

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato
padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú)**

Luiz Domingues de Almeida Junior
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu
2013

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato
padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú)**

Luiz Domingues de Almeida Junior

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas – Área de
concentração Farmacologia,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

Botucatu
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Almeida Junior, Luiz Domingues.

Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú) / Luiz Domingues de Almeida Junior - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Intestinos – Doenças inflamatórias. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico.
3. Farmacologia.

Palavras-chave: Doença Inflamatória intestinal; Fitoesteróis; *Physalis angulata* L.

Dados Curriculares

Nome: Luiz Domingues de Almeida Junior

Data de Nascimento: 20/03/1988

Formação:

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de Marília – UNIMAR (2006-2010)

Atividades realizadas durante o Mestrado (2011-2012)

Matrícula nº: 121118-3

Disciplinas Cursadas

Disciplina	Ano	Carga horária	Frequência (%)	Conceito
Farmacologia Avançada	2011	75	100	A
Interação das vias metabólicas nos estados nutricionais	2011	60	100	A
Abordagem estatística em farmacologia I – Fundamentos	2011	15	100	A
Abordagem estatística em farmacologia II – Aplicabilidade	2011	30	100	A
Classificação de receptores farmacológicos	2011	45	100	B
Plantas medicinais: Abordagens de estudo interdisciplinares	2012	90	100	A
Tópicos de atualização em farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória	2012	30	100	A
Tópicos de atualização em Farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória	2012	30	100	A

Total de carga horária em disciplinas = 375

Total de carga horária em atividades complementares = 142,5

TOTAL GERAL = 517,5

Participação em Congressos e Eventos

- 2012 XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 18 a 21 de Setembro de 2012, Bento Gonçalves-RS.
- 2012 II Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 22 a 23 de Junho de 2012, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.

- 2012 VII Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu. 16 a 19 de Maio de 2012, na Faculdade de Medicina de Botucatu.
- 2012 XI Workshop da Pós-Graduação. 03 a 05 de Maio de 2012, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2011 II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB. 28 e 29 de Novembro de 2011, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2011 14º Encontro Nacional de Biomedicina – ENBM. 20 a 22 de Outubro de 2011, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2011 Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 03 a 04 de Junho de 2011, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.

Participação em minicursos

- 2012 Mini Curso: Métodos para avaliação farmacológica pré-clínica de plantas medicinais. (3 horas) 2012. (XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil).
- 2012 Mini Curso: Estresse Oxidativo. (7h 30min) 2012. (VII Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu).
- 2012 Mini Curso: Com a palavra o professor: A aula expositiva como instrumento de trabalho. (5 horas) 2012. (XI Workshop da Pós-Graduação).
- 2011 Mini Curso: Princípios em Microscopia Confocal. (1h 30min) 2011. (II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica).
- 2011 Mini Curso: Psicofarmacologia. (5h 30min) 2011. (14º Encontro Nacional de Biomedicina-ENBM)

Trabalhos apresentados em congresso

- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Avaliação dos efeitos preventivos de *Physalis angulata* L. e prednisolona no modelo experimental de doença inflamatória intestinal. *Apresentação:* Painel. *Autores:* ALMEIDA JUNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A. E. V.; WITAICENIS, A. W.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* II Simpósio de Farmacologia da Unesp – SIMFAR. *Período:* 22 e 23 de Junho de 2012. *Título:* Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú). *Apresentação:* Painel. *Autores:* ALMEIDA JUNIOR, L. D.; DI STASI, L. C.
- 2011 *Nome do Evento:* I Simpósio de Farmacologia da Unesp – SIMFAR. *Período:* 03 e 04 de Junho de 2011. *Título:* Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú). *Apresentação:* Painel. *Autores:* ALMEIDA JUNIOR, L. D.; DI STASI, L. C.

Co-autoria em trabalhos

- 2012 *Nome do Evento:* III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos. *Período:* 14 a 19 de Outubro de 2012. *Título:* O fim de uma panaceia: Efeito negativo da *Pfaffia paniculata* no modelo de colite induzida por TNBS. *Apresentação:* Painel. *Autores:* COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A. W.; QUAGLIO, A. E. V.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos. *Período:* 14 a 19 de Outubro de 2012. *Título:* O fim de uma panacéia: Efeito negativo da *Pfaffia glomerata* no modelo de colite induzida por TNBS. *Apresentação:* Painel. *Autores:* COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A. W.; QUAGLIO, A. E. V.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Avaliação dos efeitos do extrato de *Bidens pilosa* L. no modelo experimental de doença inflamatória intestinal. *Apresentação:* Painel. *Autores:* QUAGLIO, A. E. V.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* A comparative study of the effects of Esculetin, Esculin and 4-Methylesculetin in acute experimental model of inflammatory bowel disease. *Apresentação:* Painel. *Autores:* WITAICENIS, A. W.; CHAGAS, A. S.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A. E. V.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Effects of ethyl acetate of *Baccharis dracunculifolia* DC in TNBS-induced colitis in rats. *Apresentação:* Painel. *Autores:* CHAGAS, A. S.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; WITAICENIS, A. W.; TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; QUAGLIO, A. E. V.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* International Conference of Natural Products Research, 2012, Nova Iorque, NY – EUA. *Período:* Julho 2012. *Título:* Ethyl acetate extract of *Baccharis dracunculifolia* DC inhibits TNF- α production in TNBS-induced colitis in rats. *Apresentação:* Painel. *Autores:* CHAGAS, A. S.; WITAICENIS, A. W.; QUAGLIO, A. E. V.; **ALMEIDA JUNIOR, L. D.**; TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.

Colaboração em outros projetos de pesquisa

1. Caracterização da droga vegetal *Pfaffia paniculata* como adaptógena e anti-inflamatória intestinal.

2. Atividade anti-inflamatória intestinal da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.
3. Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatório intestinal de *Baccharis dracunculifolia* DC.
4. Impacto do estresse físico e psicogênico sobre a ingestão alimentar, ganho de peso e aparência geral da pele: modulação nutrigenômica, proteômica e metabolômica por extratos de plantas e alimentos funcionais.
5. Estudos de mecanismo de ação de *Bidens pilosa* L. e de seus efeitos sobre a atividade anti-inflamatória intestinal da sulfassalazina, prednisolona e azatioprina.
6. Avaliação dos mecanismos de ação anti-inflamatória intestinal de esculetina, 4-metilesculetina e esculina sobre novos marcadores moleculares.

Auxílio Financeiro:



C A P E S

(Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)



(Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo)

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário ver toda a escada. Apenas dê o primeiro passo!

Martin Luther King

DEDICATÓRIA



A Deus pelos dons, bênçãos e direção, que conduzem minha vida e minhas escolhas.

Ao meu pai Luiz e minha mãe Ivete que com muita luta e trabalho sempre me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir. Graças à persistência e amor de vocês cheguei até aqui.

A minha irmã Cheiane por todo carinho e apoio. Obrigado por me ajudar nos momentos difíceis e por todo o incentivo. Devo muito a você por ter chegado aqui.

A minha namorada Camila por toda ajuda, paciência, carinho, e por estar ao meu lado sempre me incentivando.

A todos os meus familiares, amigos e colegas que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS



A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro deste trabalho.

A Chemyunion Química LTDA por fornecer o extrato padronizado (Physavie®).

Aos funcionários da Seção de pós-graduação do Instituto de Biociências.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia – Instituto de Biociências.

A doutoranda Ana Elisa Valencise Quaglio por toda ajuda e apoio nas dosagens, interpretação dos resultados e escrita da dissertação.

A todos os amigos do Laboratório de Fitomedicamentos LAFIT-Botu, pelos ensinamentos, companheirismo e ajuda. Celso, Juliana Severi, Aline, Bira, Adriano, Leonardo, Alexandre Kita, Alexandre Chagas, Adriana, Laura, Juliana Ziraldo, Fabiana, Camila e Tainan.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desse trabalho.

Agradeço de forma especial o Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi que abriu as portas e me deu a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa para a realização deste trabalho. Por todo aprendizado, experiência e amizade, o meu muito obrigado. Espero sempre corresponder a essa confiança...

RESUMO



A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença com etiologia desconhecida e sem terapêutica curativa disponível, englobando, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), ambas caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados com remissão dos sintomas, cujo tratamento com os fármacos disponíveis apresentam sérios efeitos colaterais. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que combinem eficácia e segurança é uma importante meta na terapia da DII, sendo que as plantas medicinais são indispensáveis fontes de novos compostos de valor terapêutico. *Physalis angulata* L. é uma planta nativa brasileira que cresce especialmente nas regiões norte e nordeste do Brasil e em outros países tropicais da África, América e Ásia, sendo amplamente utilizada pela população para o tratamento de uma série de doenças, especialmente aquelas que possuem características inflamatórias. Estudos *in vitro* em culturas de células realizados por nosso grupo de pesquisa, somados aos dados descritos na literatura mostram que a *P. angulata* é capaz de modular vários mediadores inflamatórios. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado em fitoesteróis totais de *P. angulata*, nas fases aguda e crônica (com recidiva) do processo inflamatório intestinal induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Os resultados obtidos mostraram, pela primeira vez, que o extrato padronizado produziu uma série de efeitos que melhoraram a resposta dos animais frente à lesão intestinal promovida pelo TNBS. Estes efeitos foram mais pronunciados nos estudos de fase aguda, indicando uma propriedade preventiva importante por meio da redução da atividade da mieloperoxidase e fosfatase alcalina, acompanhado da capacidade do extrato em impedir a depleção de glutatona causada pelo processo inflamatório intestinal. Os efeitos benéficos foram evidenciados com as doses de 50 e 100 mg/Kg, o que representa 13,32 e 26,65 mg/Kg de fitoesteróis totais. Em adição, o tratamento prolongado dos animais no modelo curativo promoveu uma melhora da resposta inflamatória apenas na primeira semana após o tratamento. Por fim, pode-se concluir que o extrato padronizado de *P. angulata* possui atividade anti-inflamatória no modelo de inflamação intestinal, sendo que esta atividade biológica provavelmente está relacionada com a presença dos fitoesteróis totais do extrato.

ABSTRACT



Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a disease with unknown etiology and no curative treatment available, embracing essentially two distinct diseases: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both characterized by chronic inflammation of the intestine, with periods of exacerbation followed by long intervals with symptom remission, whose treatment with available drugs have serious side effects. Therefore, the development of new treatment strategies that combine effectiveness and safety is an important goal in the treatment of IBD, where medicinal plants are sources of essential novel compounds of therapeutic value. *Physalis angulata* L. is a native Brazilian plant that grows especially in Northern and Northeastern Brazil and other tropical countries of Africa, America and Asia and is widely used by people to treat a number of diseases, especially those with inflammatory characteristics. *In vitro* studies in cell cultures conducted by our research group, combined with the previously reported data, show that *P. angulata* is capable of modulating several inflammatory mediators. Thus, the objective of this study was to evaluate the intestinal anti-inflammatory activity of *P. angulata* standardized extract in total phytosterols, in the acute and chronic (with relapse) phases of the intestinal inflammatory process induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats. The results showed, for the first time, that the standardized extract produced a series of effects that improved the response of animals against intestinal injury promoted by TNBS. These effects were more pronounced in the acute studies, indicating an important preventive property by reducing the activity of myeloperoxidase and alkaline phosphatase, in addition with the ability of the extract to prevent depletion of glutathione induced by intestinal inflammation. The beneficial effects were seen at doses of 50 and 100 mg/kg, representing 13.32 and 26.65 mg/Kg of total phytosterols. Interestingly, prolonged treatment of animals in the chronic model promoted an improvement of the inflammatory response only at the first week after treatment. Finally, it can be concluded that the standardized extract of *P. angulata* has anti-inflammatory activity in the model of intestinal inflammation, and that this biological activity probably is related to the presence of total phytosterols extract.

Lista de Figuras

- Figura 1** Desenho experimental. B (grupo branco; ratos não colíticos); C (grupo controle; ratos colíticos); CR (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que receberam uma segunda administração de TNBS); T (grupo tratado; ratos colíticos tratados com *P. angulata*)xix
- 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 / número de animais..... 25
- Figura 3** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final – Peso inicial) ± E.P.M..... 26
- Figura 4** Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 28
- Figura 5** Avaliação dos níveis de Glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 29
- Figura 6** Avaliação da atividade da Fosfatase Alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ 29
- Figura 7** Avaliação do consumo médio de ração dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica, na primeira, segunda e terceira semanas após a administração do TNBS. Dados expressos em média de consumo por animal, em gramas. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14° dia indução da recidiva (jejum), nos animais mortos na terceira semana (21° dia). 31
- Figura 8** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica com recidiva induzida por TNBS. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14° dia indução da recidiva, nos animais mortos na terceira semana (21° dia). Dados expressos em delta peso média (Peso final-peso inicial) ± E.P.M..... 32
- Figura 9** Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semana de tratamento. Dados expressos em média ± E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo controle. 36
- Figura 10** Avaliação dos níveis de Glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de retocolite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média ± E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo controle. 37

Figura 11 Avaliação da atividade da Fosfatase Alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparados ao grupo controle. 38

Lista de Tabelas

Tabela 1 Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon.....	21
Tabela 2 Parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato padronizado de <i>Physalis angulata</i> (25, 50, 100, 200 e 400mg/Kg) e Prednisolona (2 mg/Kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.....	27
Tabela 3 Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato de <i>Physalis angulata</i> (50mg/Kg e 100mg/Kg), e Prednisolona (2mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância de uma via
CARD15	Caspase Recruitment Domain Containing Protein 15
CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
COX	Cicloxygenase
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
CSR	Controle sem Recidiva
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DSS	Dextram Sulfato de Sódio
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
EPM	Erro padrão médio
FA	Fosfatase alcalina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFNγ	Interferon – gama
IL-12	Interleucina – 12
IL-17	Interleucina – 17
IL-1β	Interleucina – 1 beta
IL-2	Interleucina – 2
IL-23	Interleucina – 23
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeos
MMP	Matriz Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2
p/v	Peso / Volume
PGE₂	Prostaglandina E ₂
RCU	Retocolite ulcerative
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCA	Ácido tricloro acético

Th	T-helper
TNBS	Ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO



INTRODUÇÃO	1
1 Doença Inflamatória Intestinal	2
2 Etiologia	4
2.1 Microbiota intestinal	4
2.2 Dieta	5
2.3 Estresse	5
2.4 Medicamentos	6
2.5 Fatores Genéticos	7
3 Epidemiologia	7
4 Modelos experimentais na Doença inflamatória intestinal	8
5 Principais Fármacos utilizados na Doença Inflamatória intestinal	9
5.1 Glicocorticoides	9
5.2 Aminosalicilatos	10
5.3 Imunossupressores	11
6 <i>Physalis angulata</i> L.	12
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
1 Fármacos e Produto Vegetal	17
2 Animais	17
3 Modelo de colite induzida por TNBS em ratos	18
3.1 Modelo Agudo	18
3.2 Modelo Crônico	19
4 Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal <i>in vivo</i>	20
4.1 Análise Macroscópica da lesão	20
4.2 Determinações bioquímicas	21
4.2.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	21
4.2.2 Determinação do conteúdo de Glutathione total	22
4.2.3 Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina	23
5 Análise estatística	23
RESULTADOS	24
1 Avaliação do processo inflamatório intestinal agudo	25
1.1 Parâmetros macroscópicos	25
1.2 Parâmetros Bioquímicos	28
2 Avaliação do processo inflamatório intestinal crônico	30
2.1 Parâmetros macroscópicos	30
2.2 Parâmetros Bioquímicos	35
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	57

INTRODUÇÃO



1 Doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) inclui, fundamentalmente, a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), ambas são doenças inflamatórias crônicas, que acometem o trato gastrointestinal (Pithadia; Jain, 2011), com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcadas pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia, constipação e perda de peso (Singh et al., 2003).

A Retocolite Ulcerativa (RCU) é uma inflamação restrita ao cólon, e pode ser denominada em alguns pacientes de acordo com sua localização e extensão em proctite (parte inferior do cólon e reto), colite distal (cólon sigmoide, com ou sem envolvimento do cólon descendente) ou pancolite (envolvimento de todo o cólon). É caracterizada pela ocorrência de diarreia com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e rigidez da parede intestinal (Baumgart; Sandborn, 2007). A inflamação restringe-se a camada mucosa colônica, ocorre infiltração de linfócitos e granulócitos, além da presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos (Collins; Croitoru, 2005).

A doença de Crohn consiste em uma lesão transmural da mucosa gastrointestinal, podendo afetar toda a extensão (boca-anus), e apresenta-se de forma descontínua, além de promover complicações como estenoses, abscessos ou fístulas. Caracteriza-se também pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose. Pode ocorrer, dependendo do local, dor abdominal intensa, diarreia, febre, estreitamento do lúmen intestinal (estenoses), desenvolvimento de fístulas e até mesmo sinais de obstrução intestinal (Bouma; Strober, 2003; Collins; Croitoru, 2005; Baumgart; Sandborn, 2007).

No trato gastrointestinal humano, principalmente no cólon e íleo distal, locais onde se localizam as lesões da DII, existem aproximadamente 10^7 - 10^8 e 10^{11} - 10^{12} microrganismos por grama de conteúdo luminal, respectivamente (Eckburg; Relman, 2007). Esses microrganismos contribuem com o trato gastrointestinal degradando carboidratos para serem absorvidos ou, em casos atípicos, afetam negativamente o hospedeiro causando inflamação (Gersemann; Wehkamp; Stange, 2012).

A função de barreira do trato gastrointestinal é realizada pela espessa camada de muco contendo produtos antimicrobianos, a camada de células epiteliais e uma camada subjacente composta por um conjunto de células (células mesenquimais, células dendríticas, linfócitos e

macrófagos) (Gersemann; Wehkamp; Stange, 2012). A barreira superior representa um mecanismo externo de proteção, por meio da camada de muco, que é sintetizado pelas células caliciformes e apresentam vários peptídeos em seu meio, conhecido como defensinas que contribui para a imunidade colônica. A atividade antimicrobiana das defensinas é expressa pela formação de microporos na membrana do agente invasor causando perda de integridade, impedindo a entrada de microorganismos. As células epiteliais intestinais (IECs) regulam a permeabilidade intestinal, através das junções epiteliais, por limitar o acesso dos microorganismos ao hospedeiro e mediar o tráfico antigênico do lúmen para a lâmina própria, onde os antígenos são processados e eliminados (Roda et al., 2010). A capacidade de combater esses microorganismos luminais é reduzida na DII, devido à perda da função de barreira. Estudos mostram que as α - e β -defensinas estão diminuídas no íleo de pacientes com Crohn (Gersemann; Wehkamp; Stange, 2012). Pacientes com DII apresentam anticorpos contra um grande número de microorganismos e antígenos luminais, mostrando que a interação com esses microorganismos é relevante na patogênese da DII (Giaffer, 1992).

Por meio de uma resposta imune exagerada e inapropriada da mucosa à microbiota intestinal normal, a qual é facilitada por alterações na barreira epitelial intestinal e mediada principalmente por células T da mucosa, se desencadeia uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e inúmeras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, TNF- α e IFN (Tang et al., 2012; Muzes et al., 2012). A destruição celular e necrose, por sua vez, ocorrem devido à secreção de mieloperoxidase e distintas proteases, especialmente das metaloproteinases, que influenciam na função de migração de células inflamatórias, ulceração da mucosa, bem como na deposição de matriz extracelular, além da geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio, os quais contribuem no quadro inflamatório intestinal (Miller; Grisham, 1995; Kubes; Wallace, 1995; Medina; Radomski, 2006).

A doença inflamatória intestinal é considerada um grande problema da população moderna, pois afeta ainda a qualidade de vida das pessoas em seus aspectos sociais, psicológicos e profissionais (Carter; Lobo; Travis, 2004).

2 Etiologia

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia não é totalmente conhecida e um único agente ou mecanismo isolado não parecem ser suficientes para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais (estresse, fatores dietários, uso de fármacos anticoncepcionais e anti-inflamatórios não esteroidais, dentre outros), em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células de origem imune e não imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal, de modo que sua etiologia é considerada multifatorial (Su et al., 2009).

2.1 Microbiota intestinal

Os microrganismos presentes no intestino desempenham um papel chave na regulação do sistema imune, por isso são considerados muito importantes no desenvolvimento da DII (Andersen et al., 2012). O trato gastrointestinal de mamíferos é colonizado por um grande número de microrganismos, e esta microbiota é responsável por manter a homeostase e função intestinal (Nell; Suerbaum; Josehans, 2010). Estudos experimentais mostraram que animais mantidos em condições livre de patógenos não desenvolvem DII, mostrando a importância da microbiota intestinal na patogênese da doença (Danese; Fiocchi, 2006). Microrganismos como, por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae*, e outros estão sendo estudados como possíveis agentes desencadeantes da DII (Danese; Sans; Fiocchi, 2004). A colonização com bactéria comensal *E. coli* paralelamente com outras enterobactérias patogênicas ocorre apenas quando a carga de bactérias locais esta diminuída, com isso a competição contra essas bactérias patogênicas é menor (Stecher et al., 2010). Isto sugere que o potencial patogênico da *E. coli* e das bactérias comensais possivelmente não depende apenas de fatores de susceptibilidade do hospedeiro, ou de uma espécie específica, mas possivelmente devido à microbiota (Petersen et al., 2009).

Por outro lado, bactérias benéficas, como por exemplo, a *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *Bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus salivarius* spp. e *S. thermophilus* podem normalizar a função fisiológica e a integridade da barreira intestinal, além de aumentar a integridade das *tight*

junctions entre as células epiteliais (Madsen et al., 2001). O balanço entre as bactérias patogênicas e comensais do intestino é um fator significativo na patogênese da DII.

2.2 Dieta

Componentes da dieta podem afetar diretamente a homeostase intestinal por interferir no estresse oxidativo, tendo relação com a expressão de fatores de transcrição envolvidos na inflamação intestinal (Kruidener; Vespaget, 1998). Outro aspecto é que a dieta pode ainda influenciar a microbiota intestinal, levando a um desequilíbrio entre os microrganismos maléficos e benéficos, contribuindo com o desenvolvimento do processo inflamatório (Neish, 2009; Doré; Corthier, 2010).

Existem muitos alimentos relacionados ao desenvolvimento da DII, como o leite de vaca (Yamamoto; Nakahigashi; Saniabadi, 2009), alto consumo de carboidratos (Martini; Brandes, 1976), álcool e café (Boyko et al., 1989). Estudo realizado por Andersen e colaboradores (2011), mostra que uma dieta rica em proteínas, principalmente proteína animal, esta associada a uma maior propensão para desenvolver DII, enquanto que o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos de cadeia curta como ômega 3, podem prevenir a doença, assim como uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras (Targan; Shanahan, 1994). Apesar de a dieta ser um importante fator para o desenvolvimento da DII, ela ainda esta vinculada a outros fatores como, alterações genéticas e imunes, fazendo com que esse parâmetro seja difícil de ser elucidado.

2.3 Estresse

O estresse pode ser definido como qualquer fator que ameace a homeostase de um organismo, e envolve adaptações fisiológicas e comportamentais (Chrousos; Gold, 1992). Estudos de Mawdsley e Ramptom (2005) indicam que o estresse crônico estaria relacionado com a recidiva da DII.

Acredita-se que os efeitos do estresse sobre a inflamação intestinal são mediados através de alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), por meio da estimulação e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF), com aumento do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e conseqüente incremento dos níveis de cortisol, além de alterações na microbiota e ativação de mastócitos na mucosa. O cortisol, liberado pela

glândula adrenal, influencia no processo inflamatório principalmente por estimular a liberação de citocinas (Mawdsley; Ramptom, 2005). Um estudo de Mawdsley e colaboradores (2006) mostrou que o estresse aumenta a liberação de citocinas, a contagem de leucócitos, plaquetas, células natural *killer* e produção de metabólitos reativos de oxigênio, bem como reduziu o fluxo sanguíneo da mucosa retal em pacientes com colite ulcerativa. Além disso, o estresse pode aumentar a permeabilidade intestinal permitindo que as bactérias atravessem a barreira epitelial e ativem a resposta imune da mucosa (Kiliaan et al., 1998).

Os estudos que exploram a relação do eixo cérebro-intestino tem proporcionado uma visão mais clara para entender a importância do estresse na DII em humanos. Trabalhos recentes mostram que a depressão e o estresse podem desempenham um papel tanto no desencadeamento da DII bem como na exacerbação dos sintomas (Bonaz; Bernstein, 2013).

2.4 Medicamentos

Já se sabe que o uso dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), pode gerar danos à mucosa do trato gastrointestinal, resultando em ulcerações gástricas e duodenais, podendo ocorrer perfuração e sangramento (Feagins; Cryer, 2010). Estudos revelam que a inibição da ciclooxigenase (COX) pela ação dos AINEs resulta na incapacidade de manter a integridade da mucosa, pela diminuição na síntese de prostaglandinas e conseqüentemente da capacidade de defesa (Feagins; Cryer, 2010). Além da COX, a via da lipoxigenase gera leucotrienos e lipoxina (Eberhart; Duboi, 1995). Esses leucotrienos são pró-inflamatórios, e tem sido encontrado em pacientes com DII, estando correlacionados com a atividade inflamatória. A hipótese é que o tratamento com AINEs, por inibir COX 1 e 2, desvia o metabolismo do ácido araquidônico por meio da via da lipoxigenase, conduzindo a formação de Leucotrieno B4 que é um importante agente pró-inflamatório, agravando a inflamação intestinal. (Hawkey et al., 1997).

Os contraceptivos orais são outra classe de medicamentos extensamente estudada por predispor o desenvolvimento da doença. Estudos realizados por Cornish e colaboradores (2008), mostram que uma das hipóteses é que os contraceptivos orais geram infartos microvasculares, pois alteram o potencial trombogênico.

2.5 Fatores genéticos

Recentes estudos epidemiológicos examinaram os aspectos genéticos em diferentes grupos familiares e étnicos. A doença inflamatória intestinal que ocorre nas famílias e entre irmãos está associada a um fenótipo de risco aumentado de desenvolver a doença (Montgomery et al., 2002; apud Ishihara et al., 2009).

Um gene muito estudado é o gene NOD2/CARD15 correlacionado à predisposição a DC. NOD2 é uma proteína citosólica que reconhece componentes da parede bacteriana e desencadeia a ativação da cascata do NF- κ B (Henckaerts; Vermeire, 2007). A diminuição na ativação do NF- κ B, devido à mutação do gene NOD2 pode resultar no desbalanço da homeostase, gerando um desequilíbrio na quantidade das bactérias patogênicas intestinais, influenciando a produção de outras citocinas pro-inflamatórias, que pode culminar com o desenvolvimento da DC (Ishihara et al., 2009). Muitos outros genes estão relacionados à patogênese da DII, mas não existem evidências conclusivas sobre seus papéis.

Entender as consequências das influências genéticas no desenvolvimento da DII é importante, pois, a utilização de marcadores genéticos, a fim de prever o curso da doença, possíveis complicações e a resposta ao tratamento em indivíduos afetados contribui para o desenvolvimento de novas terapias de tratamento (Telakis, 2007).

3 Epidemiologia

A Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn são consideradas doenças da sociedade moderna e sua frequência em países desenvolvidos tem aumentado desde meados do século XX, já que fatores ambientais como dieta e estresse estão associados ao estilo de vida moderno e urbanizado (Danese; Fiocchi, 2011; Crohn et al., 2000). A maior incidência e prevalência da DII são vistas em populações da América do Norte e Europa e menor no continente asiático (Ahuja; Tandon, 2010). A prevalência mundial está em 37-246 casos de retocolite ulcerativa e 26-199 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes, variando de acordo com a região demográfica, sexo ou etnia (Loftus, 2004). Nos Estados Unidos estima-se que 1.4 milhões de pessoas apresentem a doença (Abraham; Cho, 2009).

Em ambas as doenças foi observado um predomínio de casos em pessoas de cor branca, casadas, com idade entre 20 e 50 anos, não tabagistas e residentes na zona-urbana (Souza et al., 2002; Loftus, 2004; Victoria; Sasaki; Nunes, 2009). Segundo levantamento

realizado por Schoffen e Prado (2011), no Brasil a maior incidência dos casos de DC esta em indivíduos brancos e pardos do que em amarelos e negros. Victoria, Sasaki e Nunes (2009) constataram no hospital da Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu/SP que a maioria dos pacientes atendidos eram brancos e moravam em centros urbanos, sendo 65% dos atendimentos para RCU e aproximadamente 25% para DC, ocorrendo cerca de 14,81 casos para retocolite ulcerativa e 5,65 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes. Outros estudos também mostram um aumento do número de casos no interior de Minas Gerais e em Ribeirão Preto-SP (Gaburri et al., 1998; Souza et al., 2002).

Existem outros aspectos importantes associados a estas doenças, um deles se baseia no alto custo envolvido no tratamento. Dados recentemente publicados mostram que o custo médio anual/paciente para o tratamento da Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa nos Estados Unidos é respectivamente de US\$ 8.265 e US\$ 5.066 perfazendo um total aproximado de US\$ 137 milhões/ano (Kappelman et al., 2008). Um segundo aspecto, é a característica incapacitante destas doenças, que restringem os pacientes no desenvolvimento de suas atividades diárias, gerando um alto impacto sobre sua qualidade de vida e nas atividades econômicas relacionadas (Peyrin-Biroulet et al., 2010). Terceiro a Retocolite Ulcerativa e a Doença de Crohn, são indiscutivelmente o principal fator de risco para o aparecimento de câncer colo-retal, sendo 19 vezes maior quando comparado com a população em geral (Onken, 2008). Além disso, o tratamento atualmente disponível para estas doenças ainda não é o adequado devido ao aparecimento de inúmeros e sérios efeitos colaterais e adversos, assim como uma baixa resposta e tolerância dos pacientes aos diferentes tratamentos disponíveis (Scribano, 2008). Todos estes aspectos ressaltam, por um lado, a necessidade de busca de novas alternativas de tratamento e, por outro, a importância da realização de estudos tendo-se em vista o maior entendimento da fisiopatologia da DII e a pesquisa de novos alvos farmacológicos com consequente ampliação das possibilidades de estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

4 Modelos experimentais na doença inflamatória intestinal

Os modelos murinos tradicionais desenvolvidos para o estudo da DII usam indução química, transferência de células imunes, ou manipulação genética. Modelos da DC, quimicamente induzidos incluem o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), dextran sulfato de sódio (DSS) e oxalazone. Estes modelos são particularmente úteis no estudo das vias

bioquímicas do processo inflamatório e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Pizarro et al., 2003). Eles não representam a complexidade da doença no ser humano e não substituem os estudos clínicos, porém são de grande importância para entender o aspecto da doença, como as fases iniciais da inflamação e os efeitos de novas estratégias terapêuticas (Wirtz; Neurath, 2000).

O TNBS atua como um hapteno, e ao se associar com proteínas teciduais é capaz de desencadear uma resposta imunológica, levando a uma inflamação caracterizada pela presença de células T e macrófagos (Strober; Ludvíksson; Fuss, 1998). Mieloperoxidase e fosfatase alcalina apresentam atividade aumentada nesse modelo (Sánchez de Medina, 2004; Sánchez-Fidalgo et al., 2007), além de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 e IL-17 (Zhang et al., 2006; Sánchez-Fidalgo et al., 2007; Muzes et al., 2012). O modelo experimental pelo TNBS é um importante representante da inflamação intestinal, que permite o estudo dos eventos iniciais da inflamação e a análise da resposta imune da mucosa (Strober; Fuss; Blumberg, 2002), possibilitando a avaliação de novos compostos, úteis tanto para o tratamento da DC como da RCU.

5 Principais fármacos utilizados na doença inflamatória intestinal

Os tratamentos atuais para DII tem o objetivo de induzir ou manter o paciente em remissão e atenuar os efeitos secundários da doença. Dentre os fármacos utilizados destacam-se os aminossalicilatos, os glicocorticoides, os imunossupressores e a terapia biológica (Yamamoto-Furusho, 2007; Morrison; Headon; Gibson 2009; Pithadia; Jain, 2011) A terapêutica disponível não representa a cura da DII e o uso dos fármacos disponíveis estão associados a vários problemas, tais como graves efeitos colaterais, como é o caso dos glicocorticoides, alto custo, como o infliximab e baixa resposta dos pacientes aos diferentes tratamentos.

5.1 Glicocorticoides

A hidrocortisona e a prednisolona são os glicocorticoides base para o tratamento da DII, sendo que a prednisolona é a mais utilizada, comumente por via oral (Pithadia; Jain, 2011). O mecanismo geral de ação desses fármacos consiste da ativação de receptores intracelulares que controlam a expressão gênica. A interação com o receptor promove

formação de dímeros que ao chegar ao núcleo, ligam-se ao DNA, modificando a transcrição genica (Marx, 1995). Com isso os glicocorticoides modificam a resposta celular inflamatória, afetando assim a expressão de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, cininas, moléculas de adesão, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2) (Rogler, 2010). Segundo estudo realizado por Sandle e colaboradores (1986) o tratamento com glicocorticoides promove uma maior absorção de sódio e água no cólon, o que contribui para diminuição da diarreia.

Aproximadamente 40% dos pacientes respondem a terapia com glicocorticoides, 30 a 40% respondem parcialmente e cerca de 15 a 20% dos indivíduos não respondem. O tratamento não é efetivo para remissão da RCU e da DC, logo o uso contínuo dos glicocorticoides tem sido limitado por seus efeitos secundários e cumulativos (Pithadia; Jain, 2011).

5.2 Aminosalicilatos

Os aminossalicilatos (derivados do ácido 5-aminossalicílico, ou 5-ASA), são pró-fármacos geralmente utilizados em combinação com os glicocorticoides para induzirem a remissão da DII nos casos graves e são a primeira linha de tratamento para os quadros leve e moderado de RCU, onde o protótipo dessa classe é a Sulfassalazina, constituída pelo grupo 5-ASA ligado a sulfapiridina por uma ligação azo. (Pithadia; Jain, 2011).

Após a administração por via oral, a ligação azo deste fármaco é quebrada por bactérias azo-redutases no cólon, liberando sulfapiridina e o ativo 5-aminossalicilato. A sulfapiridina é absorvida sistemicamente e é a principal responsável pela toxicidade e efeitos colaterais apresentados pelo fármaco. Os derivados do 5-ASA liberados são compostos anti-inflamatórios que agem inibindo as vias da ciclooxigenase e da 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, resultando em redução nos níveis de prostaglandinas e leucotrieno B₄, que é um potente agente quimiotático de neutrófilos e de mediadores inflamatórios (Jani et al., 2002; Whittle; Varga, 2010).

Sulfassalazina é administrada por via oral com uma dose usual de 4 g/dia, e tem sido efetiva em pacientes com colite, onde 60 a 80% dos pacientes respondem ao tratamento (Prantera et al., 1999). Segundo Pithadia e Jain, (2011) os aminossalicilatos de nova geração como Mezalazina, Osalazina e Balsalazina apresentam menores efeitos colaterais pela ausência da sulfapiridina, podendo se utilizar doses maiores, melhorando o controle da doença.

5.3 Imunossuppressores

Os agentes imunossuppressores podem ser uma terapia adjuvante valiosa em casos graves de DII. Embora apresentem efeitos colaterais significativos, são mais toleráveis e seguros, quando comparados à terapia de longo prazo com os glicocorticoides (Pithadia; Jain, 2011). Azatioprina e mercaptopurina têm sido utilizadas no tratamento da DII, em cerca de 50 a 70% de pacientes com DC perianal intratável (Aberra et al., 2003). Observa-se um efeito benéfico na faixa de 50 a 100 mg/dia com mercaptopurina e 75 a 150 mg/dia com azatioprina, onde uma leucopenia leve sugere que a droga é efetiva e, portanto, mais susceptíveis de beneficiar o paciente. Estes fármacos mantêm efetivamente a remissão tanto da RCU quanto da CD, eles também podem impedir/atrasar a recidiva de CD após cirurgia. A decisão de iniciar a terapia imunossupressora depende de uma avaliação precisa do risco/benefício (Pithadia; Jain, 2011).

Recentemente, novos procedimentos terapêuticos têm sido propostos e usados isoladamente ou em combinação com outros fármacos, principalmente de compostos com atividade antioxidante e/ou imunomoduladora e produtos com ação prebiótica ou probiótica capazes de melhorar a resposta das células colônicas ao processo inflamatório que se instala. De fato, há ainda a necessidade de estudos para a obtenção de novas estratégias terapêuticas que maximizam a eficácia dos fármacos e minimizam sua toxicidade (Scribano, 2008), dentre os quais se destacam produtos de origem vegetal com diferentes propriedades farmacológicas, especialmente antioxidantes.

Diversos produtos naturais têm sido estudados em diferentes modelos de inflamação intestinal e apresentado resultados significativos. Grupos de compostos secundários distribuídos por todo o reino vegetal são conhecidos por possuírem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias em culturas de células e modelos experimentais. Os principais componentes naturais ativos na DII são compostos fenólicos como flavonoides, especialmente quercetina, quercetrina, silimarina, hesperidina e rutina (Sánchez de Medina et al., 1996; Crespo et al., 1999; Cruz et al., 2001; Sánchez de Medina et al., 2002), vitamina E (González et al., 2001), cumarina e derivados cumarínicos como a 4-hidroxycumarina, esculetin e 4-metilesculetina (Luchini et al., 2008; Witaicenis et al., 2010; Witaicenis et al., 2012), além dos compostos lipídicos como os ácidos graxos de cadeia curta (Hur et al., 2012). Estudos têm mostrado que

os polifenóis curcumina e rutina têm propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tanto *in vitro* quanto em modelos animais de colite (Nones et al., 2009). Segundo Liu e Wang (2012), glicosídeos iridoides inibiram a atividade de MPO, em um modelo de colite induzida por TNBS.

Diferentes prebióticos e probióticos tem sido avaliados como produtos com ação protetora do processo inflamatório intestinal induzido por diferentes agentes, especialmente a lactulosa (Camuesco et al., 2005), polidextrose (Witaicenis et al., 2010), assim como extratos padronizados incorporados na dieta, tais como *Plantago ovata* (Fernández-Bañares et al., 1999) e farinha de *Typha angustifolia* L (Fruet et al., 2012) e *Musa* spp AAA (Scarminio et al., 2012) que promovem entre outras ações uma melhora do estresse oxidativo intestinal. Com o interesse de buscar novos ativos com valor para o tratamento desta doença, a espécie *Physalis angulata* foi selecionada para o presente estudo, uma vez que já se sabe a potencialidade dessa espécie em modular o quadro inflamatório.

6 *Physalis angulata* L.

P. angulata é uma planta nativa brasileira que cresce como erva daninha, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e em outros países tropicais da África, América e Ásia. Esta planta é amplamente utilizada pela população para o tratamento de uma série de doenças, especialmente como anti-inflamatória. Inúmeros compostos têm sido isolados de *P. angulata*, (Pietro et al., 2000; Soares et al., 2003), para os quais inúmeras atividades biológicas têm sido descritas, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, antitumoral, hipotensora e imunomoduladora (Simas, 2005). Na Amazônia, *P. angulata* é utilizada como sedativo, depurativo, antirreumático e para o alívio da dor de ouvido (Bastos et al., 2008). No oeste da África, *P. angulata* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento do câncer (Lawal et al., 2010).

A espécie de *P. angulata* apresenta uma variável e extensa composição química, e grande parte desses componentes já foram isolados e caracterizados quimicamente, incluindo alcaloides (Basey; McGaw; Woolley, 1992); flavonoides simples e glicosilados; ácidos graxos; carotenoides (Ismail; Alam, 2001); terpenoides (Barbi; Xavier; Tomassini, 1999; Shim et al., 2002); e esteróis (Shingu et al., 1991; Chiang et al., 1992; Shingu et al., 1992; Shingu et al., 1992-2; Januário et al., 2002). Segundo Jin e colaboradores (2012) diversos

compostos isolados de *P. angulata*, como as fisalinas, withangulatinas, fisangulinas, fisanolidas, entre outros, apresentaram atividade biológica significativa.

Estudos *in vitro* em culturas de queratinócitos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o extrato hidrometanólico liofilizado das partes aéreas de *P. angulata* foi capaz de reduzir os níveis de histamina, PGE₂, IL-6, IL-1 α e aumentar os níveis da IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Checon, 2011).

O extrato metanólico (80%) das flores de *P. angulata* administrado em camundongos por via oral a 200mg/kg foi capaz de inibir as inflamações aguda e subaguda além de inibir a reação alérgica do tipo IV (Choi; Hwang, 2003). Frações provenientes do extrato da planta inteira promoveram atividade imunomoduladora *in vitro* através do aumento da proliferação das células B na concentração de 10 a 40 μ g/50 μ l (Lin et al., 1992).

Experimentos *in vivo* demonstraram que a withangulatina-A é capaz de inibir a síntese de proteínas e estimular outras de baixo peso molecular, além de alterar a fosforilação de proteínas, sendo que estas evidências indicam a citotoxicidade da withangulatina-A em glicosarcomas de ratos. Além disso, a withangulatina-A apresenta atividade antitumoral *in vitro*, através da inibição da topoisomerase-II, o que acarreta em clivagem do DNA nestas células (Juang et al., 1989; Lee et al., 1991). Ismail e Alam (2001) atribuíram a atividade antitumoral ao flavonoide miricetina 3-O-neoesperidosideo isolado das folhas de *P. angulata*. Segundo estudo realizado por Hseu e colaboradores (2011), *P. angulata* é um potencial agente anti-metastático e anti-angiogênico para o tratamento de inflamação e câncer.

Segundo Soares e colaboradores (2006) a administração de fitoesteróis de *P. angulata* (fisalinas B, F e G) podem ser úteis no tratamento de patologias autoimunes e alérgicas e na prevenção da rejeição de transplantes, devido aos seus efeitos imunomoduladores. Segundo Wu e colaboradores (2012), fisalina F induz apoptose em células de carcinoma renal humano pela modulação de NF- κ B. Fisalina H diminuiu os níveis de IL-2 e IFN γ *in vitro*, modulando a resposta celular Th1, além de ter importante atividade imunomoduladora *in vivo* e *in vitro* (Yu et al., 2010). Resultados encontrados por Pinto e colaboradores (2010), mostram evidências de ações anti-proliferativas e anti-inflamatórias da fisalina E.

Com base nos resultados observados por nosso grupo de pesquisa e nos dados apresentados na literatura, à espécie *P. angulata* apresentou-se como potencial para ser testada no modelo experimental de DII.

OBJETIVOS



Avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado *P. angulata* nas fases aguda e crônica (com recidiva) do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS



1 Fármacos e Produto Vegetal

Os produtos testados foram:

- Prednisolona (Sigma Aldrich®);
- Extrato supercrítico padronizado em fitoesteróis totais de partes aéreas de *Physalis angulata* L. obtida de cultivo orgânico próprio certificado pela Ecocert Brasil (Anexo 1) e comercialmente denominado Physavie®, fornecido pela Empresa Chemyunion Química Ltda.

P. angulata foi submetida à extração em CO₂ supercrítico e o extrato obtido foi padronizado em 26.65% de fitoesteróis totais por análises espectroscópicas, como ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN¹H, RMN¹³C) e espectrometria de massa (anexo 2).

Por ser uma espécie de ampla ocorrência na Amazônia, foi estabelecido o cultivo desta espécie em área da Empresa Chemyunion Química Ltda, participante do presente projeto, visando o rastreamento de todo o processo de obtenção dos extratos padronizados por extração em fluido supercrítico, com apoio recente da FAPESP (Projeto PIPE-FAPESP 06/51824-0).

2 Animais

Ratos machos albinos da linhagem Wistar de 180 a 220 g de peso, oriundos da ANILAB Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA - Paulínia, São Paulo foram usados para os testes de atividade anti-inflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, durante pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos de estante ventilada com temperatura ambiente controlada de 21 ± 2°C, um ciclo de claro-escuro de 12 horas e filtração de ar de entrada e saída. Os ratos foram separados em grupos de no máximo 7 animais, alojados em caixas, 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 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (n°42/04 – CEEA).

3 Modelo de colite induzida por TNBS em ratos

3.1 Modelo Agudo

Os experimentos foram realizados de acordo com o método descrito por Morris e colaboradores (1989), com pequenas modificações. A indução do processo inflamatório intestinal por TNBS em suas fases aguda e crônica com recidiva obedece ao mesmo procedimento. Antes da indução, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas e, posteriormente, anestesiados com éter etílico. O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) foi preparado a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v), utilizando-se 0,25 ml de uma solução de 10 mg de TNBS em etanol a 50% (v/v). O TNBS foi administrado via retal (intracolônica) com a ajuda de um cateter de teflon (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia, quando foram devolvidos às caixas de manutenção. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de salina em substituição ao TNBS. Na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

- A. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento
- B. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento
- C. Grupos com os compostos-testes:
 - C1. Animais tratados com *Physalis angulata* 25mg/Kg
 - C2. Animais tratados com *Physalis angulata* 50mg/Kg
 - C3. Animais tratados com *Physalis angulata* 100mg/Kg
 - C4. Animais tratados com *Physalis angulata* 200mg/Kg
 - C5. Animais tratados com *Physalis angulata* 400mg/Kg
- D. Grupo com o fármaco:
 - D1. Animais tratados com prednisolona 2mg/Kg

Os tratamentos com fármacos (Prednisolona 2mg/Kg) ou o extrato de *P. angulata* na dose de 25, 50, 100, 200 ou 400mg/Kg, foram realizados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite, e como padrão de comparação foi utilizado o grupo controle (com colite e sem tratamento farmacológico) e o grupo branco

(sem colite e sem tratamento farmacológico). Os animais dos grupos controle receberam por via oral uma solução de tween 80(8%) em metilcelulose (1%) que foi utilizada na dissolução dos produtos testes. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite.

3.2 Modelo Crônico

Na fase crônica os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

- A. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento
- B. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento
- C. Grupo controle sem recidiva: animais com colite e sem recidiva do processo inflamatório
- D. Grupos com os compostos-testes:
 - D1. Animais tratados com *Physalis angulata* 50mg/Kg
 - D2. Animais tratados com *Physalis angulata* 100mg/Kg
- E. Grupo com o fármaco:
 - E1. Animais tratados com prednisolona 2mg/Kg

Nos estudos de fase crônica com recidiva se utilizou o fármaco de referência na mesma dose descritas anteriormente, além das doses mais ativas no experimento agudo do extrato vegetal, 50 ou 100 mg/Kg. Os compostos foram estudados de acordo com o protocolo experimental crônico de colite com recidiva conforme descrito por Di Stasi e colaboradores (2004). Neste protocolo, os animais foram submetidos ao processo de indução da colite no primeiro dia de experimento e tratados diariamente (via oral) com os diferentes produtos e veículos durante o período de 21 dias. A recidiva do processo inflamatório intestinal foi induzida com uma segunda administração de TNBS que ocorreu 14 dias após a primeira. Os grupos de cada tratamento, controle e branco foram mortos 7, 14 e 21 dias após a primeira indução da colite, e um grupo adicional sem indução de recidiva, foi morto 21 dias após a indução inicial de colite.

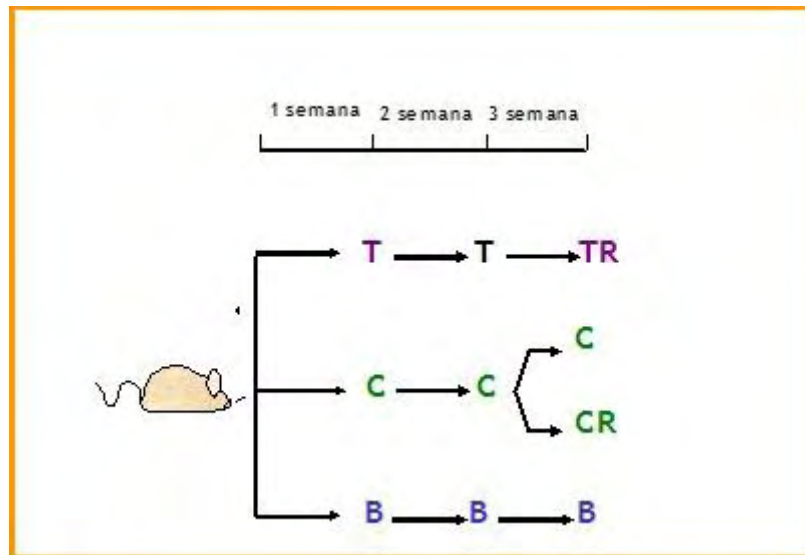


Figura 1 Desenho experimental. B (grupo branco; ratos não colíticos); C (grupo controle; ratos colíticos); CR (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que receberam uma segunda administração de TNBS); T (grupo tratado; ratos colíticos tratados com *P. angulata*).

4 Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal *in vivo*

4.1 Análise macroscópica da lesão

Durante o desenvolvimento dos distintos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarreicas. Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

Na análise macroscópica foram avaliados peso e 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 e colaboradores (1995).

Tabela 1 Critérios de avaliação da severidade e da extensão de lesões no cólon

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 Determinações bioquímicas

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em cinco fragmentos longitudinais, três deles foram congelados a -30°C para determinação de proteínas e atividade da fosfatase alcalina, avaliação da atividade da mieloperoxidase e determinação dos níveis de glutathione total. Este último fragmento foi pesado e congelado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson, 1985). Os fragmentos restantes foram armazenados a -80°C para as análises moleculares.

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de cólon, sendo que a homogeneização foi realizada a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflon e um recipiente de vidro de 10 ml de capacidade. Nas análises bioquímicas foram avaliados os seguintes parâmetros:

4.2.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz e colaboradores (1984). A atividade da mieloperoxidase é um marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular. A determinação foi realizada em fragmentos de cólon (150-300 mg), os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras e com 1ml de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), durante 15 segundos. O tampão HTAB, ao funcionar como um detergente facilita a liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos intracelulares dos neutrófilos, nos quais está armazenada. Em

seguida o material picado foi transferido para um tubo de vidro, adicionando-se o restante de tampão, de modo a se obter uma proporção 1:20 (p/v), homogeneizando-se durante 45 segundos a frio, usando um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflon. O homogeneizado resultante foi dividido em duas alíquotas de 1,0ml, armazenadas em *ependorff*. O material foi sonicado por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento durante 1-2 dias. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 7000G por 5 minutos a 4°C. Em uma placa de 96 canais, foi adicionado 100µl do sobrenadante de cada amostra em pocilhos distintos, 150µl do tampão de reação (cloridrato de orto-dianisidina). Em seguida, se determinou o incremento de absorbância a 450nm usando um espectrofotômetro. A atividade da enzima mieloperoxidase foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com MPO procedente de neutrófilos humanos. Uma unidade de mieloperoxidase (U) foi considerada como aquela que degrada 1µmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos em U/g de tecido.

4.2.2 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 está baseado na oxidação total do glutathiona reduzido (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorbância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona total, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador automático, provido com pistilo de teflon. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 2000G por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante se utilizou 20µl que foi colocado em uma placa de 96 canais, onde se adicionou 140µl de NADPH, 5µl de PBS e 20µl DTNB. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por

5 minutos em uma temperatura de 30°C. Após este período adicionou-se 15µl de glutathione redutase e registrou-se o incremento de absorbância a 412nm no espectrofotômetro. A concentração de glutathione foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com glutathione (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

4.2.3 Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foram realizadas pelos métodos clássicos descritos por Smith e colaboradores (1984) e Bessey e colaboradores (1946). A realização é feita através da determinação de proteínas por espectrofotometria a 562 nm, pela reação de ácido bicinchonínico e sulfato de cobre que formam 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 MgCl₂ que adquire coloração amarelada após incubação a 37 °C por 25 minutos, sendo detectada a 405 nm. O cálculo da fosfatase alcalina é baseada na quantidade de proteínas totais e expressa em mU/mg de proteína.

5 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± 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 foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Dados descontínuos foram analisados pelo teste Fisher. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS



1 Avaliação do processo inflamatório intestinal agudo

1.1 Parâmetros macroscópicos

A administração intracolônica do TNBS resulta em inflamação no epitélio intestinal, que pode ser evidenciada após 48 horas com uma necrose na camada mucosa que se estende ao longo do cólon, variando de 1,5 – 3,9 cm. Também ocorre espessamento e hiperemia na parede intestinal, ocasionando um aumento na relação peso/comprimento quando em comparação ao grupo não colítico (Tabela 2). Além disso, nos animais controle ocorre uma diminuição do consumo de ração e de ganho de peso (Figuras 2 e 3), apesar de não ser significativa. Um fato interessante é que o grupo tratado com extrato de *P. angulata* 100 mg/Kg não diminuiu seu consumo mesmo após a indução do processo inflamatório quando comparado ao grupo controle, ($p < 0,05$ diferença estatística em relação ao grupo controle, não demonstrada no gráfico) (Figura 2).

O processo inflamatório promove uma diminuição do peso corpóreo, que está relacionada com a diminuição do consumo alimentar, consequência da dor abdominal e da diarreia durante a fase ativa da doença (Figura 3).

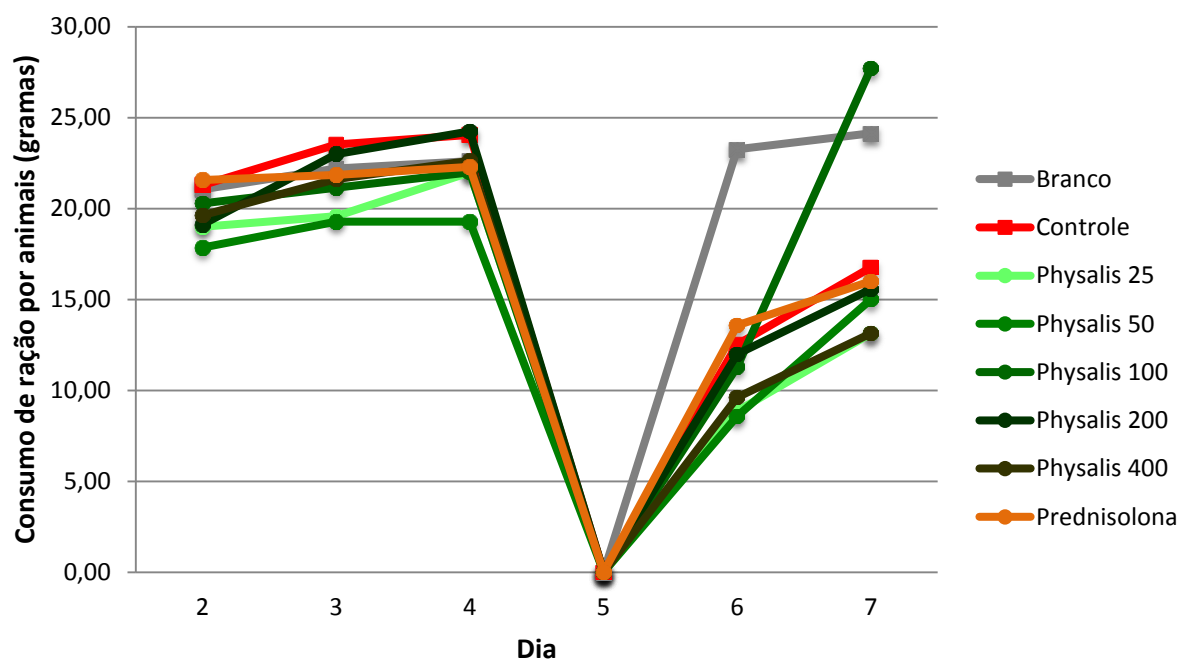


Figura 2 Avaliação do consumo de ração, por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/número de animais.

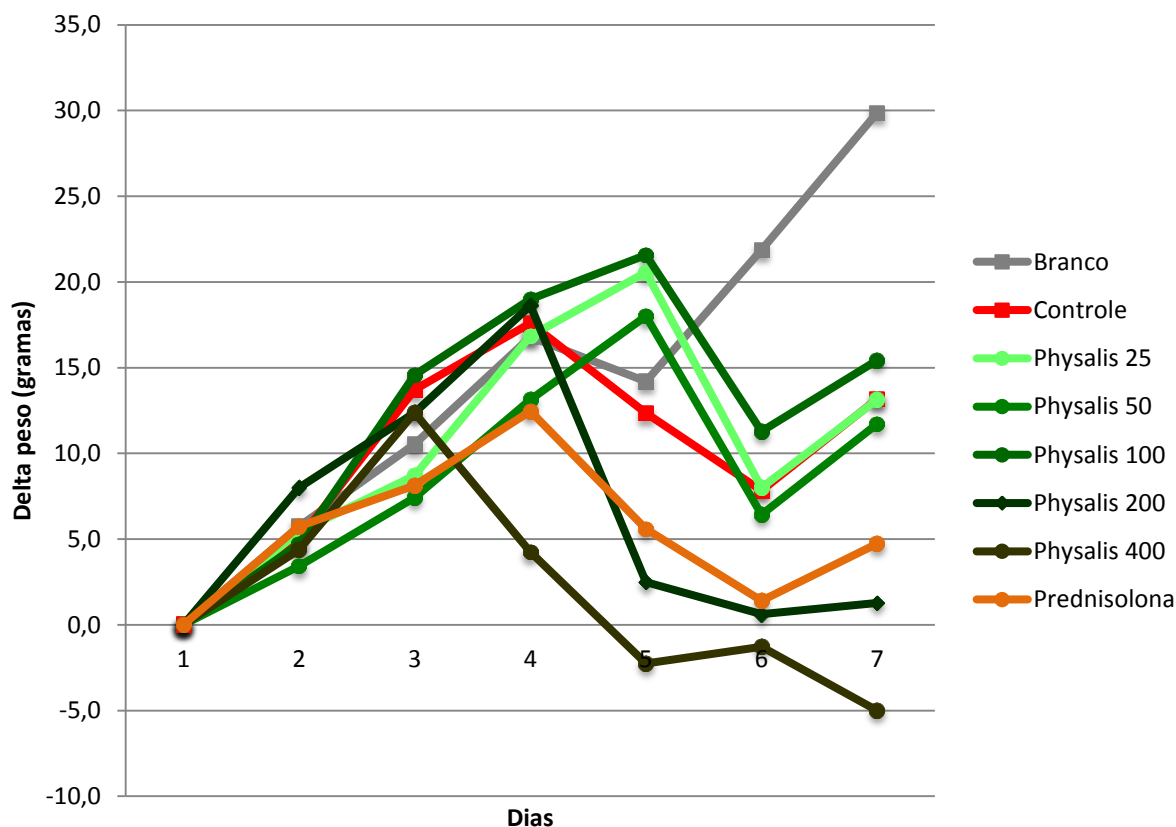


Figura 3 Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final – Peso inicial) \pm E.P.M.

Após a administração do TNBS nota-se uma diminuição na absorção caracterizada pela presença de diarreia, o que foi observado em 80% dos animais. Nenhum dos produtos testados foi capaz de alterar esse parâmetro. Além disso, cerca de 80% dos animais apresentaram aderência do colón a órgãos adjacentes. Isso caracteriza a instalação do processo inflamatório colônico, que também é evidenciado por um aumento da relação peso comprimento conforme observado, quando se compara o grupo branco e controle. Como se pode notar na tabela 2, o tratamento com a dose de 50mg/kg do extrato de *P.angulata* ou com 2mg/kg da prednisolona foi capaz de diminuir a extensão da lesão, além de diminuir a relação peso/comprimento.

Tabela 2 Parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato padronizado de *Physalis angulata* (25, 50, 100, 200 e 400mg/Kg) e prednisolona (2mg/Kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Score (0-10)	Extensão da lesão (cm)	Relação Peso/comprimento (mg/cm)	Diarreia %	Aderência %
Branco (Sadio)	0***	0***	84 ± 2.59***	0***	0***
Controle (TNBS)	8 (4-10)	3.25 ± 0.31	140 ± 3.42	87.5	81,25
<i>P. angulata</i> 25mg/Kg	7 (5-8)	2.44 ± 0.18	135 ± 6.86	100	71.42
<i>P. angulata</i> 50mg/Kg	6.5 (2-8)	2.12 ± 0.34**	124 ± 7.72*	85.71	71.42
<i>P. angulata</i> 100mg/Kg	7 (4-9)	2.93 ± 0.20	162 ± 5.04	100	57.14
<i>P. angulata</i> 200mg/Kg	9 (7-10)	3.46 ± 0.26	155 ± 5.41	87.5	100
<i>P. angulata</i> 400mg/Kg	9 (7-10)	3.70 ± 0.20	161 ± 7.35	85.71	85.71
Prednisolona 2mg/Kg	6 (0-9)	1.56 ± 0.58**	124 ± 12.4*	42.85	42.85

Os valores de score estão expressos em mediana (intervalo); extensão da lesão e relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M.; diarreia e aderência foram analisados pelo teste Fisher, * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001 comparados ao grupo controle.

1.2 Parâmetros bioquímicos

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de cólon, onde bioquimicamente, os mediadores inflamatórios estão em intensa atividade após a administração de TNBS. Nos animais controles foi observado um aumento de 13 vezes na atividade da MPO (Figura 4) e aproximadamente 4 vezes na atividade da fosfatase alcalina (Figura 6), quando comparados aos animais não colíticos (branco). Estes resultados são acompanhados por uma significativa redução no conteúdo de glutathiona colônica (Figura 5).

A figura 4 mostra que o pré-tratamento com o extrato de *P. angulata* foi capaz de diminuir de forma significativa a atividade da mieloperoxidase nas doses de 50 e 100mg/Kg de forma semelhante à prednisolona (fármaco referência), quando comparados ao grupo controle. Além de reduzir a atividade de mieloperoxidase, *P. angulata* também reduziu os níveis de fosfatase alcalina na dose de 50mg/kg, resultado também observado pelo tratamento com o fármaco referencia (Prednisolona) na dose de 2mg/Kg.

Somente nas doses maiores (200 e 400mg/Kg) o extrato de *P. angulata* foi capaz de evitar a depleção dos níveis de glutathiona total de forma significativa, quando comparados ao controle. Prednisolona também evitou a depleção dos níveis de glutathiona de forma significativa comparado ao grupo controle, como visto na figura 5.

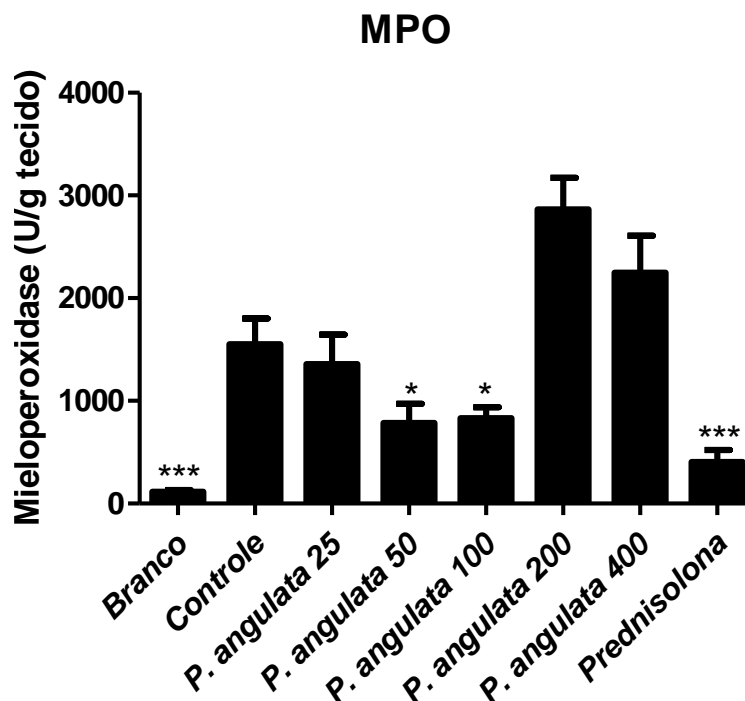


Figura 4 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. Valores * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

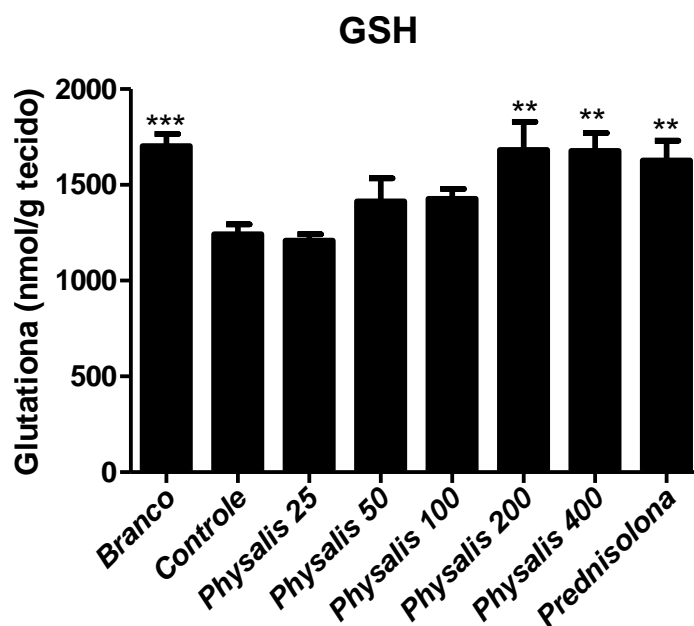


Figura 5 Avaliação dos níveis de glutathione colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. Valores ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

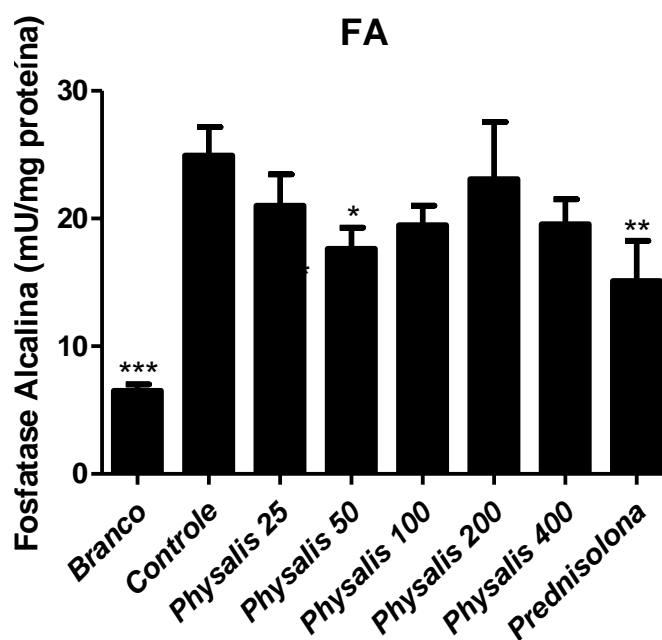


Figura 6 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. Valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2 Avaliação do processo inflamatório intestinal crônico

2.1 Parâmetros macroscópicos

O experimento crônico foi dividido em 3 semanas. Como pode se notar na figura 7, há uma tendência na redução no consumo de ração pelos animais do grupo controle quando comparado aos animais do grupo branco (não-colítico), principalmente após a primeira semana da administração do TNBS, sendo que essa diferença diminuiu ao longo da segunda e terceira semanas. O tratamento com *P. angulata* na dose de 50mg/Kg promoveu um maior consumo em relação ao grupo controle, na primeira semana após a indução do processo inflamatório. O consumo foi restabelecido após a indução da recidiva, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados.

Os animais do grupo controle tiveram um ganho de peso menor do que os animais do grupo branco (não-colítico) na primeira, segunda e terceira semana de tratamento, mas isto não foi estatisticamente significativo. Os animais tratados com *P. angulata* 50mg/Kg tiveram um ganho de peso superior aos animais tratados com o fármaco de referência na primeira semana, o que pode ser observado na figura 8.

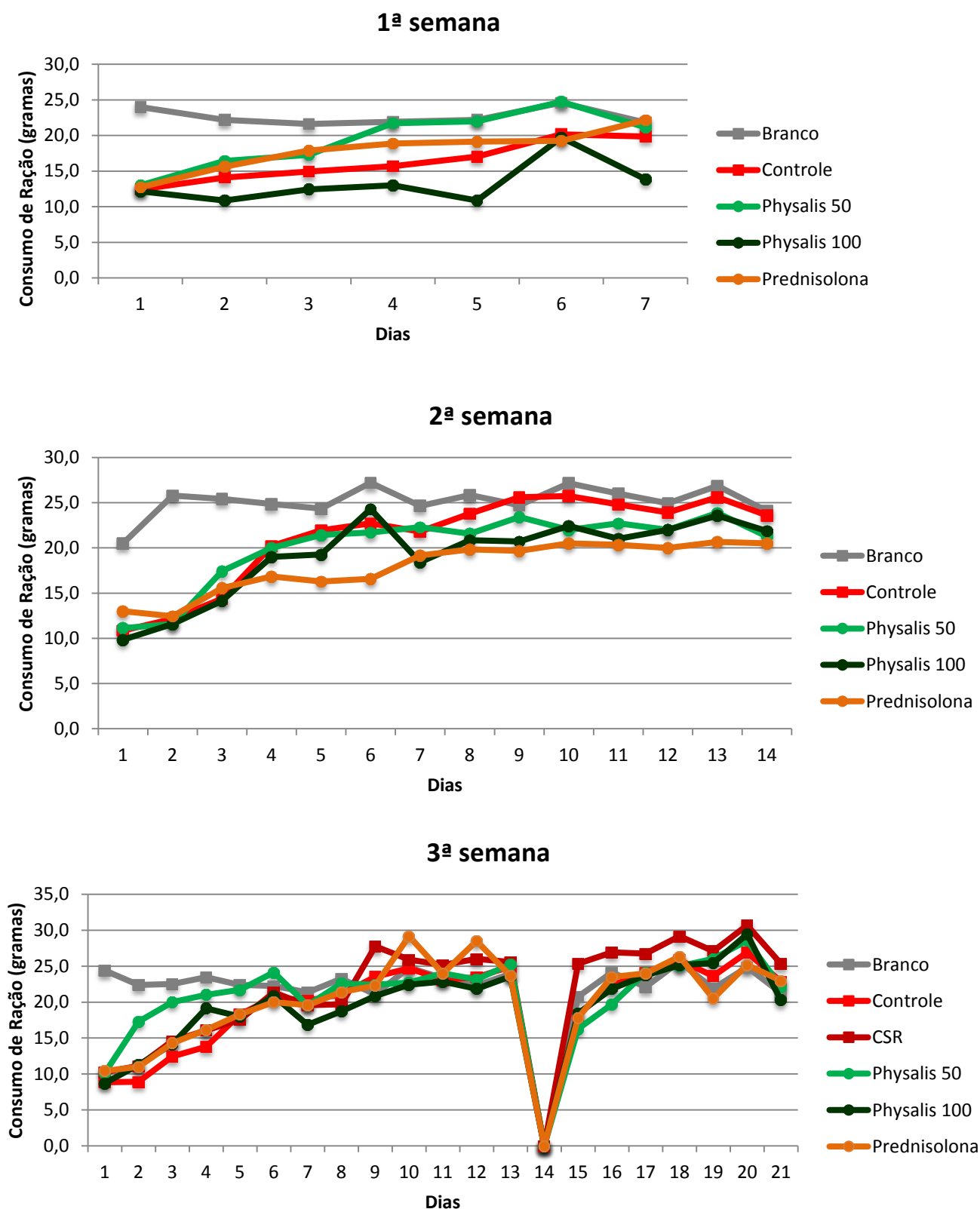


Figura 7 Avaliação do consumo médio de ração dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica, na primeira, segunda e terceira semanas após a administração do TNBS. Dados expressos em média de consumo por animal, em gramas. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva (jejum), nos animais mortos na terceira semana (21º dia).

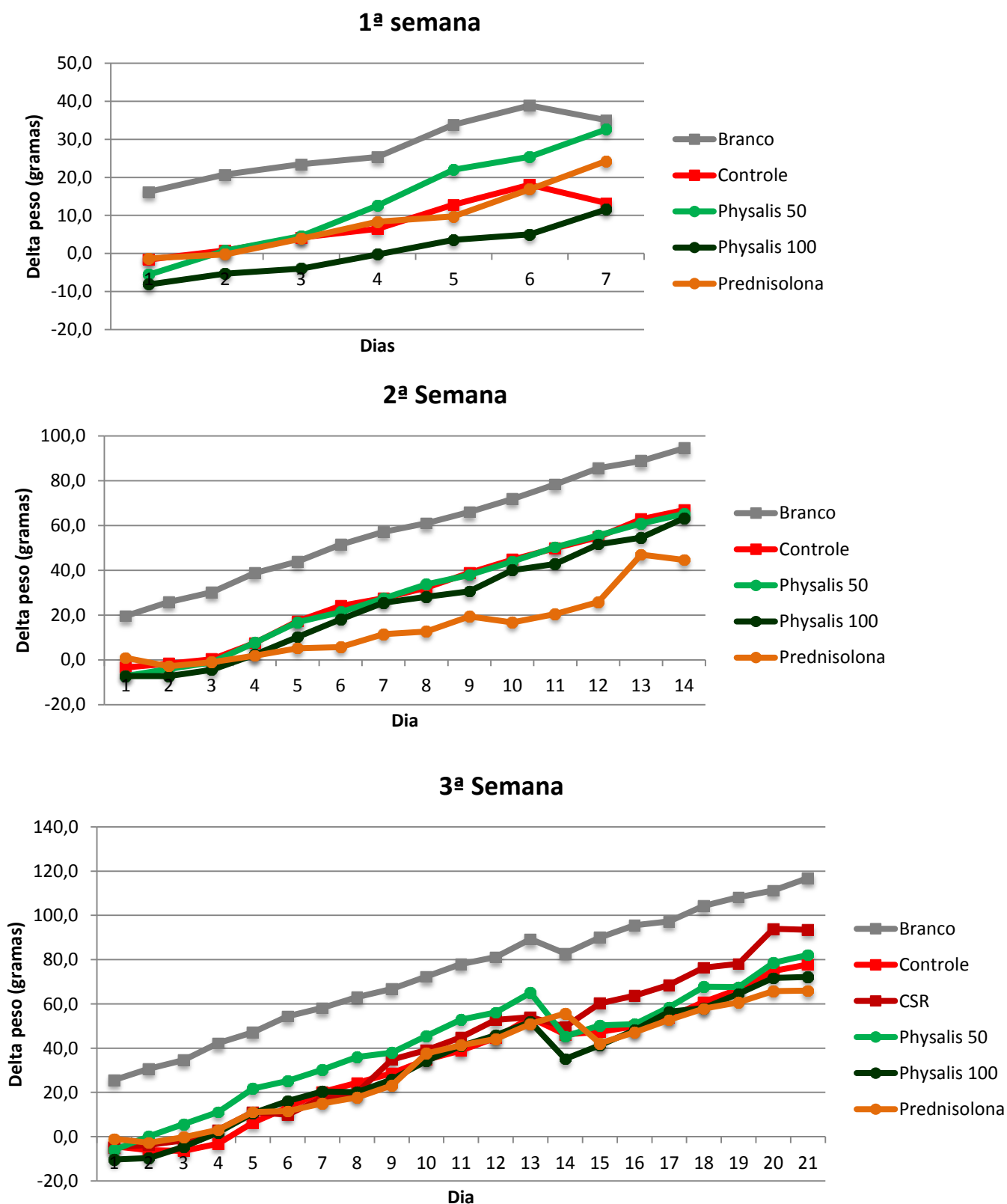


Figura 8 Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica com recidiva induzida por TNBS. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva, nos animais mortos na terceira semana (21º dia). Dados expressos em delta peso média (Peso final-peso inicial) \pm E.P.M.

Assim como no modelo experimental de fase aguda, o modelo crônico se caracteriza pela inflamação no epitélio colônico com a presença de necrose na camada mucosa. Esta lesão é máxima 48 horas após a administração do TNBS e diminui gradativamente ao longo do experimento. As características macroscópicas do modelo crônico evidenciam com o passar dos dias que a inflamação tende a desaparecer, recuperando assim o tecido, exceto aos animais que recebem a recidiva do processo inflamatório. Na segunda semana após a administração do TNBS, o colón está em processo de cicatrização, e a relação peso comprimento é menor do que os resultados observados na primeira semana (Tabela 3). Outra característica que evidencia esse processo de recuperação são os valores de escore, que na segunda semana estão menores em relação à primeira, assim como o controle sem recidiva também apresenta um escore menor na terceira semana (Tabela 3). Foi possível observar que os animais tratados com *P. angulata* na dose de 50mg/Kg apresentaram uma extensão da lesão menor em relação ao grupo controle na segunda semana de tratamento bem como a incidência de diarreia foi menor significativamente em relação às 3 semanas comparado ao grupo controle (Tabela 3). As doses de 50 e 100mg/Kg do extrato de *P. angulata* também apresentou uma menor incidência de aderência na segunda semana de tratamento, quando comparados ao grupo controle (Tabela). Em relação aos outros parâmetros avaliados não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle.

Tabela 3 Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato de *Physalis angulata* (50mg/Kg e 100mg/Kg), e prednisolona (2mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Período	Grupos	Escore (0-10)	Extensão (cm)	Relação (mg/cm)	Diarreia (%)	Aderência (%)
7 dias	Branco	0*	0***	87.1 ± 2.70	0***	0***
	Controle TNBS	7 (5-9)	2.35 ± 0.21	180 ± 18.3	88.2	47
	<i>P. angulata</i> 50 mg/Kg	7 (6-9)	2.33 ± 0.23	176 ± 14.3	0***	85.7
	<i>P. angulata</i> 100 mg/Kg	7 (0-9)	2.26 ± 0.43	189 ± 41.9	57.1	85.7
	Prednisolona 2 mg/Kg	7 (0-7)	1.51 ± 0.27*	151 ± 13.9	100	71.42
14 dias	Branco	0**	0***	91.6 ± 1.43***	0***	0***
	Controle TNBS	5 (4-7)	1.58 ± 0.14	131 ± 3.78	53.3	73.3
	<i>P. angulata</i> 50 mg/Kg	4 (2-6)	0.98 ± 0.22*	137 ± 13.1	0*	14.3*
	<i>P. angulata</i> 100 mg/Kg	5 (1-5)	1.40 ± 0.27	134 ± 7.83	0*	14.3*
	Prednisolona 2 mg/Kg	4 (3-6)	1.08 ± 0.22	121 ± 16.3	100	40
21 dias	Branco	0***	0***	85.6 ± 3.77***	0***	0***
	Controle TNBS	6 (4-7)	2.03 ± 0.31	140 ± 8.11	53.8	76.9
	Controle sem recidiva	4 (3-6)	0.74 ± 0.17**	117 ± 3.44	46.1	46.1
	<i>P. angulata</i> 50 mg/Kg	6 (4-7)	2.56 ± 0.47	138 ± 5.44	0*	28.6
	<i>P. angulata</i> 100 mg/Kg	5 (4-7)	1.87 ± 0.41	139 ± 14.6	28.5	57.1
Prednisolona 2 mg/Kg	6 (5-7)	1.70 ± 0.56	137 ± 8.54	71.4	57.1	

Escore são expressos em mediana (intervalo); extensão da lesão e relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M. e diarreia e aderência foram analisados pelo teste exato de Fisher * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

2.2 Parâmetros bioquímicos

Bioquimicamente, nos animais do grupo controle, os mediadores inflamatórios estão em maior atividade na primeira semana do processo inflamatório, dados que podem ser observados pela atividade da MPO e FA que são máximas após 7 dias da administração do TNBS e diminuem com o tempo, quando comparados aos animais não colícticos (Figuras 9 e 11). Estes resultados foram acompanhados de uma significativa redução no conteúdo de glutathiona colônica durante a primeira e a segunda semana de experimentação, retornando a níveis normais na terceira semana (Figura 10).

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, na primeira semana após a administração do TNBS, o tratamento com *P. angulata* evitou a depleção dos níveis de glutathiona na dose de 100mg/Kg (Figura 10), em relação ao grupo controle e reduziu a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) nas doses de 50 e 100mg/Kg (Figura 9) sem interferir na atividade da fosfatase alcalina (FA) (Figura 11). Efeitos mais discretos foram observados após o tratamento com a prednisolona que apenas diminuiu a atividade de mieloperoxidase na primeira semana.

Nas segunda e terceira semanas após a administração do TNBS, nenhum dos tratamentos inibiu a atividade da fosfatase alcalina e mieloperoxidase, bem como não evitou a depleção dos níveis de glutathiona.

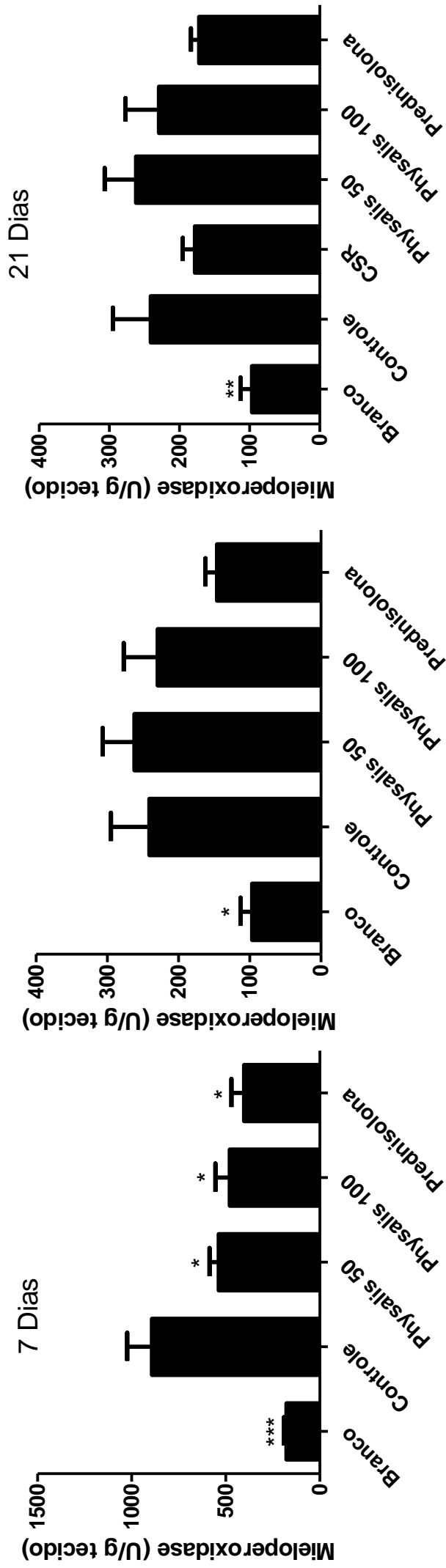


Figura 9 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semana de tratamento. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo controle.

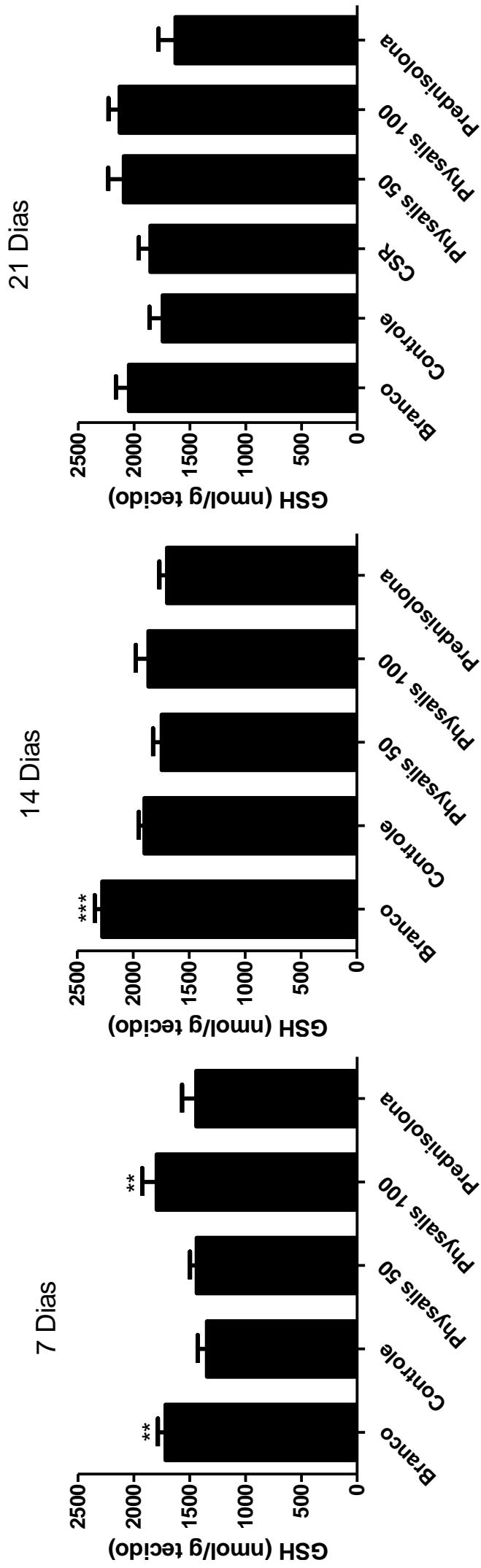


Figura 10 Avaliação dos níveis de glutatona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de retocolite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo controle.

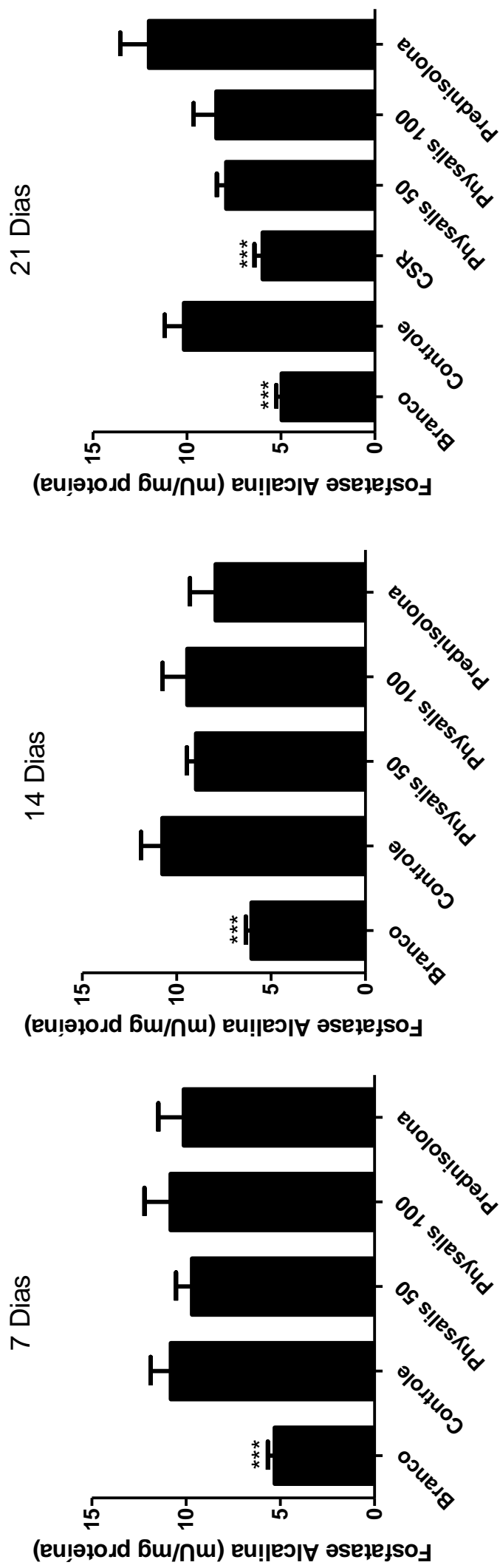


Figura 11 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparados ao grupo controle.

DISCUSSÃO



Os dados obtidos no presente estudo mostram, pela primeira vez, que o extrato padronizado em fitoesteróis obtido a partir das partes aéreas de *P. angulata*, produziu uma série de resultados que melhoram a resposta dos animais frente à lesão intestinal induzida pelo TNBS, indicando a potencialidade desta espécie vegetal como fonte de compostos com atividade anti-inflamatória. Estes efeitos foram mais pronunciados nos estudos de fase aguda, os quais foram demonstrados pela redução da atividade da mieloperoxidase e fosfatase alcalina, acompanhado da capacidade do extrato em impedir a depleção de glutathiona causada pelo processo inflamatório intestinal, sendo que o perfil anti-inflamatório foi evidenciado com as doses de 50 e 100mg/Kg, as quais apresentam em sua constituição 13,32 e 26,65mg/Kg de fitoesteróis totais.

Nos estudos de fase crônica, o tratamento com o extrato vegetal restituiu os níveis de glutathiona após a primeira semana, assim como reduziu da atividade da mieloperoxidase também na primeira semana. Curiosamente, o tratamento prolongado dos animais com o extrato vegetal não caracterizou em uma melhora após o processo inflamatório já estar instalado.

O processo inflamatório colônico está associado a um aumento da relação peso/comprimento do cólon, além da ocorrência de diarreia, aderência, redução no consumo de alimento e consequente redução no peso corpóreo. A relação peso/comprimento do cólon é um parâmetro difícil de ser revertido. Ela indica a severidade e extensão da lesão inflamatória, e está aumentado nos animais que recebem o TNBS (Rachmilewitz et al., 1989; Veljaca et al., 1995). O tratamento com a dose de 50mg/Kg diminuiu a relação peso/comprimento no modelo agudo, indicando uma melhora do processo inflamatório. Outra avaliação importante é a diarreia, que indica uma perda da capacidade absorptiva do cólon (Sánchez de Medina, et al., 2002). O tratamento com 50mg/Kg do extrato de *P. angulata* diminuiu a diarreia em todas as semanas do experimento. Essa redução de diarreia pode estar relacionada a um aumento na absorção de sódio e água, como descrito por Sandle, Hayslett e Brinder (1986). Além da diarreia foi observada ausência de aderência a órgãos adjacentes na segunda semana de tratamento.

Devido ao processo inflamatório, grande parte dos animais apresentaram uma diminuição no ganho de peso após a administração do TNBS, fato também descrito por Morris e colaboradores (1989) e está relacionado com a redução no consumo alimentar por consequência da dor abdominal (Campos et al., 2002). Os tratamentos na dose de 100mg/Kg no modelo agudo e 50mg/kg no modelo crônico mantiveram consumo alimentar após a

administração do TNBS, indicando que esses animais apresentaram condições melhores devido ao tratamento com o extrato de *P. angulata*.

Somado as características macroscópicas do processo inflamatório, as alterações bioquímicas que ocorrem após a administração do TNBS são extremamente expressivas na inflamação intestinal. A mieloperoxidase (MPO) desempenha um papel central na inflamação e no estresse oxidativo, e exerce seus efeitos deletérios por meio de várias vias no processo inflamatório. Como descrito no estudo de Karakas e Koenig (2012), o ácido hipocloroso, uma espécie reativa gerada por MPO, é um indutor potente de desacoplamento da sintase endotelial, transformando a óxido nítrico sintase (NOS) em uma enzima produtora de superóxido. Uma das características cruciais da MPO e do seu produto final, o ácido hipocloroso, é a sua capacidade para ativar as metaloproteinases de matriz (MMPs) e desativar seus inibidores (TIMPs), que promovem o enfraquecimento da camada fibrosa que leva a desestruturação tecidual (Karakas; Koenig, 2012).

Os neutrófilos são responsáveis pela lesão tecidual em doenças inflamatórias, por produzirem ácido hipocloroso e radicais livres que aumentam o estresse oxidativo local e que causam danos a proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, além de outras estruturas biológicas, e estão intimamente associados ao aumento da resposta inflamatória (Dhiman et al., 2009). A mieloperoxidase é encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e caracteriza a infiltração desse tipo celular, sendo que uma redução de sua atividade relaciona-se a uma diminuição na migração de neutrófilos para a área inflamada, de forma que compostos que são capazes de diminuir sua atividade são potencialmente anti-inflamatórios (Krawisz et al., 1984; Winterbourn; Brennan, 1997). O presente trabalho revelou que o extrato de *P. angulata* foi capaz de diminuir a atividade de mieloperoxidase nas doses de 50 e 100mg/Kg reduzindo a inflamação tecidual no modelo agudo da doença e na primeira semana de avaliação no modelo crônico.

O estresse oxidativo também pode ser avaliado através dos níveis de glutathiona, que é a primeira linha de defesa contra os produtos tóxicos do oxigênio, reduzindo peróxido de hidrogênio, peróxidos de lipídios, e outros hidroperóxidos (Deleve; Kaplowitz, 1991; Masella et al., 2005). A GSH desempenha um papel-chave, pois elimina as espécies reativas de oxigênio e mantém o equilíbrio redox celular. Essas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio atuam sobre a forma reduzida de glutathiona (GSH), que por sua vez é oxidada, sendo esta reação catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), a qual converte peróxido de hidrogênio em água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto (GSSG). A GSH é regenerada pela glutathiona redutase (GSHred) por intermédio da oxidação de NADPH, isso constitui um ciclo redox essencial para a manutenção da integridade do sistema protetor celular (Wang;

Ballatori, 1998; Huber; Wanda, 2008). Na presença de grandes quantidades de radicais livres ou deficiência do sistema protetor, a via de oxirredução fica desequilibrada, causando acúmulo de glutathiona oxidada (GSSG) no citoplasma. A membrana da célula é relativamente permeável à glutathiona oxidada, que se difunde mais facilmente do que a glutathiona reduzida e isso contribui para o esgotamento intracelular de glutathiona gerando estresse oxidativo (White; Thannickal; Famburg, 1994). Dessa forma a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela Glutathiona total (GSH+GSSG).

No presente estudo o extrato de *P. angulata* evitou a depleção de glutathiona em doses maiores que 200mg/Kg no modelo agudo da doença inflamatória intestinal, assim como a prednisolona na dose de 2mg/Kg. No modelo crônico somente a dose de 100mg/Kg na primeira semana evitou a depleção dos níveis de glutathiona significativamente. A importância da glutathiona na doença inflamatória intestinal tem sido demonstrada em modelos animais, que sugerem que sua depleção altera a função das células T e dos macrófagos (Karp; Koch, 2006). Segundo Loguercio e colaboradores (2003), a suplementação com glutathiona diminui o dano colônico, promovendo restauração nos níveis de GSH e cisteína e consequentemente diminuição da peroxidação lipídica em ratos, no modelo experimental de colite induzida por TNBS. Vivancos e Moreno (2005) descrevem em seu estudo que o β -sitosterol, um esteroide presente em plantas, estimula as enzimas antioxidantes, e sugerem que os fitoesteróis presentes em *P. angulata* podem contribuir com a diminuição do estresse oxidativo. Logo, baseado nos dados encontrados, sugere-se que os fitoesteróis do extrato de *P. angulata* podem ser os responsáveis por esta atividade, justificando os resultados encontrados.

Além da mieloperoxidase e glutathiona, outro mediador avaliado foi a fosfatase alcalina, que se encontra em níveis elevados durante o processo inflamatório intestinal. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e compreende uma família de enzimas que quelam radicais fosfato em pH alcalino (Smith et al., 1984). A atividade da fosfatase alcalina intestinal não é exclusiva dos enterócitos, mas está presente também nas células da lâmina própria, incluindo neutrófilos e outros leucócitos (Smith et al., 1984). Sua função fisiológica é ainda desconhecida, mas sabe-se que esta enzima fica aumentada no processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina et al., 1996; Gonzalez et al., 2001; Sanchez de Medina et al., 2002). Acredita-se que a FA esta relacionada ao processo de calcificação óssea, transporte de imunoglobulinas através da placenta e transporte de fosfato nas células do epitélio intestinal (Karlsson et al., 1995). Como descrito no estudo realizado por Tuin e colaboradores (2009), o aumento da atividade da enzima pode estar associado a um influxo de células inflamatórias. O tratamento com *P. angulata* na dose de 50mg/Kg diminuiu a atividade da fosfatase alcalina na fase aguda do processo inflamatório,

reforçando sua atividade anti-inflamatória, como descrito por Sanchez de Medina e colaboradores (2004) que relatam que uma redução na atividade da fosfatase alcalina pode ser interpretada como uma manifestação da atividade anti-inflamatória. No modelo crônico não houve diminuição da atividade desta enzima por nenhum dos tratamentos.

A importante atividade anti-inflamatória da espécie *P. angulata* esta relacionada com a modulação do sistema imune, principalmente pelas citocinas pró-inflamatórias, como visto no estudo *in-vitro* realizado por nosso grupo, onde se observou diminuição nos níveis de IL-6 e IL1- α , assim como aumento da síntese de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Checon, 2011). Esses resultados ilustram a potencialidade da planta em influenciar os mediadores inflamatórios, relacionando-se com os efeitos encontrados pelo tratamento com as doses de 50 e 100mg/Kg do extrato, as quais foram capazes de diminuir a atividade das enzimas MPO e FA, sugerindo que a planta atua como modulador dos eventos inflamatórios.

É provável que esses efeitos estejam relacionados à presença dos fitoesteróis que compõem o extrato. Os esteroides constituem uma classe de compostos naturais com ampla distribuição na natureza e apresentam uma vasta gama de aplicações terapêuticas: funcionam como cardiotônicos (digitoxina), precursores da vitamina D (ergosterol), anticoncepcionais orais (estrógenos e progestinas semissintéticos), agentes anti-inflamatórios (corticosteroides) e agentes anabolizantes (androgênios) (Robbers; Speedie; Tyler, 1997). Nas plantas, o esterol mais comum é o β -sitosterol (estigmasta-5-em-3 β -ol), composto C₂₉ que é muito disseminado em todo o reino vegetal, e pode ser obtido do óleo de germe de trigo, de centeio, de milho, de algodão e de outros óleos feitos com sementes. (Robbers; Speedie; Tyler, 1997). O extrato de *P. angulata* utilizado no presente estudo contem 26,65% de fitoesteróis totais. Diversos trabalhos mostram que o principal grupo de esteróis presentes nesta planta são os seco-esteróis (fisalinas), moléculas derivadas do ergostano do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo-ergostano, carboxilados em C-15 (Makino et al., 1995). Já foram descritas em sua constituição, as fisalinas B, D, E, F, G, H, I, J, K. (Row et al., 1978; Row et al., 1978-2; Chiang et al., 1992; Makino et al., 1995; Soares et al., 2003; Soares et al., 2006), e os withaesteroides (Shingu et al, 1992; Lee et al, 2008). Esses compostos possuem uma série de atividades descritas, tais como, imunossupressora e de regulação do equilíbrio de respostas Th1 e Th2, como visto no trabalho realizado por Sun (2011), o qual demonstrou o potencial imunomodulador da withangulatin A, um fitoesterol isolado de *P. angulata*. Segundo Bouic, (2001) os fitoesteróis podem ser utilizados como suplementos para combater doenças graves, em que o sistema imunológico precisa ser modulado. Em estudo realizado por Soares (2003) uma dose de 20mg/Kg de seco-esteróis isolados de *P.angulata* inibiu a produção de óxido nítrico e TNF- α produzidos por macrófagos desafiados com LPS e IFN γ em camundongos.

Vieira (2005) mostrou que a administração de fisalinas B e F (seco-esteróis) inibiram o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos no intestino, pulmões e soro em modelo de isquemia e reperfusão em camundongos. Esses resultados corroboram com nossos estudos, justificando a diminuição dos níveis de MPO por inibir o recrutamento de neutrófilos. Checon (2011) também mostra que *P. angulata* foi capaz de inibir a produção de histamina em queratinócitos humanos *in vitro*, assim como a produção de prostaglandina E₂.

Kuo et al., 2006 relatam que a potencialidade dos fitoesteróis de *P. angulata* em inibir o crescimento de células tumorais, assim como Soares et al, (2006), descrevem que a administração de seco-esteróis de *P. angulata* (Fisalinas B, F e G) podem ser úteis em doenças mediadas por complexos imunes, tais como doenças autoimunes, alérgicas ou em casos de rejeição em transplantes, sendo seus usos muito relevantes, pois apresentam menores efeitos tóxicos quando comparados aos glicocorticoides. Yu et al. (2010) descrevem que fisalina H um seco-esterol isolado de *P. angulata*, apresentou efeitos imunossupressores provavelmente por regular o ciclo da mitose celular e modular o equilíbrio Th1/Th2 de citocinas.

Esses estudos mostram que os fitoesteróis de *P. angulata* são compostos promissores no tratamento de doenças inflamatórias, lembrando que os glicocorticoides estão entre as classes de medicamentos mais utilizadas em doenças inflamatórias e autoimunes, porém sua utilização é limitada por seus efeitos colaterais graves causados especialmente durante o tratamento em longo prazo, além de diversos estudos mostrarem que após um ano de tratamento, de 50% a 60% dos pacientes voltam a apresentar a doença. (Jani et al., 2002; Soares et al 2003).

Assim, a busca por novos compostos naturais, semelhantes aos esteroides, com atividades benéficas e menores efeitos colaterais, é um campo de pesquisa promissor (Vanden Berghe et al., 1999; Vayssiere et al., 1997 apud Soares et al., 2003). A correlação dos resultados apresentados pelo presente trabalho aos dados descritos na literatura demonstra a habilidade da *P. angulata* em regular a resposta inflamatória por meio de diferentes classes de mediadores, reduzindo a intensidade e severidade do processo inflamatório no tecido agredido.

CONCLUSÃO



Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. O extrato padronizado de *P. angulata* L. (Physavie®) avaliado, possui efeito anti-inflamatório intestinal agindo na diminuição da atividade de mieloperoxidase e fosfatase alcalina, assim como antioxidante atenuando a depleção de glutathiona colônica;
2. Desta forma, os efeitos anti-inflamatórios observados estão relacionados a uma melhora do estresse oxidativo característico da inflamação intestinal;
3. Sugere-se que as atividades biológicas estão relacionadas com a presença dos fitoesteróis totais no extrato padronizado;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ABERRA, F. N. et al. Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 320-7, ago. 2003.
- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 361. n. 21. p. 2066-78. nov, 2009
- AHUJA V.; TANDON R. K. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. **Journal of Digestive Diseases**, v. 11, p. 134-47, 2010.
- ANDERSEN, V. et al. Diet and risk of inflammatory bowel disease. **Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 44, n. 3, p. 185-94, mar. 2012.
- ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-55, 1985.
- BARBI, N. S.; XAVIER, D. C. D.; TOMASSINI, T.C.B. Volatile's composition of *Physalis angulata* L. **Bollettino chimico Farmacêutico**, v. 138, n. 2, 1999.
- BASEY, K.; MCGAW, B. A.; WOLLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4173-6, 1992.
- BASTOS, G. N. T. et al. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 246-51, 23 jul. 2008.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease : clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p. 1641-57, 2007.
- BELL CJ, et al. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. G622-30, 1995.
- BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROOK, M. J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 321-9, 1946.
- BONAZ, B. L.; BERNSTEIN, C. N. Brain-Gut Interactions in Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, p. 1-14, 11 out. 2013.
- BOUIC, P. J. D. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. **The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation**, v. 4, p. 471-5, 2001.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-33, jul. 2003.
- BOYKO, E. J. et al. Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 84, n. 5, p. 530-4. 1989.

- CAMPOS, F. G. et al. Inflammatory bowel disease. Principles of nutritional therapy. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 187-98, 2002.
- CAMUESCO, D. et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflam Bowel Dis**, v.11, p. 265-71, 2005.
- CARTER, M. J; LOBO, A. J; TRAVIS, S. P. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53, Suppl 5p. v1-16, 2004.
- CHECON, J. T. **Atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado de *Physalis angulata* L. em cultura de queratinócitos humanos e seu potencial como ativo dermocosmético.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2011.
- CHIANG, H. C. et al. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Research**, v. 12, n. 3, p. 837-43, 1992.
- CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 171-5, nov. 2003.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, p. 1244–52, 1992.
- COLLINS, S. M.; CROITORU, K. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: effect of inflammation on intestinal function. **Inflammatory bowel disease: From Bench to Bedside**, p. 223-34, 2005.
- CORNISH, J. A. et al. The Risk of Oral Contraceptives in the Etiology of Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.103, p. 2394–400, 2008.
- CRESPO, M. E. et al. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS, **Planta Med.** v.65, p. 651–3, 1999.
- CROHN, B. B. et al. Regional ileitis: a pathological and clinical entity. **Mt Sinai J Med**, v. 67, p. 174-89, 2000.
- CRUZ, T. et al. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis, **Planta Med.** v.67, p. 94–6. 2001.
- DANESE, S.; FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 30, p. 4807-12, 2006.
- DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity reviews**, v. 3, n. 5, p. 394-400, jul. 2004.
- DELEVE, L. D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 287-305, 1991.

- DHIMAN, M. et al. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 16, n. 5, p. 660-6, maio. 2009.
- DI STASI, L. C et al. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, p. 315-20, 2004.
- DORÉ, J.; CORTHER, G. The human intestinal microbiota. **Gastroentérologie clinique et biologique**, v. 34 Suppl 1, p. S7-15, set. 2010.
- EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 285-301, jul. 1995.
- ECKBURG, P. B.; RELMAN, D. A. The Role of Microbes in Crohn's Disease. **Clin Infect Dis**. v. 44. p. 256-62. 2007.
- FEAGINS, L. A; CRYER, B. L. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs cause exacerbations of inflammatory bowel disease? **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 2, p. 226-32, fev. 2010.
- FERNÁNDEZ-BAÑARES, F. et al. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol**. v.94, p.427-33, 1999.
- FRUET, A. C. et al. Dietary intervention with narrow-leaved cattail rhizome flour (*Typha angustifolia* L.) prevents intestinal inflammation in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 62, 2012.
- GABURRI, P. D. et al. Epidemiology, clinical features and evolution of Crohn's disease: a study of 60 cases. **Arq Gastroenterol**, v. 35. p. 240-6. 1998.
- GERSEMANN, M.; WEHKAMP, J.; STANGE, E. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 271, n. 5, p. 421-8, dez. 2012.
- GIAFFER, M. H.; CLARK, A.; HOLDSWORTH, C. D. Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. **Gastroenterology Unit**, v. 33, p. 1071-5, 1992.
- GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, Suppl 220, p. 83-6, 1996.
- GONZÁLEZ, R. et al. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 71, n. 4, p. 243-50, 2001.
- HAWKEY C. J. et al. A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 112, p. 718-24, 1997.
- HENCKAERTS, L.; VERMEIRE, S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 2, p. 235-41, fev. 2007.

- HSEU, Y. C. et al. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 762-71, 1 jun. 2011.
- HUBER, P. C.; WANDA, P. A. Glutaciona e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-9, 2008.
- HUR, S. J. et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**, v. 32, p. 801-16, 2012.
- ISHIHARA, S. et al. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, n. 11, p. 1097-108, jan. 2009.
- ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 676-9, 2001.
- JANI, N. et al. Medical therapy for ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 31, p. 147-66, 2002.
- JANUÁRIO, A. H. et al. Antimycobacterial Physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytotherapy Research**, v. 16, p.445-8, 2002.
- JIN, Z. et al. Physangulidines A, B, and C: three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L. **Organic letters**, v. 14, n. 5, p. 1230-3, 2 mar. 2012.
- JUANG, J. K. et al. A new compound, withangulatin A, promotes type II DNA topoisomerase-mediated DNA damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 159, n. 3, p. 1128-34, 1989.
- KAPPELMAN, M. D. et al. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults. **Gastroenterology**, v. 135, p. 1907-13, 2008.
- KARAKAS, M.; KOENIG, W. Myeloperoxidase Production by Macrophage and Risk of Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 14, n. 3, p. 277-83, 2012.
- KARLSSON, A. et al. Neutrophil Alkaline Phosphatase Activity Increase in Bacterial Infections Is Not Associated with a General Increase in Secretory Vesicle Membrane Components. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 911-6, 1995.
- KARP, S. M.; KOCH, T. R. Oxidative Stress and Antioxidants in Inflammatory Bowel Disease. **Disease a Month**, v. 56, p. 199-207, 2006.
- KILIAAN, A. J. et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 5, p. G1037-44, 1998.
- KOUTROBAKIS, I. E. et al. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 9, p. 1433-7, set. 2004.
- 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**, v. 87, p. 1344-50, 1984.

- KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H. W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators of inflammation**, v. 7, n. 3, p. 157-62, jan. 1998.
- KUBES, P.; WALLACE, J. L. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. **Mediators Inflammation**, v. 4, p. 397-405, 1995.
- KUO, P. C. et al. Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*. **Organic letters**, v. 8, n. 14, p. 2953-6, 2006.
- LAWAL, I. et al. Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2010.
- LEE, S. W. et al. Withangulatin I, a new cytotoxic withanolide from *Physalis angulata*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 56, n. 2, p. 234-6, fev. 2008.
- LEE, W. C. et al. Induction of heat-shock response and alterations of protein phosphorylation by a novel topoisomerase II inhibitor, withangulatin A, in 9L rat brain tumor cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 149, p. 66-76, 1991.
- LIN, Y. S. et al. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. Extract. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 20, n. 3-4, p. 233-43, 1992.
- LIU, X; WANG, J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 780-7, 2011.
- LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1504-17, 2004.
- LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 35, n. 9, p. 635-41, set. 2003.
- LUCHINI, A. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biol Pharmacol Bull.** v.31, p. 1343-50, 2008.
- MADSEN, K. et al. Probiotic Bacteria Enhance Murine and Human Intestinal Epithelial Barrier Function. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 580-91, set. 2001.
- MAKINO, B. et al. Structural Revision of physalin H isolated from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1668-74. 1995.
- MARTINI, G. A.; BRANDES, J. W. Increased Consumption of Refined Carbohydrates in Patients with Crohn's Disease. **Klinische Wochen Schrift**, v. 371, p. 367-71, 1976.
- MARX, J. How the glucocorticoids suppress the immunity. **Science**, v. 270, n. 13, 1995.

- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-86, 2005.
- MAWDSLEY, J. E. et al. The effect of acute psychologic stress on systemic and rectal mucosal measures of inflammation in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 131, n. 2, p. 410-9, ago. 2006.
- MAWDSLEY, J. E.; RAMPTON, D. S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**, v. 54, p.1481-91, 2005.
- MEDINA, C.; RADOMSKI, M. W. Role of Matrix Metalloproteinases in Intestinal Inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 933-8, 2006.
- MILLER, M. J. S; GRISHAM, B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediators Inflammatory**, v. 4, p. 387-96, 1995.
- MORRIS G. P. et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p. 795-803, 1989.
- MORRISON, G.; HEANDON, B. H.; GIBSON, P. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**. v. 38, n. 12, p. 956-61, 2009.
- MÚZES, G. et al. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 18, n. 41, p. 5848-61, 7 nov. 2012.
- NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 65–80, 2009.
- NELL, S.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 564-77, ago. 2010.
- NONES, K. et al. The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (*mdr1a*^{-/-}) mice, a model of inflammatory bowel diseases. **The British journal of nutrition**, v. 101, n. 2, p. 169–81. 2009.
- ONKEN, J. E. Is Colorectal Cancer Surveillance Cost-Effective in patients with Ulcerative Colitis? **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, p. S196-7, 2008.
- PETERSEN, A. M. et al. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. **BMC microbiology**, v. 9, p. 171, jan. 2009.
- PEYRIN-BIROULET, L. et al. Disability in Inflammatory Bowel Diseases: Developing ICF core sets for patients with Inflammatory Bowel Diseases based on the International classification of functioning, disability, and health. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 16, n. 1, p. 15-22, 2010.
- PIETRO, R. C. L. R. et al. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-8, 2000.

- PINTO, N. B. et al. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 10, p. 740-3, ago. 2010.
- PITHADIA, A. B.; JAIN, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 3, p. 629-42, jan. 2011.
- PIZARRO, T. T. et al. Mouse models for the study of Crohn's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 218-22, maio. 2003.
- PRANTERA, C. Mesalamine in the treatment of mild to moderate active Crohn's ileitis, results of a randomised multicenter trial. **Gastroenterology**, v. 116, p. 521-6, 1999.
- RACHMILEWITZ, D. et al. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 97, p. 326-37, 1989.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacologia e Farmacobiocologia**, Brasil: São Paulo, 1997. 372p.
- RODA, G. et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. **World Journal Gastroenterology**, v.16, p. 4264-71, 2010.
- ROGLER, G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 157-65, abr. 2010.
- ROW, L. R. et al. Physalins E and H, new Physalins from *Physalis angulata* and *P. Lancifolia*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1641-5, 1978.
- ROW, L. R.; SARMA, N. S.; REDDY, K. S. The structure of Physalins F and J from *Physalis angulata* and *P. Lancifolia*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1647-50, 1978-2.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F. et al. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 70, p. 3097-108, 2002.
- 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, p. 2317-26, 2004.
- SANCHEZ DE MEDINA, F. et al. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p.771-9, 1996.
- SÁNCHEZ-FIDALGO, S. et al. PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, p. 216-23, 2007.
- SANDLE, G. I.; HAYSLETT, J. P.; BINDER, H. J. Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 27, n. 3, p. 309-16, 1 mar. 1986.
- SCARMINIO, V. et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa* sp AAA) prevents intestinal inflammation in a trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Nutrition Research**. v.32, p.202-09, 2012.

- SCHOFFEN, J. P. F.; PRADO, I. M. M. Aspectos Epidemiológicos e Etiológicos da Doença de Crohn. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 73-80, 2011.
- SCRIBANO, M. L. Adverse Events of IBD Therapies. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, p. S210-1, 2008.
- SHIM, J. S. et al. Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. **Nutraceuticals and Food**, v. 6, n. 2, p. 215-8, 2002.
- SHINGU, K. et al. New Withanolide from *Physalis angulata* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 39, n. 6, p. 1591-3, 1991
- SHINGU, K. et al. Three new withanolides, physagulins A, B and D from *Physalis angulata* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 2088-91, 1992.
- SHINGU, K. et al. Three new withanolides, physagulins E, F and G from *Physalis angulata* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 2448-51, 1992-2.
- SIMAS, N. K. *Physalis angulata* L. In: Amaral ACF, Simões EV, Ferreira JLP (coord). **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 147-64p.
- SINGH, V.P. et al. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 71, p. 163-75, 2003.
- SMITH, G. P. et al. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. **Clinica Chimica Acta**, v. 142, n. 2, p. 221-30, 1984.
- SOARES, M. B. P. et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European journal of pharmacology**, v. 459, n. 1, p. 107-12, 10 jan. 2003.
- SOARES, M. B. P. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 408-14, mar. 2006.
- SOUZA, M. H. L. P. et al. 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. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 2, 2002.
- STECHER, B. et al. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 1, jan. 2010.
- STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 495-549, jan. 2002.
- STROBER, W.; LÚDVÍKSSON, B. R.; FUSS, I. J. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. **Annals of internal medicine**, v. 128, n. 10, p. 848-56, 15 maio. 1998.

- 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. 551-63, fev. 2009.
- SUN, L. et al. Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 482-8, 2011.
- TANG, C. et al. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. **Immunology**, v. 135, n. 2, p. 112-24, fev. 2012.
- TARGAN S. R.; Shanahan F. **Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside**. Retford D.C., editor. Baltimore: Williams and Wilkins. 1994.
- TELAKIS, E. Inflammatory bowel disease genetics and pharmacogenetics: An overview. **Annals of Gastroenterology**, v. 20, n. 3, p. 174-9, 2007.
- TUIN, A. et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **BMJ Journals**, v. 58, p. 379-87, 2009.
- VELJACA, M. et al. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **Journal Pharmacol. Exp. Ther**, v. 272, p. 417-22. 1995.
- VICTORIA, C. R.; SASSAKI L. Y.; NUNES, H. R. C. Incidence and Prevalence Rates of Inflammatory Bowel Diseases, In Midwestern of São Paulo State, Brazil. **Gastroenterology**, v. 46, n.1, 2009.
- VIEIRA, A. T. et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 2, p. 244-51, set. 2005.
- VIVANCOS, M.; MORENO, J. J. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 39. p. 91-7. 2005.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, 1998.
- WHITE, A. C.; THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Review Glutathione deficiency in human disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 5, p. 218-26, 1994.
- WHITTLE, B. J. R.; VARGA, C. New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosalicylates: the role of heme oxygenase. **Pharmacological Reports**, v. 62, p. 548-56, 2010.
- WINTERBOURN, C. C.; BRENNAN, S. O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 15, n. 326, p. 87-92, 1997.
- WIRTZ, S.; NEURATH, M. F. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. **International journal of colorectal disease**, v. 15, n. 3, p. 144-60, jun. 2000.

WITAICENIS, A. et al. Dietary Polydextrose Prevents Inflammatory Bowel Disease in Trinitrobenzenesulfonic Acid Model of Rat Colitis. **J Med Food**. v.13, n.6, p.1391–6. 2010.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**. v.186, p. 211–8, 2010.

WITAICENIS, A.; LUCHINI, A. C.; HIRAMA-LIMA, C. A.; et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**. v.195, p. 76–85, 2012.

WU, S.Y. et al. Physalin F induces cell apoptosis in human renal carcinoma cells by targeting NF-kappaB and generating reactive oxygen species. **PloS one**, v. 7, n. 7, jan. 2012.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A R. Review article: diet and inflammatory bowel disease epidemiology and treatment. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 99-112, 1 jul. 2009.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1893-6, 2007.

YU, Y. et al. Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 290-7, mar. 2010.

ZHANG, Z. et al. Critical Role of IL-17 Receptor Signaling in Acute. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 12, n. 5, p. 382-8, 2006.