



unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Ação do mirceno no modelo de Retocolite Ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos



**Renata Assunção**

Botucatu - 2023

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

Assunção, Renata.

Ação do mirceno no modelo de retocolite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos / Renata Assunção. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 21006008

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Estresse oxidativo. 3. Monoterpenos. 4. Camundongos endogâmicos C57BL. 5. Mirceno.

Palavras-chave: Camundongos C57BL/6J; Doença inflamatória intestinal; Estresse oxidativo; Monoterpeno.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Ação do mirceno no modelo de Retocolite Ulcerativa induzida por  
dextran sulfato de sódio em camundongos

Renata Assunção

Prof<sup>a</sup>. Titular Clélia Akiko Hiruma-Lima

Prof<sup>a</sup> Dr. Lúcia Regina Machado da Rocha

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada, Área de  
concentração Biomoléculas: estrutura e  
função.

## AUXÍLIO FINANCEIRO:

O presente trabalho foi realizado com os apoios da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior - Brasil (CAPES) – processo CAPES: 88887.669273/2022-00 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## **Agradecimentos:**

Gostaria de começar agradecendo minha família, aos meus pais, Ana Maria e Abelardo, que investiram tempo, dinheiro e paciência, e respeitaram meu desejo de persistir na área de pesquisa acadêmica que é turbulenta e incerta no nosso país. Preciso agradecer a minha irmã, Bruna (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presente nesse plano terrestre me deu muita força e o sentimento de querer dar orgulho a ela não me deixou desistir nesses dois anos de mestrado. Ao meu namorado, Bruno, que esteve do meu lado durante todo o meu período acadêmico, me ouvindo e aconselhando por todos esses anos. Amo todos vocês!

Agradeço aos meus amigos de graduação, Gabriel e Pedro, acredito que enfrentar a pós-graduação, mesmo em programas diferentes, foi mais fácil com vocês, me ajudando em tudo o que foi preciso e brigando comigo toda vez que eu falava que as coisas não iam dar certo! Preciso agradecer à Jennyfer, que morou comigo durante um ano do mestrado e sua companhia foi essencial para mim durante esse período.

À minha psicóloga, Raquel, que me ajudou muito nesses anos, e me mostrou que eu era capaz de concluir e realizar tudo aquilo que desejei.

Seguindo aos agradecimentos preciso citar meus colegas de trabalho, Rie, Priscila, Vinicius, Maycon, Gabriela, Felipinho, Felipe e Mel, agradeço a todos os dias de convivência com vocês, desde os biotérios intermináveis até aos cafezinhos que aprendi a beber durante o mestrado. Obrigada por segurarem minha mão quando eu estava confusa e me darem uma luz quando estava perdida. Assim como agradeço à Thaysi, nos aproximamos nos últimos meses de mestrado, mas que me ajudou muito, nossas conversas foram fundamentais para mim. Amo todos vocês imensamente!

Agradeço às minhas orientadoras, Clélia e Lúcia. Obrigada pela orientação e por acreditarem em mim, pelas conversas e pelos puxões de orelha necessários. Tenho certeza que sou uma profissional melhor, e que estarei pronta para as novas aventuras da minha vida por ter convivido com vocês.

Preciso agradecer também as instituições de auxílio financeiro pois sem CAPES e CPNq não seria possível desenvolver pesquisa no Brasil.

Por fim agradeço aos funcionários do departamento de Biologia Funcional e Estrutural, em especial do Setor de Fisiologia, pois todos foram fundamentais para que o trabalho que eu realizei ao longo desses dois anos acontecesse da melhor forma possível.

## Prólogo

O desenvolvimento desse projeto de mestrado possibilitou o desenvolvimento de estudos direcionados a Retocolite Ulcerativa, e a atividade de produtos naturais no tratamento do quadro da doença. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e científica da aluna.

### Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos

- FIORETO, A.C.; OHARA, R.; EMILIO-SILVIA, M.T.; RODRIGUES, V.P.; BUENO, G.;  
**ASSUNÇÃO, R.**; DARIO, F.L.; GOMES, V.G.; RAIMUNDO, P.R.; MACHADO DA ROCHA, L.R; HIRUMA-LIMA, C.A. Evaluation of protective effect of citral on gastroesophageal reflux disease in eutrophic and obese mice. Simpósio de produtos naturais e sintéticos bioativos e seus potenciais terapêuticos. On-line, 2021.
- BUENO, G; RODRIGUES, V.P; OHARA, R.; EMILIO-SILVIA, M.T; **ASSUNÇÃO, R.**; GOMES, V.G; DARIO, F.L.; RAIMUNDO, P.R.; FIORETO, A.C.; MACHADO DA ROCHA, L.R; HIRUMALIMA, C.A. Effect of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil in obese mice on a high-fat diet, part 1. adipose tissues evaluation. Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos, Online, 2021.
- OHARA, R.; DARIO, F.L; BUENO, G; RODRIGUES, V.P; EMILIO-SILVIA, M.T; **ASSUNÇÃO, R**; FIORETO, A.C.; P.R.; MACHADO DA ROCHA, L.R; HIRUMA-LIMA, C.A. Modulation of matrix metalloproteinases exerted by Citral in the healing of gastric ulcers in eutrophic and obese mice. Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos, Online, 2021.
- **ASSUNÇÃO, R.**; PINTO, T.S.; EMILIO-SILVA, M.T.; ANDRADE, A.F.C., ZAMBUZZI, W.F., HIRUMA-LIMA, C.A. Limonene acts on cell differentiation through modulation of adipogenic factors in 3T3-L1 cells, SBFTE, Online, 2022.

### **Participação em eventos científicos**

- Seminário de Toxinologia Básica e Aplicada - 2ª Edição (Carga horária: 60 hrs). Online, 2022.
- 54th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Online, 2022.

### **Atividades de extensão universitária**

- Monitora do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu/SP, 2022.
- Palestra “Reprodução de A a Z”. realizado na E.E. Dr. Manuel José Chaves, São Manuel/SP, 2022.
- Expositora das atividades do Curso de Férias: “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programa "Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre Pós- Graduação e Ensino Básico", realizado no Instituto de Biociências da UNESP, durante o Evento de Extensão Universitária "XII VENHA CONHECER O IB", Área Temática "Saúde e Bem-Estar", realizado no dia 20 de setembro de 2022.

### **Cursos realizados**

- Oficina de Escrita Acadêmica (Carga horária: 2hrs). Online, NTAPS. 2022.
- Curso/Seminário de Toxinologia Básica e Aplicada - 2ª Edição (Carga horária: 60 hrs). Online, 2022
- Digital Games as Tools for Scientific Divulgation Digital Games as Tools for Scientific (Carga horária - 3hrs). Online, 2022

### **Artigo completo publicado em periódico**

Bueno, G.; Chavez Rico, S.L.; Périco, L.L.; Ohara, R.; Rodrigues, V.P.; Emílio-Silva, M.T.;

**Assunção, R.;** Machado da Rocha, L.R.; Nunes, D.S.; Besten, M.A.; Heiden, G.; Lima Camargo, A.C.; Justulin, L.A.; Hiruma-Lima, C.A. The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. J. Ethnopharmacol. 2021 May

10; 271:113832. doi: 10.1016/j.jep.2021.113832. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33460758

Ohara, R.; Dario, FL.; Emílio-Silva, M.; **Assunção, R.**; Bueno, G.; Rodrigues, VP.; Bueno, G.; Raimundo, PR.; Rocha, LRM.; Hiruma-Lima, C.A. Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(5), 4888; doi: 10.3390/ijms24054888. Epub 2023 March 3.

### **Disciplinas cursadas:**

- O Cientista e o professor universitário / Créditos: 2 / Conceito: A
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada / Créditos: 2 / Conceito: A
- Fundamentos de Informática e de Tecnologias Digitais Aplicadas ao Ensino e à Pesquisa / Créditos: 4 / Conceito: A
- Imunomodulação por produtos naturais / Créditos: 6 / Conceito: A
- Interação entre Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia / Créditos: 6 / Conceito: A
- Biologia Celular / Créditos: 3 / Conceito: A
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Toxinologia Básica e Aplicada: Biotecnologias de Toxinas Úteis à Saúde Humana e Animal / Créditos: 4 / Conceito: A
- Cientista Empreendedor: Soluções Inovadoras para Projetos de Pesquisa / Créditos: 4 / Conceito: A
- Introdução à Bioestatística / Créditos: 2 / Conceito: A

## Lista de abreviaturas

**CAT:** Catalase;

**DII:** Doença Inflamatória Intestinal;

**DTNB:** 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoicacid)

**DSS:** Dextran Sulfato de Sódio;

**e.p.m:** erro padrão da média

**ERO's:** Espécies Reativas de Oxigênio;

**GSH:** Glutathiona;

**HTAB:** Hexadeciltrimetilamônio

**IDD:** Índice de Desenvolvimento da Doença;

**IL:** Interleucinas;

**LPS:** Lipopolissacarídeo bacteriano;

**MDA:** Malondialdeído;

**MPO:** Mieloperoxidase;

**NO:** óxido nítrico;

**RCU:** Retocolite Ulcerativa;

**TBA:** ácido tiobarbitúrico.

## Lista de figuras

**Figura 1:** Representação da inflamação contínua na porção final do intestino grosso, conhecida como Retocolite Ulcerativa (fonte: Elaborada pelo autor).

**Figura 2:** Molécula de  $\beta$ -Mirceno (Surendran *et al.*, 2021).

**Figura 3:** Esquema da indução com DSS a 2% e o tratamento dos animais com as diferentes doses de mirceno (3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg).

**Figura 4:** Esquema da indução com DSS a 2.5% e o tratamento dos animais com as diferentes doses de mirceno (50, 100 e 200 mg/kg).

**Figura 5:** Evolução da massa corporal de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno (3.75, 7.5, 11.25 mg/kg), por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15) e a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

**Figura 6:** Evolução da massa corporal de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com mirceno (50, 100 e 200 mg/kg), por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. @ p < 0,01 e @@ p < 0,001 vs Tween 80 a 1%.

**Figura 7:** Score calculado nos dias de indução por DSS a 2% e durante o tratamento com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg. Os resultados foram expressos na forma de mediana (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon \* p < 0,01 vs Branco.

**Figura 8:** Score calculado nos dias de indução por DSS a 2.5% e durante o tratamento com mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg. Os resultados foram expressos na forma de mediana (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon \* p < 0,01, \*\* p < 0,001 e \*\*\* p < 0,05 vs Branco.

**Figura 9:** Comprimento dos cólons de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \* p < 0,01, \*\*\* p < 0,05, \*\*\*\* p < 0,005 vs Branco.

**Figura 10:** Comprimento dos cólons de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*\*\* p < 0,005 vs Branco.

**Figura 11:** Imagens representativas dos cólons de camundongos C57BL/J6 submetidos à RCU induzida por oferta de DSS a 2% na água de beber e tratamento de mirceno nas doses 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, durante 6 dias.

**Figura 12:** Imagens representativas dos cólons de camundongos C57BL/J6 submetidos a RCU induzida por oferta de DSS a 2.5% na água de beber e tratamento de mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg durante 6 dias.

**Figura 13:** A - Quantidade de Glutationa (GSH); B - Superóxido Dismutase (SOD); C - Catalase (CAT) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados

com mirreno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=6) e a significância foi determinada pela ANOVA seguido por teste de Tukey., \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

**Figura 14:** A - Quantidade de Glutationa (GSH); B - Superóxido Dismutase (SOD); C - Catalase (CAT) no cólon de camundongos induzidos por DSS 2.5% e tratados com mirreno nas doses 50, 100 e 100 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=6) e a significância foi determinada pela ANOVA seguido por teste de Tukey., \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

**Figura 15:** Quantidade de Malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirreno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

**Figura 16:** Quantidade de Malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com mirreno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

**Figura 17:** Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirreno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

**Figura 18:** Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com mirreno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*  $p < 0,001$  vs Branco, @  $p < 0,01$  @ vs Veículo.

**Figura 19:** Níveis séricos de Interleucinas 4(A), 5(B), 10(C), 13(D) e 33(E) em camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirreno (3.75 mg/kg, 7.5 mg/kg e 11.25 mg/kg) por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*  $p < 0,01$ , vs Branco e @  $p < 0,01$ , vs Veículo.

**Figura 20:** Score os animais Branco e Tratados com Tween 80 a 1%, nos grupos induzidos por DSS a 2% e 2.5%. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon. \*  $p < 0,01$ , vs DSS 2%.

**Figura 21:** Comprimento dos cólons de camundongos induzidos por DSS 2% e 2.5% por seis dias e animais brancos. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*  $p < 0,001$ , vs DSS 2%.

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Tabela de score para o cálculo do Índice de Desenvolvimento da Doença ao longo dos sete dias de experimento (Alex *et al.*, 2009).

**Tabela 2:** Massa (mg) do Baço, Fígado, Cólon e Estômago de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirreno por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=15) e a significância estatística foi determinada por teste ANOVA, seguido por teste de Tukey ou Dunnett. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

**Tabela 3:** Massa (mg) do Baço, Fígado, Cólon e Estômago de camundongos induzidos por DSS a 2.5 % e tratados com mirreno por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=15) e a significância estatística foi determinada por teste ANOVA, seguido por teste de Tukey ou Dunnett. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

## Resumo

A retocolite ulcerativa (RCU) é uma doença inflamatória intestinal, caracterizada por inflamação crônica e pelo desenvolvimento de úlceras no cólon. A inflamação provoca infiltração de neutrófilos, aumento do estresse oxidativo e ativação de vias inflamatórias. Apesar de ser uma doença que está se tornando cada vez mais comum ao redor do mundo, ainda não existe um tratamento efetivo. O mirceno é um monoterpeneo com comprovada ação antioxidante, anti-inflamatório e gastroprotetora em estudos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro*. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do mirceno no quadro de RCU aguda em camundongos C5BL/6J machos. Para a realização desse estudo foram usadas duas concentrações (2% e 2.5%) de Dextran Sulfato de Sódio (DSS), assim como diferentes doses do mirceno (3.75, 7.5, 11.25, 50, 100 e 200 mg/kg). Assim como foram utilizados camundongos machos C5BL/6J (n=15) que foram induzidos por DSS durante 7 dias consecutivos ofertados no bebedouro. O tratamento com o mirceno (pela via oral) foi realizado concomitantemente a indução da colite com DSS. Ao longo do período de indução mais tratamento, foi analisada a progressão dos sintomas da RCU através do Índice de Desenvolvimento da Doença (IDD). Através da análise do soro e do tecido obtido do cólon foram realizadas observações morfométrias (massa e comprimento do cólon) e bioquímicas por meio dos marcadores de inflamação (mieloperoxidase - MPO, malondialdeído - MDA, citocinas anti-inflamatórias – IL 4, 5, 10, 13 e 33) e do estresse oxidativo (glutathiona redutase - GSH, superóxido dismutase - SOD e catalase – CAT). Para a análise estatística foi realizado teste de Shapiro-Wilk para determinação de normalidade e ANOVA de uma via para comparação de três ou mais grupos, seguidos do teste de Dunnett ou Tukey, ou teste de Wilcoxon, para conjuntos de dados não paramétricos. Com valor de significância mínimo de  $p < 0,05$ . As diferentes concentrações de DSS (2% vs 2.5%) resultaram no aumento significativo do IDD no 6º de tratamento. O tratamento dos animais com mirceno promoveu aumento do IDD a partir do 5º dia em ambas concentrações de DSS. Se observou um encurtamento do comprimento dos cólons dos animais submetidos ao DSS em ambas concentrações sendo que nos animais tratados com DSS a 2.5% houve uma redução significativa do comprimento em comparação com os animais tratados com DSS a 2%. Após o tratamento, houve aumento da massa do cólon e baço (DSS 2%), estomago e baço (DSS 2.5%) dos animais submetidos as diferentes concentrações de DSS em relação aos animais brancos. As análises bioquímicas demonstraram que a aplicação do DSS a 2% foi capaz de reduzir os níveis de GSH e SOD assim com a IL-4 no grupo de animais tratados com o veículo em comparação com os animais branco. A indução do DSS a 2.5% reduziu os níveis de GSH dos animais tratados com mirceno e aumentou a atividade de MPO no grupo de animais que recebeu mirceno (200 mg/kg) em comparação com branco. Através dos resultados desse trabalho foi possível concluir que a indução com DSS em ambas concentrações foi capaz de elevar o IDD, porém o tratamento dos animais com mirceno nas doses utilizadas não foi capaz de proteger os animais dos danos causados pelo DSS.

**Palavra-chave:** Doença inflamatória intestinal; estresse oxidativo; monoterpeneo e camundongos C5BL/6J.

## Abstract

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation and the development of ulcers in the colon. Inflammation causes neutrophil infiltration, increased oxidative stress, and activation of inflammatory pathways. Despite being a disease that is becoming increasingly common around the world, there is still no effective treatment. Myrcene is a monoterpene with proven antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective action in preclinical in vivo and in vitro studies. This study aims to evaluate the effect of myrcene on acute UC in male C5BL/6J mice. To carry out this study, two concentrations (2% and 2.5%) of Sodium Dextran Sulfate (DSS) were used, as well as different doses of myrcene (3.75, 7.5, 11.25, 50, 100 and 200 mg/kg). As well as male C5BL/6J mice (n=15) that were induced by DSS for 7 consecutive days offered in the drinking fountain. Treatment with myrcene (by mouth) was performed concomitantly with the induction of colitis with DSS. Throughout the period of induction plus treatment, the progression of UC symptoms was analyzed using the Disease Development Index (IDD). By analyzing the serum and the tissue obtained from the colon, morphometry (colon weight and length) and biochemical observations were performed using inflammation markers (myeloperoxidase - MPO, malondialdehyde - MDA, anti-inflammatory cytokines - IL 4, 5, 10, 13 and 33) and oxidative stress (glutathione reductase - GSH, superoxide dismutase - SOD and catalase - CAT). For statistical analysis, the Shapiro-Wilk test was used to determine normality and one-way ANOVA to compare three or more groups, followed by the Dunnett or Tukey test, or the Wilcoxon test, for non-parametric data sets. With a minimum significance value of  $p < 0.05$ . The different concentrations of DSS (2% vs 2.5%) resulted in a significant increase in the IDD on the 6th day of treatment. The treatment of animals with myrcene promoted an increase in the IDD from the 5th day on in both DSS concentrations. A shortening of the length of the colons of the animals submitted to DSS in both concentrations was observed and, in the animals, treated with DSS at 2.5% there was a significant reduction of the length in comparison with the animals treated with DSS at 2%. After treatment, there was an increase in mass of the colon and spleen (DSS 2%), stomach and spleen (DSS 2.5%) of animals submitted to different concentrations of DSS compared to white animals. Biochemical analyzes demonstrated that the application of 2% DSS was able to reduce the levels of GSH and SOD as well as IL-4 in the group of animals treated with the vehicle compared to the white animals. The induction of 2.5% DSS reduced the GSH levels of the myrcene-treated animals and increased the MPO activity in the group of animals that received myrcene (200 mg/kg) compared to the white group.

**Keywords:** Inflammatory bowel disease; oxidative stress; monoterpene and C5BL/6J mice.

## Sumário

1- Introdução .....	16
2- Objetivo Geral .....	21
3 - Material e Métodos .....	22
3.1- Animais .....	22
3.2 – Indução da Retocolite Ulcerativa e Tratamento.....	22
3.3 - Índice de Desenvolvimento da Doença .....	23
3.4 – Coleta de Material .....	24
3.5 – Avaliação bioquímica das atividades de Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Mieloperoxidase (MPO) e dos níveis de Glutathione Redutase (GSH) e Malondialdeído (MDA) .....	25
3.7 – Análise Estatística .....	26
4. Resultado e Discussão .....	26
4.1 - Análises Macroscópicas e Morfométricas .....	26
4.2 Marcadores de Estresse Oxidativo .....	35
4.3 - Malondialdeído .....	38
4.4. - Atividade da Mieloperoxidase .....	40
4.5 - Interleucinas Anti-Inflamatórias.....	42
4.6 Comparação entre DSS a 2% e DSS a 2.5%.....	44
5. Conclusão.....	46
6. Referências .....	46

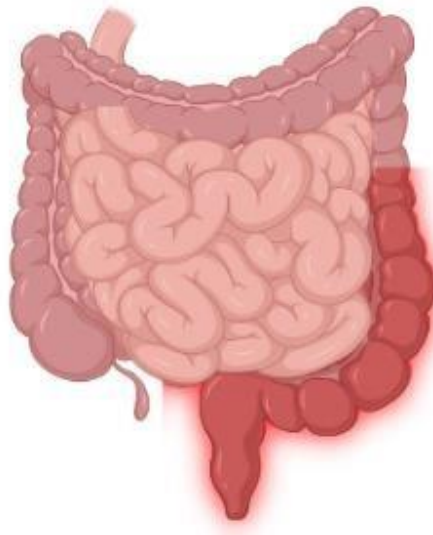
## 1- Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) é uma inflamação crônica do intestino (Ng *et al.*, 2017). A patogênese não é completamente esclarecida, mas sabe-se que existem componentes genéticos e ambientais que levam ao surgimento dessa inflamação intestinal. Essas doenças estão associadas com o aumento da globalização, com o estilo de vida ocidental voltado ao alto consumo de alimentos industrializados, assim como de álcool e estresse elevado. Outro fator que pode levar ao aumento das DII no mundo moderno é o aumento da assepsia, que faz com que as pessoas não entrem em contato com bactérias benéficas que possam contribuir para a composição final da microbiota intestinal (Bernstein *et al.*, 2015). Além disso, o uso prolongado e cada vez mais frequente de medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais, para o tratamento de outras doenças, pode contribuir para o surgimento das DII (Feuerstein *et al.*, 2014). O aparecimento das DII nos países é cada vez mais evidente em todos os continentes, sendo considerada como uma doença global (Bernstein *et al.*, 2015). Um exemplo é o continente Asiático, no qual foi realizado um estudo de 2012 em que foi demonstrado a ocorrência de um aumento na prevalência de DII de 0.54 em 100 mil habitantes para 3.44 em 100 mil habitantes em um pouco menos de um ano (Ng *et al.*, 2013). No Brasil, em 2019 se observou que a prevalência de DII é de 4.48 em 100 mil habitantes, sendo mais comum em áreas mais urbanas e industrializadas, quando comparado com áreas rurais (Quaresma *et al.*, 2019).

Dentre as DII mais comuns e mais estudadas estão as Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa (RCU). Quando se compara a Doença de Crohn e a RCU, essa última é aquela que tem maior incidência desde que estudos sobre as DII começaram a ser realizados. Normalmente, a RCU tende a aparecer entre os trinta e os setenta anos de vida e acomete homens e mulheres na mesma proporção. Existe também a RCU pediátrica, bem menos frequente na sociedade (Bernstein *et al.*, 2015). Os sintomas mais recorrentes da RCU são dor abdominal e ao defecar, diarreia com sangue, podendo ocorrer anemia, perda de peso e febre (He *et al.*, 2019). Caso a doença não seja tratada, pode evoluir para o câncer colorretal e levar o paciente até mesmo ao óbito (Silva *et al.*, 2019). Existem diferentes formas de se

diagnosticar um quadro colítico, sendo que o exame de sangue e de fezes são os mais comuns (Bernstein *et al.*, 2015).

A fisiopatologia da RCU é caracterizada por uma inflamação crônica e contínua (figura 1) não apresentando áreas contínuas entre o tecido saudável e inflamado do cólon. E sua cronicidade está relacionada a uma característica de ocorrência de recidivas, muito comum no histórico da doença. A RCU é uma doença com um caráter superficial, promovendo o comprometimento da camada epitelial, a mucosa, da porção final do intestino (He *et al.*, 2019).



**Figura 1:** Representação da inflamação contínua na porção final do intestino grosso, conhecida como Retocolite Ulcerativa (fonte: Elaborada pelo autor).

A função do intestino é absorver água e nutrientes para a manutenção da homeostase do organismo, e para que isso ocorra é de suma importância não só a integridade do epitélio intestinal e a homeostase das bactérias encontradas no lúmen intestinal, como também, é relevante o equilíbrio do sistema imune da região, que deve defender o organismo contra patógenos e tolerar a microbiota intestinal (De Medina *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2018). Durante a RCU, ocorre um processo de disbiose, que é o desbalanço na proporção da composição saudável da microbiota intestinal, onde o aumento exagerado de uma bactéria endógena pode ter predominância de bactérias patogênicas. Durante o quadro colítico ocorre também a ruptura do epitélio protetor, a camada da mucosa. Essa quebra da proteção altera a permeabilidade do intestino, e assim os metabólitos bacterianos - como o

lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) gerados pelas bactérias ali presentes, são absorvidos pelo intestino, alcançando assim a circulação sistêmica (He *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2020).

Para mimetizar o quadro de RCU em camundongos, é usado o dextran sulfato de sódio (DSS), um polissacarídeo solúvel em água que induz danos na camada epitelial da porção final do intestino e possui propriedades anticoagulantes. Esses danos fazem com que a função de proteção seja comprometida, assim os metabólitos bacterianos do lúmen infiltram a corrente sanguínea. Essa infiltração estimula o sistema imune e assim citocinas pró-inflamatórias são secretadas, somado a migração de células com potencial citotóxico, geram o quadro de RCU no modelo animal (Kiesler *et al.*, 2015). Esse é um modelo experimental muito utilizado por induzir um quadro avançado de RCU em um curto espaço de tempo (de 6 a 8 dias). Além disso, outra vantagem desse modelo experimental *in vivo* é de não necessitar de intervenções cirúrgicas, e poder ser usado para reproduzir diferentes quadros de RCU, tanto crônico como agudo. O DSS ocasiona um dano na camada superior do cólon, permitindo a infiltração de metabólitos pró-inflamatórios, mimetizando um quadro clínico de RCU (Chassaing *et al.*, 2014).

O processo inflamatório sistêmico se dá pela entrada do LPS na corrente sanguínea, ativando a via do NF- $\kappa$ B, que possui como função a indução e controle de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IL-8). Essa cascata inflamatória induz a produção de outros mediadores inflamatórios, perturbando a homeostase do sistema imune inato, que contribui para o aumento de macrófagos e células dendríticas, comumente aumentadas em pacientes com RCU, sugerindo com isso um papel na perpetuação da inflamação. Com o aumento de macrófagos locais, a capacidade celular de secretar citocinas pró-inflamatórias também aumenta, retroalimentando positivamente o processo inflamatório (Abraham and Medzhitov, 2011; Atreya *et al.*, 2008; Ordás *et al.*, 2012). Em contrapartida, como tentativa de regular o processo inflamatório, existem citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que são produzidas por células T ou por linfócitos ativados, componentes do sistema imune adaptativo, e que atuam na inibição de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6, e também na redução da proliferação de células T (Kucharzik *et al.*, 1996; Moldoveanu *et al.*, 2015). Porém, com o

desbalanceamento de todo o sistema imune, o controle anti-inflamatório fica comprometido, ocasionando a uma resposta atípica na produção de citocinas, como a IL-5 e IL-13. A IL-13 possui um papel específico por possuir ação citotóxica para células epiteliais levando a alteração de composição de proteínas e apoptose, gerando assim as lesões nessa camada epitelial (Ordás *et al.*, 2012). Contudo, também existe a via ainda não totalmente esclarecida, que libera IL-33, na qual essa citocina atua em condições de homeostase como fator nuclear intracelular. A mesma citocina, com estímulos inflamatórios funciona como alerta para o sistema imunológico, quando ocorrem traumas e infecções, o que por sua vez desregula o sistema imune adaptativo e inato, agravando a inflamação e ocasionando em uma migração de neutrófilos para o tecido inflamado do cólon (Groß *et al.*, 2012).

A infiltração dos neutrófilos em um tecido inflamado, leva ao aumento de mieloperoxidase (MPO), enzima marcadora de atividade inflamatória, que atua na modulação de matriz extracelular, reconstruindo tecido lesionado e essa enzima também é responsável por catalisar diversas reações que produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kato, 2016; Klebanoff, 2005; Yasukawa *et al.*, 2012).

O aumento na produção de EROs é outro fator importante na patogênese da RCU, que ocasiona o surgimento de um quadro de estresse oxidativo (Tan *et al.*, 2018). Existem diferentes defesas contra o aumento de EROs podendo ser enzimática, como a atuação da superóxido dismutase (SOD). A SOD é conhecida como a primeira linha de defesa e é responsável por converter superóxido em oxigênio molecular e peróxido. Porém, com o aumento exacerbado das EROs, a SOD não consegue neutralizar todos os radicais livres, os radicais que não são quebrados pela enzima interagem com óxido nítrico (NO), substância comumente presentes nas células, e essa combinação (EROs + NO) leva ao agravamento do quadro de estresse oxidativo. Outra defesa enzimática contra as EROs é a enzima catalase (CAT), responsável por catalisar a reação de quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, diminuindo a quantidade de EROs livres. Existe também o mecanismo não enzimático, como aquele exercido pela glutathiona redutase (GSH), que atua como sequestrador de radicais livres, participando da reação feita pela CAT (Mather-Mihaic *et al.*, 1986; Nishiyama *et al.*, 2012). O processo oxidativo está correlacionado ao desbalanço causado pela disbiose, quadro sempre presente na RCU (Tomasello *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo aumenta também a presença de oxigênio livre levando à peroxidação lipídica, ocorrendo a incorporação dessa molécula de oxigênio nos ácidos graxos da membrana citoplasmática, levando à morte celular e culminando no aumento dos níveis de malondialdeído (MDA). Portanto, o aumento dos níveis de MDA é tido como um importante indicador do processo de estresse oxidativo, além de ser um marcador de lesão em membrana celular (Mather-Mihaich *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2016). Portanto, reverter esses processos inflamatórios é importante para a melhora do quadro da RCU, porém ainda não existem tratamentos eficazes, na atualidade, que atuem efetivamente para nessa finalidade.

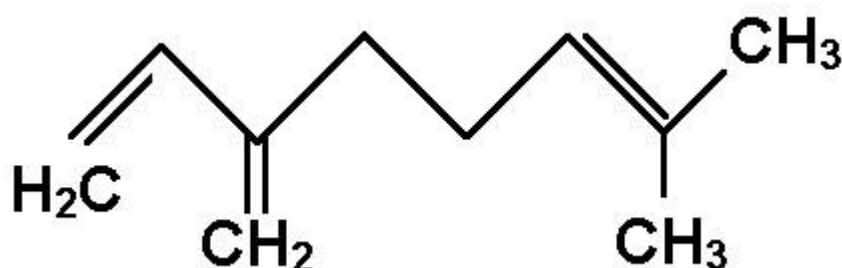
Atualmente, o tratamento para a RCU é realizado através de uma abordagem medicamentosa para o alívio dos sintomas, com o uso de corticóides e agentes biológicos, que podem ter diversos efeitos colaterais, como maiores alterações no sistema imunológico. É também possível a realização da colectomia (retirada da porção danificada do cólon), porém, os casos de recidivas da doença são comuns (Le Berre *et al.*, 2020). Alternativas aos tratamentos convencionais são interessantes em casos como a RCU pois o uso concomitante de vários medicamentos para o combate pode resultar em interação medicamentosa. A interação pode agravar ainda mais a inflamação do cólon ou contribuir para o aparecimento de outros problemas de saúde (Bernstein *et al.*, 2015).

Tendo em vista a falta de tratamento efetivo para a cura da doença na atualidade, novas abordagens são necessárias para o tratamento da RCU, procurando, um tratamento rápido para que não ocorra o agravamento do quadro e para a manutenção da doença em remissão.

Tratamentos alternativos com produtos naturais comumente apresentam menor toxicidade, e poderiam ser usados juntamente com os medicamentos que aliviam os sintomas, pensando no conforto do paciente (Deng *et al.*, 2020). Dentre os produtos naturais comumente observados como potenciais fármacos existem os monoterpenos.

Os monoterpenos pertencem a classe de terpenos que possuem na molécula dois isoprenos, e possuem atividades farmacológicas como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, analgésica e anti-ulcerogênica já descritas na literatura (Périco *et al.*, 2020). O mirceno (figura 2) é

um monoterpeno normalmente usado na composição de produtos cosméticos, alimentos e produtos de limpeza, derivado de plantas como *Humulus lupulus* (lúpulo), *Laurus nobilis* (louro) e *Melissa officinalis* (erva-cidreira) (Surendran *et al.*, 2021). O mirceno apresenta atividade antiulcerogênica e ação antioxidante, protegendo tanto o estômago quanto o duodeno, além de diminuir os níveis de MPO nas mucosas gástrica e duodenal. Associado a essa atividade protetora, o mirceno induz o aumento dos níveis de GSH, em ambas as mucosas, quando comparado com o controle negativo (veículo) (Bonamin *et al.*, 2014). O tratamento dos animais com mirceno nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, também promove efeito hepatoprotetor, diminuindo a produção de MPO e de óxido nítrico, marcadores do processo inflamatório, e aumentando a produção de GSH quando comparado ao fígado de camundongos que receberam altas doses de paracetamol (Cardia *et al.*, 2022). Apesar desse potencial efeito anti-inflamatório demonstrado pela literatura, a ação do mirceno no tecido intestinal, mais especificamente o cólon, ainda não foi avaliada.



**Figura 2:** Molécula de  $\beta$ -Mirceno (Surendran *et al.*, 2021, modificado pelo autor).

A hipótese para esse estudo é de que o mirceno pode proteger o intestino da inflamação causada pela RCU, revertendo o quadro colítico.

## 2- Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação de diferentes doses do mirceno em camundongos machos C57BL/J6 submetidos a RCU aguda pela administração de Dextran Sulfato de Sódio.

### 2.1 - Objetivos Específicos

- Padronizar o modelo de RCU no laboratório;

- Padronizar homogeneização do mirceno nas diferentes doses;
- Avaliar efeitos do DSS, nas concentrações de 2% e 2.5%, e do mirceno, nas doses de 3.75, 7.5, 11.25, 50, 100 e 200 mg/kg, em marcadores inflamatórios, como MPO, e de morte celular, como MDA, no cólon de animais submetidos RCU (DSS) e tratamento (mirceno) e
- Avaliar efeitos do DSS, nas concentrações de 2% e 2.5%, e do Mirceno, nas doses de 3.75, 7.5, 11.25, 50, 100 e 200 mg/kg, em marcadores do estresse oxidativo como CAT, GSH e SOD, no cólon de animais submetidos RCU (DSS) e tratamento (mirceno).

### **3 - Material e Métodos**

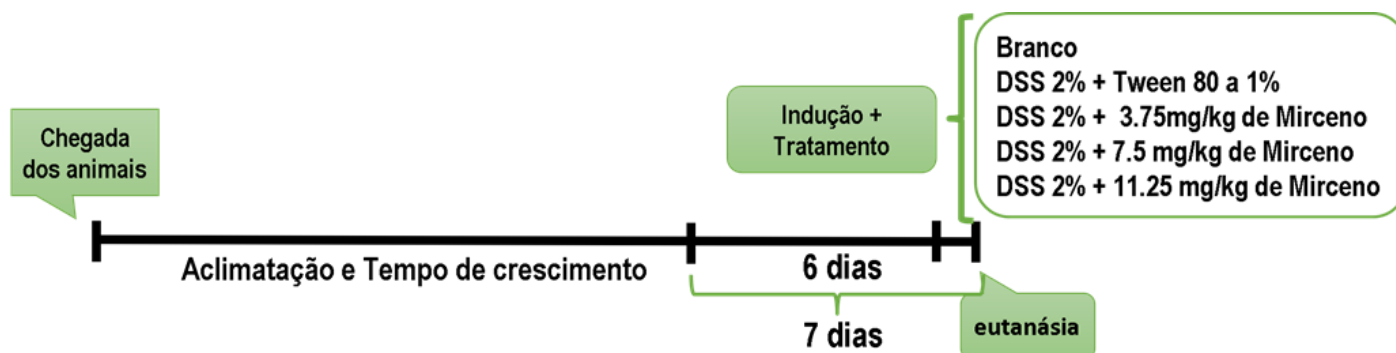
#### **3.1- Animais**

Para a realização do projeto foram utilizados camundongos C57BL/J6 machos (n=150), com aproximadamente oito semanas, oriundos do Centro de Pesquisa e Produção Animal – CPPA, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu (CEUA), de número 5437170821 (anexo 1). Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de camundongos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências, setor Fisiologia, UNESP – Botucatu, a uma temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo de claro-escuro de 12 horas controlados com acesso à alimentação e água *ad libitum*.

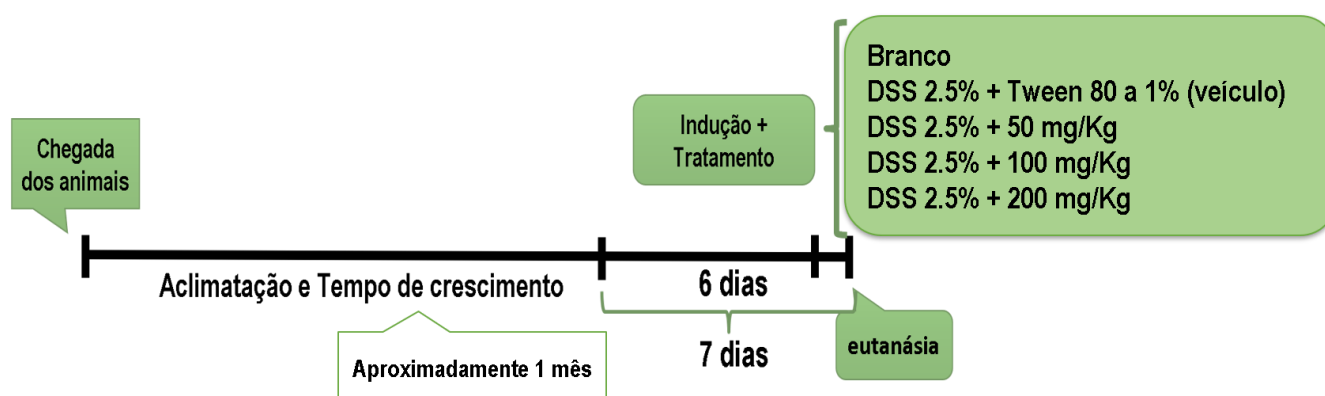
#### **3.2 – Indução da Retocolite Ulcerativa e Tratamento**

Para induzir o quadro de colite ulcerativa nos camundongos foi utilizado o método de indução por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) (Mähler *et al.*, 1998). Os grupos que receberam a indução da colite ulcerativa receberam água filtrada com 2% ou 2.5% de DSS durante 6 dias, concomitantemente houve o tratamento preventivo com o mirceno (figuras 3 e 4). Os tratamentos estão separados em dois grupos de curva dose-efeito o primeiro deles: 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, e mais o grupo veículo (Tween 80 a 1% a 10 mL/kg), e o segundo grupo curva dose-efeito: 50, 100 e 200 mg/Kg e o grupo veículo (Tween 80 a 1% a 10 mL/Kg) (Bonamin *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2019; Esteves Cardia *et al.*, 2022) A indução e o

tratamento começaram quando os animais atingiram 8 semanas de idade e massa corporal entre 18-22g (Melgar *et al.*, 2005; Stucchi *et al.*, 2000).



**Figura 3:** Esquema da indução com DSS (2%) e tratamento com as diferentes doses de mirceno (3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg).



**Figura 4:** Esquema da indução com DSS (2.5%) e tratamento com as diferentes doses de mirceno (50, 100 e 200 mg/kg).

### 3.3 - Índice de Desenvolvimento da Doença

Durante a indução da retocolite foi acompanhado a avaliação do índice de desenvolvimento da doença (IDD), através da análise da aparência e comportamento dos animais com base em parâmetros pré-determinados. Avaliou-se a perda de massa (em porcentagem), inflamação anal, consistência das fezes e presença de sangue nas mesmas. Os dados foram coletados durante os 6 dias da indução da RCU e tratamento com mirceno e foram analisados, por meio de score (Tabela 1), valendo de zero a cinco, sendo zero a ausência total do fator, e cinco o caso mais grave (Alex *et al.*, 2009).

**Tabela 1:** Tabela de score para o cálculo do IDD ao longo dos sete dias de experimento (Alex *et al.*, 2009).

<b>Pontuação Parâmetro</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Perda de massa</b>	1-4%	5-8%	9-13%	14-16%	17-20%
<b>Inflamação Anal</b>	Baixa	Baixa-Média	Média	Média-Alta	Alta (sangramento)
<b>Consistência das fezes</b>	Sólida-úmida	Mole	Pastosa	Líquida	Diarréia
<b>Presença de Sangue nas fezes</b>	Pequenos focos	Sangue visível	Metade das fezes com sangue	Sangue abundante nas fezes	Completamente tomada por sangue

### 3.4 – Coleta de Material

Após o tempo de tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, onde os animais foram anestesiados usando o equipamento de anestesia inalatória (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com Isoflurano<sup>®</sup>, sob a taxa 2.5-3%, e posterior taxa de 2-2.5% durante o procedimento. Com o animal sob anestesia profunda, foi realizado um corte na altura do diafragma do mesmo para expor a caixa torácica e o coração do mesmo, realizando a punção cardíaca com o auxílio de seringa e agulha para a coleta de sangue do mesmo. Foram coletados também cólon, estômago, fígado, baço e coração. O sangue foi posteriormente separado em soro, para análises bioquímicas. Tanto o cólon como o estômago foram abertos e limpos para a realização dos registros fotográficos. Para as análises bioquímicas do material, o cólon foi aberto longitudinalmente e posteriormente foi realizada a homogeneização do tecido com posterior congelamento em freezers -80°C até a utilização.

### **3.5 – Avaliação bioquímica das atividades de Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Mieloperoxidase (MPO) e dos níveis de Glutathiona Redutase (GSH) e Malondialdeído (MDA).**

Para quantificar a atividade da MPO foi utilizado o método de Krawisz *et al.* (1984). Amostras de tecido dos diferentes grupos, mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram solubilizadas com brometo hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e a atividade da MPO foi determinada por meio de um ensaio com Odianisidina, substrato da peroxidase. O tampão HTAB atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então é liberada. A atividade enzimática é determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 Unidade de mieloperoxidase é capaz de degradar 1 mmol/minuto de água oxigenada a  $25^{\circ}\text{C}$ . Os resultados foram expressos como unidade de MPO/g de tecido (Krawisz *et al.*, 1984).

Para quantificação do SOD foi realizado o método de Winterbourn *et al.*, (1975). As amostras de tecido foram diluídas em tampão fosfato, na proporção 1:20. Em 100  $\mu\text{l}$  do homogenato foram adicionados 150  $\mu\text{l}$  da solução de hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT – 0,6mM). A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD/g de tecido (Winterbourn *et al.*, 1975).

Para quantificação da atividade da CAT foi utilizado o método de Aebi, (1984). Sobre a amostra do tecido foi adicionada uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,01 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de catalase/minuto x g tecido (Aebi, 1984).

O nível de GSH foi quantificado pelo método de Faure & Lafond, (1995). O conteúdo de GSH foi determinado utilizando-se 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). A reação enzimática é constituída de 20  $\mu\text{l}$  da amostra, 140  $\mu\text{l}$  de NADPH, 5  $\mu\text{l}$  de PBS e 20  $\mu\text{l}$  DTNB. A absorbância será determinada em 412 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido (Faure *et al.*, 1995).

Determinado pelo método de Ohkawa *et al.*, (1979), a quantificação de MDA foi realizada medindo-se a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com amostras de tecido. Em tubos de ensaio foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de água destilada, 200  $\mu\text{L}$  de

lauril 8.1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de TBA 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400µL de amostra para a reação colorimétrica. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi determinada a 532 nm, e os resultados foram expressos em nmols de MDA/g de tecido (Ohkawa *et al.*, 1979).

### **3.6- Quantificação de citocinas (Multiplex)**

Foi utilizado o soro obtido dos animais para a quantificação de citocinas anti-inflamatória IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL- 33 com o kit MCYTOMAG-70K-04C (Merck Millipore, MA, USA) por ensaio multiplex. As instruções fornecidas pelos fabricantes foram seguidas na utilização dos kits.

### **3.7 – Análise Estatística**

Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para determinação de normalidade. Dados paramétricos foram submetidos a ANOVA de uma via para comparações de três ou mais grupos, seguidos do teste de Dunnett ou Tukey, e teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos, expressos por mediana. O valor mínimo de significância estatística considerado foi  $p < 0,05$ .

## **4. Resultado e Discussão**

### **4.1 - Análises Macroscópicas e Morfométricas**

Nesse trabalho inicialmente, a RCU foi induzida por seis dias com o DSS na concentração de 2% pois já existem dados da literatura acerca dessa indução em camundongos C57BL/6J (Lin *et al.*, 2020). Concomitantemente a indução da colite, foi realizado inicialmente o tratamento com mirceno (3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg), a fim de obter uma curva-dose resposta e caracterizar a menor dose efetiva do composto capaz de reverter o quadro inflamatório da RCU(Bonamin *et al.*, 2014). As doses de mirceno inicialmente selecionadas para essa avaliação se baseiam estudos prévio realizados por Bonamin *et al.*, (2014) que avaliou a ação gastroprotetora do monoterpene em ratos Wistar machos através da administração de etanol absoluto como agente lesivo gástrico. Subsequentemente, após a análise dos resultados obtidos inicialmente e em decorrência da ausência de ação efetiva do mirceno no cólon, um novo estudo foi realizado elevando a concentração de DSS para 2.5%,

assim como a elevação nas doses de mirceno para 50, 100 e 200 mg/kg (Cardia *et al.*, 2022), em busca de uma ação efetiva do composto na indução de RCU.

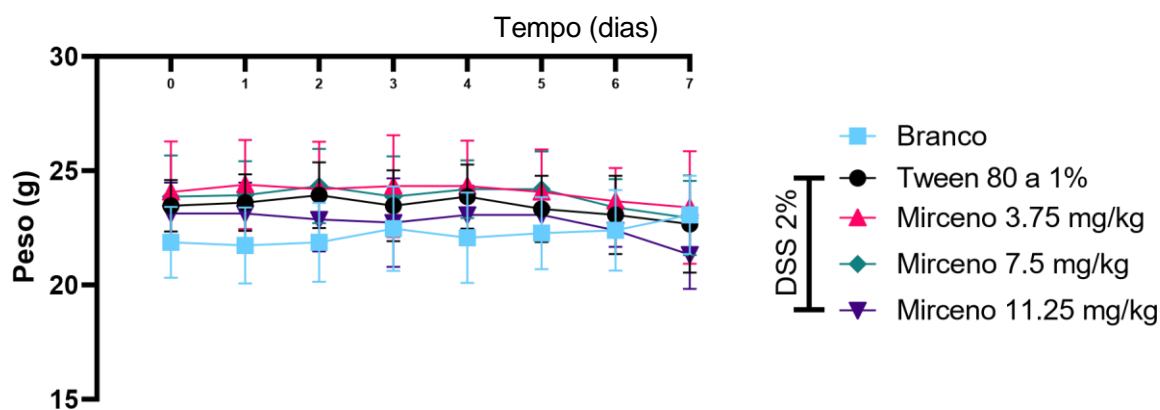
Para evitar a variabilidade de massa dos animais nos diferentes grupos e manter a homogeneidade da massa entre os grupos antes do início do experimento, foi realizada a análise estatística que assegurou a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos estudados ( $p > 0.05$ ).

Durante todo o período de indução de RCU, a evolução da massa corporal dos animais foi acompanhada diariamente para calcular o índice de IDD e assim acompanhar a evolução da doença nos animais.

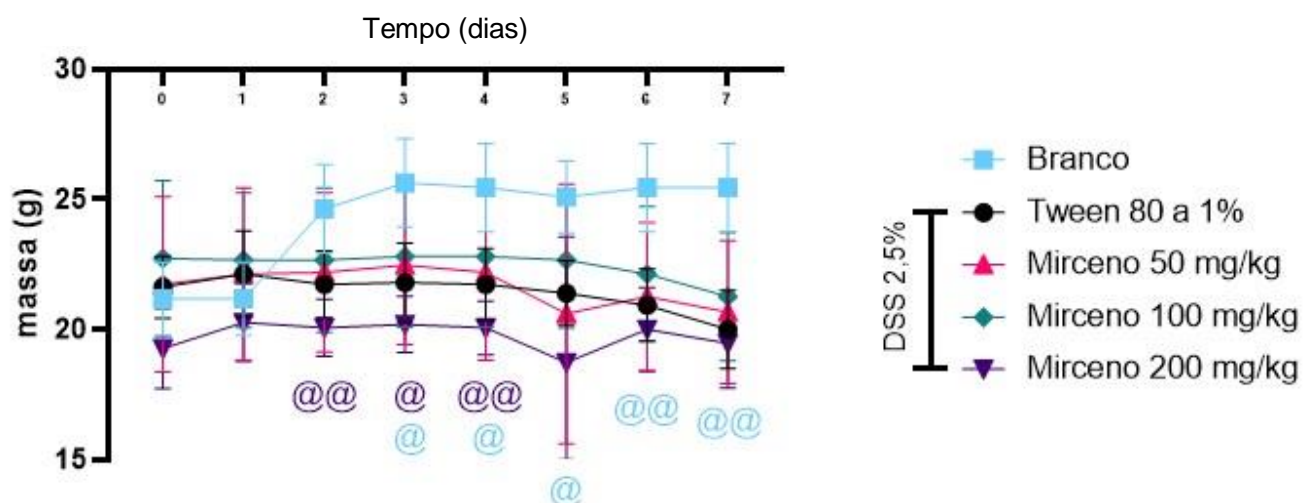
Para o grupo de animais induzidos por DSS 2%, nenhum grupo apresentou diferença significativa na evolução da massa corporal (figura 5). Na figura 6, é possível observar que os animais tratados com a dose de mirceno de 200 mg/kg apresentaram uma redução da massa corporal desde o segundo dia de indução da colite, quando comparados aos animais tratados com tween 80 a 1%, veículo utilizado no projeto (controle negativo). A redução significativa da massa corporal dos animais tratados com mirceno na dose de 200 mg/kg persistiu até o quarto dia de tratamento comparado com os animais submetidos ao veículo (controle negativo), e a partir do quinto dia de observação tal diferença não foi mais constatada de forma significativa. Além disso, é possível observar, a partir do terceiro dia, um aumento significativo da massa corporal dos animais pertencentes ao grupo branco, quando comparados com a massa dos animais do grupo veículo que sofreram a indução da colite com DSS a 2.5%. Os resultados apresentados nas figuras 5 e 6 indicam que a elevação na concentração

DSS de 2% para 2.5% afetou a massa corporal dos animais. Com o passar do tempo de indução observamos que somente os animais tratados com o veículo e submetidos a indução de colite com DSS a 2.5% apresentaram redução desse parâmetro em relação ao grupo branco.

A perda de massa dos animais submetidos a indução por DSS é um parâmetro já observado em estudos dessa doença, principalmente a partir do quarto dia de indução, e a perda de massa se mantém constante por até nove dias, como relatado por Yoshioka e colaboradores, 2008 (Yoshioka *et al.*, 2008).



**Figura 5:** Evolução da massa corporal de camundongos induzidos por DSS (2%) e tratados com mirceno (3.75, 7.5, 11.25 mg/kg), por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.



**Figura 6:** Evolução da massa corporal de camundongos induzidos por DSS (2.5%) e tratados com mirceno (50, 100 e 200 mg/kg), por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. @  $p < 0,01$  e @@  $p < 0,001$  vs Tween 80 a 1%.

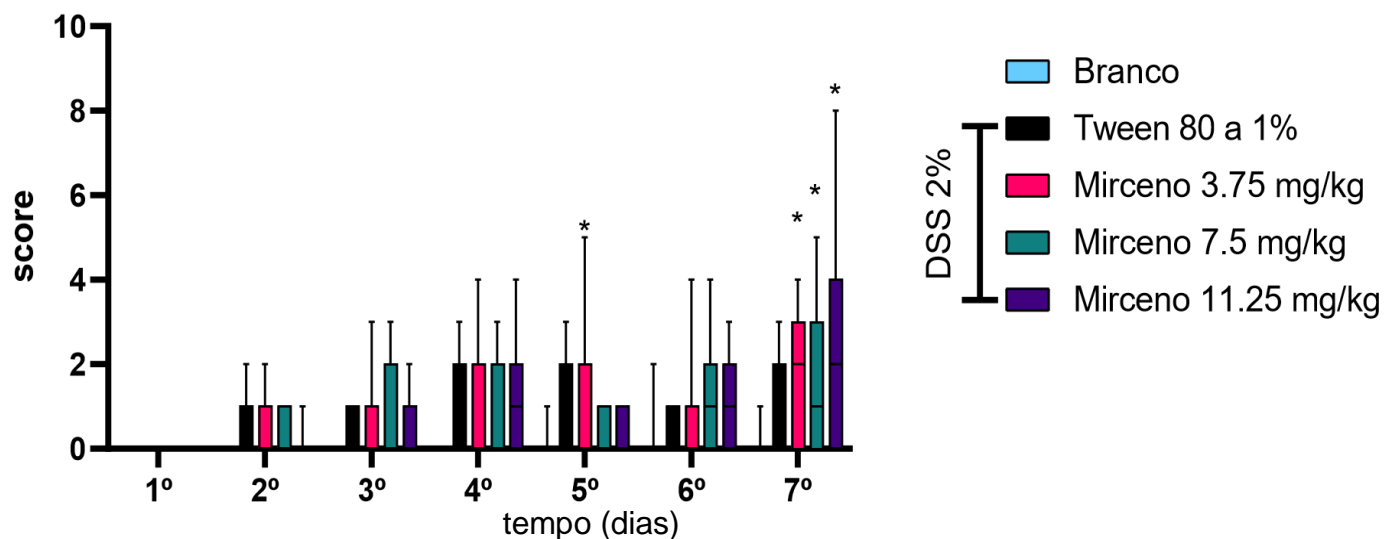
O IDD é uma forma de quantificar macroscopicamente e acompanhar o desenvolvimento progressivo da doença durante a indução da RCU (Wang *et al.*, 2022). Durante seis dias de indução da inflamação, a evolução do IDD nos camundongos foi avaliada diariamente em parâmetros como: inflamação anal, sangramento anal, presença de sangue nas fezes e perda de massa (em porcentagem). Esses parâmetros foram classificados em scores de 0 a 5 (Alex *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram que esses parâmetros são equivalentes aos sintomas clínicos de pacientes com RCU, por isso foram

considerados nesse modelo (Cooper *et al.*, 1993). O IDD também é utilizado para o desenvolvimento de novos medicamentos, como um indicativo de melhoria de sintomas humanos, sendo considerado como um ponto positivo a queda do score da doença (Cai *et al.*, 2021).

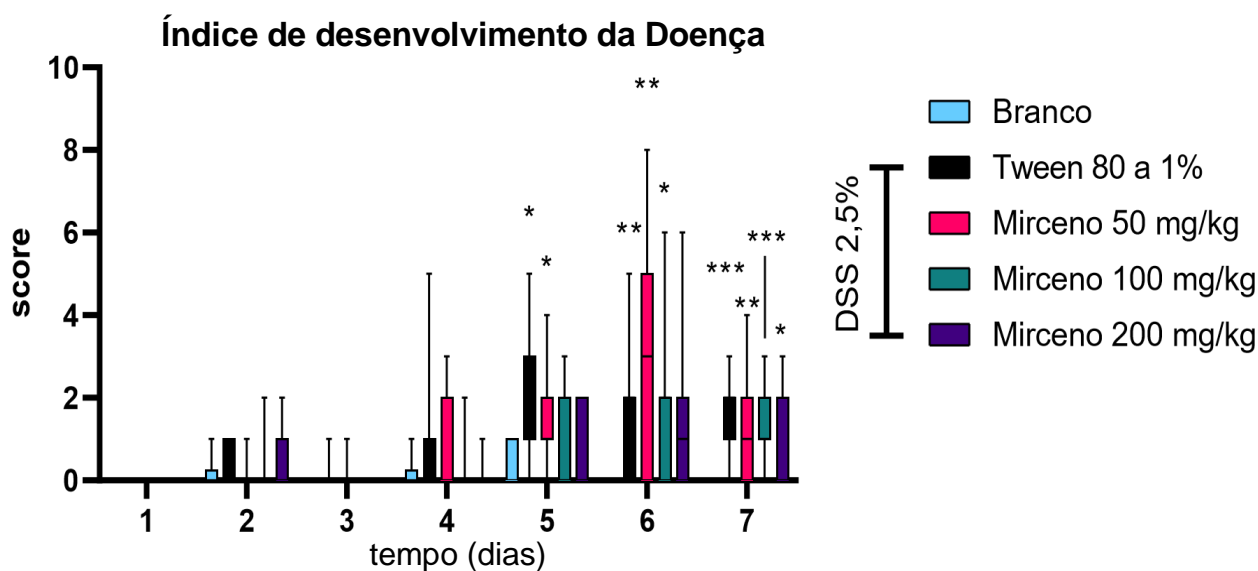
Na figura 7 é possível observar que o surgimento dos sintomas ocorreu a partir do segundo dia e que nenhum dos tratamentos realizados com o mirceno foi capaz de reverter as lesões causadas pelo DSS 2% quando comparado com os animais denominados de branco. Nesse estudo, tão pouco se observou elevação do IDD no grupo de animais submetidos ao DSS a 2% e tratados com o veículo em relação a grupo branco (sem DSS). Foi evidenciado que no quinto dia os animais tratados com a menor dose de mirceno (3.75 mg/kg) apresentaram sintomas mais evidentes da RCU, quando comparados com os animais do grupo branco. No sétimo dia de observação, todos os animais que foram submetidos ao tratamento com mirceno, nas três doses, também apresentaram sintomas mais evidenciados da RCU quando comparado ao grupo branco (sem tratamento com DSS).

Como demonstrado na Figura 8, os animais induzidos por DSS a 2.5% começaram a mostrar sintomas da RCU a partir do segundo dia de indução, assim como no estudo em que foi utilizado DSS a 2%. A partir do quinto dia, o score aumentou significativamente quando se comparou os grupos veículo e mirceno 50 mg/kg com o grupo branco. Esse aumento do score ocorreu nos dias subsequentes, não apenas nesses dois grupos, como nos demais grupos também (mirceno 100 e 200 mg/kg). Todos os grupos de indução com DSS e tratados com mirceno, apresentaram sinais de inflamação, chegando até a apresentar sangramento anal, variação na consistência e presença de sangue nas fezes, menos os seus respectivos grupos brancos.

### **Índice de Desenvolvimento da Doença**



**Figura 7:** Score calculado nos dias de indução por DSS a 2% e tratamento com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg. Os resultados foram expressos na forma de mediana (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon \*  $p < 0,01$  vs Branco.

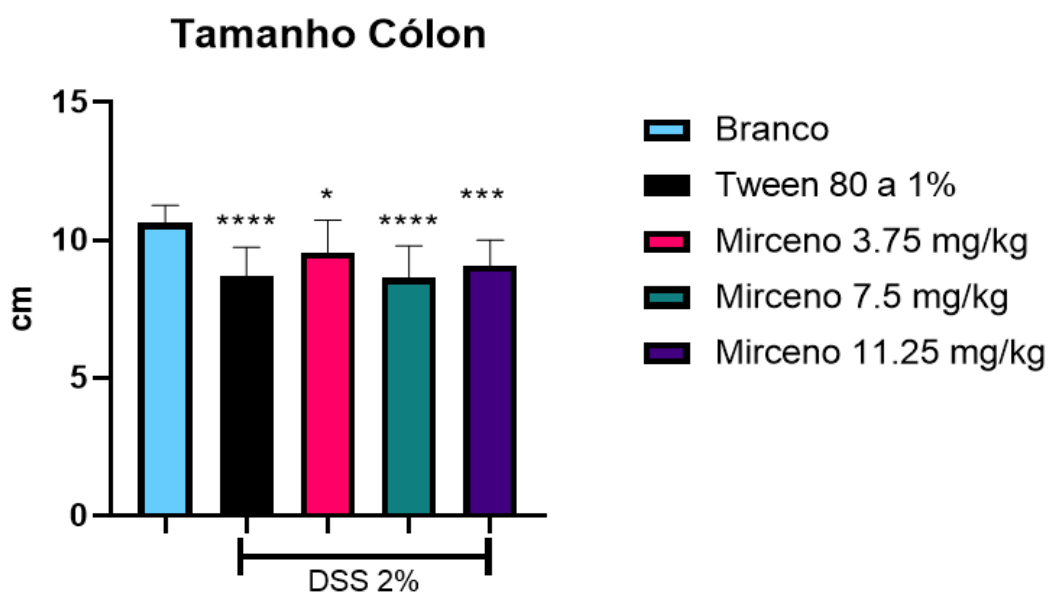


**Figura 8:** Score calculado nos dias de indução por DSS a 2.5% e tratamento com mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg. Os resultados foram expressos na forma de mediana (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,05$  vs Branco.

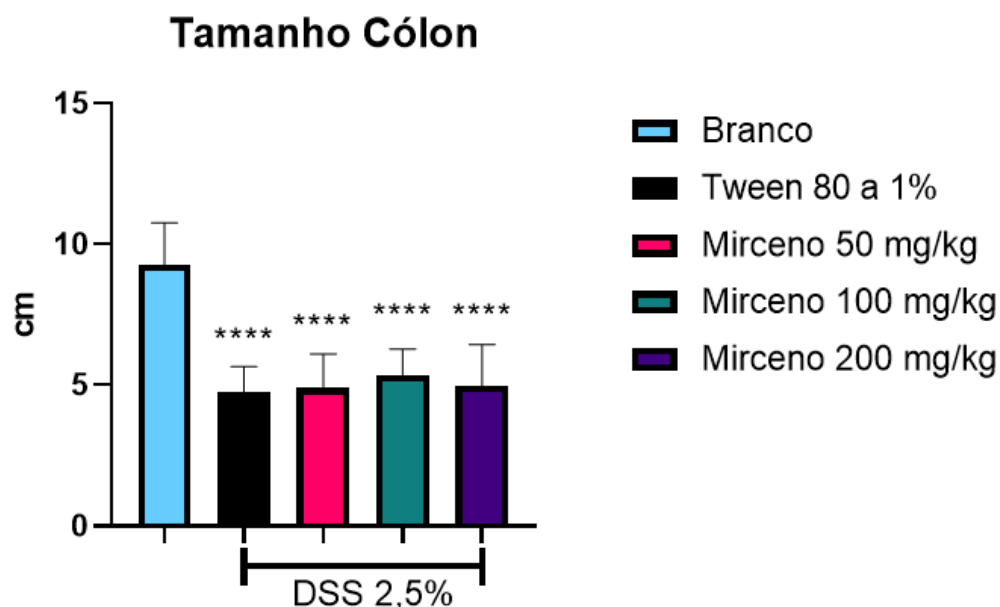
Segundo Nascimento e colaboradores (2020) outro importante parâmetro a ser considerado no modelo de indução por DSS é o encurtamento do cólon, fato

que foi observado em nosso estudo (Nascimento *et al.*, 2020). O encurtamento do cólon em decorrência da inflamação ainda não possui mecanismo completamente esclarecido, mas esse encurtamento do cólon pode ser devido a apoptose de células causada pelo desbalanço do sistema imune gerada pelo DSS. A apoptose possui como característica o encolhimento da célula, podendo modificar a estrutura do tecido (D'Arcy, 2019).

As figuras 9 e 10 representam a extensão do cólon (em cm) dos animais submetidos a indução por DSS em diferentes concentrações e tratados com veículo ou mirceno (três diferentes doses). Foi observado que todos os grupos induzidos por DSS, independente da concentração apresentaram encurtamento do cólon, indicando, portanto, a ação efetiva do DSS no tecido.

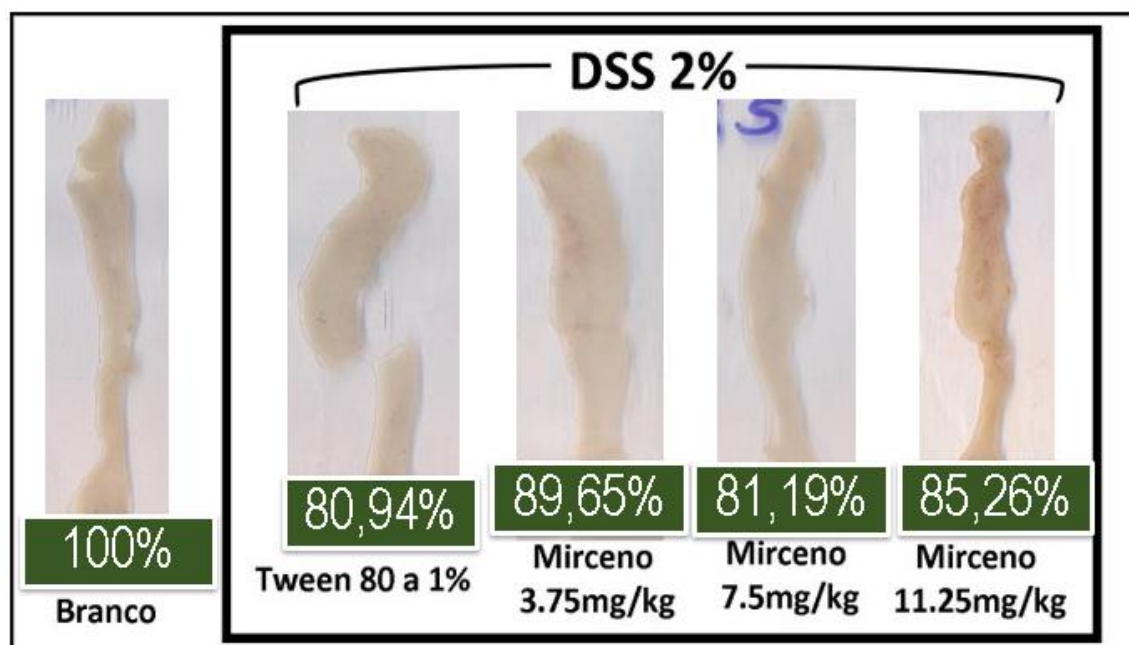


**Figura 9:** Comprimento dos cólons (cm) de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,005$  vs Branco.

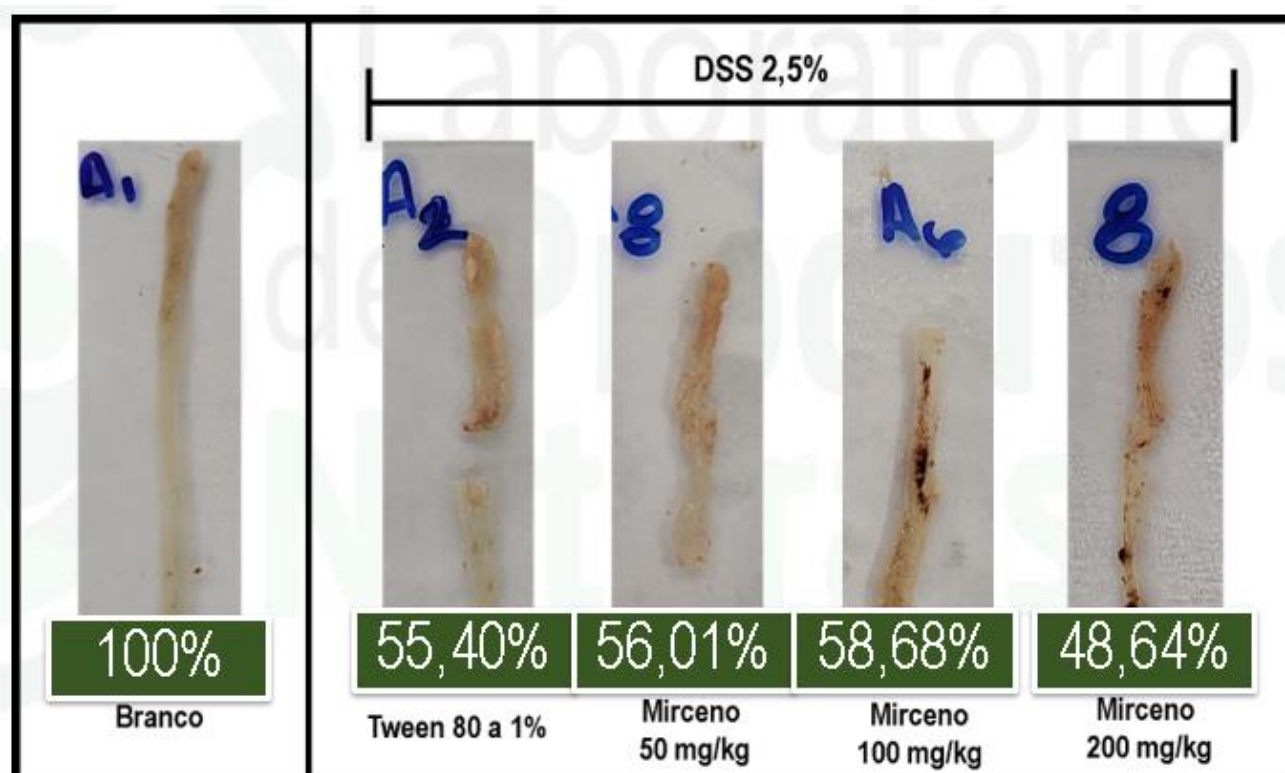


**Figura 10:** Comprimento dos cólons de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com miraceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,005$  vs Branco.

Na Figura 11 e 12 temos os cólons de cada grupo, com a porcentagem referente à média dos comprimentos dos cólons (sendo o Branco 100% do comprimento), e observamos que os cólons de todos os grupos que tiveram indução da RCU por DSS apresentaram encurtamento quando comparados com o grupo branco. Demonstrando assim, que ocorreu uma ação do DSS no cólon (Nascimento *et al.*, 2020).



**Figura 11:** Imagens representativas dos cólons de camundongos C57BL/J6 submetidos a RCU induzida pelo DSS a 2% na água de beber, e tratamento de mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, durante 6 dias.



**Figura 12:** Imagens representativas dos cólons de camundongos C57BL/J6 submetidos a RCU induzida pelo DSS a 2.5% na água de beber e tratados com mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg durante 6 dias.

Foram pesados cólon e estômago, para observar uma possível alteração, seja pela ação do DSS ou pelo tratamento com mirceno. Com relação ao cólon o aumento de massa ocorreu pela infiltração de macrófagos, que é mais intensa nesse local. Pode ocorrer um princípio de inflamação gerada pela baixa absorção do DSS no estômago, alterando assim sua massa. Para avaliar possíveis evidências toxicológicas da ação do DSS e/ou do mirceno, também avaliamos possíveis alterações de massa no baço e fígado. Estudos anteriores descrevem como uma das características da ingestão de DSS, o aumento da massa e comprimento do baço, que possivelmente se dá por uma anemia causada pelo modelo (Balaha *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

**Tabela 2:** Massa (mg) do Baço, Fígado, Cólon e Estômago de camundongos induzidos por DSS 2% e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=15) e a significância estatística foi determinada por teste ANOVA, seguido por teste de Tukey ou Dunnett. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

Tratamento /Órgão	Sem DSS	Indução de RCU por DSS			
	Branco	Veículo (Tween 80 a 1%)	Mirceno (3.75 mg/kg)	Mirceno (7.5 mg/kg)	Mirceno (11.25 mg/kg)
<b>Cólon</b>	0.0120 $\pm$ 0.0009	0.0144 $\pm$ 0.0011**	0.0135 $\pm$ 0.0021	0.0132 $\pm$ 0.0021	0.0140 $\pm$ 0.0025*
<b>Estômago</b>	0.0065 $\pm$ 0.0007	0.0066 $\pm$ 0.0007	0.0062 $\pm$ 0.0007	0.0068 $\pm$ 0.0010	0.0071 $\pm$ 0.0008
<b>Baço</b>	0.0025 $\pm$ 0.0002	0.0030 $\pm$ 0.0007*	0.0027 $\pm$ 0.0003	0.0026 $\pm$ 0.0003	0.0026 $\pm$ 0.0043
<b>Fígado</b>	0.0565 $\pm$ 0.0044	0.0555 $\pm$ 0.0047	0.0536 $\pm$ 0.0039	0.0529 $\pm$ 0.0048	0.0510 $\pm$ 0.0042*

**Tabela 3:** Massa (mg) do Baço, Fígado, Cólon e Estômago de camundongos induzidos por DSS 2.5% e tratados com mirceno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=15) e a significância estatística foi determinada por teste ANOVA, seguido por teste de Tukey ou Dunnett. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,001$  vs Branco.

Tratamento/ Órgão	Sem DSS		Indução de RCU por DSS		
	Branco	Veículo (Tween 80 a 1%)	Mirceno (50 mg/kg)	Mirceno (100 mg/kg)	Mirceno (200 mg/kg)
<b>Colón</b>	0.0124 $\pm$ 0.0016	0.0138 $\pm$ 0.0032	0.0122 $\pm$ 0.0026	0.0123 $\pm$ 0.0013	0.0117 $\pm$ 0.0021
<b>Estômago</b>	0.0078 $\pm$ 0.0005	0.0104 $\pm$ 0.0013**	0.0091 $\pm$ 0.0012	0.0099 $\pm$ 0.0018	0.00100 $\pm$ 0.0018*
<b>Baço</b>	0.0022 $\pm$ 0.0003	0.0028 $\pm$ 0.0005	0.0032 $\pm$ 0.0007**	0.0033 $\pm$ 0.0010*	0.0028 $\pm$ 0.0004
<b>Fígado</b>	0.0497 $\pm$ 0.0061	0.0471 $\pm$ 0.0034	0.0498 $\pm$ 0.0038	0.0501 $\pm$ 0.0041	0.0505 $\pm$ 0.0041

Foi observado na tabela 2 que o grupo de animais tratados com DSS 2% apresenta um aumento significativo da massa do cólon nos animais submetidos ao tratamento com mirceno na dose de 11.25 mg/kg e veículo (tween 80 a 1%), em comparação ao grupo branco (sem DSS) e também na dose de 11.25 mg/kg de mirceno, quando comparados com os animais do grupo branco. Já o baço apresentou um aumento significativo da massa no grupo veículo quando comparado com o grupo branco, resultados que corroboram com os dados já existentes na literatura (Chassaing *et al.*, 2014). Quando avaliado a massa do fígado, observamos uma diminuição significativa da massa no grupo que recebeu a dose de 11.25 mg/kg de mirceno, quando comparado com o grupo branco. Na tabela 3 são apresentados os animais submetidos a DSS 2.5%. Pode-se observar que os animais tratados com mirceno nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram elevação da massa do baço e redução da massa do estômago, quando comparado ao grupo dos animais brancos. O aumento da massa do estômago também é possível ser observada nos animais tratados com veículo, em comparação aos animais pertencentes do grupo branco (sem DSS).

#### 4.2 Marcadores de Estresse Oxidativo

O aumento da ação e atividade de agentes antioxidantes se mostra importante no quadro de RCU. Nishiyama e colaboradores (2012) usaram SOD e eliminadores de EROs (inalação de radônio) como tratamento para a doença, e foi

observado uma melhora do quadro colítico, estabelecendo uma relação entre o estresse oxidativo e a inflamação causada pela RCU (Nishiyama *et al.*, 2012).

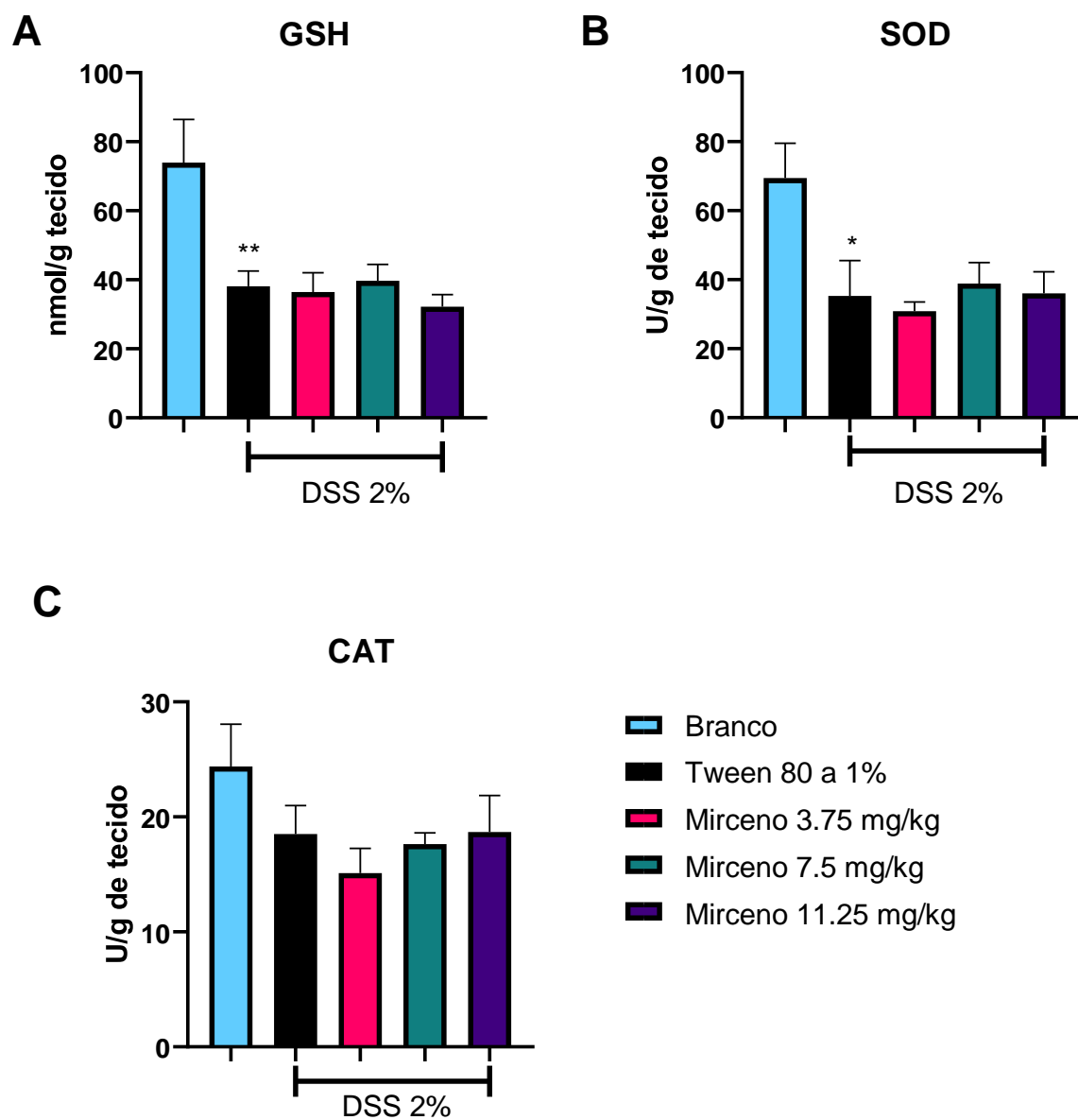
O SOD, primeira linha de defesa, normalmente apresenta queda em seus níveis quando o animal se encontra em um quadro inflamatório, comparados com animais saudáveis, assim como o GSH, responsável por sequestrar radicais livres. A CAT, neutraliza o radical livre do peróxido de hidrogênio, com o auxílio do GSH, transformando em oxigênio e água. Portanto, quando os animais apresentam um quadro inflamatório, frequentemente é observada uma diminuição na atividade da CAT (Liu *et al.*, 2020; Nishiyama *et al.*, 2012).

Na figura 13 observamos que o DSS a 2% foi capaz de diminuir significativamente os níveis de GSH (Fig 13A) e SOD (Fig 13B) do cólon dos animais tratados com veículo, em comparação com o grupo branco indicando, portanto, a efetividade do indutor da inflamação sob esse parâmetro. Porém, o tratamento dos animais com mirceno (nas diferentes doses) não alterou esses parâmetros antioxidantes, não existindo diferença significativa entre nenhum dos grupos que receberam o tratamento com mirceno e o grupo veículo ou o grupo branco. A figura 13C mostra que a atividade da CAT não se alterou independente da indução por 2% de DSS ou pelo tratamento com mirceno, indicando que o DSS nessa concentração não foi capaz de alterar esse parâmetro.

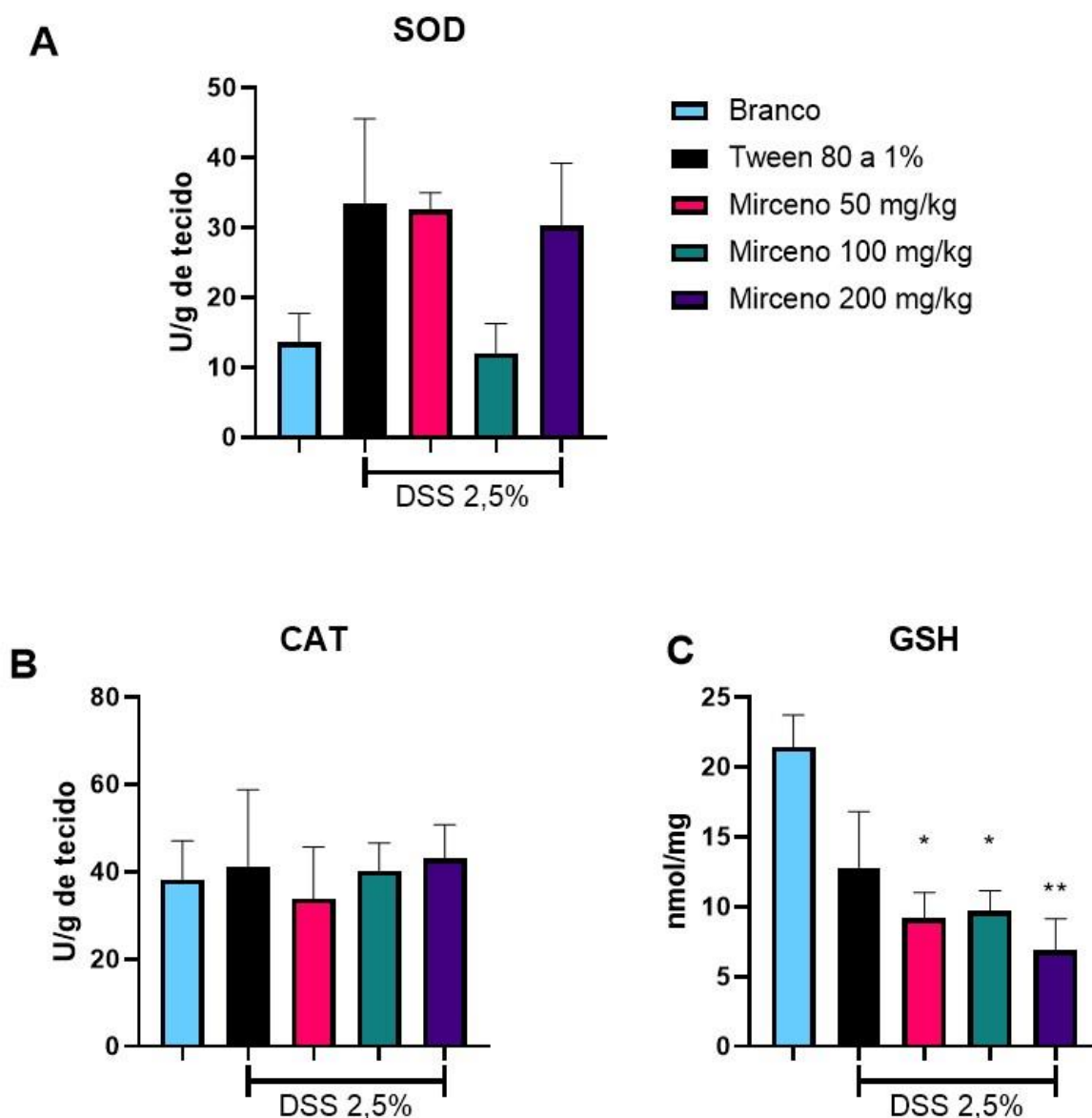
Podemos observar pela figura 14 os níveis de SOD (fig 14A) e GSH (fig 14C), e a atividade de CAT (fig 14B). A indução da colite por DSS a 2.5% e o tratamento com o mirceno foi capaz de alterar os níveis de GSH, em que é possível observar uma queda dos níveis dessa enzima nos três grupos tratados com mirceno (50, 100 e 200 mg/kg) quando comparados com o grupo branco, que não foi induzido por DSS. Na figura 8A é observado que o nível de SOD não sofreu alteração, independentemente do grupo observado e comparado. Segundo Liu e colaboradores (2020), o aumento nos níveis de SOD corresponde a um aumento da proteção antioxidante atribuída ao tratamento em questão, já que na indução por DSS ocorre a diminuição dos níveis desse marcador de estresse oxidativo (Liu *et al.*, 2020). Portanto, a ausência de alguma alteração nos níveis de SOD demonstra que a indução por DSS a 2.5%, assim como os tratamentos com mirceno, não foram capazes de alterar tal parâmetro.

Na figura 14B é observado que a atividade da CAT não se alterou independente do tratamento com DSS ou com mirceno, indicando que o modelo

utilizado com DSS não foi capaz de alterar esse parâmetro, diferentemente dos resultados mostrado por Liu e colaboradores (2020) em que a indução por DSS leva a uma diminuição da atividade da CAT (Lin *et al.*, 2020).



**Figura 13:** A - Quantidade de Glutathiona redutase (GSH); B - Superóxido Dismutase (SOD); C - Catalase (CAT) no cólon de camundongos induzidos por 2% de DSS e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=6) e a significância foi determinada pela ANOVA seguido por teste de Tukey. \*p < 0,01 e \*\*p < 0,001 vs Branco.



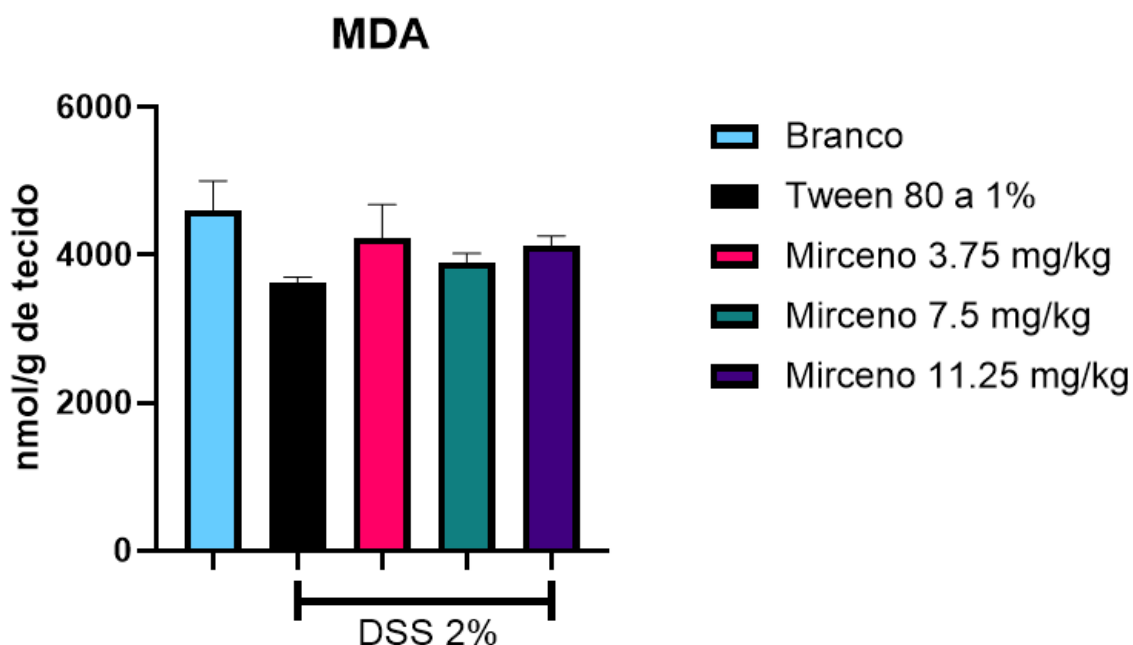
**Figura 14:** A - Quantidade de Glutathiona redutase (GSH); B - Superóxido Dismutase (SOD); C - Catalase (CAT) no cólon de camundongos induzidos por 2.5% de DSS e tratados com mirceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=6) e a significância foi determinada pela ANOVA seguido por teste de Dunnet. \*p < 0,01 e \*\*p < 0,001 vs Branco.

#### 4.3 - Malondialdeído

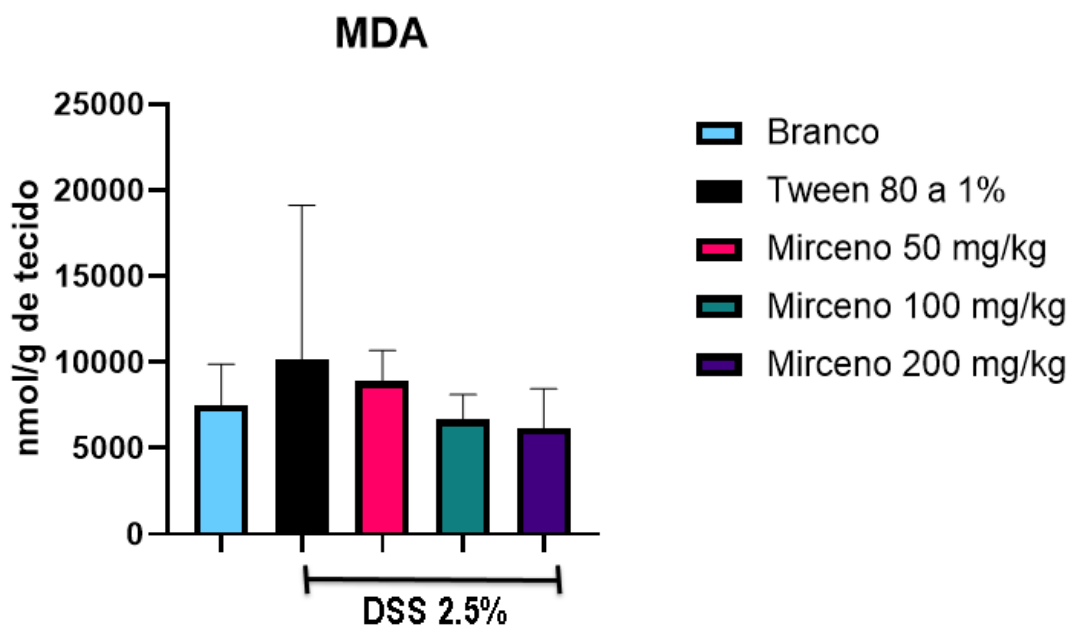
O MDA é utilizado comumente como um indicativo de dano de membrana plasmática, dano esse causado pelo intenso processo inflamatório e pelo desbalanço da resposta imune adaptativa causada pela inflamação. Segundo Liu e colaboradores (2020) os níveis de MDA aumentam nos modelos de indução de RCU

por DSS quando comparado o grupo veículo com o branco, confirmando que houve lesões no tecido. Assim como uma queda nos níveis de MDA ocorre nos grupos de animais que receberam um tratamento efetivo denotando um possível efeito de preservação da estrutura celular (Liu *et al.*, 2020).

Nos gráficos presentes nas figuras 15 e 16 é possível observar que a administração do DSS nas duas concentrações (2% e 2.5%) não foi efetiva em promover alterações significativas do nível de MDA nos respectivos grupos veículo, em comparação com seus respectivos grupos branco, assim como os grupos que foram tratados com mirceno, independente da dose. A ausência do aumento desse parâmetro pode estar relacionada com a necessidade do aprimoramento do modelo experimental. A literatura reporta vários estudos em que o DSS gera lesões teciduais no intestino e que esse parâmetro é indicativo da evolução da RCU ou da proteção de algum fármaco em teste (Ahmad *et al.*, 2022).



**Figura 15:** Quantidade de Malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

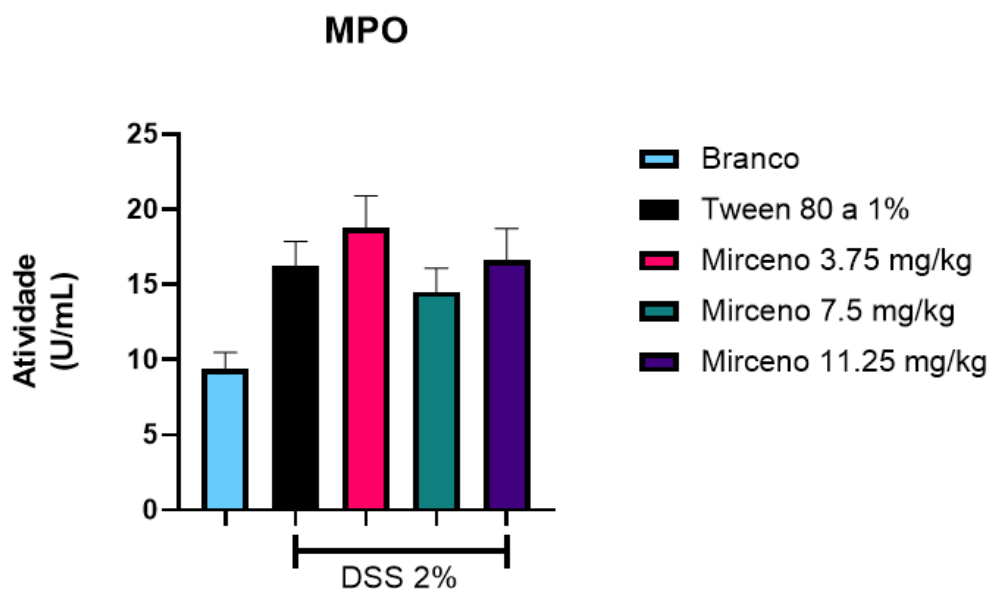


**Figura 16:** Quantidade de Malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com miraceno nas doses 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

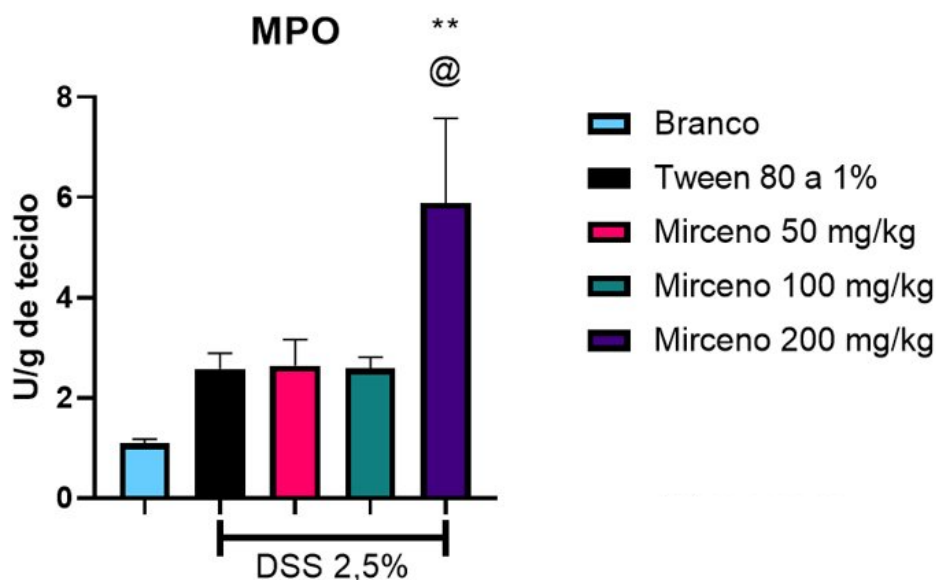
#### 4.4. - Atividade da Mieloperoxidase

A MPO é um marcador enzimático do processo inflamatório, desencadeado pelo DSS. Associado a patogenia da RCU, ela representa o aumento de neutrófilos, que se infiltram no tecido lesionado pela inflamação, aumentando a atividade de MPO no cólon inflamado (Yasukawa *et al.*, 2012). Segundo Kim e colaboradores (2012), camundongos C57BL/6 machos com RCU induzida por DSS apresentam aumento na atividade da MPO, quando comparado com animais saudáveis (Kim *et al.*, 2012).

É possível observar na figura 17 que o DSS a 2%, assim como o tratamento de miraceno nas diferentes doses utilizada, não promoveu nenhuma alteração no marcador enzimático MPO. Na figura 18 observamos que a atividade de MPO aumentou de forma significativa no grupo Miraceno 200 mg/kg quando comparado com o grupo branco e com o grupo veículo. Assim é possível concluir que o miraceno na maior dose contribuiu para o agravamento da inflamação do cólon.



**Figura 17:** Atividade da Mieloperoxidase no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno nas doses de 3.75, 7.5 e 11.25mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

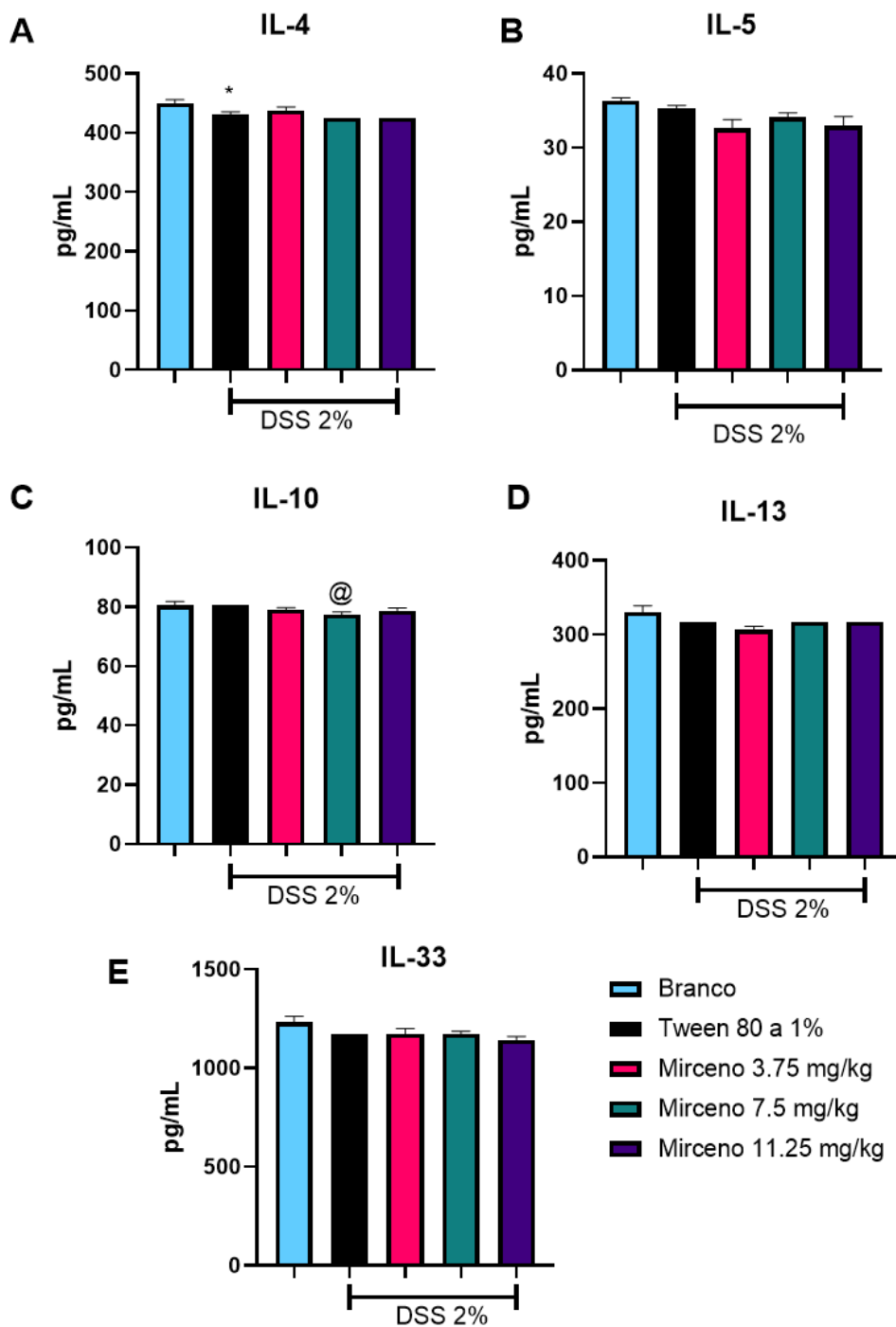


**Figura 18:** Atividade da Mieloperoxidase no cólon de camundongos induzidos por DSS a 2.5% e tratados com mirceno nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*p < 0,001 vs Branco e @p < 0,01, vs Veículo.

#### **4.5 - Interleucinas Anti-Inflamatórias**

Outro fator importante que caracteriza o perfil inflamatório é a produção de citocinas que fazem parte da via de sinalização e promovem a comunicação de células imunes epiteliais, inatas e adaptativas. Essas citocinas fazem parte do mecanismo de defesa contra as lesões causadas pela inflamação, quadro comum durante o desenvolvimento e cronicidade da RCU (Abraham *et al.*, 2011).

Na figura 19 podemos observar uma queda significativa da IL-4 no grupo Tween 80 a 1% (veículo) quando comparado com o grupo branco (Fig 19A) e também uma diminuição significativa da IL-10 (Fig 19C) nos animais tratados com mirceno na dose de 7.5 mg/kg, em comparação com o grupo veículo, demonstrando que o DSS foi capaz de desbalancear essas interleucinas em ambos os casos, mas em grupos diferentes. Segundo Abraham e colaboradores (2011), em geral, se observa o aumento das interleucinas anti-inflamatórias para controlar o processo inflamatório (Abraham *et al.*, 2011), o que não foi observado em nenhum dos resultados



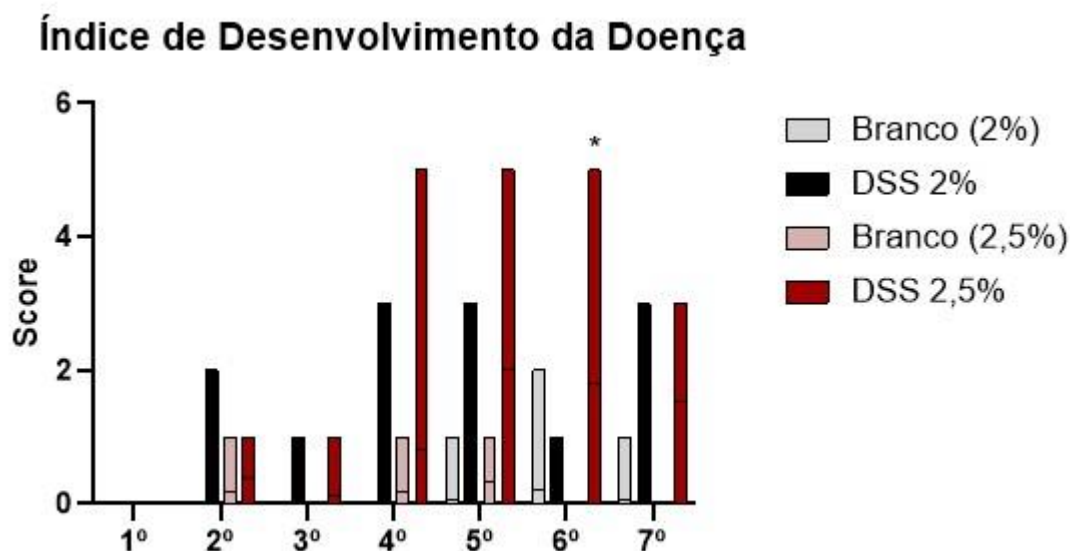
**Figura 19:** Níveis séricos de Interleucinas 4(A), 5(B), 10(C), 13(D) e 33(E) em camundongos induzidos por DSS a 2% e tratados com mirceno (3.75 mg/kg, 7.5 mg/kg e 11.25 mg/kg) por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=6), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \* vs Branco, @ vs Veículo,  $p < 0,01$ .

#### 4.6 Comparação entre DSS a 2% e DSS a 2.5%

Egger e colaboradores (2000), afirmam que a porcentagem de DSS na água dos animais contribui mais para o desenvolvimento da doença do que o consumo de água do animal (Egger *et al.*, 2000). Tendo em vista que esse modelo de indução de RCU por DSS não tinha sido executado em nosso laboratório anteriormente, examinamos se o DSS a 2% seria uma concentração mínima efetiva para gerar o quadro de RCU, e se um acréscimo de 0.5% de DSS afetaria os parâmetros de inflamação por nós estudados.

Os resultados aqui obtidos e que condizem com a literatura encontrada foram o IDD e o Comprimento dos cólons, por conta disso foram usados para comparar as diferentes concentrações de DSS.

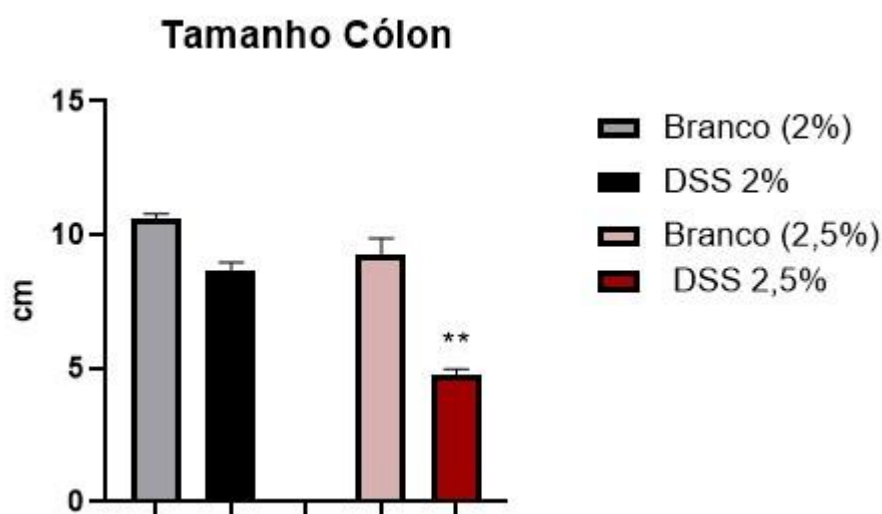
Na figura 20 é possível observar o IDD comparativo entre os animais brancos dos experimentos e seus respectivos grupos veículo. Nos animais que receberam a indução por DSS nas diferentes concentrações adicionalmente ao tratamento de tween 80 a 1%, é possível observar uma diferença no IDD no sexto dia, em que os animais que receberam o DSS a 2.5% apresentam um índice estatisticamente maior quando comparado com os animais que receberam DSS a 2%. Comparando os demais dias de indução, os grupos de animais que receberam DSS 2% e DSS 2.5% não apresentam diferença estatística no IDD.



**Figura 20:** Score os animais Branco e Tratados com Tween 80 a 1%, nos grupos induzidos por DSS a 2% e 2.5%. Os resultados foram expressos na forma de mediana (n=15), a significância foi determinada por teste de Wilcoxon. \*  $p < 0,01$ , \* vs DSS 2%.

Ambas as induções tiveram alteração do parâmetro comprimento do cólon, portanto foi realizada a comparação entre as diferentes porcentagens de indução. Egger e colaboradores (1997), relatam que o comprimento do cólon é um parâmetro comumente utilizado desde o início das pesquisas com DSS para a avaliação da instalação de RCU nos animais (Egger *et al.*, 1997).

É possível observar na figura 21 que existe uma diminuição do comprimento do cólon, quando se compara esse parâmetro dos animais submetidos ao DSS 2% com o DSS 2.5%. Assim é possível concluir que o DSS a uma porcentagem de 2.5% de fato agiu de forma mais intensa, quando comparado com o DSS a 2%.



**Figura 21:** Comprimento dos cólons de camundongos induzidos por DSS 2% e 2.5% por seis dias. Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  e.p.m (n=15), a significância foi determinada por teste ANOVA seguido por teste de Tukey. \*\*  $p < 0,001$ , \* vs DSS 2%.

Segundo Almarzooqi e colaboradores (2022) o mirceno, nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg é capaz de controlar a inflamação, suprimindo as vias de NF-kb, proteína envolvida na resposta imune inata e adaptativa, sistema que fica desbalanceado durante a RCU (Almarzooqi *et al.*, 2022). Como o que diferencia o estudo de Almarzooqi e o presente estudo é o veículo utilizado para a solubilização do mirceno, acreditamos no potencial terapêutico do mirceno, em dosagens maiores ou com veículos que melhorem a solubilização desse óleo essencial. Adicionalmente é importante avaliar o possível efeito pró-inflamatório do mirceno detectado em alguns dos nossos resultados. Porém, nosso estudo carece de uma forma segura e efetiva de homogeneização do mirceno. Além disso, temos que o

DSS a 2.5% não foi totalmente efetivo para a reprodução de uma inflamação que coincidissem com a encontrada em um quadro de RCU. Seria interessante um estudo sobre diferentes águas utilizadas para a solubilização (filtrada, autoclavada ou da torneira) e seus efeitos no desenvolvimento da inflamação, para a padronização desse modelo.

## 5. Conclusão

Concluimos que o mirreno não é capaz de ser um tratamento para o modelo agudo de RCU, independente da dose aplicada, já que não foi efetivo na proteção da mucosa frente ao desafio imposto pelo efeito lesivo induzido pelo DSS nos parâmetros que foram avaliados, dentre eles os marcadores de inflamatórios, de morte celular e de estresse oxidativo. O modelo utilizado foi efetivo para um princípio de indução de RCU, já que obtivemos resultados nos sintomas macroscópicos, tanto na porcentagem de DSS a 2% quanto na porcentagem de 2.5%, porém o modelo não foi capaz de promover alterações de parâmetros bioquímicos avaliados.

## 6. Referências

- Abraham, C., Medzhitov, R., 2011. Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 140, 1729–1737. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.012>
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahmad, T., Ishaq, M., Karpinić, S., Park, A., Stringer, D., Singh, N., Ratanpaul, V., Wolfswinkel, K., Fitton, H., Caruso, V., Eri, R., 2022. Oral *Macrocystis pyrifera* Fucoidan Administration Exhibits Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties and Improves DSS-Induced Colitis in C57BL/6J Mice. *Pharmaceutics* 14, 2383. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112383>
- Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.-E., Conklin, L.S., Centola, M., Li, X., 2009. Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 341–352. <https://doi.org/10.1002/ibd.20753>
- Almarzooqi, S., Venkataraman, B., Raj, V., Alkuwaiti, S.A.A., Das, K.M., Collin, P.D., Adrian, T.E., Subramanya, S.B., 2022.  $\beta$ -Myrcene Mitigates Colon Inflammation by Inhibiting MAP Kinase and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Molecules* 27, 8744. <https://doi.org/10.3390/molecules27248744>
- Atreya, I., Atreya, R., Neurath, M.F., 2008. NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 591–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01953.x>
- Balaha, M., Kandeel, S., Elwan, W., 2016. Garlic oil inhibits dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *Life Sci.* 146, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.012>

- Bernstein C, 2015, Inflammatory Bowel Disease. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/inflammatory-boweldisease-ibd/inflammatory-bowel-disease-ibd-english>. Acesso em Janeiro, 2023
- Bonamin, F., Moraes, T.M., Dos Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., Junior, I. V., Nogueira, L., Bauab, T.M., Souza Brito, A.R.M., Da Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A., 2014. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of  $\beta$ -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem. Biol. Interact.* 212, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.009>
- Cai, J., Liu, J., Fan, P., Dong, X., Zhu, K., Liu, X., Zhang, N., Cao, Y., 2021. Dioscin prevents DSS-induced colitis in mice with enhancing intestinal barrier function and reducing colon inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 99, 108015. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108015>
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., Vijay-Kumar, M., 2014. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 104. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J., 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69, 238–49.
- D'Arcy, M.S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- De Medina, F.S., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C., Martínez-Augustin, O., 2014. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2394–2404. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000204>
- de Souza, M.C., Vieira, A.J., Beserra, F.P., Pellizzon, C.H., Nóbrega, R.H., Rozza, A.L., 2019. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine* 53, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.027>
- Deng, L., Qi, M., Li, N., Lei, Y., Zhang, D., Chen, J., 2020. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* 108, 493–508. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0320-444R>
- Egger, B., Bajaj-Elliott, M., Macdonald, T.T., Inglin, R., Eysselein, V.E., Büchler, M.W., 2000. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: Cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 62, 240–248. <https://doi.org/10.1159/000007822>
- Egger, B., Procaccino, F., Lakshmanan, J., Reinshagen, M., Hoffmann, P., Patel, A., Reuben, W., Gnanakkan, S., Liu, L., Barajas, L., Eysselein, V., 1997. Mice lacking transforming growth factor alpha have an increased susceptibility to dextran sulfate-induced colitis. *Gastroenterology* 113, 825–832. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70177-X)
- Esteves Cardia, G.F., de Souza Silva-Comar, F.M., Bonetti, C.I., Teobaldo da Rocha, E.M., Zagoto, M., do Amaral, V., Bracht, L., Silva-Filho, S.E., Bersani-Amado, C.A., Nakamura Cuman, R.K., 2022. Hepatoprotective effect of  $\beta$ -myrcene pretreatment against acetaminophen-induced liver injury. *Avicenna J. Phytomedicine* 12, 1–12. <https://doi.org/10.22038/AJP.2022.19493>
- Faure, P., Lafond, J.-L., 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation, in: *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 237–248. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8_17)
- Feuerstein, J.D., Cheifetz, A.S., 2014. Ulcerative colitis: Epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin. Proc.* 89, 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.07.002>
- Groß, P., Doser, K., Falk, W., Obermeier, F., Hofmann, C., 2012. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1900–1909. <https://doi.org/10.1002/ibd.22900>
- He, W., Liu, M., Li, Y., Yu, H., Wang, D., Chen, Q., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, T., 2019. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer

- integrity. *Eur. J. Pharmacol.* 857, 172456. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172456>
- Kato, Y., 2016. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 58, 99–104. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.15-104>
- Kiesler, P., Fuss, I.J., Strober, W., 2015. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 154–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.006>
- Kim, J.J., Shajib, M.S., Manocha, M.M., Khan, W.I., 2012. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/3678>
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344–1350. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90202-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90202-6)
- Kucharzik, T., Lügering, N., Weigelt, H., Adolf, M., Domschke, W., Stoll, R., 1996. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin. Exp. Immunol.* 104, 483–490. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.39750.x>
- Le Berre, C., Ananthakrishnan, A.N., Danese, S., Singh, S., Peyrin-Biroulet, L., 2020. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Have Similar Burden and Goals for Treatment. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.005>
- Lin, R., Piao, M., Song, Y., Liu, C., 2020. Quercetin Suppresses AOM/DSS-Induced Colon Carcinogenesis through Its Anti-Inflammation Effects in Mice. *J. Immunol. Res.* 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/9242601>
- Liu, B., Piao, X., Niu, W., Zhang, Q., Ma, C., Wu, T., Gu, Q.C., Cui, T., Li, S., 2020. Kujieyuan Decoction Improved Intestinal Barrier Injury of Ulcerative Colitis by Affecting TLR4-Dependent PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B Oxidative and Inflammatory Signaling and Gut Microbiota. *Front. Pharmacol.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01036>
- Mähler, M., Bristol, I.J., Leiter, E.H., Workman, A.E., Birkenmeier, E.H., Elson, C.O., Sundberg, J.P., 1998. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 274, 6–9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.3.g544>
- Mather-Mihaich, E., Di Giulio, R.T., 1986. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to def and N-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 85, 427–432. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(86\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90220-3)
- Melgar, S., Karlsson, A., Michaëlsson, E., 2005. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: Correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 288, 1328–1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>
- Moldoveanu, A.C., Diculescu, M., Braticevici, C.F. Ierbintean., 2015. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom. J. Intern. Med.* 53, 118–127. <https://doi.org/10.1515/rjim-2015-0016>
- Nascimento, R. de P. do, Machado, A.P. da F., Galvez, J., Cazarin, C.B.B., Maróstica Junior, M.R., 2020. Ulcerative colitis: Gut microbiota, immunopathogenesis and application of natural products in animal models. *Life Sci.* 258, 118129. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118129>
- Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)

- Ng, S.C., Tang, W., Ching, J.Y., Wong, M., Chow, C.M., Hui, A.J., Wong, T.C., Leung, V.K., Tsang, S.W., Yu, H.H., Li, M.F., Ng, K.K., Kamm, M.A., Studd, C., Bell, S., Leong, R., de Silva, H.J., Kasturiratne, A., Mufeeena, M.N.F., Ling, K.L., Ooi, C.J., Tan, P.S., Ong, D., Goh, K.L., Hilmi, I., Pisespongsa, P., Manatsathit, S., Rerknimitr, R., Aniwana, S., Wang, Y.F., Ouyang, Q., Zeng, Z., Zhu, Z., Chen, M.H., Hu, P.J., Wu, K., Wang, X., Simadibrata, M., Abdullah, M., Wu, J.C., Sung, J.J.Y., Chan, F.K.L., 2013. Incidence and Phenotype of Inflammatory Bowel Disease Based on Results From the Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study. *Gastroenterology* 145, 158-165.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.007>
- Nishiyama, Y., Kataoka, T., Yamato, K., Taguchi, T., Yamaoka, K., 2012. Suppression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice by Radon Inhalation. *Mediators Inflamm.* 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/239617>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D.C., Sandborn, W.J., 2012. Ulcerative colitis. *Lancet* 380, 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60150-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60150-0)
- Périco, L.L., Emílio-Silva, M.T., Ohara, R., Rodrigues, V.P., Bueno, G., Barbosa-Filho, J.M., da Rocha, L.R.M., Batista, L.M., Hiruma-Lima, C.A., 2020. Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules* 10. <https://doi.org/10.3390/biom10020265>
- Quaresma, A.B., Kaplan, G.G., Kotze, P.G., 2019. The globalization of inflammatory bowel disease: The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 35, 259–264. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000534>
- Shen, Z.-H., Zhu, C.-X., Quan, Y.-S., Yang, Z.-Y., Wu, S., Luo, W.-W., Tan, B., Wang, X.-Y., 2018. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 24, 5–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Silva, Pinto, Mateus, 2019. Preclinical Study in Vivo for New Pharmacological Approaches in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Chronic Model of TNBS-Induced Colitis. *J. Clin. Med.* 8, 1574. <https://doi.org/10.3390/jcm8101574>
- Stucchi, A.F., Shofer, S., Leeman, S., Materne, O., Beer, E., McClung, J., Shebani, K., Moore, F., O'Brien, M., Becker, J.M., 2000. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 279, 1298–1306. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.6.g1298>
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., Heinrich, M., 2021. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Front. Nutr.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699666>
- Tan, Y., Zheng, C., 2018. Effects of Alpinetin on Intestinal Barrier Function, Inflammation and Oxidative Stress in Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis Mice. *Am. J. Med. Sci.* 355, 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.01.002>
- Tomasello, G., Mazzola, M., Leone, A., Sinagra, E., Zummo, G., Farina, F., Damiani, P., Cappello, F., Gerges Geagea, A., Jurjus, A., Bou Assi, T., Messina, M., Carini, F., 2016. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed. Pap.* 160, 461–466. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.052>
- Wang, D., Li, S., Ma, X., Chen, X., Tian, X., Li, X., Chen, L., Kang, Q., Wang, X., Jin, P., Lu, X., Fu, Y., Li, J., Sheng, J., 2022. Immunomodulatory effects of fentanyl and morphine on DSS- and TNBS-induced colitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 44, 1044–1057. <https://doi.org/10.1080/08923973.2022.2102993>

Wang, Z., Li, S., Cao, Y., Tian, X., Zeng, R., Liao, D.F., Cao, D., 2016. Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9875298>

Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 337–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214375904394>

Yasukawa, K., Tokuda, H., Tun, X., Utsumi, H., Yamada, K., 2012. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic. Res.* 46, 1427–1436. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.732698>

Yoshioka, Y., Akiyama, H., Nakano, M., Shoji, T., Kanda, T., Ohtake, Y., Takita, T., Matsuda, R., Maitani, T., 2008. Orally administered apple procyanidins protect against experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1802–1807. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.08.021>

Zhang, W., Zou, G., Li, B., Du, X., Sun, Z., Sun, Y., Jiang, X., 2020. Fecal Microbiota Transplantation (FMT) Alleviates Experimental Colitis in Mice by Gut Microbiota Regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1132–1141. <https://doi.org/10.4014/jmb.2002.02044>

## Anexo 1



Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ação do mirceno no modelo de retocolite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 5437170821 (ID 000307), sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências (IBB/UNESP) na reunião de 10/12/2021.

We certify that the proposal "Action of Limonene in the ulcerative colitis model induced by sodium dextran sulfate in mice.", utilizing 75 isogenics mice (75 males), protocol number CEUA 5437170821 (ID 000307), under the responsibility of **Clélia Akiko Hiruma-Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University/Biosciences Institute (IBB/UNESP) in the meeting of 12/10/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2021 a 03/2023 Área: Ciências Biológicas

Origem: CPPA - IBTEC/UNESP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 6 a 8 semanas

Quantidade: 75

Linhagem: C57BL/6j

Peso: 25 a 30 g

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Botucatu, 08 de março de 2023

X

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências



