANCHI PORRO, G. Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on TH1/TH2 cytokines in inflammatory bowel disease: an in vitro study. **In. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v.22, p.63-71, 2009.
- ARNOLD, G.L.; BEAVES, M.R.; PRYJDUN, V.O.; MOOK, W.J. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.8, p.10-15, 2002.
- ASAKURA H.; SUZUKI K.; HONMA T. Recent advances in basic 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, p.2145-9, 2007.
- BAILÓN, E.; COMALADA, M.; ROMÁN, J.; MICHELENA, P.; RAMIS, I.; MERLOS, M.; NIETO, A.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. UR-1505, a salicylate able to selectively block T-cell activation, shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the DSS model of rat colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.14, p.888-897, 2008.
- BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; EL KADRI, M.Z.; RODRIGUEZ, M.A.M.; BURINI, R.C.; DICI, I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. **Nutrition**. v.19, p.837-842, 2003.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BECK P. L.; WALLACE J.L. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Med. Inflamm.**, v.6, p.95-103, 1997.

BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am. J. Physiol.**v.268, p.G622-G630, 1995.

BELTRÁN, B.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.A.; CALATAYUD, S.; HINOJOSA, J.; ESPLUGUES, J.V. Pharmacological bases of therapy with 5-ASA. **Gastroenterol Hepatol.**,v.20, p.322-34, 1997.

BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **J. Biol. Chem.**, v.164, p.321-329, 1946.

BEUTLER, E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. **Annu. Rev. Nutr.** v.9, p. 287-302,1989.

BLONSKA, M.; CZUBA, Z.P.; KROL, W. Effect of flavone derivates on interleukin-1 beta (IL-1 beta) mRNA expression and IL-1 beta protein synthesis in stimulated RAW 264.7 macrophages. **Scand. J. Immunol.**, v.57, p.162-166, 2003.

BORRUEL, N. Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. **Gastroenterol. Hepatol. Lett.**, v.26, p.13-22, 2003.

CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; NIETO, A.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with na inhibition in Inos expression. **Br. J. Pharmacol.**, v.143, p.908-918, 2004.

CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, p.265-271, 2005.

CESTARI, S.H.; BASTOS, J.K.; DI STASI, L.C. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Baccharis dracunculifolia in the trinitrobenzenesulphonic acid model os rat colitis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.x, pxxx, 2009.

CHUNGI, V.S.; DITTERT, L.W.; SHARGEL, L. Pharmacokinetics of sulfasalazine metabolites in rats following concomitant oral administration of riboflavin. **Pharm. Res.**,v.6, p.1067-1072, 1989.

COLLINS, S.M. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.280, p.G315-G318, 2001.

COOK, N. C.; SAMMAN, C. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutr. Biochem.**, v.7, p.66-76, 1995.

COOPER, H.S.; STEPLEWSKI, Z. Immunohistologic study of ulcerative colitis with monoclonal antibodies against tumor-associated an/or differentiation antigens. **Gastroenterol.** v.95, p.686-693, 1989.

CRESPO, M.E.; GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; OCETE, M.A., ZARZUELO, A. Anti inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rats colitis induced by TNBS. **Planta Med.**,v.65, p.651-653, 1999.

CRUZ, T.; GÁLVEZ, J.; CRESPO, E.; OCETE, M.A .; ZARZUELO, A . Effects of silymarin on the acute stage of the Trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v.67, p.94-96, 2001.

CRUZ, T.; GÁLVEZ, J.; OCETE, M.A.; CRESPO, M.E., SÁNCHEZ de MEDINA, F., ZARZUELO, A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. **Life Sciences.**, v.62, p. 687-695, 1998.

CUZZOCREA, S.; MC DONALD, M.C.; MASÓN, E.; DUGO, L.; LEPORE, V.; FONTI, M.T.; CICCOLO, A.; TERRANOVA, M.L.; CAPUTI, A.P.; THIEMERMANN, C. Tempol. A membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.406, p.27-37, 2000.

D'ODORICO, A.; BORTOLAN, S.; CARDIN, R.; D'INCA, R.; MARTINES, D.; FETTONATO, A.; STUMIOLO, G.C. Reduced plasma antioxidant concentration and increseadnoxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. **Scand J. Gastroenterol.** v.36, p.1289-1294, 2001.

DAMASKOS, D.; KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora on the scope. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.65, p.453-467, 2008.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun. Rev.**, v.3, p. 394-400, 2004.

DESREUMAUX, P.; BRAND, E.; GAMBIEZ, L.; MILIE, D.; GEBOES, K.; KLEIN, O.; ECTORS, N.; CORTOT, A.; CAPRON, M., COLOMBEL, J.F. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.113, p.118-126, 1997.

DI STASI, L.C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v.70, p. 315-320, 2004.

DICULESCU, M.; CIOCIRLAN, M.; PITIGOI, D.; BECHEANU, G.; CROITORU, A.; SPANACHE, S. Folic acid and sulfasalazine for colorectal carcinoma chemoprevention in patients with ulcerative colitis: the old and new evidence. **Rom J. Gastroenterol.** v.12, p.283-286, 2003.

DIELEMAN, L.A.; GOERRES, M.S.; ARENDS, A.; SPRENGERS, D.; TORRICE, C.; HOENTJEN, F.; GRENTHER, W.B.; SATOR, R.B. Lactobacillus GG prevents

recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. **Gastroenterology**, v.126, p.353-355, 2003.

FABIA, R.; AR'RAJAB, A.; JOHANSSON, M.L.; ANDRERSSON, R.; WILLEN, R.; JEPPSON, B.; MOLIN, G.; BENGMARK, S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. **Digestion**, v.54, p.248-255, 1993.

FARROKYAR, F.; SWARBRICK, E.T.; IRVINE, E.J. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.36, p.2-15, 2001.

FEAGAN, B.G.; ROCHON, J.; FEDORAK, R.N.; IRVINE, E.J.; WILD, G.; SUTHERLAND, L.; STEINHART, A.H.; GREENBERG, G.R.; GILLIES, R.; HOPKINS, M. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.292-297, 1995.

FELTER, S.P.; VASSALLO, J.D.; CARLTON, B.D.; DASTON, G.P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food Chem Toxicol.**, v.44 (4), p.462-75, 2006.

FERGUSON, A.; CAMPIERI, M.; DOE, W.; PERSSON, T.; NYGARD, G. Oral budesonide as maintenance therapy in Crohn's disease-results of a 12-month study. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.12, p.175-183, 1998.

FERNANDEZ-BAÑARES, F. AND GASSULL, M.A. "Role of dietary management and artificial nutritional support in the treatment of inflammatory bowel disease" In: Management of Inflammatory Bowel Disease, M.A. Gassull, A. Obrador and C. Chantar eds., pp 269-277, Prous Science, Barcelona, 1994.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, p.182-205, 1998.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food-Chem. Toxic.**, v.33, p.1061-1080, 1995.

FRANCHIMONT, D.; KINO, T.; GALON, J.; MEDURI, G.U.; CHROUSOS, G. Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art.NIH clinical staff conference. **Neuroimmunomodulation**, v. 10, p.247-260, 2003.

FRASER, A.G. Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.16, p.1071-1072, 2003.

FUSS, I. J.; NEURATH, M.; BOIRIVANT, M.; KLEIN, J.S.; DE LA MOTTE, C.; STONG, S. A.; FIOCCHI, C.; STROBER, W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gama, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **J. Immunol.**, v.157, p.1261-70, 1996.

FYLAKTAKIDOU, K.C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; LITINAS, K.E.; NICOLAIDES, D.N. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Curr. Pharm. Des.**, v.10, p.3813-3833, 2004.

GÁLVEZ, J.; COELHO, G.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; CONCHA, A.; GONZALEZ, M.; ZARZUELO, A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. **Alimen. Pharmacol. Ther.**, v.15, p.2027-2039, 2001.

GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; CRESPO, M.E.; OCETE, M.A.; LORENTE, M.D.; SANCHEZ DE MEDINA, F.; ZARZUELO, A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. **Planta Med.**, v.63, p.409-414, 1997.

GÁLVEZ, J.; GARRIDO, M.; MERLOS, M.; TORRES, M.I.; ZARZUELO, A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.130, p.1949-1959, 2000.

GÁLVEZ, J.; GARRIDO, M.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M.E.; RAMIS, I.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; MERLOS, M.; ZARZUELO, A. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.96, p.363-371, 2003.

GÁLVEZ, J.; SANCHEZ DE MEDINA F.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. **Bioactive natural products (Part f)**. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. In: ATTA-UR-RAHMAN, (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2001, p.607-649.

GASCHE, C. Complications of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.47, p.49-56, 2000.

GASSULL, M.A. Review article: the role of nutrition in the treatment of inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.20, p.79-83, 2004.

GASSULL, M.A.; MANE, J.; PEDROSA, E.; CABRE, E. Macronutrients and bioactive molecules: is there a specific role in the management of inflammatory bowel disease? **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v.29, suppl.4, p.S179-182, 2005.

GEBOES, K. Collagenous and microscopic colitis: clinical importance. **Neth. J. Med.**, v.45, p.47-51, 1994.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.220, suppl., p.83-86, 1996.

GOMOLLÓN, F.; HINOJOSA, J.; NOS P. Budesonide and inflammatory bowel disease. **Gastroenterol. Hepatol.**, v.22, p.525-532, 1999.

GONZÁLES, R.; SANCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; RODRÍGUEZ-CABEZA, M. E.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.71, p.243-250, 2001.

GORDON, F.H.; HAMILTON, M.I.; DONOGHUE, S.; GREENLESS, C.; PALMER, T.; ROWLEY-JONES, D.; DHILLON, A.P.; AMLLOT, P.L.; POUNDER, R.E. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized

monoclonal antibody to alpha-4 integrin. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.16, p.669-705, 2002.

GORDON, F.H.; LAI, C.W.; HAMILTON, M.I.; ALISSON, M.C.; SRIVASTARA, E.D.; FOUWEATHER, M.G.; DONOGHUE, S.; GREENLEES, C.; SUBHANI, J.; AMLOT, P.L.; POUNDER, R.E. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha 4 integrin in active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.121, p.268-274, 2001.

GOTTELAND, M.; CRUCHET, S.; VERBEKE, S. Effect of Lactobacillus ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.15, p.11-17, 2001.

GRAY, J.R.; LEUNG, E.; SCALES, J. Treatment of ulcerative colitis from the patient's perspective: a survey of preferences and satisfaction with therapy. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.29, p.1114-1120, 2009.

GRIFFITHS, A.P.; SHEPHERD, N.A.; BEDDALL, A.; WILLIAMS, J.G. Gastrointestinal tumor masses due to multiple myeloma: a pathological mimic of malignat lymphoma. **Histopathology**, v.31, p.318-323, 1997.

GRISHAM, M.B.; VOLKMER, C.; TSO, P.; YAMDA, T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. **Gastroenterology**, v.101, p.540-547, 1991.

HALME, L.; PAAVOLA-SAKKI, P.; TURUNEN, U.; LAPPALAINEN, M.; FAKKILA, M.; KONTULA, K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.3668-3672, 2006.

HANAUER, S. B. Update on the etiology, pathogenesis and diagnosis of ulcerative colitis. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v.1, p.26-31, 2004.

HANAUER, S.B.; FEAGAN, B.G.; LICHTENSTEIN, G.R.; MAYER, L.F.; SCHREIBER, S.; COLOMBEL, J.F.; RACHMILEWITZ, D.; WOLF, D.C.; OLSON, A.; BAO, W.; RUTGEERTS, P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomized trial. **Lancet**, v.359, p.1541-1549, 2002.

HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. Management of Crohn's disease in adults. **Am. J. Gastroenterol.**, v.96, p.635-643, 2001.

HERBERT, T.B.; COHEN, S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. **Psychosom. Med.**, v.55, p.364-379, 1993.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **Gen. Pharmacol.**, v.27, p.713-722, 1996.

INOHARA, N.; OGURA, Y.; NUÑEZ, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.5, p.76-80, 2002.

ISHIYAMA, M.; TOMINAGA, H.; SHIGA, M.; SASAMOTO, K.; OHKURA, Y.; UENO, K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, p.1518-1520, 1996.

ITO, H.; TAKAZOE, M.; FUKUDA, Y.; HIBI, T.; KUSUGAMI, K.; ANDOH, A.; MATSUMOTO, T.; YAMAMURA, T.; AZUMA, J.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; SHIMOYAMA, T.; KISHIMOTO, T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.126, p.989-996, 2004.

JIANG, H.; DENG, C-S.; ZHANG, M.; XIA, J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. **World J. Gastroenterol.**, v.12, n.24, p.3848-3853, 2006.

KANAUCHI, O.; ANDOH, A.; IWANAGA, T.; FUJIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; TOYONAGA, A.; BAMBA, T. Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.14, p.1173-1179, 1999.

KANAUCHI, O.; SERIZAWA, I.; ARAKI, Y.; SUZUKI, A.; ANDAH, A.; FUZIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; TAKAKI, K.; TOYONAGA, A.; SATA, M.; BAMBA, T. Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. **J. Gastroenterol.**, v.38, p.134-141, 2003.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v.142, p.239-254, 2003.
KATZ, J.A.; ITOH, J.; FIOCCHI, C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.15, p.291-297, 1999.

KOLKMAN, J.J.; MOLLMANN, H.W.; MOLLMANN, A.C.; PENÃ, A.S.; GREINWALD, R.; TAUSCHEL, H.D.; HOCHHAUS, G. Evaluation of oral budenoside in the treatment of active distal ulcerative colitis. **Drugs Today (Barc)**, v.40, p.589-601, 2004.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Curr. Med. Chem.**, v.5, p.29-46, 2005.

KRAWISZ, J.E.; SHARON, P.; STENSON, W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, v.87, p.1344-1350, 1984.

KROK, K.L.; LICHTENSTEIN, G.R. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.20, p.43-48, 2004.

KUGATHASAN, S.; JUDD, R.H.; HOFFMANN, R.G.; HEIKENEN, J.; TELEGA, G.; KHAN, F.; WEISDORF-SCHINDELE, S.; SAN PABLO, W.Jr.; PERRAULT, J.; PARK, R.; YAFFE, M.; BROWN, C.; RIVERA-BENNETT, M.T.; HALABI, I.; MARTINEZ, A.; BLANK, E.; WERLIN, S.L.; RUDOLPH, C.D.; BINION, D.G.;

WISCONSIN PEDIATRIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE ALLIANCE. Epidemiological and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. **J. Pediatr.**, v.143, p.525-531, 2003.

KURTOVIC, J.; SEGAL, I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. **Trop. Gastroenterol.**, v.25, p.9-14, 2004.

LACATOS, P.L.; FISCHER, S.; LAKATOS, L.; GAL, I.; PAPP, J. Current concepts on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crossstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered cationic sensing or changes in mucosal integrity take "toll". **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.1829-1841, 2006.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Curr. Pharm. Des.**, v.10(30), p. 3797-3811, 2004.

LAKE, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. **Food Chem Toxicol.**, v.137, p.423-453, 1999.

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

LAUTERBURG, B.H.; BILZER, M.; ROWEDDER, E.; INAUEN, W. Decreased glutathione in inflamed colonic mucosa in man. A possible role of hypochlorous acid and prevention by 5-aminosalicylic acid. In MacDERMOTT (Ed.). **Inflammatory bowel disease: current status and future approach**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p.273-277.

LENNARD, L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. **Gut**, v.51, p.143-146, 2002.

LEON, F.; SMYTHIES, L.E.; SMITH, P.D.; KELSALL, B.L. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.579, p.117-132, 2006.

LEVENSTEIN, S.; PRANTERA, C.; VARVO, V.; SCRIBANO, M.L.; ANDREOLI, A.; LUZI, C.; ARCA, M.; BERTO, E.; MILITE, G.; MARCHEGGIANO, A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. **Am. J. Gastroenterol.**, v.95, p.1213-1220, 2000.

LEVINE, D.S. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.296-319.

LIANG, H.L.; OUVANG, Q. A clinical trial of rosiglitazone and 5-aminosalicylate combination for ulcerative colitis. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**. v.45, p.548-551, 2006.

LICHTMAN, S.N.; BALFOUR SARTOR, R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.317-335.

LIGUMSKY, M.; SIMON, P.L.; KARMELI, F.; RACHMILEWITZ, R. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. **Gut**. v.31, p.463-466, 1990.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P.; REDDY, G.M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G.; KATZ S.; FLOYD, R.A.; MCKINLEY, M.J.; FISHER, S.E.; MULLIN, G.E. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p. 2078-2086, 1996.

LIM, W.C.; HANAUER, S.B. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, v.4, p.66-85, 2004.

LIU, B.G.; JIA, X.M.; CAO, Y.Y.; CHEN, S.H.; GAO, P.H.; WANG, Y.; JIANG, Y.Y.; CAO, Y.B. Changtai granule, a traditional Chinese drug, protects hapten-induced colitis by attenuating inflammatory and immune dysfunctions. **J. Ethnopharmacol.**, v.115, p.1-8, 2008.

LOCHS, H.; MAYER, M.; FLEIG, W.E.; MORTENSEN, P.B.; BAUER, P.; GENSER, D.; PETRITSCH, W.; RAITHEL, M.; HOFFMANN, R.; GROSS, V.; PLAUTH, M.; STAUN, M.; NESJE, L.B. Prophylaxis of postoperative relapse in Crohn's disease with mesalamine: European Cooperative Crohn's Disease Study VI. **Gastroenterology**, v.118, p. 264-273, 2000.

LOFTUS JUNIOR, E.V.; SILVERSTEIN, M.D.; SANDBORN, W.J.; TREMAINE, W.J.; HARMSSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1933: incidence, prevalence, and survival. **Gut**, v.46, p.336-343, 2000.

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p.1204-1211, 1996.

LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Dig. Liver Dis.**, v.35, p.635-641, 2003.

LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; SEITO, L. N.; WITAICENIS, A.; PELLIZZON, C. H.; Di STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biol. Pharm. Bull.** , v.31, p.1343-1350, 2008.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics, infection and immunity. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.15, p.501-506, 2002.

MAHIDA, Y.R.; WU, K.; JEWELL, D.P. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. **Gut**, v.30, p.835-838, 1999.

MANNON, P.J.; FUSS, I.J.; MAYER, L.; ELSON, C.O.; SANDBORN, W.J.; PRESENT, D.; DOLIN, B.; GOODMAN N.; GRODEN, C.; HORNUNG, R.L.; QUEZADO, M.; YANG Z.; NEURATH, M.F.; SALFELD, J.; VELDMAN, G.M.; SCHWERTSCHLAG, U.; STROBER, W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **N. Engl. J. Med.**, v.351, p. 2069-2079, 2004.

MATSUMOTO, S.; HARA, T.; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v.140, p.417-426, 2005.

MCGEE, D.W. Inflammation and mucosal cytokine production. In: OGRA, P.L.J.; MESTECKY, M.E. LAMM, W. STROBER, J. BIENESTOCK, J.R.MCGHEE (Eds.). **Mucosal immunology**. San Diego: Academic Press, 1999. p.559-573.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. "Plant flavonoid modulation of immune and inflammatory cell functions" In: Human Nutrition - A Comprehensive Treatise. Vol. 8: Nutrition and Immunology, D.M. Klurfeld eds., pp, 239-266, Plenum Press, New York, 1993.

MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO, R.; MORRONE, G.; MARASCO, O.; LUZZA, F.; PALLONE, F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. **Gastroenterology**, v.112, p.1169-1178, 1997.

MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p.795-803, 1989.

MORTEAU, O.; MORE, J.; PONS, L.; BUENO, L. Platelet-activating factor and interleukin-1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v.104, p.47-56, 1993.

MUNKHOLM, P.; LANGHOLZ, E.; DAVIDSEN, M.; BINDER, V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. **Gut**, v.35, p.360-362, 1994.

NIELSEN, O.H.; RASK-MADSEN, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.31, p.149-159, 1996.

NIESSNER, M.; VOLK, B.A. Altered Th1/Th2 cytokines profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). **Clin. Exp. Immunol.**, v.101, p.428-435, 1995.

NIKOLAUS, S.; FOLSCN, U.; SCHREIBER, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.47, p.71-82, 2000.

OBRADOR, A.; RIERA, J. Definitions. In: GASSULL, M.A.; OBRADOR, A.; CHANTAR, C. (Eds.). **Management of inflammatory bowel disease**. Barcelona: Prous Science, 1994. p.1-6.

OCETE, M.A., GÁLVEZ, J., CRESPO, M.E., CRUZ, T., GONZALEZ, M., TORRES, M.I., ZARZUELO, A. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v.57, p.261-170, 1998.

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INHORA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUER, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSCHNER, B.S., HANUER, S.B.; NUÑEZ, G.; CHO, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, p.537-539, 2001.

OSMAN, N.; ADAWI, D.; AHRNE, S.; JEPPSSON, B.; MOLIN, G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig. Dis. Sci.*, v.49, p.320-327, 2004.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical. Biol. Med.**, v.33, p.311-322, 2002.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P.A.; DE LAS HERAS, B.; HOULT, J.R. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochem. Pharmacol.**, v.48, p.445-451, 1994.

PEARSON, D.C.; MAY, G.R.; FICK, G.H., SUTHERLAND, L.R. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. **Ann. Intern. Med.**, v.123, p.132-142, 1995.

PEPPERCORN, M.A. "Antiinflammatory Agents" In: *Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside*, S.R. Targan and F. Shanahan eds., pp 478-486, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

PERÁN, L.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; NIETO, A.; CONCHA, A.; DIAZ-ROPERO, M.P.; OLIVARES, M.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* SSP. *Salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. **World J. Gastroenterol.**, v.11, p.5185-5192, 2005.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, v.347, p.417, 2002.

PODOLSKY, D.K.; FIOCCHI, C. Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, ed. Inflammatory bowel disease. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000, p.191-207.

POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. **Hepatogastroenterology**, v.47, p.57-70, 2000.

PRESENT, D.H.; LICHTIGER, S. Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.39, p.374-380, 1994.

RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P. L.; SCAWARTZ L. W.; GRISWOLD, D. E.; FONDACARO, J. D.; WASSERMAN, M. A. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v.97, p.357-367, 1989.

RANSFORD, R.A.; LANGMAN, M.J.S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, v.51, p.36-39, 2002.

RASTALL, R.A. Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the balance. **J. Nutr.**, v.134, p.2022S-2026S, 2004.

REGUEIRO, M.; KIP, K.E.; CHEUNG, O.; HEGAZI, R.A.; PLEVY, S. Cigarette smoking and age at diagnosis of inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, p.42-47, 2005.

REIF, S.; KLEIN, I.; LUBIN, F.; FARBSTAIN, M.; HALLAK, A.; GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.40, p.754-760, 1997.

REINECKER, H.C.; STEFFEN, M.; WITTOEFT, T.; PFLUGER, I.; SCHREIBER, S.; MACDERMOTT, R.P.; RAEDLER, A. Enhanced secretion of tumor necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, p.174-181, 1993.

REINISCH, W.; HOMMES, D.W., VAN ASSCHE, G.; COLOMBEL, J.F.; GENDRE, J.P.; OLDENBURG, B.; TEML, A.; GEBOES, K.; DING, H.; ZHANG, L.; TANG, M.; CHENG, M.; VAN DEVENTER, S.J.; RUTGEERTS, P.; PEARCE, T. A dose escalating placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanized anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. **Gut**, v.55, p.1138-1144, 2006.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E., GALVEZ, J., LORENTE M.D., CONCHA, A., CAMUESCO, D., AZZOUZ, S., OSUNA, A., REDONDO, L., ZARZUELO, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor α and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J. Nutr.**, v.132: 3263-3271, 2002.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; GÁLVEZ, J.; CAMUESCO, D.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; REDONDO, L.; ZARZUELO, A.

Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. **Clin. Nutr.**, v.22, p.463-471, 2003.

RUEMMELE, F.M.; EL KHOURY, M.G.; TALBOTEC, C.; MAURAGE, C.; MOUGENOT, J.F.; SCHMITZ, J.; GOULET, O. Characteristics of inflammatory bowel disease with onset during the first year of life. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.43, p.566-567, 2006.

RUTGEERTS, P.; VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G. Biological Therapies for Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.136, p.1182-1197, 2009.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sci.**, v.70, p.3097-3108, 2002.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.278, p.771-779, 1996.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R., BALLESTER, I.; NIETO, A.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A. Induction of alkaline phosphatase in inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p.2317-2326, 2004.

SANDBORN, W.J. How future tumor necrosis factor antagonists and other compounds will meet the remaining challenges in Crohn's disease. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, v.4, p.S25-33, 2004.

SANDBORN, W.J.; HANAUER, S.B.; KATZ, S.; SAFDI, M.; WOLF, D.G.; BAERG, R.D.; TREMAINE, W.J.; JOHNSON, T.; DIEHL, N.N.; ZINSMEISTER, A.R. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, v.121, p.1088-1094, 2001.

SARTOR, R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **Am. J. Gastroenterol.**, v.92, p.5S-11S, 1997.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.361S-364S, 2001.

SELLIM, J.H.; PASRICHA, P.J. Pharmacotherapy of inflammatory bowel disease. In: BRUNTON, L.L. (Ed.) **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2006. p.1009-1019.

SETOYAMA, H.; IMAOKA, A.; ISHIKAWA, H.; UMESAKI Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. **Microbes. Infect.**, v.5, p.115-122, 2003.

SHANAHAN, F.; TARGAN, S.R. "Mechanisms of tissue injury in inflammatory bowel disease" In: *Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside*, S.R. Targan and F. Shanahan eds., pp 78-88, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

SHEN, B.; REMZI, F.H.; LOPEZ, A.R.; QUEENER, E. Rifaximin for maintenance therapy in antibiotic-dependent pouchitis. **BMC Gastroenterol.**, v.23, p.26, 2008.

SIDDIQUI, A.; ANCHA, H.; TEDESCO, D.; LIGHTFOOT, S.; STEWART, C.A.; HARTY, R.F. Antioxidant therapy with N-acetylcysteine plus mesalamine accelerates mucosal healing in a rodent model of colitis. **Dig. Dis. Sci.**, v.51, p. 698-705, 2006.

SINGH, V.P.; PATIL, C.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins Others Lipid Mediat.**, v.71, p.163-175, 2003.

SLINKER, B.K. The Statistics of Synergism. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 30, p.723–731, 1998.

SMITH, P.D.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H. Measurement of protein using BCA. **An. Bioch.**, v.150, p.76–85, 1985.

SONNENBERG, A.; MCCARTY, D.J.; JACOBSEN, S.J. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. **Gastroenterology**, v.100, p.143-149, 1991.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, p.98-105, 2002.

SPIVAK, W.; SOCKOLOW, R.; RIGAS, A. The relationship between insurance class and severity of presentation of inflammatory bowel disease in children. **Am. J. Gastroenterol.**, v.90, p.982-987, 1995.

STEIN, R.B.; HANAUER, S.B. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. **Drug Saf.**, v.23, p.429-448, 2000.

STUCCHI, A.F.; SHOFR, S.; LEEMAN, S.; MATERNE, O.; BEER, E.; MCCLUNG, J.; SHEBANI, K.; MOORE, F.; O'BRIEN, M.; BECKER, J.M. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.279, p.298-306, 2000.

STUHLMEIER, K., THEYER, G., BAUMGARTNER, G., ZLABINGER, G.J. Synergistic effect of coumarin (1,2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. **Clin. Exp. Immunol.**, v.84(2), p.317-323, 1991.

SUTHERLAND, L.; ROTH, D.; BECK, P.; MAY, G.; MAKIYAMA, K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintaining remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v.2, CD000544, 2000.

SUTHERLAND, L.; SINGLETON, J.; SESSIONS, J.; HANAUER, S.; KRAWITT, E.; RANKIN, G.; SUMMERS, R.; MEKHJIAN, H.; GREENBERG, N.; KELLY, M., LEVINE, J.; THOMSON, A.; ALPERT, E.; PROKIPCHUK, E. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. **Gut**, v.32, p.1071-1075, 1991.

SVARTZ, N. Salazopyrine, a new sulfanilamide preparation: A. Therapeutic results in rheumatic polyarthritis. B. Therapeutic results in ulcerative colitis. C. Toxic manifestations in treatment with sulfanilamide. **Acta Med. Scand.**, v.110, p.557-590, 1942.

SWENNEN, K.; COURTIN, C.M., DELCOUR, J.A. Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v.46, p.459-471, 2006.

SWIDSINKI, A.; LADHOFF, A.; PERNTHALER, A.; SWIDSINSKI, S.; LOENING-BAUCHE, V.; ORTNER, M.; WEBER, J.; HOFFMANN, U.; SCHREIBER, S.; DIETEL, M.; LOCHS, H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.122, p.44-54, 2002.

SYKES, A.P.; BRAMPTON, C.; KLEE, S.; CHANDER, C.L.; WHELAN, C.; PARSONS, M.E. An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Res.**, v.49, p.311-319, 2000.

TARGAN, S.R.; HANAUER, S.B.; VAN DEVENTER, S.J., MAYER, L., PRESENT, D.H., BRAAKMAN, T., DEWOODY, K.L., SCHAIBLE, T.F., RUTGEERTS, P.J. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease CA2 Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p.1029-1035, 1997.

THEIS, M.K.; BOYKO, E.J. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v.89, n.10, p.1920, 1994.

TORRES, M.I.; LORITE, P.; LÓPEZ-CASADO, M.A.; RIOS, A. A new approach using alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. **Pathol. Res. Pract.** v. 203, p.485-487, 2007.

VAN ASSCHE, G.; DALLE, I.; NOMAN, M.; AERDEN, I.; SWIJSEN, C.; ASNONG, K.; MAES, B.; CEUPPENS, J.; GEBOES, K.; RUTGEERTS, P. A pilot study on the use of the humanized anti-interleukin-2 receptor antibody daclizumab in active ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.98, p.369-376, 2003.

VAN DEVENTER, S.J. Immunomodulation of Crohn's disease using TNF-alpha neutralizing monoclonal antibodies. **Clin. Nutr.**, v.16, p.271-275, 1997.

VELJACA, M.; LESCH, C.A.; PLLANA, R.; SANCHES, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.272, p.417-422, 1995.

VIDELA, S.; VILASECA, J.; ANTOLIN, M.; GARCIA-LAFUENTE, A.; GUARNER, F.; CRESPO, E.; CASALATOS, J.; SALAS, A.; MALAGELADA, J.R. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. **Am. J. Gastroenterol.**, v.96, p.1486-1493, 2001.

VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; ORJALES, A.; ALARCÓN DE LA LASTRA C. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.460, p.209-218, 2003.

XAUS, J.; COMALADA, M.; VALLEDOR, A.F.; CARDÓ, M.; HERRERO, C., SOLER, C.; LLOBERAS, J., CELADA, A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. **Immunobiology**, v.204, p.543-550, 2001.

YAMADA, T.; GRISHAM, M.B. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen; in Targan SR, Shanahan F(eds): Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Beside. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994, pp 133-150.

YAMADA, T.; MARSHALL, S.; SPECIAN, R.D.; GRISHAM, M.B. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**. v.102, p. 1524-1534, 1992.

ZHOU, H.; MINESHITA, S. The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.294, p.822-9, 2000.

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, p. 199-209, 1999.