

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP  
Instituto de Biociências de Botucatu  
Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

## **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do óleo de *Bertholletia excelsa* Bonpl.**

Cristiane Mori



Botucatu – SP  
2018



Cristiane Mori

**Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal  
do óleo de *Bertholletia excelsa* Bonpl.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Titular Luiz Claudio Di Stasi

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mori, Cristiane.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do óleo de *Bertholletia excelsa* Bonpl. / Cristiane Mori. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

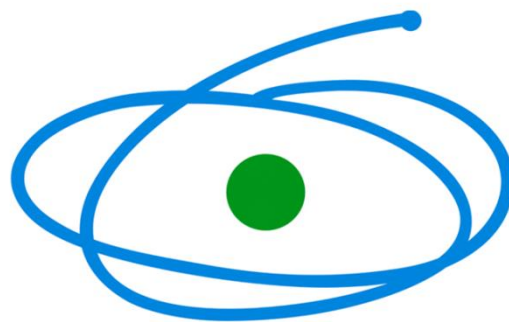
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Castanha-do-Pará. 3. Agentes anti-inflamatórios. 4. Stress oxidativo. 5. Fitoterapia.

Palavras-chave: Anti-inflamatório; Castanha-do-pará; Doença Inflamatória Intestinal.

Auxílio financeiro



**C A P E S**



*“Se não houver frutos  
Valeu a beleza das flores  
Se não houver flores  
Valeu a sombra das folhas  
Se não houver folhas  
Valeu a intenção da semente.”*

Henfil

Aos meus pais Roberto e Célia, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Robertinho e Luciane, por serem meus companheiros por toda a vida.

Aos meus avós José Mori e Maria Lúcia dos Santos.

*“Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração.  
O essencial é invisível aos olhos”*

Antoine de Saint-Exupéry

Aos colegas e amigos do FitoFarmaTec: Tainan, Luiz, Ariane, Gabriela, Késsien, Aline, Celso, Vinícius, Lesvi, Erika, Alexandre Silveira, Alexandre Tanimoto, Patrícia, Fernanda, Priscila, Eduardo e Ramon, por fazerem da nossa convivência fonte de alegria, risadas e boas histórias.

Agradeço especialmente à Ana Elisa, por participar de maneira mais próxima da minha formação e por toda assessoria científica fornecida nos finais de semana, férias e feriados.

Aos integrantes da Meriquei: Vitor, Isabela e Thársis, que compartilham comigo do mesmo teto e me salvam dos insetos que entram em casa.

Aos amigos-irmãos da graduação, que continuam comigo há 7 anos: Dianne, Renan, Júlia e Maysa.

À Rebecca, por ser a melhor das galáxias.

A todos os amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho.

À Janete, por ter me ensinado a fazer café e aguentar nossas bagunças.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e da Seção de Pós-Graduação, pelo suporte fornecido.

A CAPES pela bolsa concedida, e a FAPESP pelos demais recursos financeiros.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

*“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um grande prazer poder compartilhar um planeta e uma época com você”*

Carl Sagan

Ao Prof. Di Stasi pela orientação, paciência e oportunidade concedida para que eu possa desenvolver meu potencial.

*"It's the terror of knowing  
What the world is about  
Watching some good friends  
Screaming "Let me out!"  
Pray tomorrow gets me higher  
Pressure on people, people on streets"*

Queen feat. David Bowie



## **Formação:**

Graduação em Ciências Biológicas modalidade Licenciatura (2011-2015) e Bacharelado (2015-2016) pelo Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Botucatu – SP.

## **Atividades realizadas durante o mestrado (2016-2018)**

### **I) Disciplinas cursadas**

<b>Disciplina</b>	<b>Créditos</b>	<b>Conceito</b>
Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia	3	A
Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia	3	A
Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar	6	B
Prática de Ensino de Farmacologia	4	A
Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia:	2	A
Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina		
Farmacologia e Sociedade	3	B
Farmacologia e Sociedade	3	A
Mediadores da Resposta Inflamatória	3	A
Metodologia e Redação Científica	3	A
<b>Total</b>	<b>30</b>	

### **II) Participação em eventos**

2016: Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa – UNESP – Araraquara/SP

2016: XII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu – UNESP – Botucatu/SP

2016: XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – UFMG – Belo Horizonte/MG

2017: Seminário de Ética em Pesquisa – FMB/UNESP – Botucatu/SP

2017: 3ª Jornada caipira da Doença Inflamatória Intestinal – FMB/UNESP – Botucatu/SP

2017: XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais – FCLAR/UNESP – Araraquara/SP

### III) Trabalhos apresentados em congresso

2016: XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil - “Caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante do fruto verde de *Musa* spp. AAA”. Autores: **Mori, C.**; Tanimoto, A.; Witaicenis, A.; Costa, E.F.; Dalmau, L.M.; Curimbaba, T.F.S.; Di Stasi, L.C.

2016: XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil – “Avaliação da atividade antioxidante e dos compostos secundários de *Hibiscus esculentus* L.”. Autores: Oliva, K.R.S.; Witaicenis, A.; Tanimoto, A.; **Mori, C.**; Costa, E.F.; Dalmau, L.M.; Curimbaba, T.F.S.; Di Stasi, L.C.

2016: XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil – “Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da farinha dos frutos de *Musa* spp AAB.”. Autores: Costa, E.F.; Witaicenis, A.; Tanimoto, A.; **Mori, C.**; Oliva, K.R.S.; Dalmau, L.M.; Curimbaba, T.F.S.; Di Stasi, L.C.

2016: XXIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil – “Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como potencial protetor da inflamação intestinal”. Autores: Curimbaba, T.F.S.; Witaicenis, A.; Tanimoto, A.; **Mori, C.**; Costa, E.F.; Oliva, K.R.S.; Dalmau, L.M.; Di Stasi, L.C.

2017: XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais – “Avaliação da atividade anti-Inflamatória intestinal do óleo de *Bertholletia excelsa* Bonpl.”. Autores: **Mori, C.**; Dalmau, L.M.; Di Stasi, L.C.

2017: XIII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais – “Avaliação da atividade anti-inflamatória da *Cnidioscolus aconitifolius* no modelo experimental de doença inflamatória intestinal”. Autores: Dalmau, L.M.; Costa, E.F.; Oliva, K.R.S.; **Mori, C.**; Curimbaba, T.F.S.; Di Stasi, L.C.

#### **IV) Formação complementar:**

2016: Oficina Jardins Sensoriais – carga horária: 3h - Botucatu/SP

2016: Seminário “Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados” – carga horária: 3h – Botucatu/SP

2017: Mini-Curso ‘Bioensaios Aplicados ao Estudo de Plantas Mediciniais’ – carga horária: 3h - Araraquara/SP

2017: Seminário “Western Blot: princípios básicos e vantagens dos produtos Abcam” – carga horária: 2h – Botucatu/SP

2017: Seminário “Nova tecnologia em anticorpos monoclonais primários: vantagens, benefícios e validação dos RabMabs” – carga horária: 2h – Botucatu/SP

#### **V) Outras atividades**

2017: Membro da comissão organizadora do VI Simfartec – IBB/UNESP – Botucatu/SP

2017: 20º Encontro Nacional de Biomedicina - participação em mesa-redonda na qualidade de palestrante – “Papel da mídia na divulgação científica”.

## **VI) Colaboração em projetos de pesquisa:**

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal de *Cnidocolus aconitifolius* no modelo experimental induzido por TNBS em ratos

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com banana prata verde (*Musa* sp AAB) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com quiabo (*Hibiscus esculentus*) no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Efeitos da dieta enriquecida com os frutos de *Euterpe oleraceae* Mart. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal da dieta enriquecida com farinha de *Coix lachryma-jobi* L. no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos

## Resumo

O termo Doença Inflamatória Intestinal (DII) compreende duas doenças, a Retocolite Ulcerativa (RCU) e a Doença de Crohn (DC), caracterizadas por inflamação crônica que compromete o trato gastrointestinal. Estudos mostram que o estresse oxidativo é um dos fatores determinantes para o desenvolvimento da DII. A terapêutica atual não proporciona cura permanente, demonstrando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. A espécie *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae), popularmente conhecida como castanha-do-pará, é uma árvore nativa da Floresta Amazônica; de seu fruto retira-se a castanha, semente oleaginosa com alto teor de ácidos graxos, selênio e outros componentes como vitaminas e minerais, que podem apresentar atividade farmacológica associada a efeitos benéficos. Devido à sua composição, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória da castanha-do-pará como potencial terapia adjuvante para o tratamento da DII. Ratos Wistar receberam por via oral cinco doses do óleo (18,75; 37,5; 75; 150 e 300 mg/kg) durante 5 dias consecutivos. Após o tratamento, foi feita indução do processo inflamatório por meio da administração via retal de 0,25 mL de solução contendo 10 mg de TNBS em etanol a 50% (v/v). Após 72h da indução do processo inflamatório, os animais foram mortos e os cólons retirados para análises macroscópicas (tamanho e escore da lesão, relação peso-comprimento colônico) e bioquímicas tais como atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA), e níveis de glutatona total. As doses de 75 e 150 mg/kg do óleo de castanha-do-pará melhoraram a relação peso-comprimento colônico em comparação ao grupo controle. A dose de 150mg/kg também apresentou melhora no tamanho da lesão em comparação ao grupo controle. O tratamento também não recuperou a atividade da MPO e FA, mas evitou a depleção dos níveis cólicos de glutatona nas doses de 18,75 e 37,5 mg/kg, mantendo-os semelhantes aos dos animais saudáveis. Os resultados, em conjunto, não indicam atividade anti-inflamatória nas doses testadas.

**Palavras chave:** Doença Inflamatória Intestinal, anti-inflamatório, castanha-do-pará

## Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a term that comprises two disorders, Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (DC), which are chronic inflammation that compromise the gastrointestinal tract. Studies show that the oxidative stress is one of the many factors involved in IIB pathogenesis. The pharmacological treatment doesn't bring cure, highlighting the necessity of new therapeutical strategies. The species *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae), popularly known as Brazil nut, is a native tree from the amazon rainforest. From its fruit is removed a oilseed with high contents of fatty acids, selenium and another components such vitamins and minerals, that can produce pharmacological activity associated with beneficial effects. Due to its composition, the objective of this project was to evaluate the anti-inflammatory activity of the Brazil nut oil as a potential adjuvant therapy for the treatment of IBD. Male wistar rats received orally five dosis of oil (18,75; 37,5; 75; 150 e 300 mg/kg) through five consecutive days. After treatment the inflammatory process was induced by rectally administration of 0,25 mL of a solution containing 10 mg of TNBS diluted in ethanol 50% (v/v). Seventy two hours after induction of the inflammatory process, the animals were killed and the colons removed for macroscopic (size and score of lesion, weight/length ratio) and biochemical analysis such as activity of the enzymes myeloperoxidase (MPO) and alkaline phosphatase (AP), and total levels of glutathione. The 75 mg/kg and 150 mg/kg doses of the oil ameliorated the weight/length ration in comparison with the control group. The 150 mg/kg dose also ameliorated the size of lesion in comparison with the control group. The treatment didn't recovered the activity of the enzymes MPO and AP, but prevented the depletion of colonic levels of glutathione in the 18,75 mg/kg and 37,5 mg/kg doses. The results of the glutathione levels in these doses were similar to the healthy group. The results, in conjoint, didn't indicate the anti-inflammatory activity on the tested doses.

**Palavras chave:** Inflammatory Bowel Disease, anti-inflammatory, Brazil nut

## Lista de abreviações

AA – Ácido araquidônico

AINES – Anti-inflamatório não esteroide

AL – Ácido linoleico

ALA – Ácido alfa-linolênico

COX - Cicloxigenase

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

GPCR – Receptores acoplados à proteína G

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

LOX - Lipoxigenase

LTB4 – Leucotrieno B4

MPO – Mieloperoxidase

MUFA – Ácido graxo mono-insaturado

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PUFA – Ácido graxo poli-insaturado

RCU – Retocolite ulcerativa

TNBS – Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

## Sumário

I – Introdução .....	1
II - Objetivo .....	11
III – Material e métodos .....	12
1 - Material Vegetal .....	12
2 - Animais .....	12
3 - Delineamento experimental .....	13
4 – Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal.....	14
4.1. Avaliações macroscópicas.....	14
4.2. Avaliações bioquímicas .....	15
4.3. Avaliação microscópica .....	16
5 - Análises estatísticas .....	17
IV - Resultados.....	18
1 – Avaliações macroscópicas.....	18
2 – Avaliações bioquímicas.....	20
3 – Avaliação microscópica.....	22
V – Discussão e conclusão .....	25
VI - Referências.....	33



## **I – Introdução**

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma disfunção do trato gastrointestinal caracterizada por inflamação crônica e persistente, marcada por períodos intercalados de remissão e exacerbação das lesões, as quais comprometem a estrutura e o seu funcionamento normal (ANDERSON et al., 2011; BOUMA; STROBER, 2003; XAVIER; PODOLSKY, 2007). A DII possui duas formas clínicas descritas, a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) (ANANTHAKRISHNAN, 2015; FIOCCHI, 2014), que possuem características patofisiológicas importantes que as distinguem (PARK; PFEIL, 2015). A DC pode afetar qualquer porção do trato gastrintestinal, acarretando o surgimento de lesões na boca, esôfago, estômago, intestinos e ânus. Essas lesões são descontínuas e transmurais, podendo atingir desde a camada mucosa até a serosa do tecido, provocando infiltração de linfócitos, formação de fibrose e granuloma (BOUMA; STROBER, 2003). A RCU apresenta lesões contínuas, restritas à camada mucosa do cólon, infiltração de linfócitos e granulócitos, perda de células caliciformes, formação de abscessos nas criptas e ulcerações (BOUMA; STROBER, 2003; XAVIER; PODOLSKY, 2007). Os sintomas característicos são dor abdominal, diarreia com ou sem sangue, perda de peso acentuada em curto período de tempo, mal-estar, febre, além de complicações como formação de abscessos e fístulas (BOUMA; STROBER, 2003; MICHALAK; MOSIŃSKA; FICHNA, 2016). Também podem surgir manifestações extra-intestinais, principalmente nos músculos, olhos, pele, fígado e ossos (PARK; PFEIL, 2015). Para fornecer tratamento eficaz, é necessário o correto diagnóstico diferencial das doenças, além de avaliar a extensão e severidade das lesões. Devido ao seu caráter crônico, os pacientes

passam por diversos períodos de hospitalização, intervenções cirúrgicas e o uso de medicamentos que levam à redução na qualidade de vida, produtividade econômica e desenvolvimento de desordens psiquiátricas (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Os primeiros sintomas da DII costumam surgir entre 20 e 40 anos (COSNES et al., 2011), entretanto nos últimos anos tem sido verificado o aumento de casos em crianças (NASIRI; KUENZIG; BENCHIMOL, 2017). A incidência é maior em países industrializados e desenvolvidos, como os da América do Norte, o norte da Europa e Reino Unido (PARK; PFEIL, 2015). Atualmente o número de casos em países em desenvolvimento tem aumentado, principalmente nos países da Ásia, América Latina e leste Europeu (NG et al., 2013; PARK; PFEIL, 2015). Isso pode ser devido à crescente industrialização desses países, sendo que o aumento da incidência de RCU precede o de DC (COSNES et al., 2011).

O aumento na incidência da DII nos últimos 15 anos, e o surgimento de casos em países em desenvolvimento, sugere que fatores ambientais associados ao estilo de vida moderno desempenham papel importante na patogênese, em conjunto com fatores genéticos (COSNES et al., 2011; DE SOUZA; FIOCCHI, 2016).

A patogênese da DII é pouco elucidada devido à sua complexidade e de seu caráter multifatorial (FIOCCHI, 2012). Atualmente a hipótese mais aceita é a de que a doença se estabelece em indivíduos geneticamente susceptíveis sob determinadas condições ambientais, desencadeando resposta imune exacerbada à microbiota intestinal e antígenos da dieta (ANDERSON et al., 2011). Esses fatores estão intimamente inter-relacionados, formando uma

complexa rede de interações, o qual é denominado “interactoma” da DII (FIOCCHI, 2014). Isoladamente, nenhum desses fatores explica totalmente o desencadeamento da doença.

O envolvimento do genoma na patogênese da DII tem sido amplamente estudado, e atualmente 235 loci já foram associados com a sua predisposição (IANIRO; HANSEN, 2017). A influência desse componente hereditário é evidenciada por estudos que mostram que entre 2 a 14% dos pacientes com DII possuem histórico familiar dessa doença (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Dentre os loci associados com a predisposição à DII, destacam-se os genes *NOD2*, *CARD9*, *ATG16L1*, *IRGM*, *FUT2*, e mais recentemente o gene *LRRK2*, também associado com a predisposição à doença de Parkinson (HUI et al., 2018; IMHANN et al., 2016). Esses genes e suas variações podem afetar o sistema imune do indivíduo, desencadeando resposta exacerbada, ou afetar a composição e complexidade da microbiota intestinal, permitindo o estabelecimento de bactérias consideradas patogênicas (IMHANN et al., 2016).

A microbiota intestinal é composta por diversos organismos, como vírus, fungos, helmintos e bactérias (HUGON et al., 2016). Devido ao grande número de indivíduos, diversidade de taxa e relevância dos metabólitos produzidos pela fermentação, as bactérias são amplamente estudadas no envolvimento com a saúde do hospedeiro, podendo modular a fisiologia e o sistema imune do trato gastrointestinal (CAMMAROTA et al., 2015; DAMASKOS; KOLIOS, 2008). Essas bactérias coabitam o intestino, tanto as benéficas quanto as patogênicas, e quando ocorre desequilíbrio da microbiota estabelece-se o quadro denominado disbiose, responsável por diversas doenças no

hospedeiro, entre elas a DII (CAMMAROTA et al., 2015; DAMASKOS; KOLIOS, 2008).

Dentre os fatores ambientais, estão descritos a influência de alguns fármacos intrinsecamente relacionados ao desenvolvimento da DII, entre eles os contraceptivos orais e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os contraceptivos orais possuem atividade trombogênica, capaz de causar isquemia e afetar a integridade da mucosa, principalmente na DC (SU et al., 2009). Os AINES possuem comprovadamente efeitos colaterais como injúria na mucosa do trato gastrointestinal, além da alteração nos níveis de prostaglandinas, mediadores envolvidos na resposta inflamatória (SU et al., 2009). Outro fator ambiental envolvido na patogênese da DII é o tabagismo, o qual desempenha diferentes papéis nas duas doenças: na RCU está associada à diminuição dos níveis de incidência, enquanto na DC está associado ao aumento (CARTER; LOBO; TRAVIS, 2004). Hábitos sedentários, estresse e privação de sono também são fatores de riscos associados com o aumento de risco da DII (ANANTHAKRISHNAN, 2015).

Finalmente, durante a inflamação intestinal, nota-se o aumento na produção de radicais livres, gerando estresse oxidativo, definido como condição caracterizada pelo acúmulo de dano oxidativo não-enzimático às moléculas, que afetam o funcionamento normal da célula ou organismo (BLOMHOFF et al., 2006; PAVLICK et al., 2002). Esse processo ocorre nos tecidos quando a produção dos radicais livres pelo metabolismo celular é elevada, e os mecanismos endógenos de eliminação desses radicais não são capazes de suprir a demanda de sua eliminação. Quando em grande concentração causam peroxidação lipídica, ao alterar ligações insaturadas nos

fosfolipídios de membrana, levando a alteração na fluidez da membrana, desalinhamento dos receptores e morte celular (KARP; KOCH, 2006). Os radicais livres também podem interagir com carboidratos e proteínas, e causar alterações nas moléculas de DNA e RNA, levando ao surgimento de mutações (BLOMHOFF et al., 2006; KARP; KOCH, 2006).

Uma vez que esses fatores desencadeiam e perpetuam o processo inflamatório ocorre a produção de diversas moléculas pró-inflamatórias (como IL-6, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas e leucotrienos), e a redução de mediadores anti-inflamatórios (como IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , lipoxinas, resolvinas, entre outros) (DAS, 2016). O desequilíbrio entre as moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias causam o dano tecidual observado na DII, e a deficiência dessas moléculas responsáveis por interromper a resposta inflamatória leva à perpetuação das lesões (DAS, 2016; UNGARO et al., 2017).

A resolução do processo inflamatório não ocorre de maneira passiva, sendo coordenada por um conjunto de moléculas anti-inflamatórias, como as lipoxinas, resolvinas, protectinas e citocinas anti-inflamatórias (UNGARO et al., 2017). Esses mediadores reduzem o influxo de neutrófilos, estimulam fagocitose e eferocitose de células apoptóticas, e podem ser produzidos a partir de lipídeos bioativos provenientes da dieta (DAS, 2016; MICHALAK; MOSIŃSKA; FICHNA, 2016). A resolução ativa do processo inflamatório ocorre a partir de uma série de eventos sequenciais, que envolvem (i) a detecção e eliminação do agente estimulador da resposta inflamatória, (ii) silenciamento dos mediadores pró-inflamatórios, (iii) eliminação de células da resposta imune (UNGARO et al., 2017).

Devido ao caráter multifatorial e o desconhecimento de todos os processos envolvidos na patogênese da DII, a busca por novos tratamentos é dificultada (DI STASI; COSTA; WITAICENIS, 2015). Atualmente, o tratamento da DII visa a induzir a remissão dos sintomas, visto que a doença não possui cura. O tratamento farmacológico da DII inclui anti-inflamatórios clássicos, como o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e derivados, glicocorticoides, imunomoduladores, e a terapia biológica (DI STASI; COSTA; WITAICENIS, 2015). Devido ao uso crônico desses medicamentos, é descrito o surgimento de diversos efeitos colaterais, o que inviabiliza a sua utilização por longos períodos (FIOCCHI, 2012). Adicionalmente, nem todos os pacientes respondem ao tratamento com esses medicamentos.

Com base nessas evidências, verifica-se a necessidade de novos medicamentos e/ou estratégias terapêuticas, complementares ao tratamento previamente estabelecido, visando reduzir a dose utilizada de medicamentos, aumentar o período de remissão dos sintomas e/ou diminuir o período de exacerbação dos sintomas. Atualmente, os estudos de novos medicamentos para o tratamento da DII estão baseados no desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais, descoberta de compostos que controlem o estresse oxidativo decorrente do processo inflamatório e produtos capazes de modular a microbiota intestinal e ampliar aos mecanismos de defesa, incluindo diferentes produtos alimentares (DI STASI; COSTA; WITAICENIS, 2015).

Dentre os produtos que modulam a microbiota intestinal ou amplificam os mecanismos de defesa da mucosa, destacam-se os alimentos funcionais incluindo prebióticos, probióticos e simbióticos e compostos naturais ativos como os lipídeos bioativos e vários micronutrientes.

Lipídeos bioativos são definidos como produtos lipídicos de origem alimentar que além de serem fonte de energia, são capazes de promover efeitos benéficos para a saúde humana (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013; DAS, 2016). Possuem atividade biológica relacionada no tratamento de diversas doenças crônicas, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e a DII (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013). Dentro dessa classificação, encontram-se os carotenoides (como o beta-caroteno e o licopeno), os fitoesteróis (como o campesterol), as vitaminas lipossolúveis, os lipídeos fenólicos (vit. A, E, K, D, e os flavonoides), e por fim os ácidos graxos de cadeia longa (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com grupos laterais de cadeias de hidrocarbonetos (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013). Os ácidos graxos podem ser classificados em saturados ou insaturados, de acordo com a ausência ou presença de duplas ligações, respectivamente. Estes últimos podem ainda ser classificados em mono-insaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs), sendo que os MUFAs possuem apenas uma dupla ligação, enquanto os PUFAs podem possuir duas ou mais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação dos ácidos graxos.

Ácidos graxos saturados	Cadeia curta	Acetato, propionato, butirato
	Cadeia longa	Ác. Esteárico, Ác. palmítico
Ácidos graxos insaturados	Mono-insaturados	Ác. Palmitoleico, Ác. oleico
	Poli-insaturados	Ác. alfa-linolênico, Ác. linoleico, Ác. araquidônico

Dentre os ácidos graxos insaturados destacam-se os PUFAs, tais como os das famílias  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, que diferem entre si pela localização da última dupla

ligação em relação à terminação metil da molécula (PATTERSON et al., 2012). Esses ácidos graxos são metabolizados em ácido linoleico (AL) e ácido alfa-linolênico (ALA), os quais são denominados ácidos graxos essenciais e podem ser obtidos através da alimentação (UNGARO et al., 2017). Esses compostos são precursores de eicosanoides e docosanoides, mediadores lipídicos responsáveis por promover e orquestrar o processo de resolução da inflamação (UNGARO et al., 2017). Esses PUFAs participam da composição de membranas celulares, e são responsáveis por manter a homeostase para o correto funcionamento de proteínas transmembrana e a fluidez da bicamada lipídica, favorecendo processos de sinalização, funções celulares e expressão gênica (PATTERSON et al., 2012). Além de sua função estrutural, os PUFAs e seus derivados podem atuar como agonistas de receptores acoplados à proteína G (G protein-coupled receptors - GPCR) presentes em macrófagos e monócitos, desempenhando papel fundamental na regulação da inflamação e da resposta imune (DAS, 2016). Também podem se ligar a receptores nucleares, modulando a expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta inflamatória (MARION-LETELLIER et al., 2013).

Alguns mediadores lipídicos derivados da metabolização dos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 estão envolvidos na cascata da resposta anti-inflamatória, como as lipoxinas, resolvinas e protectinas, e são essenciais para a regulação da inflamação e o retorno das células à homeostase (DAS, 2016; UNGARO et al., 2017). As lipoxinas são produtos da metabolização do ácido linoleico, e já foram relacionadas com a inibição da função de células dendríticas e redução na produção de Leucotrieno TB4 (LTB4) em neutrófilos humanos (MARION-LETELLIER et al., 2013), indicando atividade anti-inflamatória.



Os PUFA's são compostos presentes em diferentes produtos naturais consumidos pela espécie humana, principalmente peixes e derivados, mas também podem ser encontrados em óleos de origem vegetal, como óleo de girassol e milho, cereais, gordura animal, e sementes oleaginosas, como a castanha-do-pará (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013).

Além dos ácidos graxos de cadeia longa, tem sido demonstrada a importância do selênio como um elemento essencial para os mamíferos, pelo fato do mesmo compor 25 diferentes selenoproteínas com diferentes funções no organismo (NOGUEIRA; ROCHA, 2011). O selênio pode ser encontrado na forma inorgânica ou ligado a compostos orgânicos, e participa no processo de eliminação de radicais livres, seja através da composição de enzimas ou no sequestro desses radicais (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008). Existem várias fontes de selênio na natureza, mas a maior fonte vegetal descrita de selênio até a atualidade é a castanha-do-pará (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008).

Neste contexto, optou-se no presente trabalho estudar a espécie *Bertholletia excelsa* Bonpl. devido sua composição química rica em lipídeos bioativos e selênio. *Bertholletia excelsa* Bonpl. conhecida popularmente como castanha-do-pará é uma espécie vegetal nativa do sudeste da floresta amazônica, pertencente à família Lecythidaceae. No Brasil é encontrada nos estados do Pará, Acre, Amazonas, Rondônia e região norte dos estados de Goiás e Mato Grosso (LORENZI, 1992). A castanheira é uma árvore de porte alto, podendo atingir entre 30 a 50 metros de altura, sua idade é estimada entre 800 e 1200 anos e possui grandes folhas coriáceas (LORENZI, 1992; YANG, 2009). Muito utilizada pela população local destas regiões, e também por

comunidades tradicionais quilombolas e indígenas, suas aplicações etnofarmacológicas já foram descritas para mais de 30 doenças (OLIVEIRA et al., 2015).

De seu fruto, comumente denominado ouriço, retira-se a castanha, uma amêndoa utilizada para consumo alimentício, fonte rica em PUFA's e MUFA's, selênio, fitoesteróis, tocoferol (Vitamina E), esqualeno e compostos fenólicos, todos atribuídos a efeitos benéficos para a saúde (COLPO et al., 2014; YANG, 2009). Além disso, os níveis de ácidos graxos e selênio são importantes moduladores da expressão de glutathione peroxidase (GPx), enzima envolvida na resposta antioxidante endógena (COLPO et al., 2014). Estudos realizados em indivíduos saudáveis mostraram que uma única ingestão de grandes quantidades de castanha-do-pará (entre 20g e 50g) diminuiu significativamente e em longo prazo o perfil de marcadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (COLPO et al., 2014). Sua atividade benéfica também foi associada com a redução de biomarcadores envolvidos com o risco de câncer colo-retal (HU et al., 2016)

## **II - Objetivo**

Com base nas informações apresentadas, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal do óleo da castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) no modelo de inflamação cólica induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos.

### III – Material e métodos

#### 1 - Material Vegetal

O óleo de Castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) foi fornecido pela empresa Beraca Ingredientes Naturais SA. O material foi obtido através do processo físico de prensagem a frio da semente, e posterior refinamento, obtendo um óleo límpido, o qual foi armazenado em recipiente protegido da luz e mantido em local seco e protegido de fontes de calor. O óleo foi solubilizado em Tween 80 na concentração 1%, e administrado por via oral pelo método de gavagem. A composição de ácidos graxos fornecida pela empresa está especificada na tabela 2.

**Tabela 2.** Composição de ácidos graxos do óleo de castanha-do-pará fornecido pela empresa Beraca.

<b>Nomeclatura usual</b>	<b>Ácido Graxo</b>	<b>g/100g</b>
Ácido Palmítico	C 16:0	12,0 – 16,0
Ácido Palmitoléico	C 16:1	≤ 0,5
Ácido Esteárico	C 18:0	9,0 – 13,0
Ácido Oleico	C 18:1	31,0 – 41,0
Ácido Linoléico	C 18:2	32,0 – 42,0
Ácido Araquídico	C 20:0	≤ 0,5

#### 2 - Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos e albinos, provenientes do Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (CNPJ: 65.440.612/0001-40), os quais foram transportados em veículo providenciado pela instituição. Os ratos foram alojados em caixas (34cm de largura x 40cm de comprimento x 17cm de altura), separados aleatoriamente e imediatamente após sua chegada ao biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), em 4 ou 3

animais por caixa. Todos os animais tiveram livre acesso à água e à ração peletizada durante todo o período, exceto a um jejum de 12 horas imediatamente anterior à indução do processo inflamatório intestinal. O biotério possui ciclo claro-escuro de 12 horas e estantes com sistema de ventilação-exaustão de ar filtrado que funcionam constantemente, mantendo temperatura controlada de 21°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). O protocolo e delineamento experimental foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, segundo o Protocolo nº 900.

### 3 - Delineamento experimental

A indução do processo inflamatório intestinal foi realizada através da administração intracólica (via retal) de solução contendo 40 mg/ml de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) diluído em etanol a 50% (v/v). Os animais foram previamente mantidos em jejum por 12h, e após serem anestesiados, foi administrada 0,25ml da solução contendo TNBS por cateter introduzido pelo ânus dos animais, ao longo de 8 cm, até atingir o intestino na altura do cólon. Os animais foram mantidos em posição invertida durante todo o procedimento, para assegurar que o líquido não retornasse pelo ânus. Os animais foram divididos em grupos (cada qual contendo n=7 animais), como descritos abaixo:

- a) Grupo BRANCO: animais saudáveis e que não receberam tratamento;
- b) Grupo CONTROLE: animais com inflamação intestinal e que não receberam tratamento;
- c) Grupo TRATADO 1: animais com inflamação intestinal e tratados com solução de óleo de Castanha-do-pará na dose de 18,75 mg/kg;

d) Grupo TRATADO 2: animais com inflamação intestinal e tratados com solução de óleo de Castanha-do-pará na dose de 37,5 mg/kg;

e) Grupo TRATADO 3: animais com inflamação intestinal e tratados com solução de óleo de Castanha-do-pará na dose de 75 mg/kg;

f) Grupo TRATADO 4: animais com inflamação intestinal e tratados com solução de óleo de Castanha-do-pará na dose de 150 mg/kg;

g) Grupo TRATADO 5: animais com inflamação intestinal e tratados com solução de óleo de Castanha-do-pará na dose de 300 mg/kg.

Os animais dos grupos tratados receberam solução contendo óleo de castanha-do-pará pelo método de gavagem 98, 74, 50, 26 e 2 horas antes da indução do processo inflamatório intestinal, e foram mortos 72h após a indução, enquanto que os animais do grupo controle e branco receberam veículo (Tween 80, concentração 1%) nos mesmos momentos de administração do óleo. Após a morte dos animais, o cólon e os demais órgãos foram retirados para avaliações bioquímicas, macroscópicas e histológicas.

#### 4 – Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

A avaliação da atividade do óleo de castanha-do-pará no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS foi realizado por análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas.

##### 4.1. Avaliações macroscópicas

Durante o tratamento o peso corporal e o consumo de ração foram aferidos diariamente. Após a indução do processo inflamatório, foi verificada a presença ou ausência de fezes diarreicas. Após a morte dos animais, os cólons foram retirados para análise dos parâmetros peso e comprimento cólico,

relação peso-comprimento cólico, aderência entre o intestino e órgãos adjacentes, tamanho e escore da lesão. O escore da lesão foi determinado de acordo com escala descrita por Bell et al.(1995) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica (BELL et al., 1995)

Escala	Critério
0	Sem danos
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6 – 10	Se o dano cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (a escala é aumentada em 1 ponto para cada centímetro adicional)

#### 4.2. Avaliações bioquímicas

Após retirada da amostra histológica, os cólons de cada animal foram divididos em 7 tiras, e armazenados em temperatura -80°C para posteriores análises bioquímicas. Após o descongelamento, as amostras de tecido foram homogeneizadas em solução específica de cada protocolo.

##### A - Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO):

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método descrito por Krawisz et al., (1984) e os resultados expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 µmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C.

B - Determinação de proteínas totais e da atividade da enzima fosfatase alcalina:

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos descritos por Smith et al. (1984) e Bessey et al. (1946), respectivamente. A determinação de proteínas será espectrofotometricamente determinada a 562 nm e realizada pela reação de ácido bicinchonínico e sulfato de cobre que forma coloração roxa após incubação a 37 °C por 25 minutos. A determinação de fosfatase alcalina foi realizada através do uso de p-nitrofenilfosfato dissódico como substrato na presença de tampão glicina 50 mM (pH 10,5) com 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> que adquire coloração amarelada após incubação a 37 °C por 25 minutos e detectada a 405 nm. O cálculo da fosfatase alcalina é baseada na quantidade de proteínas totais e expressa em mU/ mg de proteína.

C - Determinação do conteúdo de glutathiona total:

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que se baseia na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

#### 4.3. Avaliação microscópica

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico amostras de tecido (0,5mm) localizadas a 0,5 cm adjacentes à área de lesão foram coletadas e fixadas em ALFAC por 48 horas. Após fixação, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo de maneira seriada, desparafinizadas, reidratadas e coradas com eosina-hematoxilina e Alcian Blue/PAS.



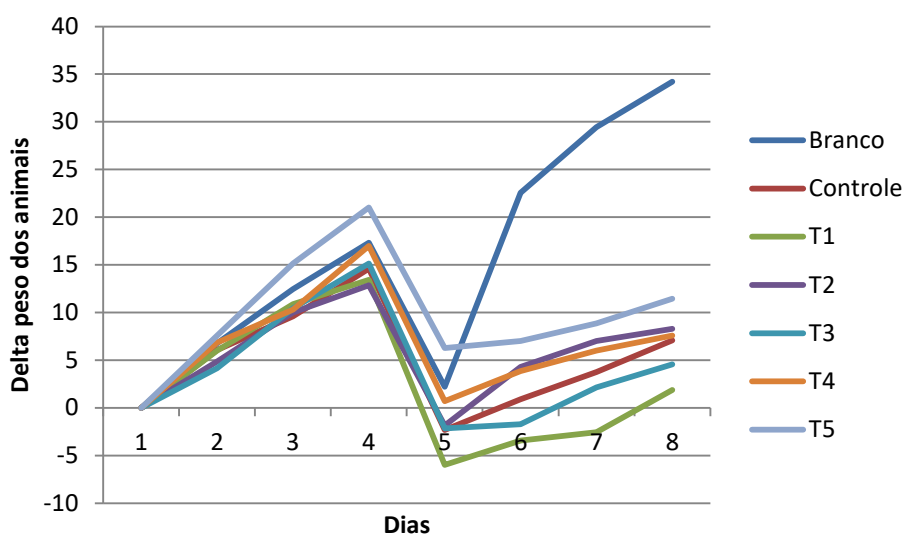
## 5 - Análises estatísticas

Resultados paramétricos foram expressos como 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 foram expressos como mediana e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Dados descontínuos foram analisados pelo teste de Fisher. Significância estatística foi considerada para valores de  $p \leq 0,05$ .

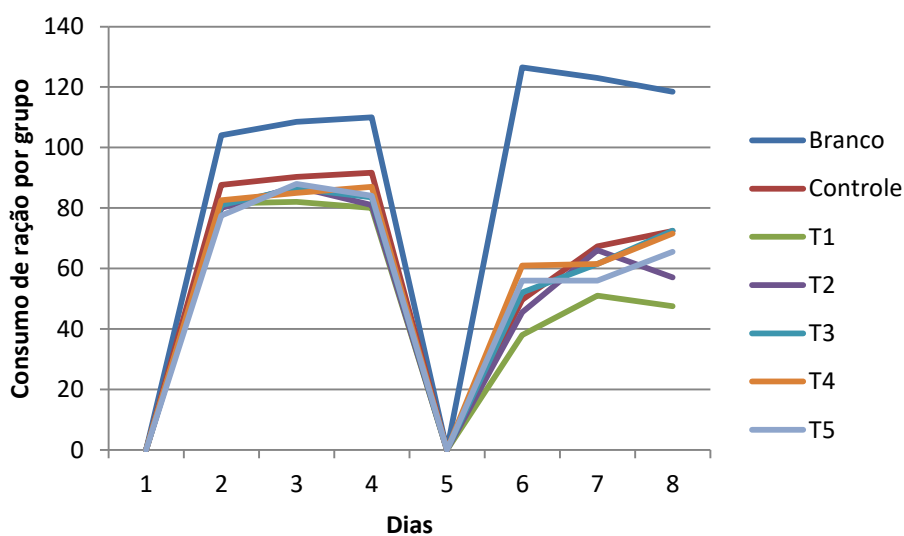
## IV - Resultados

### 1 – Avaliações macroscópicas

Os animais dos grupos controle e tratados com o óleo de castanha-do-pará apresentaram perda de peso acentuada (Figura 1) e redução do consumo de alimento (Figura 2) após a indução do processo inflamatório por TNBS, em comparação ao grupo branco, que após o jejum recuperaram o peso e o consumo de ração.



**Figura 1:** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em  $\Delta$  peso corporal.



**Figura 2:** Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo do grupo/dias.

Os animais do grupo branco não tiveram seus parâmetros macroscópicos alterados, conforme esperado para os animais saudáveis. Os animais do grupo controle apresentaram formação de lesão variável entre 2,59 cm e 4,33 cm, sendo verificada formação de tecido necrótico e hiperemia. Houve encurtamento do comprimento intestinal, levando ao aumento da relação peso-comprimento, e presença de diarreia e aderência do intestino aos órgãos adjacentes. Todos os parâmetros avaliados no grupo controle diferiram significativamente do grupo branco, validando o modelo de estudo.

As doses de 75 e 150 mg/kg do óleo de castanha-do-pará melhoraram a relação peso-comprimento colônico em comparação ao grupo controle, enquanto que a dose de 150mg/kg apresentou melhora no comprimento da lesão em comparação ao grupo controle. As demais doses não apresentaram melhora significativa nos parâmetros avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos animais que receberam óleo de castanha-do-pará no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

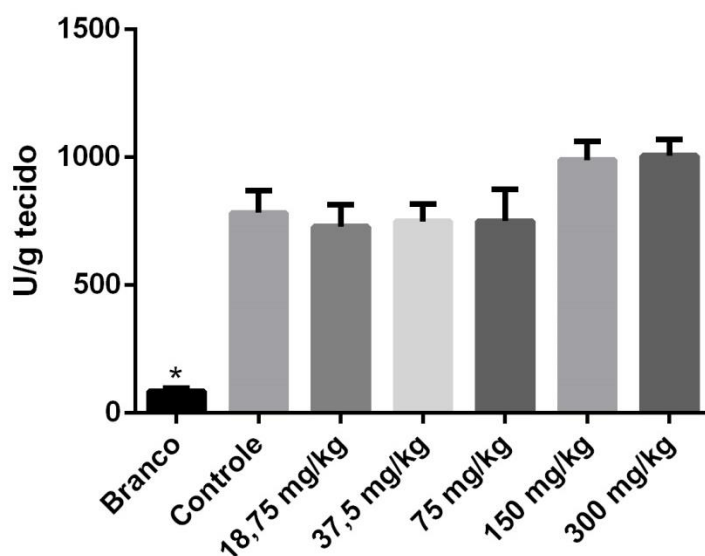
<b>Grupo</b>	<b>Escore (0-10)<sup>a</sup></b>	<b>Peso/comprimento (mg/cm)<sup>b</sup></b>	<b>Lesão (cm)<sup>b</sup></b>	<b>Aderência (%)<sup>c</sup></b>
<b>Branco</b>	0*	116,95 ± 11,52*	0*	0*
<b>Controle</b>	7 (6-9)	188,25 ± 21,67	3,46 ± 0,87	66,67
<b>18,75 mg/kg</b>	8 (7-8)	177,16 ± 14,91	3,74 ± 0,46	42,85
<b>37,5 mg/kg</b>	7 (5-8)	173,06 ± 11,33	2,94 ± 0,88	42,85
<b>75 mg/kg</b>	7 (6-8)	167,37 ± 10,45*	3,02 ± 0,46	100
<b>150 mg/kg</b>	7 (6-8)	164,46 ± 13,99*	2,61 ± 0,66*	100
<b>300 mg/kg</b>	7 (6-9)	187,65 ± 21,61	3,64 ± 0,73	100

<sup>a</sup>Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), <sup>b</sup> extensão da lesão e relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M. onde \* p ≤ 0,05, comparados ao grupo controle

## 2 – Avaliações bioquímicas

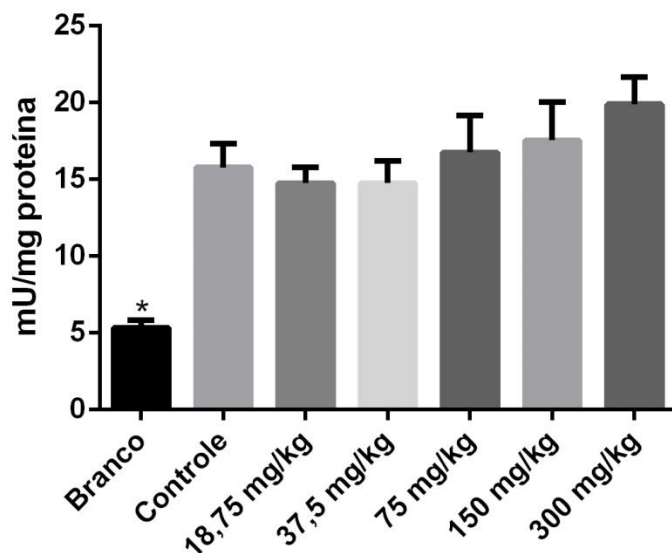
Após indução do processo inflamatório pela administração de TNBS, os parâmetros bioquímicos são alterados em relação ao grupo branco, como um aumento marcante da atividade da enzima mieloperoxidase e da atividade da enzima fosfatase alcalina e redução do conteúdo de glutathiona total. Em todos os parâmetros avaliados, o grupo controle diferiu significativamente do grupo branco, validando o método utilizado (Figuras 1, 2 e 3).

Os tratamentos nas diferentes doses de óleo de castanha-do-pará não foram capazes de evitar o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (Figura 3). Embora se observou um aumento na atividade da enzima nas maiores doses em relação ao grupo controle, esse aumento não foi estatisticamente significativo.



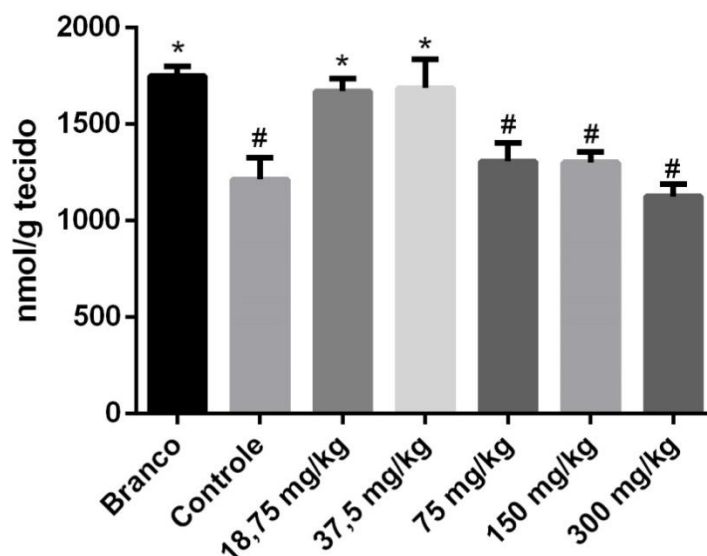
**Figura 3.** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p \leq 0,05$ , analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle.

Os tratamentos também não evitaram o aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina em comparação com o grupo controle, e as maiores doses apresentaram maior atividade em relação ao grupo controle, entretanto o aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 4).



**Figura 4.** Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p \leq 0,05$ , analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett vs. grupo controle.

As doses de 18,75 mg/kg e 37,5 mg/kg evitaram a depleção dos níveis colônicos de GSH, mantendo-os estatisticamente semelhantes aos animais do grupo branco (Figura 5). Os demais tratamentos não evitaram a depleção dos níveis de glutathiona, deixando-os comparáveis aos níveis do grupo controle.

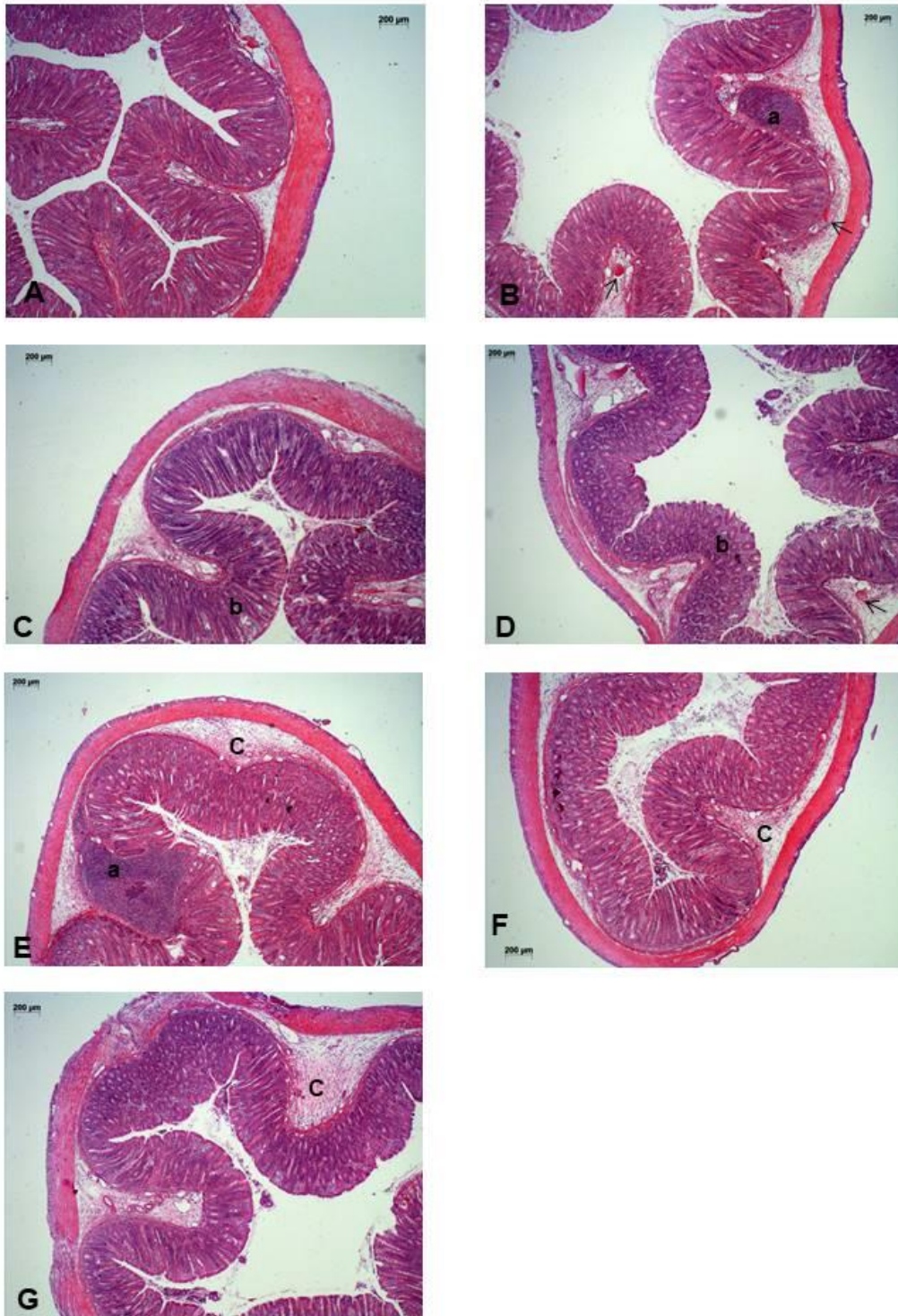


**Figura 5.** Avaliação do conteúdo de glutatona total (GSH). Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p \leq 0,05$  vs. grupo controle e #  $p \leq 0,05$  vs. grupo branco, analisados por ANOVA seguido de teste Dunnett.

### 3 – Avaliação microscópica

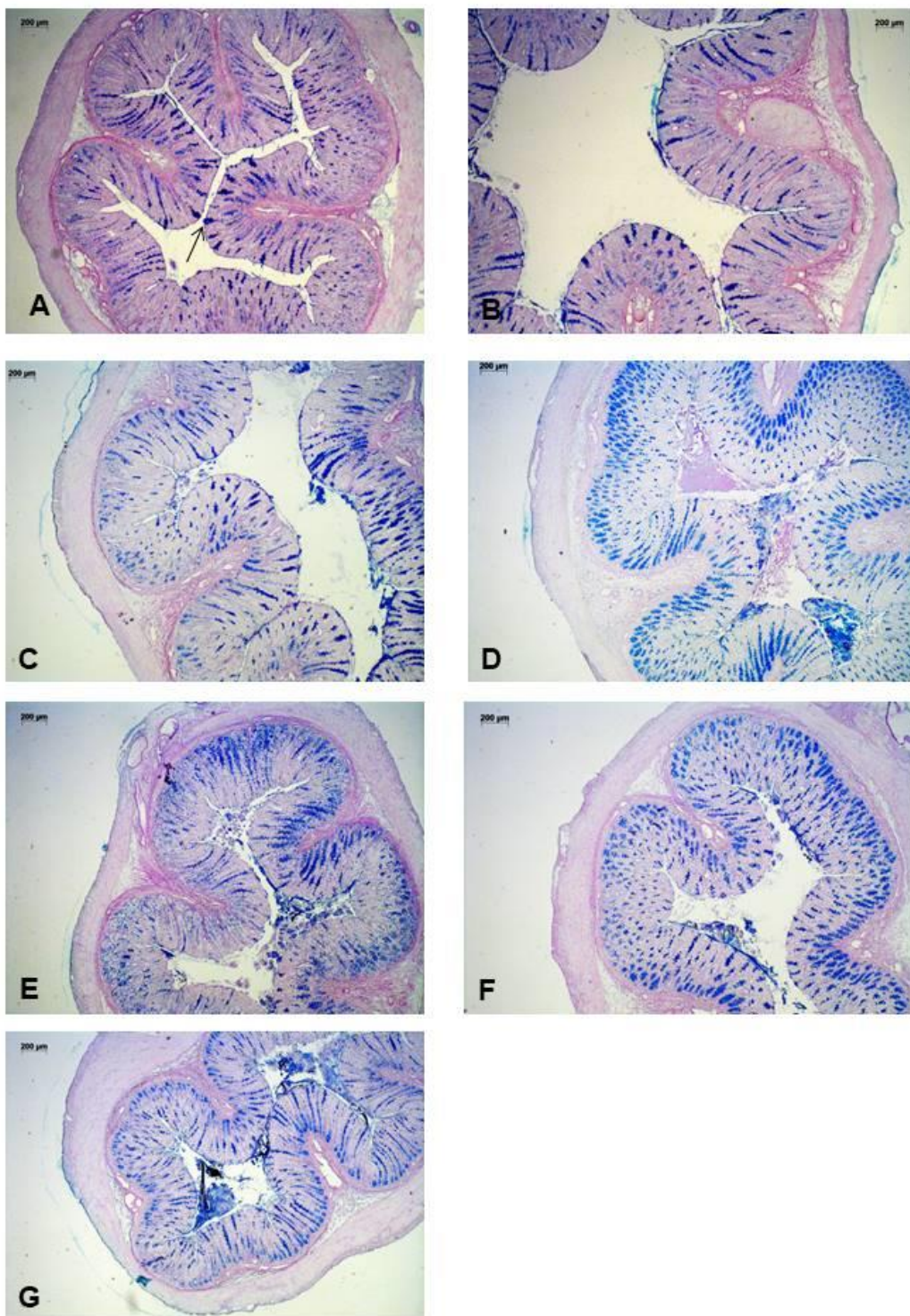
Os animais que passaram pelo processo de indução da inflamação intestinal apresentaram inflamação transmural, formação de edema e presença de vasos na submucosa, infiltrado de células da resposta imune e depleção de muco nas células caliciformes (Figura 6). Também ocorreu a perda de citoarquitetura, distorcendo a estrutura da camada mucosa quando comparado com os animais saudáveis. Nos grupos tratados, não foi possível verificar melhora dos caracteres lesionados pela indução por TNBS.

Nas lâminas coradas com Alcian blue/PAS (Figura 7), utilizada para avaliar a presença de muco nas células caliciformes, foi observada depleção da camada de muco no grupo controle, em comparação ao grupo branco. O tratamento com o óleo de castanha-do-pará não foi capaz de evitar a depleção de muco.



**Figura 6.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais 72h após a administração de TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2,5X. (A) Grupo branco, (B) Grupo controle, (C) Grupo tratado com óleo de castanha-do-pará 18,75 mg/kg, (D) Grupo tratado 37,5 mg/kg, (E) Grupo tratado 75 mg/kg, (F) Grupo tratado 150 mg/kg, (G) Grupo tratado 300 mg/kg. a=infiltração celular, b=alteração da citoarquitetura, c=edema, seta preta = vascularização.





**Figura 7.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais 72h após a administração de TNBS. Cortes corados com Alcian Blue/PAS. Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 2,5X. (A) Grupo branco, (B) Grupo controle, (C) Grupo tratado com óleo de castanha-do-pará 18,75 mg/kg, (D) Grupo tratado 37,5 mg/kg, (E) Grupo tratado 75 mg/kg, (F) Grupo tratado 150 mg/kg, (G) Grupo tratado 300 mg/kg. Seta preta: coloração azul, indica presença de mucina.



## **V – Discussão e conclusão**

Para este estudo foi escolhido o processo de indução da inflamação intestinal por TNBS, que é instilado no reto dos animais através de uma cânula. A molécula de TNBS atua como um hapteno, que ao se ligar a proteínas de alto peso molecular, é reconhecido como antígeno desencadeando uma série de respostas imunes (GOYAL et al., 2014). No local em que a solução é liberada, forma-se uma lesão de extensão e severidade variáveis de acordo com o estabelecimento do processo inflamatório. Em relação aos parâmetros clínicos, neste modelo é possível observar perda de peso progressiva e diarreia com sangue (TRAN; KATSIKEROS; ABIMOSLEH, 2012). Ambas as características foram observadas nos animais que passaram pelo processo de indução. O tratamento com o óleo de castanha-do-pará não melhorou significativamente os parâmetros clínicos em relação ao grupo controle.

Os parâmetros macroscópicos avaliam a severidade da lesão e suas consequências, como o encurtamento do comprimento colônico causado pela contração constante da camada muscular e engrossamento da parede intestinal (PARK; PFEIL, 2015) e a aderência do intestino aos órgãos adjacentes. Devido ao encurtamento do comprimento colônico, a relação peso/comprimento possui maior valor no grupo controle em relação aos animais saudáveis. Dentre os animais tratados, as doses de 75 mg/kg e 150 mg/kg promoveram melhora na relação peso-comprimento colônico em relação ao grupo controle. A dose de 150 mg/kg também reduziu o tamanho da lesão, formado por tecido necrótico e hiperemia, em relação ao grupo controle. As demais doses não alteraram os parâmetros macroscópicos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, as doses de 75mg/kg e 150 mg/kg apresentaram resultado promissor ao melhorarem os parâmetros

macroscópicos avaliados em comparação ao grupo controle. No entanto, este efeito protetor induzido por estas doses do óleo de castanha-do-pará não foram associados a alterações em nenhum dos demais parâmetros estudados, indicando que esses efeitos devem estar associados a outros parâmetros da resposta inflamatória, tais como perfil de citocinas e de outros mediadores não estudados.

Durante a inflamação intestinal induzida por TNBS, é observado o aumento de diversos mediadores inflamatórios, como o ácido araquidônico e seus metabólitos: prostaglandina E2, tromboxano B2, leucotrienos, além de citocinas e aumento da atividade de enzimas relacionadas com a resposta imune, como a mieloperoxidase e a fosfatase alcalina (GOYAL et al., 2014).

Na presença de processo inflamatório, o epitélio dos vasos deve se tornar mais permeável para a passagem dos neutrófilos e migração ao sítio de inflamação. O influxo intenso de neutrófilos é caracterizado pelo aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (SMITH; CASTRO, 1978), sendo os níveis dessa enzima diretamente proporcionais à inflamação presente no tecido. Em nossos resultados foi observado que nas maiores doses de óleo de castanha-do-pará, principalmente na dose de 300 mg/kg, houve maior atividade da enzima mieloperoxidase em relação ao grupo controle, apesar de não ser observada significância estatística.

Tal observação pode ser devido ao fato de o ácido linoleico, presente em grandes quantidades no óleo de castanha-do-pará, ser precursor do ácido araquidônico (AA), que é convertido pelas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) em diversos eicosanoides, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (PATTERSON et al., 2012). Esses eicosanoides

estão envolvidos no desenvolvimento e perpetuação da resposta inflamatória, e estão relacionados a diversos processos patológicos, como a DII (DAS, 2006). Estudos recentes comprovam que o AA estimula a enzima LOX-5 de seu estado dormente para o ativado, aumentando a produção de LTB<sub>4</sub>. Esses leucotrienos, por sua vez, atuam como agentes quimiotáticos para neutrófilos, e em pacientes com DII foi reportado o aumento desses mediadores, e com o aumento da quimiotaxia ocorre como consequência aumento da atividade da MPO (SORGI et al., 2017; VLIET, 1992).

A participação da enzima fosfatase alcalina no processo inflamatório é pouco elucidada, entretanto já foi amplamente descrito que no quadro de inflamação intestinal em modelos experimentais, como o TNBS, sua atividade está aumentada (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Essa enzima é responsável por clivar moléculas de fosfato em condições de pH alcalino, liberando fosfato inorgânico (SÁNCHEZ DE MEDINA et al., 2004). Em mamíferos, são encontradas quatro isoformas: a intestinal, a placentária, as isoformas de células germinativas, e as tecido não-específicas (HERNÁNDEZ-CHIRLAQUE et al., 2016). No intestino grosso a isoforma intestinal está relacionada com a saúde e homeostase do órgão, podendo estar envolvida no transporte de lipídeos e nucleotídeos, limitando a translocação de bactérias através da mucosa, e sua atividade e expressão podem ser moduladas pela dieta (HERNÁNDEZ-CHIRLAQUE et al., 2016; LÓPEZ-POSADAS et al., 2011). A maior atividade e expressão dessa enzima no modelo de inflamação intestinal por TNBS pode estar relacionado ao estresse oxidativo (LÓPEZ-POSADAS et al., 2011). Foi observado em nossos resultados que os animais do grupo controle possuem elevada atividade dessa enzima em comparação

ao grupo branco, corroborando os resultados observados na literatura. O tratamento com o óleo de castanha-do-pará não foi capaz de evitar o aumento da atividade da enzima, e a dose mais elevada, de 300 mg/kg, levou ao aumento da atividade em comparação ao grupo controle, apesar de não haver diferença estatística.

O estresse oxidativo ocorre pelo acúmulo de radicais livres, produtos do metabolismo normal da célula, a qual possui mecanismos endógenos para sua eliminação com o intuito de evitar os efeitos deletérios de seu excesso. Em quadros de inflamação crônica intestinal, como a DII, observa-se aumento na produção desses radicais, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, levando a danos celulares e apoptose (PAVLICK et al., 2002). Portanto, mecanismos que realizem a metabolização ou o sequestro desses radicais são de extrema importância para a saúde humana. No modelo de indução inflamatória por TNBS, ocorre a depleção dos níveis colônicos de glutathione total, um antioxidante endógeno, devido à resposta tecidual frente ao processo inflamatório. Nos resultados obtidos, pudemos observar que as menores doses, de 18,75 mg/kg e 37,5 mg/kg, evitaram a depleção dos níveis de glutathione, mantendo-os comparáveis aos animais saudáveis. No entanto, estes efeitos não foram acompanhados por uma redução da lesão induzida por TNBS.

As moléculas consideradas antioxidantes podem ser definidas como compostos com atividade redox que limita o estresse oxidativo ao reagir não-enzimaticamente com um composto oxidante, ou como uma enzima antioxidante, que é uma proteína que limita o estresse oxidativo através da catalisação de reação redox com um composto oxidante (BLOMHOFF et al., 2006). Um antioxidante depende do contexto em que está inserido: uma

mesma molécula pode ser tanto agente redutor quanto oxidante, dependendo do potencial redutor da molécula que ela irá reagir (BLOMHOFF et al., 2006). Essas moléculas podem ser endógenas, como a glutathione e as enzimas envolvidas no ciclo redox, ou exógenas, obtidas por meio da alimentação.

A defesa antioxidante endógena possui componentes enzimáticos ou não enzimáticos, que previnem a formação de radicais livres, os removem antes que eles causem danos, reparam o dano causado pela oxidação e eliminam as moléculas danificadas (BLOMHOFF et al., 2006). Um dos mais importantes antioxidantes endógenos é a glutathione, um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamina, cisteína e glicina. Possui um grupo tiol, que é agente altamente redutor, conferindo capacidade de doar elétrons para compostos eletrofílicos e evitando danos oxidativos (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003), podendo ser encontrada dentro das células nas formas oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH).

As enzimas responsáveis pelas reações de oxidação e redução que utilizam a GSH e GSSG como substrato são a glutathione peroxidase e redutase, respectivamente. A glutathione peroxidase neutraliza radicais livres utilizando a GSH como doadora de elétrons, formando GSSG. A GSSG, por sua vez, é convertida na forma reduzida através da ação da enzima glutathione redutase, a qual utiliza NADPH como doador de elétron. A forma oxidada se difunde através da membrana plasmática, reduzindo os níveis de glutathione intracelular, evidenciando a importância de manter a razão GSH:GSSG elevada, evitando a depleção dos níveis intracelulares de glutathione total. A redução dessa proporção leva ao quadro de estresse oxidativo, o qual é associado a diversos estados patofisiológicos, como inflamação, câncer,

doenças neurodegenerativas, AIDS, fibrose cística, entre outros (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

Além da defesa antioxidante endógena, também existem componentes da dieta que contribuem para a defesa antioxidante, ao fornecer compostos que ativamente sequestram ou neutralizam radicais livres, ou fornecendo compostos que induzem a expressão gênica de compostos antioxidantes endógenos (BLOMHOFF et al., 2006). O selênio é um mineral obtido através da alimentação, e a castanha-do-pará é a fonte vegetal com maior quantidade de selênio, principalmente na forma orgânica selenometionina. Sua atividade antioxidante se deve ao fato de fazer parte da composição de selenoproteínas, entre elas a glutathione peroxidase, que possui um grupo de selênio em seu sítio ativo (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008). Também atua como sequestrador direto de radicais livres, reduzindo o seu conteúdo intracelular (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008). Entretanto, já foi amplamente descrito casos de toxicidade causados pelo excesso de selênio no organismo de mamíferos, o que pode se dever ao fato de que a faixa entre deficiência, a essencialidade e toxicidade é muito estreita para esse mineral (NOGUEIRA; ROCHA, 2011). Isso pode explicar em partes o resultado encontrado, onde o conteúdo de glutathione total não segue uma curva dose-dependente, sendo que as menores doses (de 18,75 mg/kg e 37,5 mg/kg) apresentaram resultados protetores, enquanto as demais doses apresentaram resultado semelhante ao grupo controle. Outra possibilidade é que os radicais livres são produzidos por neutrófilos e macrófagos durante a resposta imune (GOYAL et al., 2014), e conforme já foi discutido, as maiores doses apresentaram maior atividade das enzimas mieloperoxidase e fosfatase alcalina, portanto levando a maior

produção de radicais livres e diminuindo de maneira mais acentuada o conteúdo da glutathiona total.

Os resultados obtidos não apresentam coerência entre as doses, sendo que as doses de 75 mg/kg e 150 mg/kg apresentaram resultados positivos nos parâmetros macroscópicos, o que não representou melhora nos demais parâmetros. Já as doses de 18,75 mg/kg e 37,5 mg/kg evitaram a depleção dos níveis de glutathiona total, tendência que não se refletiu nos parâmetros bioquímicos restantes, nem nos parâmetros macroscópicos. Tal lacuna poderia ser preenchida com experimentos envolvendo avaliação de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, como citocinas, e a avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e redutase.

Outro fator importante é que a atividade anti-inflamatória mais comumente descrita em PUFAs se deve pela ação do  $\omega$ -3, o qual não foi encontrado no óleo fornecido pela empresa e, portanto, pode ter refletido na ausência de efeitos protetores do tratamento com óleo nas doses utilizadas. Existem diversas evidências que uma dieta rica em  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 está associada a benefícios para a saúde humana, entretanto essa proporção deve seguir a proporção de até 4:1 de  $\omega$ -6 em relação a  $\omega$ -3 (PATTERSON et al., 2012), para evitar desequilíbrio entre as atividades pró-inflamatória e anti-inflamatória desses ácidos graxos. Devido à competição desses PUFAs por sítios de ligação nos tecidos, os benefícios verificados pelo  $\omega$ -3 seriam reduzidos quando em grandes concentrações de  $\omega$ -6 (FRITSCHÉ, 2008).

Com base nos objetivos propostos, nos resultados obtidos e na discussão apresentada, pode-se concluir que embora o óleo de castanha-do-pará produziu diferentes efeitos de acordo com a dose utilizada, em conjunto

não caracterizam um resposta anti-inflamatória intestinal no modelo de indução por TNBS.



## VI - Referências

- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.
- ANDERSON, C. A. et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nature genetics**, v. 43, n. 3, p. 246–52, 2011.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods of Enzymology**, v. 113, p. 548-55, 1985.
- BELL, C. J.; GALL, D. G.; WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 622-630, 1995.
- BESSEY, O.; LOWRY, O.; BROOK, M. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-329, 1946.
- BLOMHOFF, R. et al. Health benefits of nuts: Potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. SUPPL. 2, p. 52–60, 2006.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521–533, 2003.
- CAMMAROTA, G. et al. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, 2015.
- CARTER, M. J.; LOBO, A. J.; TRAVIS, S. P. L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53 Suppl 5, n. suppl\_5, p. V1-16, 2004.
- CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 35–56, 2013.
- COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 459–465, 2014.
- COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785–1794, 2011.
- DAMASKOS, D.; KOLIOS, G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: Microflora “on the scope”. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 453–467, 2008.
- DAS, U. N. Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 4, p. 420–439, 2006.
- DAS, U. N. Inflammatory bowel disease as a disorder of an imbalance between pro- and anti-inflammatory molecules and deficiency of resolution bioactive lipids. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 11, 2016.
- DE SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: Current state of the art. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2016.
- DI STASI, L. C.; COSTA, C. A. R. A.; WITAICENIS, A. Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013-2014). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 25, n. 6, p. 629–642, 2015.
- FIOCCHI, C. Towards a “Cure” for IBD. **Digestive Diseases**, v. 30, n. 4, p. 428–433, 2012.

- FIOCCHI, C. Integrating omics: The future of IBD? **Digestive Diseases**, v. 32, n. suppl 1, p. 96–102, 2014.
- FRITSCHKE, K. L. Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 3–5, p. 173–175, 2008.
- GOYAL, N. et al. Animal models of inflammatory bowel disease: A review. **Inflammopharmacology**, 2014.
- HERNÁNDEZ-CHIRLAQUE, C. et al. Germ-free and antibiotic-treated mice are highly susceptible to epithelial injury in DSS colitis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 11, 2016.
- HU, Y. et al. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p. 1901–1911, 2016.
- HUGON, P. et al. Repertoire of human gut microbes. **Microbial Pathogenesis**, p.1-10, 2016
- HUI, K. Y. et al. Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 423, p. eaai7795, 2018.
- IANIRO, J. M. G.; HANSEN, I. M. R. Review article : the gut microbiome in inflammatory bowel disease — avenues for microbial management. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, May, p.26-42, 2017.
- IMHANN, F. et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. **Gut**, p. 1–12, 2016.
- KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative Stress and Antioxidants in Inflammatory Bowel Disease. **Disease-a-Month**, v. 52, n. 5, p. 199–207, 2006.
- KRAWISZ, J.E., *et al.* Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, Vol.87, pp.1344-1350, 1984
- LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 2, p. 543–556, 2011.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v.2, 1992.
- MARION-LETELLIER, R. et al. Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 3, p. 650–661, 2013.
- MICHALAK, A.; MOSIŃSKA, P.; FICHNA, J. Polyunsaturated fatty acids and their derivatives: Therapeutic value for inflammatory, functional gastrointestinal disorders, and colorectal cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. DEC, p. 1–16, 2016.
- NASIRI, S.; KUENZIG, M. E.; BENCHIMOL, E. I. Long-term outcomes of pediatric inflammatory bowel disease. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 26, n. 6, p. 398–404, 2017.
- NG, S. C. et al. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. **Gastroenterology**, v. 145, n. 1, p. 158–165, 2013.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313–1359, 2011.

- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 424–434, 2015.
- PARK, J. R.; PFEIL, S. A. Primary Care of the Patient with Inflammatory Bowel Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 5, p. 969–987, 2015.
- PATTERSON, E. et al. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.2012
- PAVLICK, K. P. et al. Serial Review: Reactive Oxygen and Nitrogen in Inflammation Guest Editor: Giuseppe Poli ROLE OF REACTIVE METABOLITES OF OXYGEN AND NITROGEN IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 311–322, 2002.
- RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: Spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 2, p. 238–253, 2008.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 2317–2326, 2004.
- SMITH, J. W.; CASTRO, A. Relation of peroxidase mucosa to inflammation activity in gut. **American Journal of Physiology**, v. 234, n. 7, p. R72-9, 1978.
- SORGI, C. A. et al. Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- SU, L. et al. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 551–563, 2009.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3, p. 145–155, 2003.
- TRAN, C. D.; KATSIKEROS, R.; ABIMOSLEH, S. M. Current and novel treatments for ulcerative colitis. **Ulcerative Colitis Genet. Complications**, p. 189–222, 2012.
- UNGARO, F. et al. Actors and factors in the resolution of intestinal inflammation: Lipid mediators as a new approach to therapy in inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, p. 1–13, 2017.
- VLIET, VAN DER, A.; BAST, A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 12, p. 499-513, 1992.
- XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427–434, 2007.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573–1580, 2009.