
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Atividade Antiinflamatória Intestinal da Escopoletina e Fraxetina nas Fases
Aguda e Crônica do Processo Inflamatório Induzido por TNBS em Ratos**

Alexandre da Silveira Chagas

Monografia apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas, sob
orientação do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi.

BOTUCATU – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Atividade Antiinflamatória Intestinal da Escopoletina e Fraxetina nas Fases
Aguda e Crônica do Processo Inflamatório Induzido por TNBS em Ratos**

Alexandre da Silveira Chagas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Monografia apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas, sob
orientação do Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi.

BOTUCATU – SP

2010

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

Chagas, Alexandre da Silveira.

Atividade antiinflamatória intestinal da escopoletina e fraxetina nas fases aguda e crônica do processo inflamatório induzido por TNBS em ratos / Alexandre da Silveira Chagas. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Cumarinas. 2. Intestino - doenças inflamatórias. 3. Antiinflamatórios.

Palavras-chave: Antiinflamatório; Cumarinas; Escopoletina; Fraxetina; Intestinal; TNBS.

Dedicatória

Dedico esse trabalho e a conclusão desse curso aos meus pais Elo e Carlos Alberto, que me deram todo apoio necessário para a escolha da profissão de Biomédico. Muito obrigado pai e mãe, amo muito vocês.

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a Deus que sempre me deu forças
para seguir com meus sonhos.*

*Ao Professor Di Stasi pela oportunidade de início de
aprendizagem, que espero que siga em frente e que tenha
sucesso no futuro.*

*Aos amigos da rep. Vira lata: Girassol, Dona
Rosa, OB, Vagi, Rita, Rick e Diademo.*

*Aos amigos da rep. Sokanela: Panda,
Mocréia, Pelanka, Minu, Borra
lingüiça, Caminhão, Gordo, Cagão, Ibere e Pudim.*

A trupe: Bagaço, Xiba, Funga e Spiru.

*Ao pessoal do Lafit:
Leo, Aline, Ana, Tarina, Paty, Adriana, Laura, Adriano e Luiz.*

*A todos os funcionários do Departamento de farmacologia e a
as meninas da graduação, principalmente a Fátima.*

E um agradecimento especial a Talita.

Sumário

Sumário

Resumo	3
Introdução	5
1.Doença Inflamatória Intestinal	6
2.Epidemiologia	6
3.Etiologia	8
3.1. Fatores Ambientais	8
3.1.1. Dieta	9
3.1.2. Fármacos	9
3.1.3. Tabagismo	10
3.1.4. Fatores geográficos e sociais	11
3.1.5. Fatores Psicológicos	12
3.1.6. Alterações na microbiota intestinal	13
3.1.7. Alterações na permeabilidade da mucosa	14
4. Sistema imune intestinal	15
4.1 Fatores Genéticos	17
4.2. Radicais Livres e Antioxidantes	19
5Principais tratamentos farmacológicos disponíveis	22
6A busca de novos compostos para o tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais	23
7 O modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	26
Objetivos	29
Material e Métodos	31
1. Animais	32
2. Substâncias testes e desenho experimental	32

2.1 Avaliação da atividade de escopoletina, fraxetina e sulfassalazina na fase aguda do processo inflamatório intestinal.....	33
2.2 Avaliação da atividade de escopoletina, fraxetina e sulfassalazina na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal.....	34
3. Avaliação do processo inflamatório intestinal.....	36
3.1 Avaliação macroscópica.....	36
3.2 Determinações bioquímicas.....	37
A. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	37
B. Determinação do conteúdo de glutathione total.....	38
C. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.....	38
3. Análise estatística.....	39
<i>Resultados</i>	40
1. Resultados modelo experimental de fase aguda.....	41
1.1 Consumo diário de Ração.....	41
1.2 Ganho de peso corporal.....	42
1.3 Avaliação macroscópica.....	42
1.4 Determinações Bioquímicas.....	43
2. Resultados modelo experimental de fase crônica com recidiva.....	45
2.1 Ganho de peso corporal.....	45
2.2 Consumo diário de ração.....	46
2.3 Avaliação macroscópica.....	48
2.4 Determinações Bioquímicas.....	50
<i>Discussão</i>	51
<i>Conclusão</i>	56
<i>Referências</i>	58

Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU), ambas caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas. Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida e seu tratamento envolve uma série de fármacos com sérios efeitos colaterais, especialmente quando usado cronicamente. As cumarinas representam uma importante classe de compostos fenólicos naturais que apresentam inúmeras propriedades farmacológicas importantes para que um produto seja potencialmente ativo no tratamento da DII. Dentre as inúmeras cumarinas conhecidas e estudadas, dados obtidos em nosso laboratório demonstram que algumas cumarinas apresentam efeitos protetores na fase aguda e preventiva do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos, reduzindo a incidência de diarreia, aderência e obstrução intestinal, além de manterem os níveis de glutathione e reduzirem a atividade da fosfatase alcalina e da mieloperoxidase colônica. Os objetivos do presente projeto são determinar a atividade antiinflamatória intestinal da escopoletina e fraxetina na fase aguda e crônica com recidiva de colite ulcerativa induzida por TNBS tendo-se em vista a determinação de sua atividade curativa. Para tanto, serão avaliados os parâmetros clínicos gerais (consumo de alimento e peso corporal), parâmetros macroscópicos da lesão (determinação de índice de lesão, relação peso-comprimento colônico) e bioquímicos (avaliação das atividades da mieloperoxidase, fosfatase alcalina, níveis de proteínas e glutathione total).

Introdução

1. Doença Inflamatória Intestinal

Sob a denominação de Doença Inflamatória Intestinal (DII) estão englobadas, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, 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 e constipação (Singh *et al.*, 2003).

As características e distribuição do processo inflamatório intestinal são distintas. Histologicamente, a inflamação na retocolite ulcerativa se restringe a camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos e granulócitos e presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos. Já a doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação transmural, descontínua, que pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, caracterizada pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose (Collins & Croitoru, 1994).

Clinicamente, a RCU é caracterizada pela ocorrência de diarreia severa com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal e perfuração. Já a doença de Crohn é caracterizada por dor abdominal intensa, ocorrência de estreitamento do lúmen intestinal (estenoses) e desenvolvimento de fístulas (Bouma & Strober, 2003).

As doenças inflamatórias intestinais são consideradas um dos grandes problemas da população moderna, uma vez que geram repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico e profissional (Carter *et al.*, 2004).

2. Epidemiologia

Estima-se que 1.4 milhões de americanos apresentam a doença (Abraham & Cho, 2009). Dados mundiais indicam que a prevalência está em um range de 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).

No Brasil são escassos os estudos relatando a incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais, devido à existência de problemas nos sistemas de informação de saúde como, por exemplo, qualidade dos prontuários, registros constituídos apenas pelas redes públicas hospitalares e conveniadas, além da característica crônica da doença seguida de períodos de exacerbação, fatores estes que dificultam o registro dos casos. Porém, um estudo epidemiológico realizado em um hospital universitário do interior de São Paulo revelou que ocorreu um aumento nas doenças inflamatórias intestinais de 40 para 61 casos para cada 10.000 atendimentos realizados, em um período de 5 anos (Souza *et al.*, 2002). Victoria *et al.*, (2009) em estudo realizado no hospital da Universidade Estadual Paulista da cidade de Botucatu-SP, o qual atende predominantemente pacientes da região centro-oeste paulista, demonstrou que a ocorrência das doenças inflamatórias intestinais foi de 14,81 casos para a retocolite ulcerativa e 5,65 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes. Apesar destes números estarem abaixo da prevalência mundial, é relatado um aumento considerável no número de casos.

No Brasil e no mundo, em ambas as doenças, é observado um predomínio de casos em pessoas do sexo feminino, de cor branca, de estado civil casado, na faixa etária entre 20 e 50 anos, não-tabagistas e residentes na zona urbana (Souza *et al.*, 2002; Victoria *et al.*, 2009; Loftus, 2004).

As doenças inflamatórias intestinais não ocorrem em igual proporção, sendo maior a incidência de RCU do que de DC, sendo as mulheres mais predisposta a DC e não havendo distinção entre os sexos para a RCU. Porém estudos pediátricos revelam um aumento na incidência da DC em jovens nas últimas três décadas (Declercq *et al.*, 2009).

3.Etiologia

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, sabe-se que interações entre os fatores genéticos, ambientais e uma desregulação do sistema imune refletem em seu desenvolvimento (Mayer, 2010). Trata-se, portanto, de uma doença multifatorial e vários fatores podem ser ressaltados como, por exemplo, a alteração na função epitelial e na microbiota intestinal (Su *et al.*, 2009).

Dentre os fatores ambientais podemos citar a dieta, alguns fármacos, o tabagismo, fatores geográficos e sociais, fatores psicológicos, entre outros (Danese *et al.*, 2004

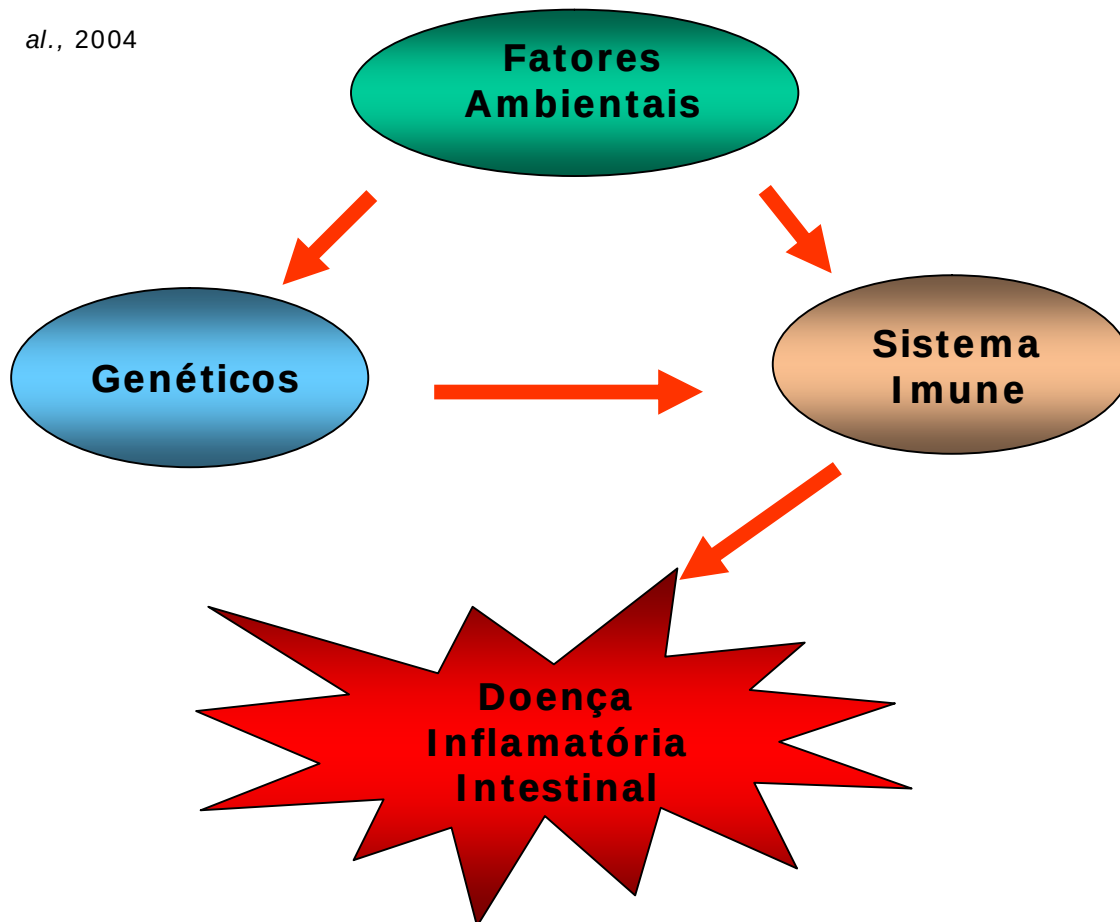


Figura 1: Interação entre os fatores ambientais, alterações genéticas e desregulação do sistema imune que refletem no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais.

3.1. Fatores Ambientais

3.1.1. Dieta

O meio que circunda a mucosa intestinal é uma mistura complexa de antígenos de três origens: da dieta, da flora bacteriana normal e de seus produtos, sendo que estes últimos podem representar patógenos potenciais. Por este motivo, é essencial que o sistema imune da mucosa tenha a capacidade de discriminar os estímulos prejudiciais dos inofensivos, prevenindo assim a entrada maciça de patógenos e não produzindo uma resposta imune frente aos agentes inofensivos.

Sendo a DII uma condição entérica, é lógico considerar a dieta como um possível fator etiológico (Shanahan & Targan, 1994). Alguns alimentos específicos podem estar relacionados com o desenvolvimento da inflamação intestinal, atuando como um antígeno. Dentre estes podemos citar o açúcar refinado (Vind *et al.*, 2008), o álcool, o café (Boyko *et al.*, 1989), o leite de vaca (Yamamoto *et al.*, 2009) e um aumento no consumo de carboidratos (Martini & Brandes, 1976).

Por outro lado, existem alguns alimentos que são relatados como preventivos do processo inflamatório intestinal, como por exemplo, produtos ricos em ômega-3, que tem demonstrado atividade antiinflamatória (O'Morain *et al.*, 1989), bem como uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras (Shanahan & Targan, 1994).

Os fatores da dieta são parâmetros difíceis de ser estudados, pois não atuam sozinhos, mas juntamente com alterações genéticas e no sistema imune.

3.1.2. Fármacos

Os contraceptivos orais e os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são duas classes de fármacos que têm sido bastante estudados como fatores etiológicos ou de relação causa-efeito das doenças inflamatórias intestinais.

Diferentes estudos analisados por Cornish *et al.*, (2008) evidenciaram a associação dos contraceptivos orais e o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais. O mecanismo pelo qual essa classe de medicamentos atua ainda não está

claro, mas atribui-se esta propriedade principalmente a sua atividade trombogênica. Estudos morfológicos demonstram que o infarto multifocal microvascular do trato gastrointestinal (TGI) pode estar envolvido com a doença de Crohn (Wakefield *et al.*, 1989), além disso, essa propriedade trombogênica pode causar isquemia, o que pode acarretar em alteração na integridade da mucosa e consequentemente permitir a entrada de antígenos no lúmen (Shanahan & Targan, 1994).

Já os AINES possuem como efeito colateral a injúria da mucosa do trato gastrointestinal, principalmente no estômago e no duodeno, porém seu efeito tóxico se estende ao cólon e ao intestino grosso. Esse efeito colateral está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular e lesão local causada por essa classe de fármacos, além de seu efeito sistêmico sobre a síntese de prostaglandinas, o que diminui os fatores de proteção da mucosa do TGI (Shanahan & Targan, 1994), acarretando em alterações na permeabilidade colônica e consequentemente no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais.

3.1.3. Tabagismo

O tabagismo é outro fator ambiental relacionado com a DII, sendo este um dos mais fáceis de ser estudado, pois é possível distinguir o fumante do não fumante, além de ser possível estimar quanto tempo à pessoa esteve exposta a este agente etiológico (Shanahan & Targan, 1994).

O cigarro apresenta ações antagônicas nos dois diferentes tipos de DII. Na retocolite ulcerativa o cigarro está relacionado com menor risco de ocorrência da doença, sendo esta incidência de apenas 40% em relação às pessoas não fumantes (Shanahan & Targan, 1994). O mecanismo pelo qual o cigarro atua na retocolite ulcerativa ainda não está esclarecido, porém pode estar relacionado com alterações do muco colônico (Shanahan & Targan, 1994). Cope *et al.*, (1986) demonstraram que a produção de muco em pacientes fumantes com retocolite ulcerativa é semelhante ao de pessoas saudáveis. Além disso, o cigarro promove uma redução na permeabilidade do epitélio intestinal, o

que ocasiona uma diminuição na entrada de patógenos e consequentemente uma menor alteração da resposta imune.

Diferentemente, o cigarro está relacionado com o aumento do risco de ocorrência da doença de Crohn, sendo os fumantes do sexo masculino duas e as do sexo feminino quatro vezes mais susceptíveis a doença, sendo a propriedade trombogênica do cigarro associada a tal fato (Shanahan & Targan, 1994). Além disso, Logan & Kay, (1989) propuseram que o cigarro pode converter a retocolite ulcerativa em doença de Crohn, por isso é observado uma maior incidência para a DC em pacientes fumantes, porém, nada pode ser afirmado, pois as duas doenças afetam os mesmos grupos demográficos e possuem sintomas semelhantes, e o cigarro é apenas um entre todos os outros fatores etiológicos das doenças inflamatórias intestinais.

3.1.4. Fatores geográficos e sociais

A DII é mais comumente observada em países ocidentais do que orientais, e em países desenvolvidos do que em desenvolvimento (Bernstein *et al.*, 2010), porém há um notável aumento no número de casos no Japão e em outros países orientais, fato este que pode estar associado ao aumento no consumo de gorduras e proteínas de origem animal, ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos, entre outros (Yamamoto *et al.*, 2009).

Além disso, a ocorrência das doenças inflamatórias intestinais é maior em grandes áreas urbanas do que na área rural e em pessoas de classes econômicas mais altas. Para este fato é levantada a “hipótese da higiene” que sugere que crianças menos expostas a infecções ou condições não-sanitárias (“sujeira”) desenvolvem menos o sistema regulatório das células-T e o sistema imune, fato este que pode estar associado a um aumento na incidência de doenças imunes crônicas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (Bernstein *et al.*, 2010).

Essas doenças podem apresentar variações em suas manifestações extraintestinais de acordo com a localização geográfica em que ocorre, por exemplo é

comum observar a ocorrência de artralgia em pacientes do Paquistão, porém a ocorrência de fístulas perianais é menor, sendo esta última bastante comum em pacientes da América do Norte, América do Sul, Europa, Austrália e Nova Zelândia. Já na Índia, o pico de ocorrência das doenças inflamatórias intestinais se dá por volta dos quarenta anos, ou seja, dez anos mais tarde do que na maioria dos países citados acima (Bernstein *et al.*, 2010).

Essas variações geográficas na ocorrência destas doenças podem ser reflexos da variação na exposição aos diferentes fatores etiológicos e/ou das variações sócio-demográficas da população (Declercq *et al.*, 2009).

3.1.5. Fatores Psicológicos

É descrito na literatura que fatores emocionais podem afetar o sistema imune e alterar a susceptibilidade às doenças (Shanahan & Targan, 1994). Existem evidências crescentes de que o estresse psicológico pode aumentar a inflamação da mucosa e piorar o curso das doenças inflamatórias intestinais (Wahed *et al.*, 2009). Estudos revelam uma forte relação entre fatores psicológicos como depressão, ansiedade, perda da agressividade e imaturidade com a DC (Shanahan & Targan, 1994). Apesar de poucos estudos comprovarem tal fato, o estresse psicológico pode estar relacionado com a exacerbação dos sintomas das doenças inflamatórias intestinais, talvez pela ativação do sistema nervoso entérico e da expressão das citocinas pró-inflamatórias (Brandi *et al.*, 2009).

Wahed *et al.*, (2009) relatam que os pacientes com DII que foram acompanhados por psicoterapia, apresentaram uma melhora na doença, bem como uma redução na ocorrência de recidiva, no uso de medicamentos e em atendimentos ambulatoriais, em relação aos pacientes do grupo controle.

A resposta ao estresse envolve uma série de respostas cerebrais, principalmente no hipotálamo, amígdala e hipocampo. Essa resposta pode estar relacionada com a

estimulação do eixo-HPA (hipotalâmico-pituitária-adrenal) e conseqüente agravamento da doença ativa e aumento dos casos de recidiva (Mawdsley & Rampton, 2005).

3.1.6. Alterações na microbiota intestinal

A microbiota bacteriana intestinal é um importante fator na etiologia das doenças inflamatórias intestinais (Ott *et al.*, 2004). Existe uma ampla evidência de que as bactérias comensais entéricas e seus produtos estão envolvidos com a iniciação e perpetuação destas doenças (Papadakis & Targan, 1999). Um fato que reforça esta hipótese reside no fato de animais “germ-free” não desenvolvem a doença, já que a ausência de microorganismos na mucosa intestinal faria com que o sistema imune não fosse estimulado devido a ausência de antígenos. Dados que corroboram a importância da microbiota intestinal consiste no fato de que em humanos com DII há um aumento nos níveis de anticorpos contra as bactérias intestinais (Hyun & Mayer, 2006).

O mecanismo pelo qual as bactérias podem levar a iniciação e ou perpetuação do processo inflamatório intestinal está relacionado principalmente com o aumento da permeabilidade deste local (Chichlowski & Hale, 2008) e desencadeamento da resposta imune.

Vários microorganismos estão relacionados como potenciais agentes etiológicos para as doenças inflamatórias intestinais, como por exemplo, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae* (Lakatos *et al.*, 2006).

Por outro lado, existem as bactérias benéficas, como por exemplo, a *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus salivarius spp.* e *Thermophilus*.

Um estudo realizado utilizando um produto contendo todas essas bactérias benéficas como probióticos, demonstrou que elas podem normalizar a função fisiológica e a integridade da barreira, reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a integridade das *tight junctions* entre as células epiteliais (Madsen *et al.*, 2001).

Em adição, algumas bactérias são produtoras de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta, considerados como uma importante fonte de energia para as células epiteliais colônicas, além de ter efeito imunomodulador e antiinflamatório (Chichlowski & Hale, 2008).

O balanço entre as bactérias benéficas e as espécies patogênicas determina a homeostase intestinal e esse balanço pode ser manipulado por antibióticos, probióticos e prebióticos usados para o tratamento e para a prevenção das recidivas das doenças inflamatórias intestinais (Sartor, 2008).

3.1.7. Alterações na permeabilidade da mucosa

O epitélio intestinal consiste na maior e mais importante barreira do organismo com o ambiente externo. A principal função deste epitélio é oferecer ao organismo uma barreira eficaz contra toxinas, antígenos e bactérias, bem como macromoléculas nocivas e outros microorganismos, ao mesmo tempo em que deve ser permeável aos nutrientes, eletrólitos e água (Groschwitz & Hogan, 2009). A função de barreira seletiva é mantida pela formação de complexos que ligam uma célula a outra através de desmossomos, junções de aderência e *tight junctions*. A integridade do epitélio intestinal é essencial para o perfeito funcionamento do trato gastrointestinal (Chichlowski & Hale, 2008). Alterações patológicas no intestino podem permitir a abertura destes complexos, especialmente das *tight junctions* e permitir a passagem de grandes antígenos (Snoeck *et al.*, 2005).

É amplamente descrito na literatura que pacientes com DII possuem um aumento na permeabilidade intestinal, que é consequência da ulceração da mucosa e de apoptose, o que acarreta em uma diminuição na função de barreira deste epitélio (Edelblum & Turner, 2009). A disfunção da barreira epitelial e a inflamação são fatores que contribuem com a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, permitindo maior exposição aos antígenos com consequente ativação do sistema imune (Hyun & Mayer, 2006) e das citocinas pró-inflamatórias, sendo que estas por sua vez, são conhecidas por

induzir a disfunção da barreira epitelial, especialmente por desregularem as *tight junctions*, como é o caso do fator de necrose tumoral (Turner, 2006). Esse aumento na permeabilidade do epitélio intestinal pode ser o fator etiológico mais importante no desenvolvimento, progressão e recidiva destas doenças (Secondulfo *et al.*, 2001).

4. Sistema Imune Intestinal

O sistema imune intestinal é considerado o maior e mais complexo do organismo, por estar constantemente exposto ao maior número de antígenos e por ser capaz de distinguir claramente entre agentes não-nocivos e nocivos. A resposta imune intestinal protege o organismo da entrada de agentes patogênicos, sendo essencial para a manutenção da fisiologia e prevenção de infecções. Por outro lado, quando a imunidade reage contra o material não-patogênico, como antígenos da dieta ou bactérias não-patogênicas, podem ocorrer distúrbios inflamatórios como o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (Mowat, 2003).

Devido essa exposição constante e a capacidade de determinar o que é ou não nocivo, a mucosa intestinal dispõem de um sistema de defesa especializado, que é dividido em imune e não imune (Plevy, 2002).

No sistema de defesa não-imune, a especialização do próprio epitélio intestinal funciona como uma barreira e sua formação, os tipos de transporte que por ele ocorre, seja por endocitose (via transcelular) ou intercelulares (via paracelular), além dos complexos que ligam uma célula a outra, reforçam o sistema de defesa, barrando a entrada de toxinas, antígenos e bactérias. Outros componentes também auxiliam na manutenção da integridade da barreira intestinal, como o glicocálix e as defensinas. O glicocálix consiste de uma barreira formada de ácido mucopolissacarídeo e glicoproteínas que recobre toda a superfície intestinal. Já as defensinas são moléculas com capacidade de defesa, produzidas pelas células de Paneth, que se dirigem contra diferentes tipos de microorganismos (Pardo, 2006).

O denominado sistema imune intestinal é um importante mecanismo de defesa imunológico constituído por distintas células e moléculas, cuja função é evitar a entrada

de agentes estranhos, sendo que a resposta desencadeada pelo sistema imune intestinal pode ser do tipo inata ou adquirida (Plevy, 2002).

Os componentes celulares da imunidade inata compreendem as células fagocíticas, como os neutrófilos, macrófagos e células natural killer. Já os componentes celulares da resposta imune adquirida ou específica são os linfócitos T, que são estimulados por exposição a um antígeno específico (Pardo, 2006). As citocinas produzidas pelos linfócitos T, em resposta a uma infecção, organizam e direcionam a resposta imune, que além de erradicar o agente infeccioso, controlam as células de memória prevenindo doenças em caso de re-exposição ao mesmo agente infeccioso (Mayer, 2010).

Disfunções do sistema imune intestinal têm sido relatadas como o principal mecanismo no desenvolvimento da inflamação intestinal. Durante a fase aguda da doença, é observada a presença de infiltrado de células inflamatórias contendo mastócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Além disso, o dano da mucosa epitelial tem sido relacionado com altas concentrações de CD4+ e CD8+ citotóxico de células T (Neuman, 2007).

Pacientes que apresentam alteração na imunidade inata tem maior incidência de DII. Porém, o sistema imune adquirido, especialmente linfócitos T, tem sido mais fortemente relacionado à patogênese dessas doenças (Mayer, 2010).

Sabe-se, que os mecanismos imunes envolvidos na iniciação e perpetuação da RCU e da DC são distintos. Na DC os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α), de int feron (INF- γ), interleucinas (IL) IL-12 e IL-1 estão aumentados, enquanto na RCU é observado um aumento na secreção de IL-5, IL-14, IL-10 e IL-13, sendo maior o desequilíbrio da homeostasia no sistema imune na DC do que na RCU ( sventoraityt  et al., 2008).

Bouma e Strober (2003) demonstram através de diferentes modelos experimentais e estudos em humanos, que a doença de Crohn está mais fortemente relacionada com linfócito Th1 e a retocolite ulcerativa com Th2, isso levando em consideração as diferentes citocinas que predominam em cada doença.

O sistema imune mucoso intestinal é muito bem coordenado para evitar a entrada de patógenos e agentes nocivos e não reagir frente às bactérias comensais e antígenos provenientes da dieta, fenômeno denominado de tolerância oral (Mowat, 2003). Sabe-se que a perda da tolerância oral e o desenvolvimento de resposta imune contra as bactérias não patogênicas são os pontos chave para o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, porém o motivo pelo qual isso ocorre ainda permanece desconhecido.

4.1 Fatores Genéticos

Existem evidências que indicam que o fator genético está intimamente relacionado com o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, especialmente com a DC. Dentre estas podemos citar a ocorrência da doença em alguns grupos étnicos e em pessoas com grau de parentesco (Cavanaugh & Pavli, 1997). Especialmente para a DC, foi observado que em gêmeos idênticos, em mais de 58% de casos, ambos desenvolveram a doença, sendo que nos casos de retocolite ulcerativa esta relação está em um range de 6-17% (Bouma & Strober, 2003).

Atualmente, o gene NOD2 (domínio de oligomerização de nucleotídeo) também denominado CARD15 (domínio 15 de recrutamento de ativação de caspase) é descrito como o gene relacionado com o desenvolvimento da DII, especialmente DC (Heliö *et al.*, 2003).

Existe mais de 60 variações do gene NOD2/CARD15 com três variantes principais R702W, G908R e 1007fs. A função exata desse gene ainda não é totalmente conhecida, porém sabe-se que ele está relacionado com o reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de membrana de bactérias Gram negativas e subsequente ativação do NF- κ B (Ogura *et al.*, 2001). Heliö *et al.*, (2003) descrevem que a variação 1007fs é a mais observada em pacientes com DC e está relacionada com a deficiência em induzir a ativação do NF- κ B mediada pelo LPS, o que aumenta o risco de DC na região do íleo. Esse risco é 17.1 vezes maior em pessoas que apresentam essa mutação e isto tem sido

relacionado ao fato de que o NOD2, assim como os receptores do tipo “toll-like” (TLRs) são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, com conseqüente ativação da imunidade inata, induzindo portanto a expressão da resposta imune de vários genes e a ativação de citocinas inflamatórias (Ishirara *et al.*, 2009).

É possível que o gene NOD2 e os TLRs atuem sinergicamente participando do reconhecimento de bactérias intestinais e na ativação da resposta da imunidade inata. Assim sendo, uma diminuição na ativação do NF- κ B, devido a mutação do NOD2 pode resultar em um desbalanço da homeostase, com o descontrole das bactérias patogênicas intestinais, sendo necessária outra via de ativação do sistema imune, ocasionando um aumento na produção de outras citocinas pró-inflamatórias, o que pode culminar com o desenvolvimento da DC (Ishirara *et al.*, 2009).

Além disso, o polimorfismo de outro gene, o OCTN1/2 (transportador de cátion orgânico) também conhecido como SLC22A4/5, localizado no *locus* IBD5, também tem sido associado com a ocorrência de DC (Peltekova *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2006; Vind *et al.*, 2008; Ishihara *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que sua mutação afeta a capacidade de transporte de xenobióticos e aminoácidos através das membranas celulares (Peltekova *et al.*, 2004).

Outro recente gene também associado principalmente a DC é o NLRP3 da família de receptores do tipo Nod (Ishihara *et al.*, 2009), visto que sua expressão está significativamente maior em animais submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS, tanto no modelo agudo como no crônico, e também em biopsias de pacientes com DC (Villani *et al.*, 2009). Sua função também parece estar relacionada com o reconhecimento de microorganismos patogênicos e ao desencadeamento da resposta imune (Ishihara *et al.*, 2009).

O estudo do fator genético na DII é um importante passo para o entendimento dessa complexa doença e a associação deste com a compreensão das alterações do sistema imune intestinal são os pontos críticos para o entendimento de sua cronicidade e patofisiologia, bem como uma das estratégias para o desenvolvimento de novos medicamentos.

4.2 Radicais Livres

Outro fator etiológico que tem sido alvo para a busca de novos tratamentos para as doenças inflamatórias intestinais são os radicais livres. O estresse oxidativo é um potencial fator etiológico de ambas as doenças, pois os efeitos nocivos das moléculas reativas de oxigênio (EROS) ou nitrogênio (ERN) têm sido amplamente observados em processos inflamatórios.

Espécies reativas de oxigênio, formadas naturalmente por produto do metabolismo do oxigênio, são moléculas altamente reativas, devido à presença de um elétron desemparelhado, porém essas moléculas são eliminadas por sistemas de defesa antioxidantes. O desbalanço entre a produção de radicais livres e sua remoção por agentes antioxidantes é denominado de estresse oxidativo (Rezaie *et al.*, 2007).

Os principais radicais livres observados nas doenças inflamatórias intestinais são: o óxido nítrico (NO), o superóxido (O_2^-), o peróxido de nitrito ($ONOO_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hipoclorito (OCl_2) (McKenzie *et al.*, 1996), sendo os neutrófilos na RCU e os monócitos na DC, a principal fonte para a produção destes radicais livres (Karp & Koch *et al.*, 2006), principalmente depois que a doença já está instalada. Estudos indicam que os radicais livres podem apresentar atividade imunomoduladora, como por exemplo o O_2^- tem sido relatado como mediador da infiltração e acúmulo de neutrófilos no local da inflamação, além de estar envolvido na mobilização do ácido araquidônico. O H_2O_2 parece estar relacionado com a quimioatração de neutrófilos, rolamento de leucócitos, ativação de linfócitos T, indução da angiogênese e na mobilização do ácido araquidônico (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana e a conseqüente morte celular. Também os radicais livres podem reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da

célula. Finalmente, quando os ácidos nucléicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese proteica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento de processos do tipo tumoral (Roessner *et al.*, 2008). Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com retocolite ulcerativa (Gitnick 1996).

As doenças inflamatórias intestinais são caracterizadas pela presença de neutrófilos e macrófagos, que quando ativados liberam radicais livres, estes causam destruição de mucina o que permite a entrada de bactérias na lamina própria intestinal. Esse fato promove a migração de mais células fagocíticas e conseqüentemente a liberação de mais moléculas reativas de oxigênio, além da liberação de toxinas, que juntos causam a degradação da collagenase e do ácido hialurônico. A degradação destas enzimas somada com a peroxidação lipídica, causada pelos radicais livres, atuam como os principais responsáveis pelo desenvolvimento da ulceração da mucosa intestinal (Dagli *et al.*, 1997).

De fato, é incontestável a forte relação existente entre o aumento nos níveis de radicais livres na DII, seja esta experimental ou em humanos (Kruidenier & Verspaget, 2002). Em adição, estudos sugerem que o dano intestinal nestas doenças está relacionado com o aumento da produção de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes endógenas (Koutroubakis *et al.*, 2004). Wendland *et al.*, (2001) observaram uma correlação entre a severidade das doenças inflamatórias intestinais e o estresse oxidativo, enquanto Lih-Brody *et al.*, (1996) comprovaram a existência de alterações nos níveis oxidativos de biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade.

4.3 Antioxidantes

Com base no exposto acima, fica fácil observar que a produção excessiva ou o descontrole na regulação dos radicais livres está relacionado com doenças inflamatórias. Portanto, é essencial que as células e os tecidos possuam um sistema de defesa para

controlar os níveis de radicais livres e evitar esses processos inflamatórios. Para isso as células dispõem de um sistema de defesa antioxidante que pode ser classificado como enzimático ou não-enzimático (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos estão incluídos os compostos da dieta que são encontrados em frutas, vegetais e extratos de plantas, alguns minerais como zinco, vitamina E, C e os flavonóides. Adicionalmente, o organismo humano em especial o intestino, produz ou já contém uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos dentre os quais podemos citar a glutatona, a metalotioneína, o ácido úrico e algumas proteínas do plasma como o α -tocoferol, a bilirrubina e o ubiquinol (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O sistema de defesa enzimático está presente nas células de mamíferos e consiste no mais importante componente de defesa contra radicais livres. Entre as principais enzimas deste sistema estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPO) (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Em condições fisiológicas a atividade destas enzimas antioxidantes é precisamente balanceada para manter um baixo e controlado nível de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Qualquer desbalanço ou uma resposta ineficiente de antioxidantes endógenos na mucosa de pacientes com DII, podem contribuir para a patogênese e a perpetuação do processo inflamatório (Kruidenier *et al.*, 2003). De fato, esse mesmo estudo demonstra que quantificações em mucosa de pacientes com DC e RCU apresentaram um aumento na atividade de CAT e GPO e uma redução na concentração de metalotioneína. Buffintom & Doe (1995) também demonstraram uma redução nos níveis de urato, glutatona reduzida e total e ubiquinol-10 em pacientes com DII.

Com base no exposto, a inibição ou neutralização dos radicais livres, juntamente com a ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, pode ser benéfico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (Nielsen & Rask-Madsen, 1996), sendo esta uma importante abordagem para a pesquisa de novos fármacos.

5 Principais tratamentos farmacológicos disponíveis

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais, inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores, imunomoduladores (Yamamoto-Furusho, 2007) e a terapia biológica (Morrison *et al.*, 2009). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII, sendo que os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os corticosteróides, e/ou são de alto custo, como por exemplo, o infliximabe, aspectos que limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes.

No Brasil, os medicamentos mais utilizados no tratamento destas doenças são os aminossalicilatos e os glicocorticóides, e menos frequentemente, os imunomoduladores ou a terapia biológica (Dewulf 2005; Biondo-Simões *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2002).

Os aminossalicilatos compreendem a classe dos derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), que possuem como representantes principais a sulfassalazina, balsalazina, olsalazina e mesalazina. Esses fármacos consistem na associação de sulfapiridina com o ácido 5-aminosalicílico unidos por uma ligação do tipo azo.

A sulfassalazina é o fármaco de primeira escolha nos casos leves ou moderados de retocolite ulcerativa, na prevenção da ocorrência de recidiva (Morrison *et al.*, 2009) e nos casos leves de DC (Navarro & Hanauer, 2003). O seu mecanismo de ação está relacionado à atividade antiinflamatória, promovida pela inibição da síntese de prostaglandinas, bem como à sua propriedade antioxidante (Peppercorn, 1994).

Apesar da sulfassalazina ser amplamente utilizada para o tratamento da retocolite ulcerativa, seu uso é limitado devido ao grande número de efeitos colaterais que apresenta. Estes efeitos compreendem desde dores de cabeça, náuseas e anorexia, os quais estão relacionados aos níveis séricos de sulfapiridina, até dispepsia, reações alérgicas, febre, hemólise, neutropenia e anemia (Ransford & Langman, 2002), sendo que grande parte destes efeitos podem ser revertidos com a diminuição da dose de sulfassalazina, o que também diminui sua eficácia. Existe também uma variedade de

reações de hipersensibilidade, que incluem hepatite, pancreatite, pneumonia, pericardites e neuropatia periférica que acarretam na descontinuação do uso deste fármaco (Peppercorn, 1994). Em adição, efeitos hepato- e nefrotóxico (Linares *et al.*, 2009) e de promoção de infertilidade masculina (Alonso *et al.*, 2009) estão associados ao uso deste fármaco.

6 A busca de novos compostos para o tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais

De acordo com as informações apresentadas, novos compostos com atividade antioxidante representam uma importante estratégia de obtenção de novos fármacos ativos para a DII. De fato, inúmeros estudos demonstram os efeitos benéficos de diferentes compostos com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de colite, incluindo flavonóides como a quercetrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002), rutosídeo (Gálvez *et al.*, 1997), silimarina (Cruz *et al.*, 2001), morina (Ocete *et al.*, 1998; Gálvez *et al.*, 2001), diosmina (Crespo *et al.*, 1999) e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), além da vitamina E (Gonzalez *et al.*, 2001) e do tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

Os flavonóides constituem um importante grupo de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos na natureza e que manifestam uma importante atividade antioxidante (Cook & Saman, 1995; Formica & Regelson, 1994), além de terem a capacidade de inibir algumas enzimas cuja atividade se encontra aumentada em processos inflamatórios, assim como modular a atividade de células do sistema imune (Middleton & Kandaswami, 1993). Em definitivo, os flavonóides são capazes de afetar três dos fatores chaves do processo de inflamação intestinal: geração de radicais livres, metabolismo de eicosanóides e o sistema imune intestinal.

Considerando-se a atividade antioxidante e as similaridades químicas com os flavonóides, especialmente quanto ao padrão de substituição de hidroxilas em seus distintos anéis e as atividades farmacológicas relatadas, as cumarinas foram selecionadas

para estudo por nosso laboratório como potenciais compostos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

As cumarinas compreendem uma grande classe de compostos fenólicos encontrados principalmente em plantas, mas com ocorrência em fungos e bactérias. Também denominadas de benzopironas, as cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo o principal representante a 1,2-benzopirona, denominada simplesmente de cumarina. Estes constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias (Hoult & Payá, 1996).

Assim como os flavonóides, as cumarinas são extremamente variáveis em sua estrutura, e os diferentes substituintes na molécula básica, podem influenciar a sua atividade biológica. Algumas cumarinas já foram estudadas e demonstraram importantes atividades farmacológicas, como por exemplo, a escoparona que possui descrita atividade imunossupressora, hipolipidêmica, hipotensora e relaxante vascular (Hoult & Payá, 1996). Além disso, é descrito que cumarinas contendo grupos di-hidroxilados em posição orto como a fraxetina (7,8-di-hidróxi-6-metoxi-cumarina), esculetina (6,7-di-hidróxi-cumarina) e 4-metilesculetina (6,7-di-hidróxi-4-metilcumarina) são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro (Kuster & Rocha, 2000). Vários derivados cumarinícos são descritos por sua atividade anticoagulante, antitumoral, antiviral, antiinflamatória e antioxidante, bem como por sua atividade antimicrobiana e de inibição enzimática (Riviero *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Di Stasi *et al.*, (2002, 2004) caracterizou a atividade antiulcerogênica e antiinflamatória da paepalantina, uma isocumarina isolada da espécie *Paepalanthus bromelioides* (Família Euriocaulaceae). Nestes estudos, observou-se uma potente atividade antiulcerogênica, especialmente contra úlceras induzidas por etanol e etanol-ácido clorídrico (Di Stasi *et al.*, 2002), assim como um importante efeito

preventivo da colite experimental aguda e crônica induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos (Di Stasi et al., 2004).

Com base no exposto, iniciou-se em nosso laboratório um estudo para avaliar a atividade antioxidante de 14 cumarinas no modelo de peroxidação lipídica induzida por ferro-ácido ascórbico em membranas de cérebro de ratos. Esse estudo demonstrou que esculetina e 4-metilesculetina possuem um dos menores valores de concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da peroxidação lipídica, com valores de 36,85 e 16,07µM respectivamente (Witaicenis et al., 2010).

De fato, esculetina e 4-metilesculetina são dois derivados cumarínicos descritos como os compostos com melhor atividade antioxidante (Payá et al., 1992, Sharma et al., 2005), além de possuírem descrita atividade antiinflamatória por inibirem a via da lipooxigenase e ciclooxigenase por um mecanismo não-competitivo (Sekiva et al., 1982). Essas substâncias, especialmente esculetina, possuem várias propriedades farmacológicas descritas, ressaltando a atividade antioxidante por diferentes mecanismos e envolvendo vários radicais livres, conforme demonstrado por diversos estudos.

Esculetina possui a propriedade de diminuir a formação de MDA (malonildialdeído) induzida por *t*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), eliminar o radical livre DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil) (Lin et al., 2000), proteger o DNA contra o estresse oxidativo (Kaneko et al., 2003), inibir o radical hidroxila e os radicais livres intracelulares promovendo a proteção do DNA contra a ação do H₂O₂ (Kim et al., 2008), inibir a xantina oxidase e os radicais livres (Lin et al., 2008). Além destas atividades, esculetina protege os animais de hepatotoxicidade causada por *t*-BHP, por diminuir a infiltração de neutrófilos e manter os níveis de glutatona (Lin et al., 2000); inibe a síntese de tromboxano B₂, de ânion superóxido dependente de neutrófilos (Egan et al., 1990), a agregação plaquetária (Okada et al., 1995), a atividade das metaloproteinases (Watanabe et al., 1999). Possui ainda efeitos como: imunomodulador em macrófagos e linfócitos murinos *in vitro* e *in vivo* (Leung et al., 2005), inibidor de crescimento (Wang et al., 2002) e indutor de apoptose (Park et al., 2009) de células leucêmicas humanas e de células adiposas (Yang et al., 2006), inibidor da morte de neurônios motores *in vitro* (Barber et al., 2009) e do

crescimento de células SAS de câncer oral (Kok *et al.*, 2009), redutor da fibrose subepitelial e dos níveis de TGF- β 1 no pulmão (Mabalirajan *et al.*, 2009) e de inibir a expressão de NF- κ B e a ativação de proteína-1 (AP-1) (Pan *et al.*, 2003).

4-metilesculetina possui a atividade de inibir a proliferação de tumores subcutâneos e a síntese de ácido hialurônico em camundongos com câncer pancreático (Hajime *et al.*, 2007), promover o relaxamento de músculo liso, efeito este tanto mediado por prostaciclina (Bettini *et al.*, 1985) como por prostaglandina (Bettini *et al.*, 1983).

Com base nas atividades antioxidante e outras descritas, esculetina e 4-metilesculetina foram selecionadas para avaliação da atividade antiinflamatória no modelo de colite experimental. Nosso estudo preliminar avaliou a atividade destes dois derivados cumarínicos em diferentes doses no modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, nas fases aguda e crônica. Esse estudo demonstrou que essas substâncias, nas doses de 10 e 5mg/Kg, apresentaram atividade antiinflamatória neste modelo experimental e tal atividade está relacionada com a propriedade antioxidante e antiinflamatória destas substâncias (Witaicenis *et al.*, 2010).

Esses importantes resultados nos impulsionaram na continuação deste estudo, para comprovar a atividade antiinflamatória destes compostos, para tentar elucidar o mecanismo pelo qual elas estão agindo, além de comparar a eficácia e a potência destes dois derivados cumarínicos, com os dois fármacos de referência mais utilizados na DII em humanos, a sulfassalazina e a prednisolona, enfocando o perfil de respostas farmacológicas destes fármacos no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

7 O modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS)

Esse modelo experimental consiste na indução da inflamação intestinal por um processo químico. A idéia inicial deste modelo baseou-se na hipótese de que na DII

ocorre um aumento na permeabilidade da mucosa, que facilita a entrada de um antígeno luminal na lâmina própria, o qual não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico.

O método se baseia no uso de uma solução de TNBS em etanol 50%, na qual o etanol agiria como um “rompedor de barreira”, enquanto que o ácido TNBS, atuaria com um hapteno, que ao associar-se com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, seria capaz de desencadear uma resposta imunológica (Gonçalves *et al.*, 2008). O TNBS associado ao etanol promove o desenvolvimento de uma inflamação severa, transmural e granulomatosa no cólon distal, sendo um modelo útil tanto para o estudo da etiopatogênese da inflamação intestinal, como para o estudo de novas drogas para o tratamento dessas doenças.

Esse modelo experimental é considerado o mais adequado para o estudo de novos compostos ativos na doença inflamatória intestinal, sendo a técnica mais adequada por simular de forma muito parecida o que ocorre com a DII em humanos (Jurjus *et al.*, 2004).

Histologicamente, a inflamação produzida pelo TNBS é caracterizada pela presença de úlceras focais, distorção das criptas, depleção das células caliciformes, presença de granulomas (Foligné *et al.*, 2006), espessamento da parede intestinal, edema, infiltração de células inflamatórias e necrose. Bioquimicamente, é observado um aumento da atividade de enzimas como a mieloperoxidase (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2007) e a fosfatase alcalina (Sánchez de Medina, 2004), além do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2007) e de interleucinas, bem como alterações nos sistemas antioxidantes da mucosa intestinal.

Segundo Strober *et al.*, (1998), após ser administrada, a solução de TNBS/etanol é apresentada para as células T pelas células apresentadoras de antígeno da lâmina própria. A presença e o reconhecimento do TNBS promove a secreção de IL-12 e indução da resposta das células Th1, que produz principalmente INF- γ , este por sua vez age nos macrófagos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que desencadeiam imediatamente o processo inflamatório (Figura 2). Além destes,

vários mediadores inflamatórios estão envolvidos nesta resposta como prostaglandinas E2, tromboxano B2, leucotrieno B4 e C4 e outras interleucinas (Zheng *et al.*, 2000).

A colite induzida pelo TNBS é um importante modelo experimental de inflamação da mucosa intestinal, porque permite o estudo dos eventos iniciais da inflamação e a análise da resposta imune da mucosa desencadeada por um antígeno específico (Strober *et al.*, 2002), possibilitando a avaliação de novos compostos, úteis tanto para o tratamento da DC como da retocolite ulcerativa, permitindo avaliar diversos mediadores envolvidos na resposta inflamatória.

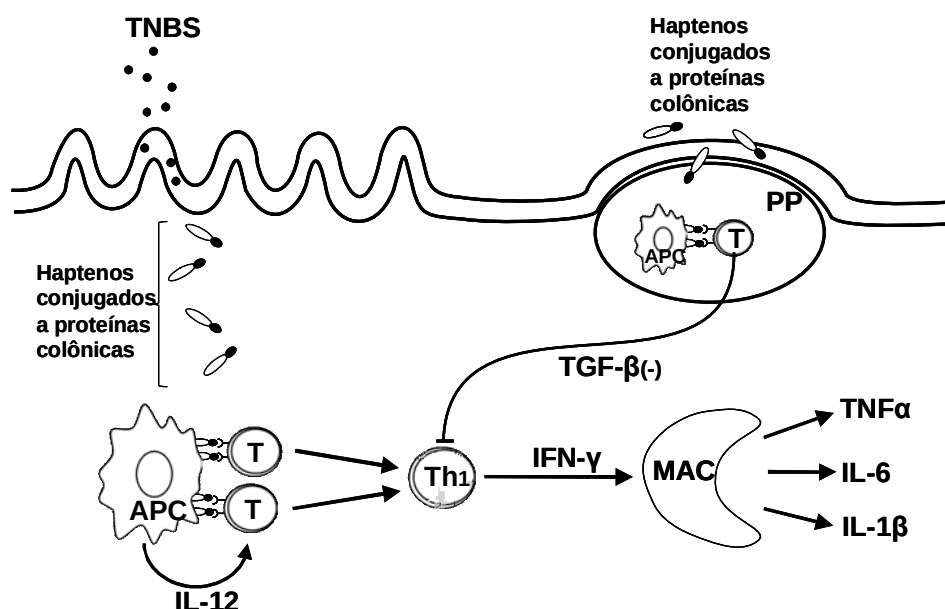


Figura 2. Mecanismo de indução da doença inflamatória intestinal pelo TNBS.

APC = célula apresentadora de antígeno; PP = Placa de Peyer; T = células T; MAC= macrófago. (adaptada de Strober *et al.*, 1998)

Objetivos

Com base no exposto os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar os efeitos antiinflamatórios de dois derivados cumarínicos (escopoletina e fraxetina), na fase aguda e na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal;
2. Comparar os resultados desses dois derivados cumarínicos (eficácia e potência) com o fármaco de referência no tratamento de DII em humanos; a sulfassalazina;
- 3 Avaliar comparativamente os efeitos destes 3 compostos sobre os parâmetros macroscópicos e bioquímicos envolvidos no processo inflamatório colônico.

Material e Métodos

1. Animais

Ratos machos albinos da Cepa Wistar de 180 a 220g de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo foram utilizados para os testes de atividade antiinflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos ficaram alojados em caixas, separados por grupo, com no máximo 6 animais por caixa e foram alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n. 42/04 – CEEA).

2. Substâncias testes e desenho experimental

Escopoletina (7-hidroxi-5-metoxicumarina), Fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) e sulfassalazina, ilustrados na figura 3, foram obtidas da Sigma, solubilizadas em etanol 5%, preparadas diariamente e usadas neste estudo conforme protocolo experimental descrito abaixo.

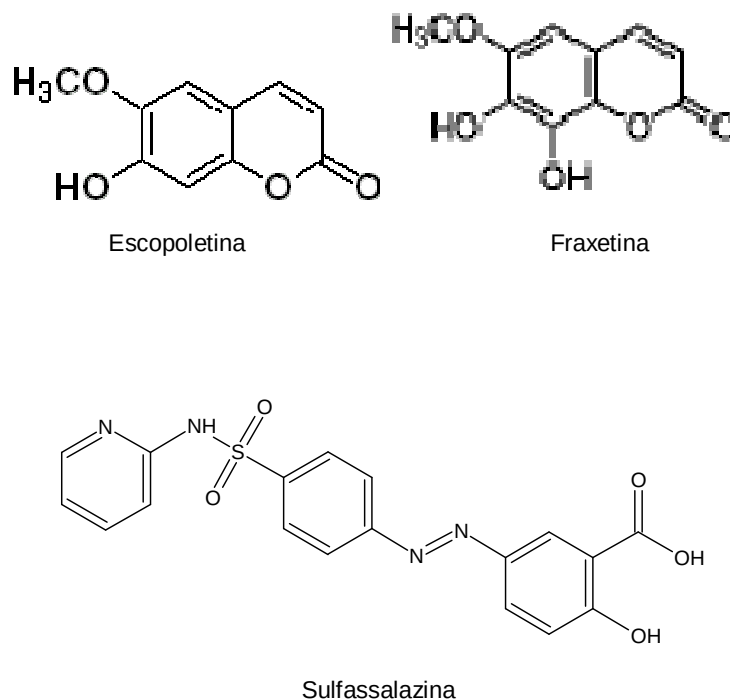


Figura 3. Estrutura química das substâncias testes.

2.1 Avaliação da atividade de escopoletina, fraxetina e sulfassalazina na fase aguda do processo inflamatório intestinal.

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 escopoletina 5mg/kg, 10mg/kg e 25mg/kg
 - C2. Animais tratados com fraxetina 5mg/Kg, 10mg/kg e 25mg/kg
- D. Grupo com o fármaco:
 - D. Animais tratados com sulfassalazina 25mg/Kg

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.*, (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados em câmara de gás CO₂ para sacrifício de roedores.

Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25ml de uma solução de 10mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foram realizados às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite. Os animais dos grupos controle e branco receberam metilcelulose 1% por via oral e 24 horas após a indução. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório.

2.2 Avaliação da atividade de escopoletina, fraxetina e sulfassalazina na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal.

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

E. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento

F. Grupo controle:

animais com colite e sem tratamento

animais com colite e sem tratamento e sem indução da recidiva (CSR)

G. Grupos com os compostos-testes:

C1. Animais tratados com escopoletina 5mg/kg

C2. Animais tratados com fraxetina 5mg/Kg

H. Grupo com o fármaco:

I. Animais tratados com sulfassalazina 25mg/Kg

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.*, (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados em câmara de gás CO₂ para sacrifício de roedores.

Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25ml de uma solução de 10mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

Na fase crônica com recidiva, os tratamentos (todos por via oral) foram iniciados 2 horas após a primeira administração de TNBS e continuaram até o dia da morte dos animais. Seis animais de cada grupo colítico e cinco do grupo branco foram mortos após 7, 14 e 21 dias a partir da primeira indução da colite, enquanto todos os animais do grupo colítico sem recidiva foram mortos apenas após 21 dias. A segunda administração de TNBS (recidiva) foi realizada no 14º dia após a primeira administração, nos animais que foram sacrificados no 21º dia, excetuando-se o grupo branco e o grupo controle sem recidiva.

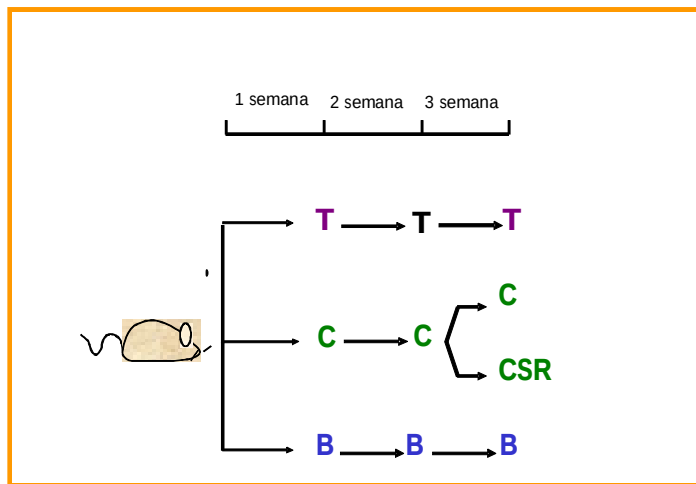


Figura 4. Desenho experimental. **B** (grupo branco; ratos não colíticos); **C** (grupo controle; ratos colíticos); **CSR** (grupo controle sem recidiva; ratos colíticos que não receberão uma segunda administração de TNBS); **T** (grupo tratado; ratos colíticos tratados com escopoletina, fraxetina e sulfassalazina).

3. Avaliação do processo inflamatório intestinal

Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

3.1. Avaliação macroscópica

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento e ganho de peso corporal. Na análise macroscópica foram avaliados o peso e o comprimento do cólon e a análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995.

Tabela 1. Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
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 prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 7 fragmentos longitudinais, três deles foram congelados a -80°C para determinação de proteínas e a atividade da fosfatase alcalina, mieloperoxidase, enquanto um fragmento foi processado para determinação dos níveis de glutathione total.

3.2. Determinações bioquímicas

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo estes realizados a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de teflón e um recipiente de vidro de 10ml de capacidade.

A. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz *et al.*, (1984) e os resultados expressos

como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C. A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

B. 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 da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à 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 conseqüente incremento de absorbância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

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

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por Smith *et al.*, (1985) e Bessey *et al.*, (1946), respectivamente.

4. Análise estatística

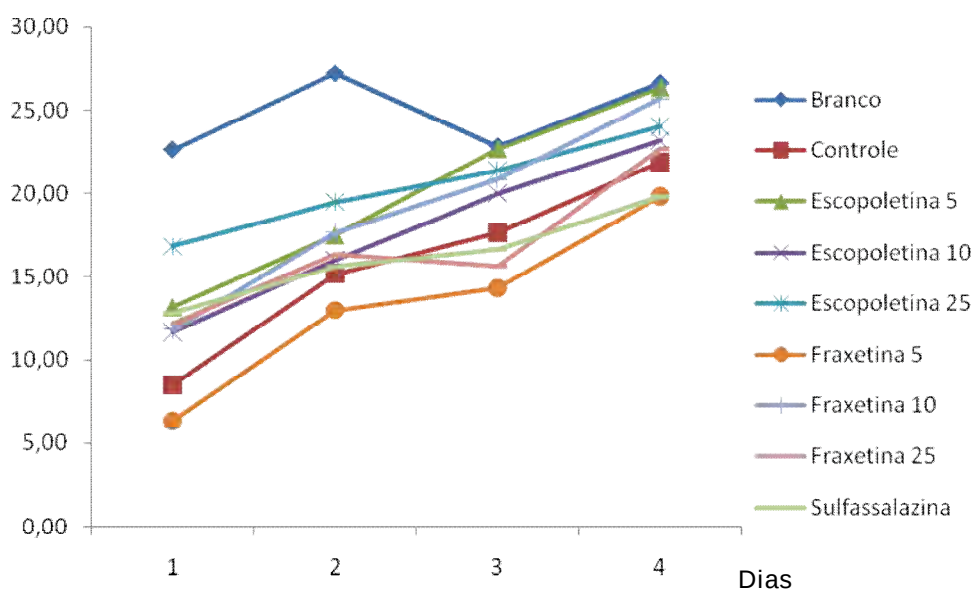
Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Dados descontínuos foram testados por ANOVA seguida por teste de Dunnet. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

Resultados

1. Resultados modelo experimental de fase aguda

1.1 Consumo diário de Ração

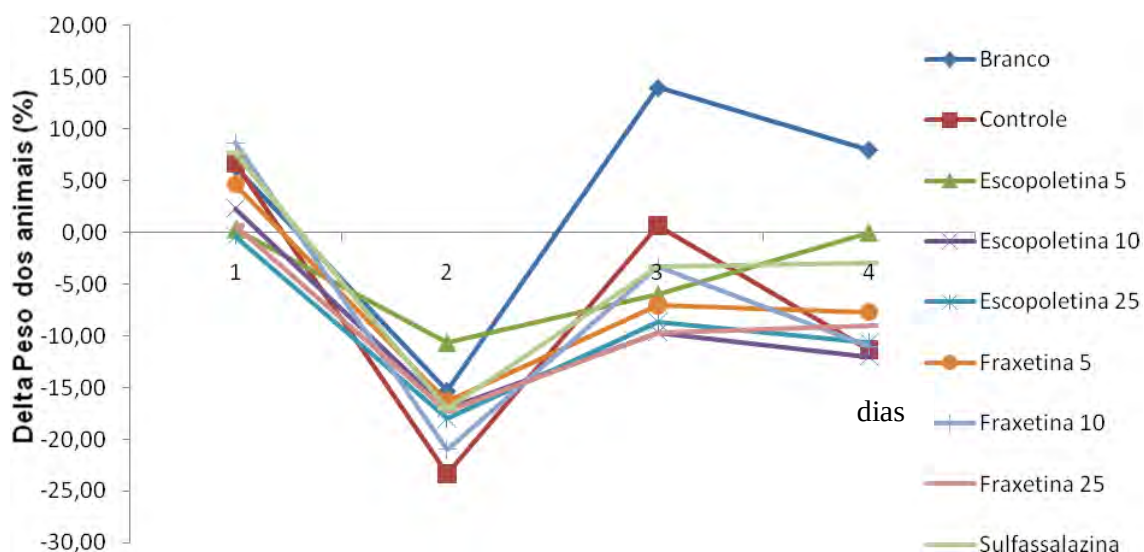
Após a administração do TNBS, o consumo de alimento fica reduzido, sendo que os animais do grupo branco (não colítico) aumentaram o consumo após o jejum e diferem na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais tratados aumentaram o consumo de alimento ao longo dos dias.



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.

1.2 Ganho de peso corporal

Os animais do grupo branco perderam peso no segundo dia do tratamento devido à indução de colite, mas recuperaram o peso com o passar dos dias; ao contrario dos animais que receberam a indução de colite por TNBS.



Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do $(\text{Peso final} - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial} \pm \text{E.P.M.}$ com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparados com o grupo controle TNBS.

1.3 Avaliação macroscópica

A administração intracolônica de TNBS resulta em inflamação no epitélio colônico, que pode ser evidenciada após 48 horas com uma necrose na camada mucosa, essa lesão estende-se por 3.8 – 5.8 cm ao longo do cólon, e promove a ocorrência de espessamento e hiperemia na parede intestinal. Esses parâmetros foram analisados e expressos em forma de escore, e os resultados podem ser observados na tabela. Os animais do grupo sulfassalazina tiveram o escore diminuído em relação ao grupo controle. Em relação a extensão da lesão os animais dos grupos fraxetina 10mg/kg e sulfassalazina tiveram uma menor

lesão do que o grupo controle. Somente o grupo branco teve uma relação peso/comprimento menor em comparação ao grupo controle.

Grupo	escore^a (0-10)	Extensão da lesão^b (cm)	Relação peso/comprimento (mg/cm)
Não colítico (5)	0 ***	0 **	74.33 ± 3.29 **
Controle (6)	8 (7-10)	4.90 ± 0.18	144.00 ± 6.45
Fraxetina - 5 mg/Kg (6)	9 (8-9)	4.89 ± 0.56	127.51 ± 7.52
Fraxetina - 10 mg/Kg (6)	7.5 (3-8)	3.13 ± 1.03 *	136.04 ± 20.9
Fraxetina - 25 mg/Kg (6)	8.5 (7-9)	4.83 ± 0.38	131.77 ± 2.81
Escopoletina - 5 mg/Kg (6)	7 (1-9)	3.56 ± 0.96	135.28 ± 14.7
Escopoletina - 10 mg/Kg (6)	8 (7-9)	4.68 ± 0.25	136.98 ± 7.95
Escopoletina - 25 mg/Kg (6)	8 (7-10)	4.88 ± 0.49	131.05 ± 7.43
Sulfassalazina - 25 mg/Kg (6)	6 (2-10) *	2.39 ± 0.36 **	130.10 ± 8.57

O escore é expresso como mediana (range). Extensão da lesão e relação peso comprimento são expressos como média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

1.4 Determinações Bioquímicas

Nos parâmetros bioquímicos avaliados os animais tratados com escopoletina 5 mg/kg e 25 mg/kg foram os que tiveram melhor resultado significativo em relação ao grupo branco, além dos animais tratados com sulfassalazina; em relação a GSH. Somente o grupo sulfassalazina teve resultado significante para MPO. Já na fosfatase alcalina os grupos escopoletina 5 mg/kg e fraxetina 10 e 25mg/kg tiveram resultado significante.

Tabela. Efeitos do tratamento dos derivados cumarínicos e sulfassalazina na glutathiona (GSH), mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase aguda de colite induzida por TNBS.

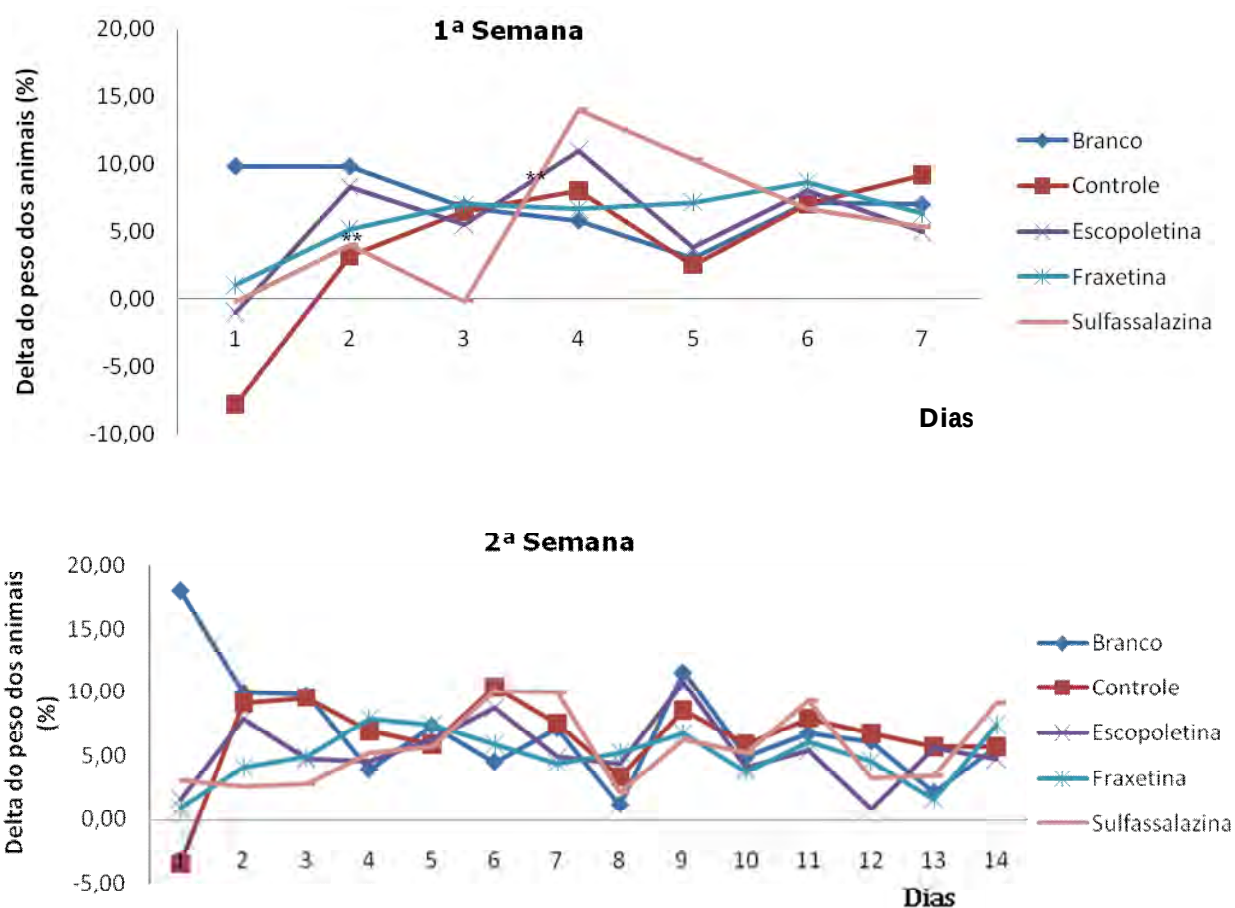
Group (n)	GSH (nmol/g)	MPO (U/g)	FA (U/mg proteína)
Não colítico (5)	2120.79 ± 92.82**	93.37 ± 5.83**	6.24 ± 0.64**
Controle (10)	1177.25 ± 40.49	653.49 ± 80.99	17.03 ± 1.31
Fraxetina - 5 mg/Kg (6)	1547.39 ± 124.6*	500.23 ± 52.89	14.34 ± 1.43
Fraxetina - 10 mg/Kg (6)	1500.77 ± 81.16*	649.99 ± 200.5	11.78 ± 2.25*
Fraxetina - 25 mg/Kg (6)	1340.85 ± 123.6	646.35 ± 111.1	11.44 ± 0.97*
Escopoletina - 5 mg/Kg (6)	1703.69 ± 102.16**	449.81 ± 102.6	8.10 ± 0.80**
Escopoletina - 10 mg/Kg (6)	921.73 ± 54.99	499.64 ± 50.21	15.09 ± 1.44
Escopoletina - 25 mg/Kg (6)	1557.97 ± 91.21**	971.69 ± 230.4	13.39 ± 1.51
Sulfassalazina - 25 mg/Kg (6)	1594.57 ± 63.96**	391.34 ± 59.29*	13.87 ± 1.23

Os parâmetros bioquímicos são expressos como média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

2. Resultados modelo experimental de fase crônica com recidiva

2.1 Ganho de peso corporal

Na avaliação do ganho de peso corporal os animais dos grupos controle, escopoletina, fraxetina e sulfassalazina ganharam peso após a primeira semana de tratamento, já no final da segunda semana somente os animais do grupo fraxetina ganharam peso e no final da terceira semana todos os animais ganharam peso; pois no décimo quarto dia eles ficaram em jejum devido a indução da recidiva.



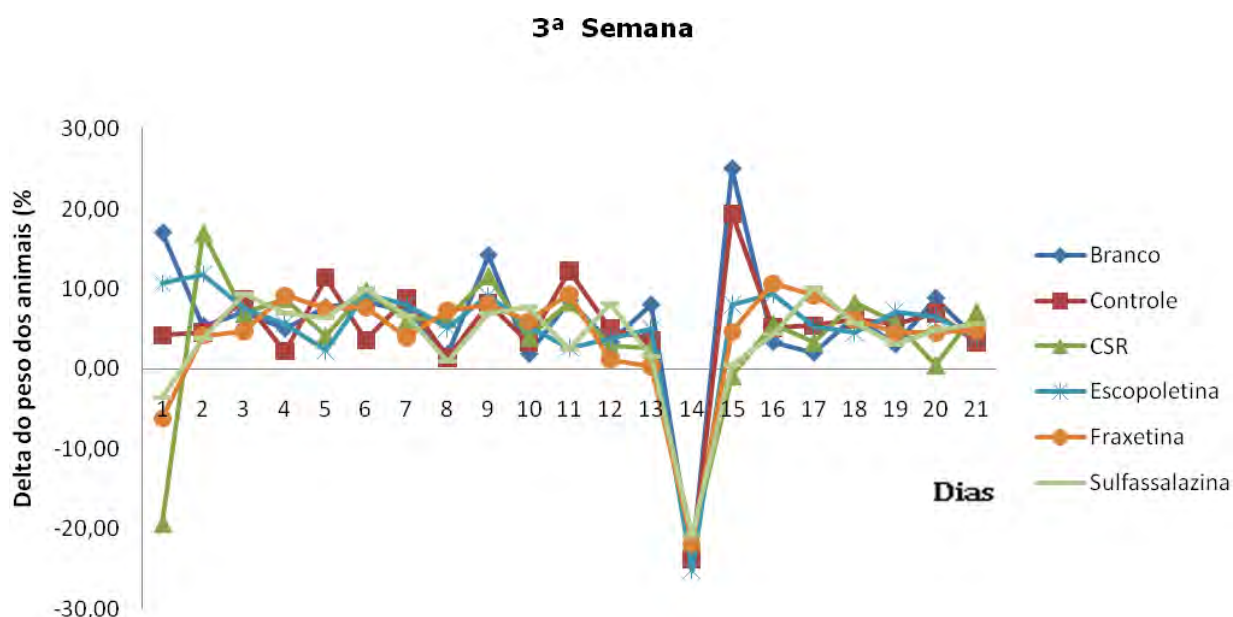


Figura 5: Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica com recidiva induzida por TNBS. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva, nos animais mortos na terceira semana. Dados expressos em média (Peso final - Peso inicial) X 100/ Peso inicial) $\pm$ E.P.M. com ** $p < 0.01$ comparados ao grupo controle TNBS.

2.2 Consumo diário de ração

Ao final da primeira semana todos os animais aumentaram o consumo de ração, no término da segunda semana somente os animais do grupo sulfassalazina não aumentaram o consumo de ração e no final da terceira semana todos os animais consumiram mais ração devido ao jejum no décimo quarto dia para a indução da recidiva.

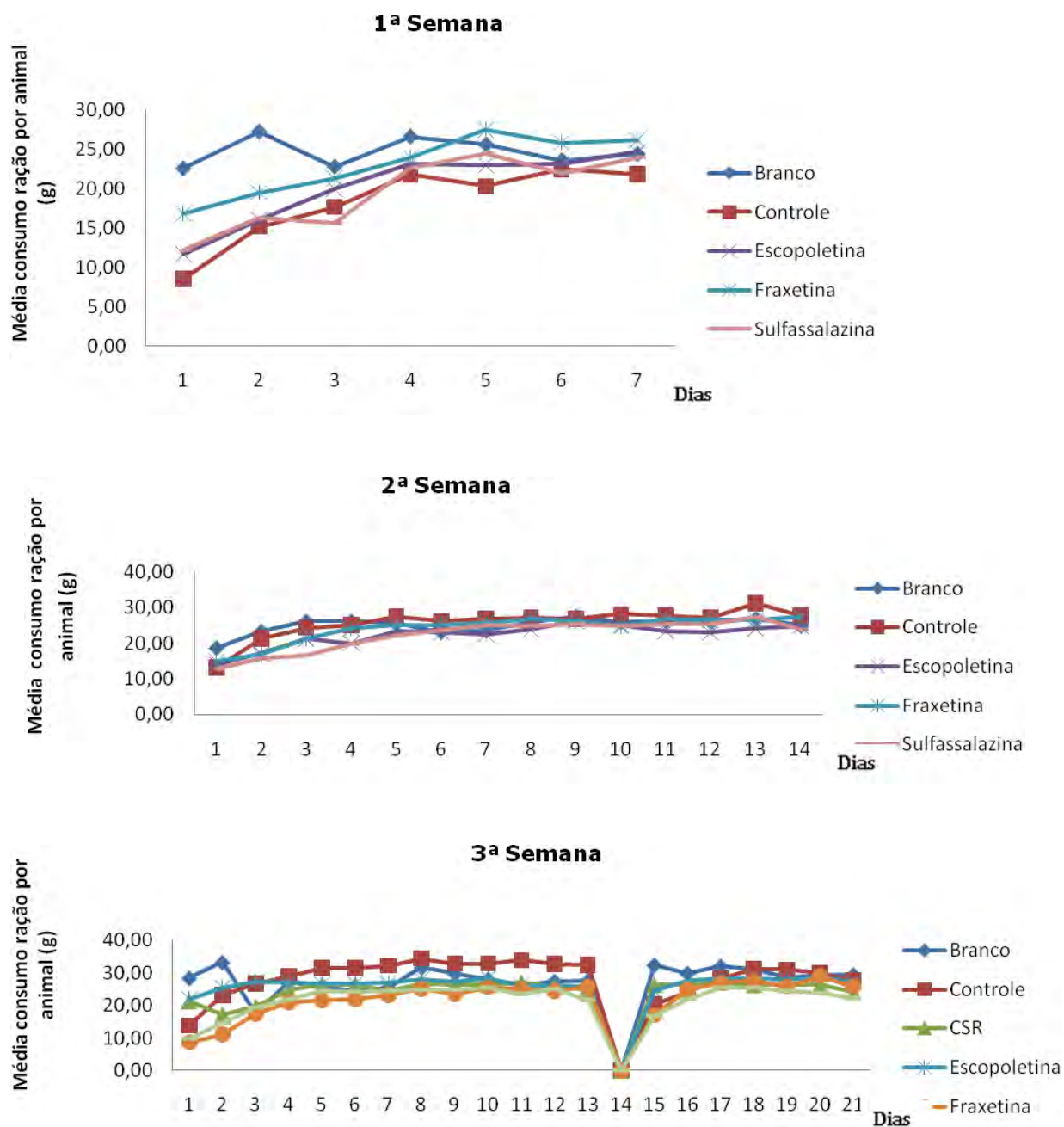


Figura 6: Avaliação do consumo médio de ração dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica, na primeira, segunda e terceira semanas após a administração do TNBS. Dados expressos em média de consumo por animal, em gramas. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva (jejum), nos animais mortos na terceira semana.

2.3 Avaliação macroscópica

O modelo crônico se caracteriza pela inflamação no epitélio colônico com a presença de necrose na camada mucosa. A ulceração e a inflamação no cólon do rato são caracterizadas pela doença na parede colônica, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, (observados pela atividade da mieloperoxidase) e formação de granulomas. No modelo experimental de doença inflamatória intestinal de fase crônica, quanto aos parâmetros macroscópicos na terceira semana de tratamento, foi possível observar que os animais tratados com escopoletina e sulfassalazina, além do grupo controle sem recidiva, apresentaram uma diminuição no escore macroscópico. Também na terceira semana, em relação a extensão da lesão, foi observado que os animais tratados com escopoletina, fraxetina e sulfassalazina, além do grupo controle sem recidiva tiveram uma diminuição na extensão da lesão. Já a relação peso/comprimento do cólon nas três semanas foi observada diferenças nos grupos brancos, escopoletina, fraxetina e sulafassalazina, além do grupo controle sem recidiva na terceira semana. Todos esses resultados foram comparados com o grupo controle colítico e estão expressos na tabela abaixo.

Tabela . Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos de escopoletina (5mg/Kg), fraxetina(5mg/Kg) e sulfassalazina (25mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS

Grupos	Escore (0-10)	Extensão (cm)	Relação peso comprimento (mg/cm)
1ª Semana			
Não Colítico	0 ***	0 **	84.14 ± 1.22 **
Controle Colítico	5.6 (4-8)	2.2 ± 0.70	180.04 ± 7.63
Escopoletina – 5mg/Kg	5.6 (4-8)	2.0 ± 0.39	112.66 ± 9.77 **
Fraxetina – 5mg/Kg	4.6 (1-8)	1.8 ± 0.70	130.17 ± 4.72 **
Sulfassalazina – 25mg/Kg	6.0 (5-7)	2.2 ± 0.29	194.33 ± 22.96 **
2ª Semana			
Não Colítico	0 ***	0 **	86.32 ± 3.85 **
Controle Colítico	4.8 (4-5)	1.8 ± 0.35	132.49 ± 6.81
Escopoletina – 5mg/Kg	3.3 (2-4)	1.2 ± 0.11	110.54 ± 7.16 **
Fraxetina – 5mg/Kg	3.6 (2-5)	1.1 ± 0.24	136.73 ± 3.23 **
Sulfassalazina – 25mg/Kg	4.1 (1-6)	1.5 ± 0.26	100.88 ± 6.29 **
3ª Semana			
Não Colítico	0 ***	0 **	78.99 ± 3.40 **
Controle Colítico	5.5 (2-7)	3.70 ± 0.40 ***	137.89 ± 6.70
CSR	2.4 (0-4) **	1.30 ± 0.38 ***	106.98 ± 3.45 **
Escopoletina – 5mg/Kg	3.0 (2-5) *	1.20 ± 0.37 ***	117.21 ± 8.59 **
Fraxetina – 5mg/Kg	5.1 (4-6)	1.46 ± 0.36 ***	131.68 ± 5.38 **
Sulfassalazina – 25mg/Kg	3.1 (2-5) *	0.70 ± 0.19 ***	116.18 ± 4.60 **

O escore é expresso como mediana (range). Extensão da lesão e relação peso comprimento são expressos como média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

2.4 Determinações Bioquímicas

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, somente a atividade da fosfatase alcalina teve diferença significativa na terceira semana de tratamento entre os animais do grupo controle colítico, controle sem recidiva e não colítico. As atividades da glutathiona total e da mieloperoxidase não tiveram diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela. Efeitos do tratamento dos derivados cumarínicos e sulfassalazina na glutathiona (GSH), mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase crônica com recidiva de colite induzida por TNBS

Grupo	GSH	MPO	Fosfatase Alcalina
1ª Semana			
Não colítico	1583,33 ± 65,49	140,60 ± 9,075	8,150 ± 0,889
Controle colítico	1512,99 ± 114,8	518,47 ± 155,9	14,05 ± 1,125
Escopoletina- 5 mg/Kg	1502,75 ± 102,2	779,06 ± 219,9	12,65 ± 2,329
Fraxetina- 5 mg/Kg	1613,82 ± 95,62	421,42 ± 144,8	11,74 ± 1,329
Sulfassalazina- 25mg/Kg	1852,50 ± 133,6	602,03 ± 154,6	14,22 ± 2,020
2ª Semana			
Não colítico	1454,35 ± 102,8	144,62 ± 11,76	6,52 ± 0,763
Controle colítico	1453,27 ± 37,86	166,46 ± 28,06	9,90 ± 1,176
Escopoletina- 5 mg/Kg	1469,72 ± 96,42	175,80 ± 14,26	9,26 ± 0,664
Fraxetina- 5 mg/Kg	1526,00 ± 131,1	261,78 ± 84,06	9,37 ± 1,727
Sulfassalazina- 25mg/Kg	1274,66 ± 119,1	195,33 ± 28,74	9,90 ± 2,051
3ª Semana			
Não colítico	1503,96 ± 116,4*	133,71 ± 9,065	5,66 ± 1,112
Controle colítico	1187,23 ± 42,39	278,49 ± 39,25	14,60 ± 2,045
CSR	1365,43 ± 145,8*	198,95 ± 37,92	6,63 ± 0,926
Escopoletina- 5 mg/Kg	1576,09 ± 54,02	169,71 ± 50,65	9,02 ± 1,523
Fraxetina- 5 mg/Kg	1380,46 ± 50,94	378,30 ± 44,71	16,31 ± 1,938
Sulfassalazina- 25mg/Kg	1896,38 ± 127,6	204,26 ± 29,96	16,34 ± 1,522

Os parâmetros bioquímicos são expressos como media ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

Discussão

O processo inflamatório intestinal envolve uma série de eventos celulares e moleculares que resultam no aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade capilar. Esse fato promove o extravasamento de granulócitos, especialmente leucócitos polimorfonucleares. A migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico, bradicinina e as citocinas presentes em macrófagos, linfócitos, e outros tipo de células, servem para iniciar, coordenar e amplificar o processo inflamatório. Esses agentes pró-inflamatórios promovem a aderência dos fagócitos no endotélio vascular e o extravasamento destas células para a mucosa intestinal e, posteriormente, a ativação destes fagócitos origina a liberação de radicais livres.

Os radicais livres oriundos do processo inflamatório apresentam um papel chave na regulação da inflamação intestinal e na ausência de mecanismos de defesa antioxidantes, promovem um aumento da lesão, depleção dos níveis de glutathione e das enzimas de detoxificação, como a fosfatase alcalina (Dryden *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo é um potencial mecanismo de lesão tecidual que contribui para a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, o que reforça a pesquisa de novos compostos com atividade antioxidante como novas terapias para o tratamento destas doenças (McKenzie *et al.*, 1996), portanto estratégia para inibir os radicais livres, seja na produção de enzimas que agem diretamente na produção destes, ou seqüestrando os que já foram produzidos, ou ainda aumentando a produção de compostos antioxidantes pelas células intestinais (Dryden *et al.*, 2005), são um importante ponto de partida na busca de novos medicamentos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Assim como observado na DII em humanos, o modelo experimental de colite induzida pelo TNBS promove um aumento da peroxidação lipídica (Loguercio *et al.*, 2003), como observado nesse estudo na fase aguda em animais que sofreram indução de colite por TNBS, porém somente os animais tratados com a droga de

referência sulfassalazina tiveram os níveis de MPO diminuídos. Na fase crônica com recidiva as substâncias testadas e nem mesmo a sulfassalazina diminuíram os níveis de mieloperoxidase.

Outro fator que confirma a presença de estresse oxidativo na mucosa colônica no processo inflamatório intestinal é a depleção dos níveis de glutatona, como observado em humanos (Sido *et al.*, 1998; Lauterburg *et al.*, 1988) e em modelos experimentais (Pavlick *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 1997; Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Loguercio *et al.*, 1996; Buffinton & Doe, 1995). A glutatona (GSH) é um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina sendo um dos mais abundantes agentes antioxidantes biológicos e que serve de substrato para a glutatona peroxidase (GP_x) e a glutatona S-transferase. A GSH em sua forma reduzida possui um grupo sulfidril, que pode atuar seqüestrando radicais livres como o O₂⁻, peroxinitrito e hidroperóxidos lipídicos, além disso, está relacionada diretamente com o processo de reparação da lesão oxidativa no DNA e proteção contra moléculas reativas de oxigênio e citocinas que induzem a apoptose (Kruidenier & Verspaget, 2002). A GSH é predominantemente a primeira defesa antioxidante intracelular contra os produtos tóxicos de oxigênio, particularmente na mitocôndria, local onde ocorre a maior síntese desses radicais (Deleve & Kaplowitz, 1991). Após a exposição da GSH em sua forma reduzida ao agente oxidante, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ocorre sua oxidação à sua forma oxidada (GSSG), cuja reação é catalisada pela glutatona peroxidase (GP_x). A recuperação da GSSG é feita pela enzima glutatona redutase (GSHred), na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para manutenção da integridade do sistema protetor celular (Wang & Ballatori, 1998). O nível intracelular de GSH é regulado pelo equilíbrio entre sua utilização e síntese (Halliwell & Gutteridge, 1984). Sob condições fisiológicas, a GSHred mantém mais de 98% da GSH intracelular na forma reduzida (Wang & Ballatori, 1998). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, há recuperação da GSH,

entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que acarreta em estresse oxidativo (Shan *et al.*, 1990; Gilbert, 1990; Halliwell, 1993). Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela glutatona total (GSH+GSSG). Estudos demonstram que os níveis de GSH colônica são significativamente depletados na retocolite ulcerativa e na doença de Crohn, quando comparados com o grupo controle de pacientes normais ou com essas doenças em fase inativa (Karp & Koch, 2006). Outros estudos também confirmam a diminuição nos níveis de GSH em sua forma reduzida na DII (Holmes *et al.*, 1998) e o aumento da GSH em sua forma oxidada em pacientes com retocolite ulcerativa ativa (Sido *et al.*, 1998). É relatado que o nível de GSH reduzida na mucosa de pacientes com DII é 27% menor do que de pessoas saudáveis (Buffinton & Doe, 1995). A potencial importância da glutatona na doença inflamatória intestinal tem sido demonstrada em modelos animais, que sugerem que a depleção de GSH altera a função das células T e dos macrófagos (Karp & Koch, 2006). Além disso, existem outras evidências de que a GSH e enzimas associadas atuam na imunidade celular. Por exemplo, níveis de GSH e células apresentadoras de antígeno determinam se a resposta imune predominante é do tipo Th1 ou Th2, porém as bases moleculares desta diferenciação ainda não são conhecidas (Townsend *et al.*, 2003). Outros estudos experimentais também associam a atividade antiinflamatória de seus compostos com a propriedade destes em evitarem a depleção nos níveis de GSH colônica (Gálvez *et al.*, 2006; Di Stasi *et al.*, 2004; González *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 1998; Ocete *et al.*, 1998; Sánchez de Medina *et al.*, 1996). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os níveis de glutatona não foram depletados nos animais que sofreram indução de colite por TNBS na fase aguda e tratados com escopoletina 5mg/kg, 25mg/kg e sulfassalazina. Já na fase crônica com recidiva nenhum grupo tratado teve o nível de glutatona diminuído. Outro resultado reforça a atividade antiinflamatória das

substâncias testes, a inibição da atividade da fosfatase alcalina. A Fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e compreende uma família de enzimas que quelam radicais fosfato em pH alcalino. Essa enzima pode ser encontrada em diferentes tipos celulares, incluindo os neutrófilos (Karlsson *et al.*, 1995). No intestino está localizada na membrana com borda em escova e participa do processo de absorção de nutrientes (Sánchez de Medina *et al.*, 2004). 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). Dentre as funções conhecidas, há evidências de participar do processo de calcificação óssea, transporte de imunoglobulinas através da placenta, transporte de fosfato nas células do epitélio intestinal (Karlsson *et al.*, 1995), podendo ainda estar relacionada com a detoxificação de lipopolissacarídeos (Tuin *et al.*, 2009). Desta forma, a redução na atividade da fosfatase alcalina pode ser interpretada como uma manifestação da atividade antiinflamatória das substâncias em estudo (Sanchez de Medina *et al.*, 2004). Na fase aguda do processo inflamatório intestinal deste trabalho os animais tratados com escopoletina 5mg/kg e fraxetina 10 e 25mg/kg tiveram a atividade da fosfatase alcalina diminuída em relação aos animais do grupo controle colítico. Já na fase crônica com recidiva nenhum grupo tratado teve diferenças significativas em relação a atividade da fosfatase alcalina.

As doses escolhidas para serem testadas na inflamação intestinal crônica com recidiva foram baseadas nos melhores resultados da fase aguda.

Conclusão

Com base nos objetivos propostos, nos resultados e discussões apresentadas, foi possível concluir que:

- 1) A escopoletina nas doses de 5mg/kg e 25mg/kg e a fraxetina nas doses de 10mg/kg e 25 mg/kg tiveram atividade antiinflamatória no modelo experimental de colite induzido por TNBS.
- 2) O experimento de colite induzida por TNBS na fase crônica com recidiva não obteve resultados significantes; nem mesmo os animais do grupo colítico tiveram níveis de glutathione, MPO e atividade da fosfatase alcalina de acordo com relatos da literatura, assim como nenhuma substância testada obteve sucesso. Talvez algum fator extra desconhecido interfiriu nos parâmetros bioquímicos.

Referências

ABRAHAM, C. & CHO, J.H. Inflammatory Bowel Disease. **N Engl. J. Med.**, v.361, p.2066-78, 2009.

ALONSO, V.; LINARES, V.; BELLÉS, M.; ALBINA, M.L.; SIRVENT, J.J.; DOMINGO, J.L.; SÁNCHEZ, D.J. Sulfasalazine induced oxidative stress: A possible mechanism of male infertility. **Reproductive Toxicology.**, v.27, p.35–40, 2009.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, v.113, p.548-555, 1985.

BARBER, S.C.; HIGGINBOTTOM, A.; MEAD, R.J.; BARBER, S.; SHAW, P.J. An in vitro screening cascade to identify neuroprotective antioxidants in ALS. **Free Radical Biology & Medicine.**, v.46, p. 1127–1138, 2009.

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

BERNSTEIN, C.N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J.H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S.; GEARRY, R.; GOH, K.L.; HAMID, S.; KHAN, A.G.; LEMAIR, A.W.; MALFERTHEINER, OUYANG, Q.; REY, J.F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; THOMSEN, O.O.; THOMSON, A.; WATERMEYER, G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. **Inflamm Bowel Dis.**, v.16, n.1, 2010.

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

BETTINI, V.; CALÒ, L.; CANTARO, S.; MARTINO, R.; MUNARI, L.; SALVATICO, E.; TON, P. Liberation of prostaglandin-like substances from the isolated coronary artery in presence of angiotensin and of 4-methylesculetin. **Acta Vitaminol Enzymol.**, v.7, p.257-267, 1985.

BETTINI, V.; CALÒ, L.; CANTARO, S.; MARTINO, R.; MUNARI, L.; SALVATICO, E.; TON, P. Liberation of prostaglandin-like substances from the isolated coronary artery in presence of angiotensin and of 4-methylesculetin. **Acta Vitaminol Enzymol.**, v.7, n.3-4, p.257-67, 1985.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev bras Coloproct.**,v.23, n.3, p.172-182, 2003.

BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology.**, v.3, p.521-533, 2003.

BOYKO, E.J.; PERERA, D.R.; KOEPESELL, T.D.; KEANE, E.M.; INUI, T.S. Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology.**, v.84, n.5, p.530–534, 1989.

BRANDI, M.T.; RIBEIRO, M.S.; CHEBLI, L.A.; FRANCO, M.B.; PINTO, A.L.; GABURRI, P.D.; ZANINI, A.; CHEBLI, J.M. Psychological distress in Brazilian Crohn's

disease patients: Screening, prevalence, and risk factors. **Med Sci Monit.**, v.15, n.8, 2009.

CARTER, M.J.; LOBO, A.J.; TRAVIS, S.P.L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut.**, v.53, p.v1–v16, 2004. doi: 10.1136/gut.2004.043372.

CAVANAUGH, J.A. & PAVLI, P. Ulcerative colitis: a genetic disease? **Baillière's Clinical Gastroenterology.**, v.11, n 1, 1997.

CHICHLOWSKI, M. & HALE, L.P. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease—an alliance gone bad. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.295, p.G1139–G1149, 2008.

COLLINS, S.M. & CROITORU, K. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: effect of inflammation on intestinal function. In: Targan SR, Shanahan F (eds) **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 194–209, 1994.

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

COPE, G.F.; HEATLEY, R.V.; KELLEHER, J. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. **Br. Med. J.**, v.293, p.481, 1986.

CORNISH, J.A.; TAN, E.; SIMILLIS, C.; CLARK, S.K.; TEARE, J.; TEKKIS, P.P. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.103, p.2394–2400, 2008.

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

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

DAGLI, U.; BALK, M.; YUCEL, D.; ULKER, A.; OVER, H.; SAYDAM, G.; SAHIN, B. The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel disease.**, v.3, n.3, p.260-264, 1997.

DECLERCQ, C.; GOWER-ROUSSEAU, C.; VERNIER-MASSOUILLE, G.; SALLERON, J.; BALDE, M.; POIRIER, G.; LEREBOURS, E.; DUPAS, J.L.; MERLE, V.; MARTI, R.; DUHAMEL, A.; CORTOT, A.; SALOMEZ, J.L.; COLOMBEL, J.F. Mapping of inflammatory bowel disease in northern france: spatial variations and relation to affluence. **Inflamm. Bowel Dis.**, 2009. DOI 10.1002/ibd.21111.

DELEVE, L.D. & KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol. Ther.**, v.52, p.287-305, 1991.

DEWULF, N.L.S. **Investigação sobre a adesão ao tratamento medicamentoso em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais.** Ribeirão Preto, 2005.

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

DI STASI, L.C.; SEITO, L.N.; GONZALEZ, F.G.; VILEGAS, W. Antiulcerogenic activity of paepalantine from *Paepalanthus bromelioides* in mice models. **50th Annual Congress of Society of Medicinal Plant Research.**, no período de 4-8 de setembro de 2002, Barcelona-España, 84, 2002.

DRYDEN, G.W.; DEACIUC, I.; ARTEEL, G.; MCCLAIN, C.J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Current Gastroenterology Reports.**, v.7, p.308–316, 2005.

EDELBLUM, K.L. & TURNER, J.R. The tight junction in inflammatory disease: communication. breakdown. **Current Opinion in Pharmacology.**, v.9, p.715–720, 2009.

EGAN, D.; O'KENNEDY, R.; MORAN, E.; COX, D.; PROSSER, E.; THORNES, R.D. The pharmacology, metabolism analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug Metab. Rev.**, v 22, p 503-529, 1990.

FOLIGNÉ, B.; NUTTEN, S.; STEIDLER, L.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; MERCENIER, A.; POT, B. Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.51, n.2, p. 390–400, 2006.

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

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

GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.**, v.63, p.169-172, 1990.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scand. J. Gastroenterol.** v.31, p. 83-86, 1996.

GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scand. J. Gastroenterol.** v.31, p. 83-86, 1996.

GONÇALVES, C.C.M.; HERNANDES, L.; OLIVEIRA, N.L.B.; NATALI, M.R.M. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Cienc Cuid Saúde.**, v.7, n. 1, p.107-111, 2008.

GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal Of Vitamin And Nutrition Research.**, v.71, n.4, p.243-250, 2001.

GROSCHWITZ, K.R. & HOGAN, S.P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, v.124, n.1, p.3-20, 2009.

HAJIME, M.; SHUICHI, Y.; MAKOTO, N.; MASANORI, Y.; IKUKO, K.; ATSUSHI, K.; MUTSUO, S.; KEIICHI, T. Inhibitory effect of 4-methylesculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. **Int. J. Cancer.**, v.120, p.2704–2709, 2007.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J.**, v.219, p.1-14, 1984

HELIÖ, T.; HALME, L.; LAPPALAINEN, M.; FODSTAD, H.; PAAVOLA-SAKKI, P.; TURUNEN, U.; FÄRKKILÄ, M.; KRUSIUS, T.; KONTULA, K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease. **Gut.**, v.52, p.558–562, 2003.

HYUN, J.G. & MAYER, L. Mechanisms underlying inflammatory bowel disease. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.**, v.3, n.4, 2006.

ISHIHARA, S.; AZIZ, M.M.; YUKI, T.; KAZUMORI, H.; KINOSHITA, Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. **J Gastroenterol.**, v.44, p.1097–1108, 2009.

JURJUS, A.R.; KHOURY, N.N.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J.Pharmacol Toxicol Methods.**, v.50, p.81-92, 2004.

KANEKO, T.; TAHARA, S.; TAKABAYASHI, F. Supresión of lipid hydroperoxide-induced oxidative damage to cellular DNA by esculetin. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, p.840-844, 2003.

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

KIM, S.H.; KANG, K.A.; ZHANG, R.; PIAO, M.J.; KO, D.O.; WANG, Z.H.; CHAE, S.W.; KANG, S.S.; LEE, K.H.; KANG, H.K.; KANG, H.W.; HYUN, J.W. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta pharmacol sin.**, v.29, n.11, p.1319-26, 2008.

KOK, S.H.; YE, C.C.; CHEN, M.L.; KUO, M.Y.P. Esculetin enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral cancer SAS cells. **Oral Oncol.**, (2009) doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.018.

KOUTROBAKIS, I.E.; MALLIARAKI, N.; DIMOULIOS, P.D.; KARMIRIS, K.; CASTANAS, E.; KOUROUMALIS, E.A. Decreased total and corrected antioxidant

capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.49, n.9, p.1433–1437, 2004.

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

KRUIDENIER, L. & VERSPAGET, H.W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators of Inflammation.**, v.7, n.157–162, 1998.

KRUIDENIER, L. & VERSPAGET, H.W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? **Aliment Pharmacol. Ther.**, v.16, p.1997–2015, 2002.

KUSTER, R.M. & ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.**, 2.ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.451-469, 2000.

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

LEUNG, K.N.; LEUNG, P.Y.; KONG, L.P.; LEUNG P.K. Immunomodulatory effects of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal macrophages. **Mol. Immunol.**, v.2, p.181-188, 2005.

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

LIN, H.C.; TSAI, S.H.; CHEN, C.S.; CHANG, Y.C.; LEE, C.M.; LAI, Z.Y.; LIN, C.M. Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Biochemical pharmacology.**, v.75, p.1416–1425, 2008.

LINARES, V.; ALONSO, V.; ALBINA, M.L.; BELLÉS, M.; SÁNCHEZ, D.J. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. **Toxicology.**, v.256, p.152–156, 2009.

LOFTUS, E.V.Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology.**, v.126, p.1504–1517, 2004.

LOGAN, R.F.A. & KAY, C.R. Oral contraception, smoking and inflammatory bowel disease — findings in the royal college of general practitioners oral contraception study. **Int. J. Epidemiol.**, v.18, p.105–107, 1989.

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

MABALIRAJAN, U.; DINDA, A.K.; SHARMA, S.K.; GHOSH, B. Esculetin Restores Mitochondrial Dysfunction and Reduces Allergic Asthma Features in Experimental Murine Model. **J. Immunol.**, v.183, p.2059-2067, 2009.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; MCKAIGNEY, C.; JIJON, H.; YACHIMEC, C.; DOYLE, J.; JEWELL, L.; DE SIMONE, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology.**, v.121, p.580–591, 2001.

MARTINI, G.A. & BRANDES, J.W. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. **Klin. Wschr.**, v.54, p.367-371, 1976.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **J Gastroenterol.**, v.45, p.9-16, 2010.

McKENZIE, S.J.; BAKER, M.S.; BUFINTON, G.D.; DOE, W.F. Evidence of Oxidant-induced Injury to Epithelial Cells during Inflammatory Bowel Disease. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.136–141, 1996.

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

MORRISON, G.; HEADON, B.; GIBSON, P. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician.**, v.38, n.12, 2009.

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews, Immunology.**; v.3, p.330-341, 2003.

NAVARRO, F. & HANAUER, S.B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. **The American Journal of Gastroenterology.**, v.98, n.12, 2003.

NEUMAN, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Translational Research.**, v.149, p.173–186, 2007.

NIELSEN, O.H. & RASK-MADSEN, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.31, n.216, p.149-159, 1996.

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

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSCHNER, B.S.; HANAUER, S.B.; NUNEZ, G.; CHO, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, p.603-606, 2001.

OKADA, Y.; MIYAUCHI, N.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, T.; TSUTSUI, C.; MAYUZUMI, K.; NISHIBE, S.; OKUYAMA, T. Inhibitory effect of coumarin and flavonoids derivatives on bovine reductase and rabbit platelet aggregation. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, p.1385-1387, 1995.

O'MORAIN C.; TOBIN A.; SUZUKI Y.; O'RIORDAN T. Risk factors in inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v.70, p.58-60, 1989.

OTT, S.J.; MUSFELDT, M.; WENDEROTH, D.F.; HAMPE, J.; BRANT, O.; FÖLSCH, U.R.; TIMMIS, K.N.; SCHREIBER, S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, v.53, p.685-693, 2004.

PAN, S.L.; HUANG, Y.W.; GUH, J.H.; CHANG, Y.L.; PENG, C.Y.; TENG, C.M. Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p.1897-1905, 2003.

PAPADAKIS, K.A. & TARGAN, S.R. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology clinics of North America**, v.28, n.2, p.283-296, 1999.

PARDO, M.P. Inflamación intestinal y dismotilidad en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal en la ratas: mecanismos de acción implicados en la ciclicidad y cronicidad. **Tese de Doutorado**, Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.

PARK, C.; JIN, C.Y.; KWON, H. J.; HWANG, H.J.; KIM, G.Y.; CHOI, W.; KWON, T.K.; KIM, B.W.; KIM, W.J.; CHOI, Y.H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells: Roles of Bcl-2 and extracellular-regulated kinase signaling. **Toxicol. In Vitro**, doi:10.1016/j.tiv.2009.09.017, 2009.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.3, p.311-22, 2002.

PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochem. Pharmacol.**, v.44, n.2, p.205-214, 1992.

PELTEKOVA, V.D.; WINTLE, R.F.; RUBIN, L.A.; AMOS, C.I.; HUANG, O.; GU, X.; NEWMAN, B.; OENE, M.V.; CESCO, D.; GREENBERG, G.; GRIFFITHS, A.M.; GEORGE-HYSLOP, H.S.; SIMINOVITCH, K.A. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease. **Nature Genetics.**, v.36, p.471-475, 2004.

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

PLEVY, S. The immunology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin N Am.**, v.31, p.77-92, 2002.

REZAIE, A.; PARKER, R.D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? **Dig Dis Sci.**, v.52, p.2015-2021, 2007.

RIVEIRO, M.E.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VÁZQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO C.; DAVIO, C. Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. **Current Medicinal Chemistry.**, v.17, n.13, p.1325-1338, 2010.

ROESSNER, A.; KUESTER, D.; Malferttheiner, P.; SCHNEIDER-STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology – Research and Practice.**, v.204, p.511-524, 2008.

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

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

SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; LASTRA, C.A. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. **European Journal of Pharmacology.**, v.562, p.247-258, 2007.

SARTOR, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology.**, v.134, p.577-594, 2008.

SECONDULFO, M.; MAGISTRIS, L.; FIANDRA, R.; CASERTA, L.; BELLETTA, M.; TARTAGLIONE, T.; RIEGLER, G.; BIAGIL, F.; CORAZZAL, G.F.; CARRATTI, R. Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relative. **Digest Liver Dis.**, v.33, p.680-685, 2001.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, v.47, p.61-71, 1990.

SHANAHAN, F. Crohn's disease. **Lancet.**, v.359, p.62-69, 2002.

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

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

SMITH, G.P.; HARRIS, H.; PETERS, T.J. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. **Clin. Chim. Acta.**, v.142, p.221–30, 1984.

SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen Uptake. **Microbes and Infection.**, v.7, p.997–1004, 2005.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, E.U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, n.2, 2002.

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

STROBER, W.; LUDVIKSSON, 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, 1998.

SU, L.; SHEN, L.; CLAYBURGH, D.R.; NALLE, S.C.; SULLIVAN, E.A.; MEDDINGS, J.B.; ABRAHAM, C.; TURNER, J.R. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology.**, v.136, p.551–563, 2009.

ŠVENTORAITYTĖ, J.; ŽVIRBLIENĖ, A.; KIUDELIS, G.; ŽALINKEVIČIUS, R.; ŽVIRBLIENĖ, A.; PRAŠKEVIČIUS, A.; KUPČINSKAS, L.; TAMOŠIŪNAS, V. Immune system alterations in patients with inflammatory bowel disease during remission. **Medicina (Kaunas).**, v.44, n.1, p.27-33, 2008.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v.57, p.145–155, 2003.

TUIN, A.; POELSTRA, K.; JAGER-KRIKKEN, A.; BOK, L.; RAABEN, W.; VELDEERS, M.P.; DIJKSTRA, G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **Gut.**, v.58, p.379-387, 2009.

TURNER, J.R. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation From Basic Mechanisms to Clinical Application. **The American Journal of Pathology.**, v.169, n.6, p.1901-1909, 2006.

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. **Arq Gastroenterol.**, v.46, p.20-25, 2009.

VILLANI, A.C.; LEMIRE, M.; FORTIN, G.; LOUIS, E.; SILVERBERG, M.S.; COLLETTE, C.; BABA, N.; LIBIOULLE, C.; BELAICHE, J.; BITTON, A.; GAUDET, D.; COHEN, A.; LANGELIER, D.; FORTIN, P.R.; WITHER, J.E.; SARFATI, M.; RUTGEERTS, P.; RIOUX, J.D.; VERMEIRE, S.; HUDSON, T.J.; FRANCHIMONT, D. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nature Genetics.**, v.41, p.71–76, 2009.

VIND, I.; LENE RIIS, L.; JESPERGAARD, C.; JESS, T.; KNUDSEN, K.; PEDERSEN, N.; ELKJAERE, M.; HANSEN, T.S.; ANDERSEN, I.B.; PAERREGAARD, A.; BONDESENH, S.; LOCHT, H.; LARSEN, S.O.; MOESGAARD, F.; BENDTSEN, F.; ANDERSEN, P.S.; MUNKHOLM, P. Genetic and environmental factors as predictors of disease severity and extent at time of diagnosis in an inception cohort of inflammatory bowel disease. Copenhagen County and City 2003–2005. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.2, p.162–169, 2008.

WAKEFIELD, A.J.; DHILLON, A.P.; ROWLES, P.M.; SAWVERR, A.M.; PITTILO, R.M.; LEWIS, A.A.M.; POUNDER, R.E. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. **The Lancet.**, v.334, n.8671, p.1057-1062, 1989.

WALLER, S.; TREMELLING, M.; BREDIN, F.; GODFREY, L.; HOWSON, J.; PARKES, M. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. **Gut.**, v.55, p.809–814, 2006.

WANG, W. & BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol. Rev.**, v.50, n.3, p.335-356, 1998.

WATANABE, K.; ITO, A.; SATO, T.; SAITO, T.; HAYASHI, H.; NIITANI, Y. Esculetin suppresses proteoglycan metabolism by inhibiting the production of matrix metalloproteinases in rabbit chondrocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v.16, p.297-305, 1999. Erratum in: *Eur. J. Pharmacol.*, v.379, n.2, p.243, 1999.

WENDLAND, B.E.; AGHDASSI, E.; TAM, C.; CARRIER, J.; HILLARY-STEINHART, A.; WOLMAN, S.L.; BARON, D.; ALLARD, J.P. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn's disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.74, n.2, p.259–264, 2001.

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.211–218, 2010.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A.R. Review article: diet and inflammatory bowel disease – epidemiology and treatment. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 30, p.99–112, 2009.

YANG, J.E.; DELLA-FERA, M.A.; HARTZEL, D.L.; NELSON-DOOLEY, C.; HAUSMAN, D.B.; BAILE, C.A. Esculetin induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Obesity**, v.14, 2006.