

Avaliação da ação farmacológica do monoterpeno
Citral como tratamento preventivo para as doenças
inflamatórias intestinais



Melina Luzzi Zarricueta

BOTUCATU – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Avaliação da ação farmacológica do monoterpeno
Citral como tratamento preventivo para as doenças
inflamatórias intestinais**

Melina Luzzi Zarricueta

Prof^a. Titular Clélia Akiko Hiruma-Lima

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, 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.

BOTUCATU – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zarricueta, Melina Luzzi.

Avaliação da ação farmacológica do monoterpeno Citral como tratamento preventivo para as doenças inflamatórias intestinais / Melina Luzzi Zarricueta. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 20700008

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Medicina preventiva. 3. Essências aromatizantes. 4. Monoterpenos. 5. Citral.

Palavras-chave: Citral; Doenças inflamatórias intestinais; Modelo agudo; TNBS; Tratamento preventivo.

AUXÍLIO FINANCEIRO:

O presente trabalho foi realizado com os apoios da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 311957/2020-0).



Agradecimentos

Primeiramente queria agradecer a mim. Incomum né, porém é isso mesmo. Queria me agradecer pela força e coragem que tive nessa etapa da minha vida. Durante esses dois anos parecia que não ia conseguir, o medo me perseguia todos os dias, mas o desejo de concluir era muito maior. O mestrado foi o maior desafio que já enfrentei na minha vida, tanto o lado acadêmico, quanto pessoal. Porque ficar longe das pessoas que mais amamos, em um momento de turbulência, não é uma tarefa fácil, mas eu sabia que eles estavam lá, torcendo por mim. O meu maior sonho está sendo concluído, através de muita perseverança, mas principalmente muito amor próprio e autocompaixão. Obrigada Melina Luzzi, por não ter desistido e nunca se esqueça que você pode tudo aquilo que mais deseja, é só acreditar em si mesma.

Agora, minha mãe, Mônica Luzzi, você com certeza é a responsável por eu ter conseguido chegar até aqui. Por sempre me lembrar de quem eu sou e de tudo aquilo que sou capaz. Mãe, eu nunca serei capaz de agradecer tudo que fez por mim durante meu mestrado. Esse trabalho é dedicado a você, minha primeira inspiração profissional, a melhor professora do mundo. Obrigada por me mostrar que a vida não é fácil, mas que nós mulheres podemos conseguir tudo aquilo que almejamos.

Thiago Luzzi, meu querido irmão, esse mestrado também é dedicado a você. Sem a sua ajuda financeira e emocional, nada disso teria acontecido. No momento mais difícil você esteve aqui, do meu lado, não fisicamente, mas com muito amor e não me deixando desistir nunca. Obrigada por investir em mim e por acreditar que posso ser essa cientista, capaz de tudo. Você sempre será meu porto seguro!!

Meu companheiro, Pedro Imada, olha o que conseguimos. Enfrentamos esses dois anos de distância, com muita coragem e reciprocidade. Parece que toda essa turbulência aumentou ainda mais nosso amor e por isso, iremos enfrentar a vida juntos a partir de agora. Obrigada por toda a força e por nunca ter desistido de mim, muito pelo contrário, por me mostrar que eu era capaz de tanta coisa que nem eu mesma reconhecia. Você é luz.

Pai, Eduardo Zarricueta, obrigada por estar do meu lado nesse momento, me apoiando, me ensinando e sempre dizendo que eu iria conseguir. Lucas Luzzi, meu primo, meu irmão de alma, foi difícil esses dois anos longe, mas sei o quanto torceu e torce por mim, sempre é tudo tão recíproco entre nós. Você me acompanha constantemente, mesmo de longe, nunca me esqueci da nossa conexão. Obrigada por existir. Mara Luzzi ou Maria Lúcia, obrigada por sempre fortalecer

minhas ideias e entender minhas loucuras, porque como você sempre diz: a vida é bela! E ter alguém para partilhar a loucura da vida, não tem preço. Tio Maaau, ou chefe Anchovas, que ano histórico, nosso reencontro tornou tudo mais leve nessa minha jornada, obrigada por estar aqui agora!! Vô Jayme e vô Marlene, obrigada por sempre confiarem em mim e mostrar do que sou capaz! Vôzinho, esse mestrado é para o senhor. Amo vocês família!! Sem essa rede, não teria chegado tão longe.

Quélita, minha irmã científica, mais uma vez encerrando ciclo acadêmico juntas, obrigada por estar ao meu lado e dizer que eu ia conseguir mais essa etapa. Jaja rumo a Paris! Jade, Fernando, Vitor, Jenny, Cauê, Sarah, Yuri e Tainara vocês foram minhas forças, não teve um dia que não agradei nossa amizade, obrigada por sempre me fortalecer. Silvia, amiga que nunca imaginei ter aqui em Botucatu, obrigada pela nossa jornada, obrigada por me mostrar que ser feliz é o que importa nessa vida! Obrigada amigos.

Felipe Fagundes, desde 2018 juntos nessa jornada, não tem como eu expressar a quão grata sou pela sua vida e por estar ao meu lado em todos os momentos, seja feliz ou triste. Saiba que sem você eu não teria conseguido, obrigada por segurar minha mão e me mostrar que eu sou capaz de tudo, e nunca se esqueça que você é minha inspiração. Laura, a IC que adotei para mim, esse mérito é seu também, obrigada por tornar tudo mais leve. Felipinho, meu querido, que esteve comigo lá no início quando não tinha mais ninguém e me fortaleceu todos os dias. Equipe do laboratório LPNat, Gabriela, Priscilla, Renata, Maycon e Vinícius obrigada pela força e ajuda nesse projeto e por compartilharem um pouco desses dois anos aqui em Botucatu.

Professora Clélia e Lúcia, agradeço imensamente pela oportunidade que me deram em elaborar esse estudo e meu mestrado. Obrigada por me mostrarem que a vida não é fácil, que teremos que enfrentar tantas coisas difíceis nessa jornada, mas que com persistência e coragem iremos conseguir tudo que almejamos. Professora Raquel, ao meu lado há mais de quatro anos, e aqui no mestrado não seria diferente, obrigada por me auxiliar quando tudo tava perdido, obrigada por não soltar a minha mão e não desistir de mim. Nunca se esqueça que você é minha inspiração, tanto profissional como mulher. Obrigada por sua experiência.

Minha psicóloga Adriana, você também fez parte dessa etapa, obrigada pela ajuda, porque sem você, não teria passado por mais essa. Luciana e Dona Marlene, vocês são pessoas incríveis que tive oportunidade de conhecer, obrigada pelas conversas e conselhos, o que seria do departamento sem vocês, mulheres incríveis. Enfim, só tenho a agradecer, obrigada!

Prólogo

Adicionalmente a execução deste trabalho, foi realizado atividades complementares de cunho científico e extensão universitária, que agrega na formação pessoal e acadêmica.

Publicações de artigo científico:

- **ZARRICUETA, M.L.**; FAGUNDES, F. L.; PEREIRA, Q.C.; SANTOS, R. de C. Relationship between Hormonal Modulation and Gastroprotective Activity of Malvidin and Cyanidin Chloride: In Vivo and In Silico Approach. **Pharmaceutics**, v 14, pg 565, 2022.
- FAGUNDES, F. L.; PEREIRA, Q.C.; **ZARRICUETA, M. L.**; SANTOS, R. de C. Malvidin Protects against and Repairs Peptic Ulcers in Mice by Alleviating Oxidative Stress and Inflammation. **Nutrients**, v.13, n.10, 2021.

Premiações em eventos científicos:

- Menção Honrosa no 54th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. "Investigation of Proliferative Potential of Monoterpene Citral in Lineage of Intestinal Cells Caco-2." Fagundes, F.L., **Zarricueta, M.L.**, Caxali, G.H., Aal. M.C.E., Delella, F.K., Hiruma-Lima, C.A.

Publicações em eventos científicos:

- Fagundes, F. L.; Pereira, Q.C.; **Zarricueta, M. L.**; Santos, R. de C. "Predições em *in silico* e validação *in vivo* da toxicidade aguda da flavona Crisina". Reunião Regional da Federação das Sociedades de Biologia Experimental
- Silva, M. T. E., **Zarricueta, M. L.**, Rodrigues, V. P., Raimundo, P. R., da Rocha, L. R. M., Hiruma-Lima, C. A. "Antipyretic effect of myrcene (MCN) as a potential therapeutic alternative for the treatment of systemic inflammation response (SI) in euthermic rats model". Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos.
- Fagundes, F.L., **Zarricueta, M.L.**, Caxali, G.H., Aal. M.C.E., Delella, F.K., Hiruma-Lima, C.A. "Investigation of Proliferative Potential of Monoterpene Citral in Lineage of Intestinal Cells Caco-2". 54th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Participação em eventos científicos:

- Banca avaliadora na modalidade apresentação de painel no X Congresso de Biociências;
- Curso PCR em Tempo Real: do Zero à Análise de Dados;
- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, 2021 e 2022;
- I Congresso Nacional Multidisciplinar de Covid-19 (IFMSA);
- Participação no International Symposium in Inflammatory Diseases (Inflamma);
- I Congresso de Biotecnologia Brasil;

- Reunião Regional e Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (Fesbe);
- Participação no simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus potenciais terapêuticos (UFPB);
- Participou do evento Darwin Day - UNESP 2022, realizado em 08/06/2022, na cidade de Botucatu.

Extensão universitária:

- Monitoria no Curso de Férias: “Reprodução de A a Z” carga horária de 40 horas), 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 (Botucatu, SP) e vinculado à Rede Nacional Leopoldo de Meis de Educação e Ciência: Novos Talentos da Rede Pública (RNEC), no período de 21 a 25 de janeiro de 2022;
- Expositora das atividades do Curso de Férias, 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, totalizando 12 horas.

Disciplinas cursadas:

- Imunomodulação por produtos naturais;
- Interação entre a pós-graduação e o ensino básico de ciência e biologia;
- Biologia Celular;
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada;
- O cientista e o professor universitário;
- Experimentos clássicos em biologia molecular;
- Introdução a bioestatística.

Sumário

1. Introdução	14
2. Objetivo geral	21
3. Materiais e métodos	22
3.1. Animais	22
3.2. Modelo de colite aguda induzida por ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	22
3.3. Avaliação do processo inflamatório intestinal (Escore)	23
3.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	23
3.5. Determinação de Glutathione Reduzida (GSH)	24
3.7 Determinação da malondialdeído (MDA)	24
3.8 Análise estatística	24
5. Conclusão	37
6. Referências	38
7. Anexo	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
CU	Colite Ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationada reduzida
HTAB	Tampão brometo hexadeciltrimetilamônio
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-23	Interleucina 23
IL-27	Interleucina 27
IL-18	Interleucina 18
IL-15	Interleucina 15
IL-6	Interleucina 6
ILC2s	Células linfoides inatas do tipo 2
INF- γ	Interferon-gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MEI	Manifestações extraintestinais
MMP-3	Metaloproteinases do tipo três
MPO	Mieloperoxidase
MDA	Malondialdeído
NK	Células <i>Natural Killer</i> (NK)
TCD8	Linfócito T auxiliador CD8+
TGI	Trato gastrointestinal
TNBS	Ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: representação dos locais de manifestações das DII. Retirado de: www.medicina.ufmg.br/observaped/doenca-inflamatoria-intestinal/ (acessado 29/01/2023).

Figura 2: Imagem retirada do artigo de Kobayashi e colaboradores (2020) e adaptado para a língua portuguesa. Esse esquema representa a fisiopatologia da DII, onde a disbiose e a fragilidade na camada de muco do intestino aproxima a microbiota ao epitélio. Isso desencadeia uma cascata inflamatória, recrutando células leucocitárias e ativando o sistema imune local. Citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucinas) são liberadas, assim como são ativadas as células NK e linfócitos T (Kobayashi et al., 2020).

Figura 3: Estrutura da molécula do Citral. Retirado do PubChem (2023).

Figura 4: Desenho experimental do modelo de DII aguda induzida por TNBS em ratos Wistar machos. Os tratamentos utilizados foram Tween 80 a 1% - 10mL/kg (veículo) e o monoterpene Citral nas doses 25, 100 e 300 mg/kg.

Figura 5: Evolução da massa corporal de ratos Wistar tratados com Citral no modelo de DII aguda induzida por TNBS. A seta verde indica o primeiro dia dos pré-tratamentos (início) e a roxa sinaliza o último dia de tratamento (final). A seta vermelha indica o dia da indução de com TNBS. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

Figura 6: Massa relativa dos órgãos (massa órgão/animal - mg/g). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** $p < 0.01$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Figura 7: Atividade da MPO no estômago dos animais submetidos a DII induzida por TNBS. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** $p < 0.01$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Figura 8: A) Comprimento do cólon dos animais; B) Massa relativa do cólon (massa órgão/animal); C) Relação do cólon massa/comprimento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de

Dunnett, quando comparado com o grupo Tween 80 a 1%, sendo * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Figura 9: Escore de lesão no cólon de ratos Wistar com DII induzida por TNBS. Os resultados foram expressos como mediana ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pós teste Dunn. Para ** $p < 0.01$ comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Figura 10: Imagem do cólon dos animais submetidos a indução de DII por TNBS e utilizada para a avaliação do processo inflamatório intestinal (escore).

Figura 11: Áreas do tecido utilizado para quantificar a atividade da MPO do cólon dos animais. A) Tecido necrótico mais tecido da borda; B) Apenas tecido adjacente.

Figura 12: Quantificação da atividade da MPO no cólon dos animais submetidos à DII induzida por TNBS. A) atividade da MPO em tecido com necrose mais tecido adjacente; B) MPO apenas com tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Figura 13: Quantificação do nível de MDA no cólon dos animais submetidos ao modelo de DII induzida por TNBS. A) nível de MDA no tecido com necrose mais tecido adjacente; B) nível de MDA no tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Figura 14: Quantificação do nível de GSH no cólon dos animais submetidos ao modelo de DII induzida por TNBS. A) Nível de GSH em tecido com necrose mais tecido adjacente; B) Nível de GSH apenas no tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são inflamações crônicas que acometem o TGI do paciente, podendo causar quebra da barreira epitelial, lesões ulcerativas, mudanças no peso e comprimento do tecido, alteração na microbiota intestinal (disbiose), desencadear uma resposta autoimune e manifestações extraintestinais. A ativação do sistema imune desencadeia o mecanismo de inflamação local aguda, ocorrendo o aumento de células leucocitárias, liberação de enzimas de sinalização inflamatória e estresse oxidativo tecidual. Sendo assim, as terapias existentes no tratamento das DII são utilizadas para que o paciente se manter em remissão, diminua os sintomas da doença e module a resposta imune. Porém, os medicamentos utilizados causam efeitos colaterais, o que torna necessária a busca de novas terapias para as DII. Os produtos naturais são alternativas promissoras para minimizar o uso desses fármacos, como é o caso do monoterpene Citral, que já foi descrito como um composto anti-inflamatório e antiulcerogênico para algumas doenças do TGI. Portanto, o presente estudo apresenta resultados da ação do Citral, na forma de tratamento preventivo, em modelo agudo de DII induzida por um agente químico (TNBS). Ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade, receberam um pré-tratamento 48, 24 e 1 horas antes da indução da DII, assim como 24 e 48 horas depois, sendo eles: controle negativo – tween 80 a 1% (10 mL/kg), três doses do monoterpene (25, 100 e 300 mg/kg) e o sham (não colítico). Passadas 72 horas da indução, os animais foram eutanasiados e seus órgãos coletados. Foram feitas análises do tamanho e massa do cólon, escore da lesão, quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO), os níveis de glutathione reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA). A análise estatística foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis - dados não paramétricos - e análise de variância (ANOVA) – dados paramétricos, sendo adotado $p < 0.05$. O Citral, na dose de 300 mg/kg, foi capaz de diminuir o infiltrado neutrofílico no tecido do cólon adjacente, evidenciado pela menor atividade da enzima MPO, assim como manter os estoques de GSH intracelular. A dose de 100 mg/kg manteve os estoques de GSH no tecido adjacente. Para as análises do tamanho e comprimento do cólon, o escore de lesão e o aumento da massa do baço, os pré-tratamentos com o monoterpene não foram capazes de impedir essas alterações. Portanto o Citral administrado na forma de tratamento preventivo, na dose de 300 mg/kg, demonstrou que pode ser uma alternativa para melhorar o estresse oxidativo tecidual e a inflamação local. Com esses resultados em um modelo agudo de DII, torna-se importante a investigação de outras possíveis ações do monoterpene que possa modular o sistema imune e as citocinas pró-inflamatória em um tratamento preventivo.

Palavras-chave: doenças inflamatórias intestinais, modelo agudo, TNBS, tratamento preventivo, Citral.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammations that affect the patient's GI tract, which can cause breakdown of the epithelial barrier, ulcerative lesions, changes in tissue weight and length, alteration in the intestinal microbiota (dysbiosis), an autoimmune response and extraintestinal manifestations. Activation of the immune system triggers the mechanism of acute local inflammation, with an increase in leukocyte cells, release of inflammation enzymes and tissue oxidative stress. Therefore, the existing therapies in the treatment of IBD are used so that the patient remains in remission, reduces the symptoms of the disease and modifies the immune response. However, the drugs used cause side effects, which makes it necessary to search for new therapies for IBD. Natural products are promising alternatives to minimize the use of these drugs, such as the monoterpene Citral, which has already been described as an anti-inflammatory and anti-ulcerogenic compound for some GIT diseases. Therefore, the present study presents the results of the action of Citral, in the form of preventive treatment, in an acute model of IBD induced by a chemical agent (TNBS). Male Wistar rats, 8 weeks old, received a pre-treatment 48, 24 and 1 hours before the induction of IBD, as well as 24 and 48 hours later, as follows: negative control - 1% tween 80 (10 mL/kg), three doses of monoterpene (25, 100 and 300 mg/kg) and sham (non-colytic). After 72 hours of induction, the animals were euthanized and their organs collected. Analyses of colon size and weight, lesion score, quantification of myeloperoxidase (MPO), levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were performed. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test - non-parametric data - and analysis of variance (ANOVA) - parametric data, adopting $p < 0.05$. Citral, at a dose of 300 mg/kg, was able to reduce the neutrophilic infiltrate in the adjacent colon tissue, evidenced by the lower activity of the MPO enzyme, as well as maintaining intracellular GSH stores. A dose of 100 mg/kg maintained GSH stores in adjacent tissue. For analyses of colon size and length, lesion score and spleen mass increase, pretreatments with monoterpene were not able to prevent these changes. Therefore, Citral administered as a preventive treatment, at a dose of 300 mg/kg, proved to be an alternative to improve tissue oxidative stress and local inflammation. With these results in an acute model of IBD, it is important to investigate other possible actions of the monoterpene that can modulate the immune system and pro-inflammatory cytokines in a preventive treatment.

Keywords: inflammatory bowel diseases, acute model, TNBS, preventive treatment, Citral.

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são distúrbios crônicos que atingem o trato gastrointestinal (TGI), mas principalmente o intestino delgado e cólon. Essas doenças envolvem respostas exacerbadas do sistema imune inato e adaptativo (Kim & Cheon, 2017). São divididas em dois principais subgrupos, a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU), das quais compartilham sintomas clínicos semelhantes como diarreia, dor abdominal, hematoquezia, fadiga e perda de peso. Embora tenham características clínicas parecidas, elas podem ser diferenciadas quanto a sua localização e profundidade da inflamação, assim como a ativação das células imunes e citocinas produzidas (Chami et al., 2018). A CU inicia seu processo inflamatório no reto do paciente migrando para o cólon, de forma contínua por toda a parede epitelial, e a profundidade limita-se às camadas da mucosa e submucos (Danese & Fiocchi, 2011; Ho et al., 2020). Já a DC pode atingir qualquer parte do TGI de forma descontínua e frequentemente transmural (Baumgart & Sandborn, 2012).

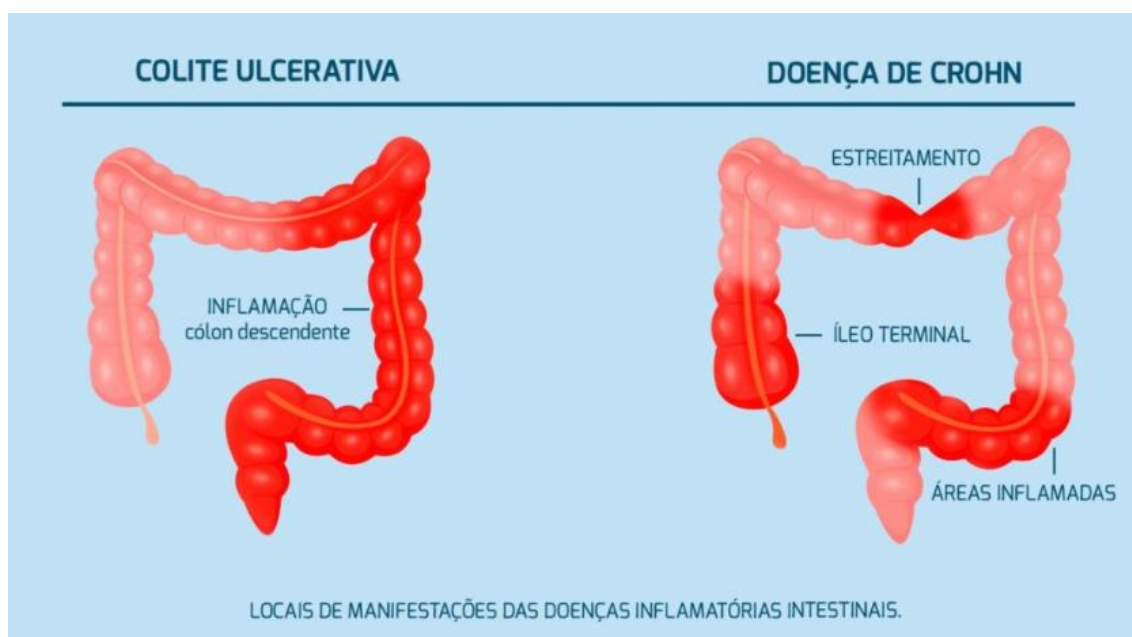


Figura 1: representação dos locais de manifestações das DII. Retirado de: www.medicina.ufmg.br/observaped/doenca-inflamatoria-intestinal/ (acessado 29/01/2023).

As DII são consideradas doenças da modernidade, pois seu surgimento está diretamente relacionado com o aumento exponencial da população global e o início da industrialização, que por consequência, levou ao excessivo consumo de alimentos ultraprocessados e com baixo índice nutricional (Kaplan & Ng, 2017). Inicialmente considerava-se que as DII estavam restritas à Europa e aos Estados Unidos, porém com a recente industrialização e a influência do estilo de vida dos países desenvolvidos e também em desenvolvimento ocasionou um aumento significativo na

incidência e prevalência na Ásia, África e Europa Oriental (de Souza, 2017; Kaplan & Ng, 2016). No Brasil, estudos demonstram que a incidência e prevalência das DII têm aumentado significativamente. Selvaratnam e colaboradores (2019) relataram que a incidência da CU variou de 4,3 para 5,3 a cada 100.000 pessoas-ano, enquanto a DC variou de 0,74 para 3,5/100.000 pessoas-ano. Já a prevalência para a CU variou de 15,0 para 24,1 a cada 100.000 habitantes e de 2,4 a cada 14,1/100.000 habitantes para DC (Selvaratnam et al., 2019). Esses dois índices vêm aumentando principalmente na região de São Paulo, quando comparados ao Espírito Santo e Piauí, por exemplo. Essa ocorrência pode ser justificada devido ao crescimento industrial acelerado e êxodo rural nas décadas passadas para o estado de São Paulo e outras regiões do sudeste brasileiro. Porém, a subnotificação e a falta de estudo em outros estados do território nacional podem contribuir para entender a real proporção desses índices na DII (Lima Martins et al., 2018; Quaresma et al., 2019). É importante ressaltar que nos países em desenvolvimento, a morbidade das DII está aumentando progressivamente, em contrapartida, a taxa de mortalidade está reduzindo, e isso pode estar relacionado com os tratamentos empregados para os pacientes que os mantém em remissão e que diminui os óbitos (Coward et al., 2019).

Mesmo com o aumento dos índices de prevalência mundial das DII, pouco se sabe sobre a sua etiologia (Ananthakrishnan, 2015). A fisiopatologia dessa doença pode ser considerada multifatorial, na qual inclui alterações na barreira epitelial, predisposição genética, desregulação do sistema imune e alteração na microbiota intestinal (Ramos & Papadakis, 2019; Ungaro et al., 2017). Alguns outros fatores relacionados ao cotidiano dos pacientes podem agravar ainda mais o quadro da doença, como o estresse e uma dieta baseada em alimentos industrializados (pobre em nutrientes), o que pode desencadear uma disbiose intestinal (Du & Ha, 2020; Johansson, 2014; Johnson & Loftus, 2021). Ainda não é bem compreendido pelos cientistas se a disbiose é um fator causal das DII ou se as DII geram uma disbiose intestinal (Khan et al., 2019). Estudos em roedores demonstram que o desequilíbrio na microbiota intestinal pode acarretar uma quebra da barreira da mucosa, permitindo a infiltração de bactérias no epitélio e aumentando a permeabilidade intestinal (Gkouskou et al., 2014; Paone & Cani, 2020).

Esse aumento na permeabilidade está diretamente relacionado à interação da microbiota intestinal com sistema imune entérico, que resulta em um quadro inflamatório (Antoni et al., 2014). A influência das DII no sistema imune leva a um alto grau de inflamação (Figura 2), não apenas local, como também em órgãos adjacentes ao cólon. Isso pode ser comprovado, com alguns mecanismos inflamatórios desencadeados pelo organismo, como por exemplo a elevação de infiltrados leucocitários (neutrófilos, monócitos e macrófagos) (Klebanoff, 2005). Essas células,

principalmente os neutrófilos, secretam uma enzima conhecida como mieloperoxidase (MPO), um marcador-chave da inflamação intestinal e diretamente associada às DII (Chami et al., 2018). Com a atividade da MPO, algumas células são recrutadas até o local e secretam citocinas pró-inflamatórias no tecido lesionado. Estudos demonstraram que na região do cólon afetada pelas DII ocorram um aumento de interferon gama (IFN γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-27) (Macias-Ceja et al., 2019; Sanchez-Muñoz et al., 2008; Yasukawa et al., 2012).

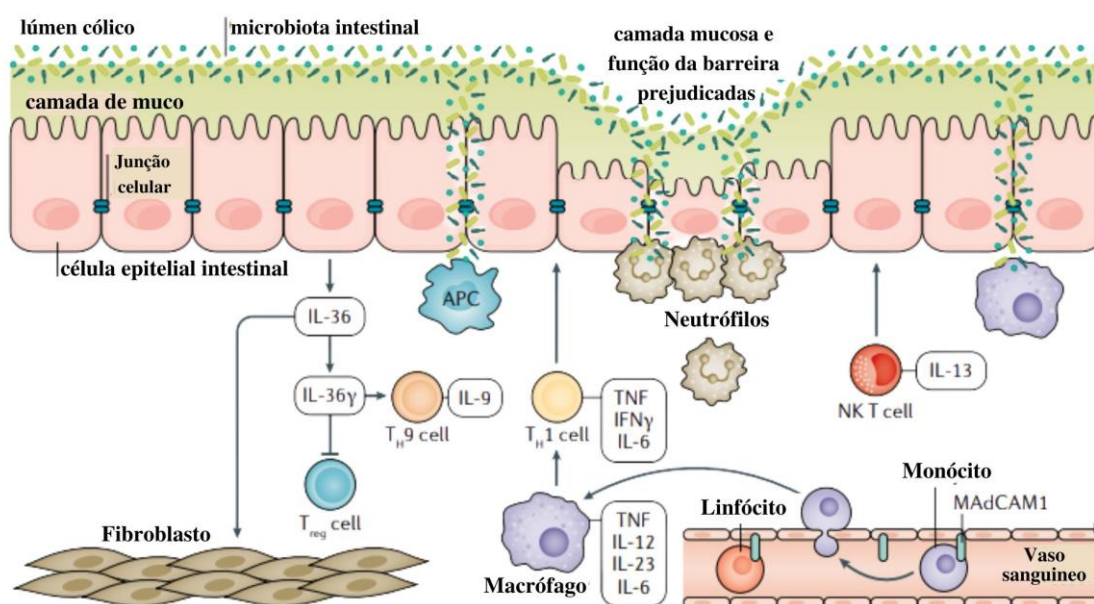


Figura 2: Imagem retirada do artigo de Kobayashi e colaboradores (2020) e adaptado para a língua portuguesa. Esse esquema representa a fisiopatologia da DII, onde a disbiose e a fragilidade na camada de muco do intestino aproxima a microbiota ao epitélio. Isso desencadeia uma cascata inflamatória, recrutando células leucocitárias e ativando o sistema imune local. Citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucinas) são liberadas, assim como são ativadas as células NK e linfócitos T (Kobayashi et al., 2020).

Apesar da constatação da existência de níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios na região lesionada, Arranz e colaboradores em 2009 demonstraram que, devido à ativação descontrolada do sistema imune desencadeada pela doença, a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias podem atingir tecidos adjacentes da inflamação, porém, sem alterações histológicas. Portanto, mesmo com a migração das células inflamatórias e a liberação de citocinas pró-inflamatórias para as áreas não afetadas (tecido e órgãos adjacentes), elas não têm a capacidade de desencadear mecanismos que degradam o epitélio tecidual (Arranz et al., 2009). Além dessa inflamação adjacente, estudos recentes apontam que pacientes com DII desenvolvem manifestações extraintestinais (MEI), que englobam o envolvimento de outros órgãos fora do TGI,

como por exemplo o trato hepatobiliar, pâncreas e o baço (Garber & Regueiro, 2019). Dados demonstram que pacientes portadores de DII são acometidos de 6% a 47% com MEI e que 25% desse total sofrem com múltiplas MEI (até cinco) (Rogler et al., 2021; Vavricka et al., 2015).

Além da inflamação, outro mecanismo diretamente relacionado às DII é o estresse oxidativo, que consiste na produção e liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Normalmente, tais radicais/moléculas são geradas no processo de metabolismo celular normal das mitocôndrias, porém quando associado às DIIs contribuem para agravar o quadro lesivo (Larabi et al., 2020). Devido a esse desequilíbrio na quantidade excessiva de EROs no tecido, há ativação dos sistemas de defesa antioxidante, composto pelo tripeptídeo - a glutathione reduzida (GSH) (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013). A GSH é um componente não enzimático responsável por sequestrar EROs durante o estresse oxidativo (Han et al., 2010). Concomitantemente às alterações causadas pelos EROs, ocorre também uma elevação na peroxidação lipídica no tecido que, por consequência, aumenta os níveis de malondialdeído (MDA), um importante marcador de estresse oxidativo (Honmore et al., 2015). Porém, o MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica e é altamente tóxica, prejudicando a função tecidual, pois degrada o epitélio, facilitando a infiltração neutrofílica e favorecendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Pérez et al., 2017).

Sendo assim, existem modelos clássicos já descritos na literatura para estudos pré-clínicos que mimetizam as características das DII, como é o caso da indução experimental da DII em roedores, empregando-se o TNBS (ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico) (Antoniou et al., 2016). Este agente químico é administrado nos animais através da via intrarretal e é solubilizado em etanol 50%. Administração conjunta com o etanol ocorre para que essa substância possa quebrar a barreira de proteção do intestino, degradando a mucosa e facilitando a infiltração e ação do TNBS no tecido e nas células, assim, desencadeando características morfológicas e histopatológicas semelhantes às das DII (Ikeda et al., 2008). O mecanismo de ação do TNBS é se associar com proteínas presentes na mucosa intestinal e formar um hapteno, pequena molécula imunogênica, para que possa ativar as células apresentadoras de antígeno e desencadear a resposta inflamatória (Randhawa et al., 2014). Neste modelo experimental normalmente são encontradas grandes áreas de ulceração e extensa necrose, acarretando em fibrose tecidual, alteração da massa e do comprimento do cólon e aumentando o infiltrado leucocitário (Cheon et al., 2012; Isik et al., 2011; Qin et al., 2011).

O TNBS está associado a ativação da resposta imune desencadeada pelo linfócito Th1. Essas células diferenciadas liberam IFN- γ , aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) através dos macrófagos (Nascimento et al., 2020). Karaboga e colaboradores (2017) realizaram o modelo de colite ulcerativa agudo induzido por TNBS em ratos, com dois grupos experimentais – colítico e controle - e foi constatado que, a resposta imune é desencadeada imediatamente após a administração do ácido, através ativação dos linfócitos Th17 nos animais colíticos. Assim como, constatou-se uma diferença histológica do tecido no grupo que recebeu o TNBS, caracterizada por erosão de células epiteliais, perda de células caliciformes, ulceração e inflamação (Karaboga et al., 2017). Machado e colaboradores (2021) realizaram o modelo de DII aguda em ratos induzida por TNBS, com cinco grupos – não colítico, colítico e três grupos de tratamentos. Foi observado que os animais não tratados (grupo colítico) obtiveram um escore da lesão elevado, alteração na relação da massa(mg)/comprimento(cm) e da incidência de diarreia (Machado et al., 2021).

Analisando esses dois trabalhos, observa-se várias manifestações das características de DII, como diarreia, perda de massa corporal, início de inflamação local e a liberação das citocinas pró-inflamatórias, mimetizando o momento inicial da doença na sua fase aguda (Sommer et al., 2021). Porém, pela história natural da progressão da doença, sabe-se que existem outras fases que precedem a evolução da doença, como a cicatrização do tecido, uma cronificação da inflamação e até mesmo as recidivas. Essas fases não podem ser demonstradas no modelo de DII aguda induzida por TNBS, mas mesmo assim, este modelo em roedores, é capaz de reproduzir as principais características do início da doença e serve também como um modelo para busca de novos agentes terapêuticos (Antoniou et al., 2016).

Devido a gravidade das DII e sua etiologia pouco conhecida, não há tratamento específico para essa doença. As terapias existentes hoje são de manutenção do paciente em remissão, diminuindo os sintomas durante a inflamação aguda para evitar uma ação sistêmica, assim como modular a resposta imune (Kobayashi et al., 2020). Os fármacos mais utilizados atualmente para o tratamento da DII são antibióticos (Sulfassalazina e Mesalazina), os anticorpos monoclonais direcionados a citocinas pró-inflamatórias (Infliximab), imunossupressores (azatioprina) e corticoides (Doherty et al., 2018). Porém, esses tratamentos além de não curar as doenças, estão associados a vários efeitos colaterais tais como: diarreia, dores abdominais e hipersensibilidade, assim como o alto custo desses medicamentos (Silva et al., 2019). Diante desse contexto, se faz necessário novas alternativas terapêuticas para o tratamento e cura das DII.

Pesquisadores estão em busca de novas estratégias terapêuticas através dos produtos naturais, isso porque são fonte de biomoléculas com ação farmacológica comprovada (Dutra et al., 2016). Nesse sentido, os terpenos são um grupo abrangente de compostos naturais que já foram identificados com milhares de combinações. São formados a partir do hidrocarboneto isopreno e classificados de acordo com o número de carbonos em sua molécula. Os terpenos já são muito utilizados nas indústrias alimentícias (aditivos de comida e bebida), de cosméticos (substâncias químicas de perfume) e farmacêutica (princípio ativo de alguns fármacos) (Boncan et al., 2020). Existe um subgrupo conhecido como monoterpenos que apresentam propriedades antibacteriana, antiulcerogênica, gastroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (Périco et al., 2020). Alguns monoterpenos como o Limoneno e o Geraniol, já foram descritos na literatura como substâncias capazes de reduzir significativamente os sinais clínicos da DII em modelo de indução com TNBS em ratos - com administração diária de 11 e 7 dias (respectivamente) (Araruna et al., 2020). Outro monoterpeno bem conhecido é o Citral (figura 3), um composto majoritário de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como por exemplo o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (Ribeiro et al., 2016).

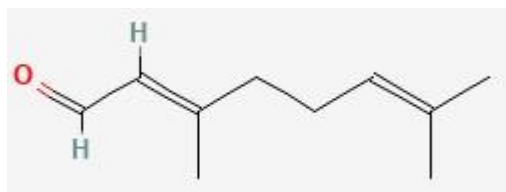


Figura 3: Estrutura da molécula do Citral. Retirado do PubChem (2023).

Emílio-Silva e colaboradores (2020), registraram um efeito anti-inflamatório do Citral, através da redução dos níveis séricos de TNF- α e diminuição dos níveis de IL-6 no hipotálamo durante a inflamação sistêmica induzida por LPS em camundongos obesos. . Nesse estudo os animais foram tratados através da via oral uma única vez com três doses (25, 100, e 300 mg/kg) do Citral (Emílio-Silva et al., 2020). Estudos *in silico* da molécula foram realizados, utilizando os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) e foi obtido um resultado com alto potencial de ser absorvida no TGI (probabilidade > 0,9919), baixo nível de toxicidade oral aguda e classificação da molécula na (maior que 50 mg/kg e menores que 500 mg/kg) e alta solubilidade em meio aquoso, prevendo sua biodisponibilidade de 0.55 (em uma escala de 0 a 1) (Gonçalves et al., 2020).

Apesar de trabalhos apontarem a atuação positiva do Citral no TGI e seus efeitos anti-inflamatório e antiulcerogênico, ainda não existem estudos descrevendo suas ações protetoras na

DII em modelos experimentais induzidos em roedores. Portanto, se faz necessário uma pesquisa mais aprofundada para avaliar o potencial desse monoterpeneo como nova alternativa terapêutica na DII.

2. Objetivo geral

Avaliar a eficiência do monoterpeno Citral como tratamento preventivo para as DII no modelo agudo induzido por TNBS em ratos Wistar machos.

2.1. Objetivos específico

2.1.1 Verificar o potencial farmacológico do Citral frente às alterações macroscópicas causadas pelo TNBS

2.1.2 Avaliar o efeito anti-inflamatório do monoterpeno no modelo de DII aguda induzida por TNBS e

2.1.3 Investigar os efeitos antioxidantes do Citral no cólon de ratos machos submetidos ao modelo de colite aguda.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 300 g, provenientes da ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA EPP (Paulínia- SP). Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de ratos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências - UNESP/Botucatu (5 animais por caixa), sob temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro-escuro (12/12 horas) com livre acesso à água filtrada e ração (Presence Labina). Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP) nº 8243240622 (Anexo 1).

3.2. Modelo de colite aguda induzida por ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS)

Ratos Wistar Machos foram divididos em 5 grupos: veículo (tween 80 – 1%), 3 grupos de tratamentos com monoterpeno Citral ($\geq 96\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e sham (grupo não submetido a administração do TNBS – não colítico). Eles receberam um pré-tratamento 48, 24 e 1 hora antes da indução da DII por TNBS (Sigma-Aldrich, Merck, USA), assim como 24 e 48 horas depois, sendo veículo (10 mL/kg) e tratamento com Citral nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg (Emílio-Silva et al., 2020). Para a indução da DII, os animais ficaram 6 horas de jejum e foram anestesiados com xilazina (12 mg/kg) e cetamina (10,5 mg/kg) – administrado via intramuscular antes da administração do TNBS. Após isso, uma sonda de 2 mm de diâmetro foi inserida cerca de 8 cm no reto do animal e administrado 10 mg de TNBS solubilizados em 0,4 mL etanol 50% (v/v). O grupo sham (não colítico) foi submetido aos mesmos procedimentos de indução da sonda no reto, entretanto, não recebeu a administração do TNBS. Passadas 72 horas após a indução da colite, os animais foram anestesiados, com administração inalatória, coletou-se amostras de sangue, através da punção cardíaca e realizou-se eutanásia (Figura 2). Foram retirados e pesados o cólon, coração, fígado, baço, rim, estômago e intestino delgado dos animais dos diferentes grupos. Os estômagos e cólons foram armazenados no biofreezer -80°C até sua utilização (Machado et al., 2021).

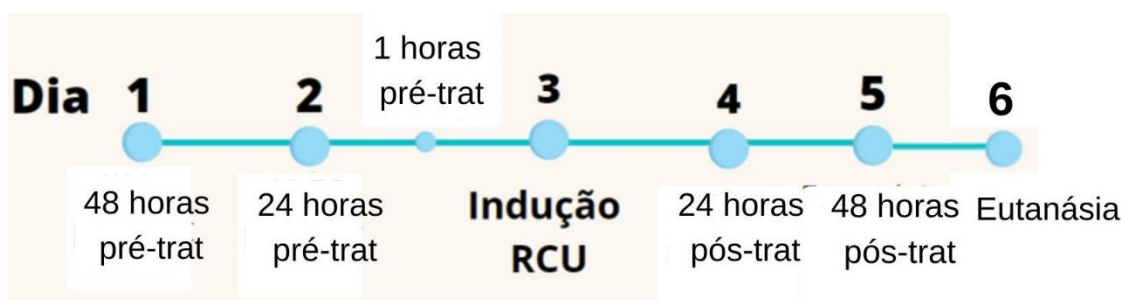


Figura 4: Desenho experimental do modelo de DII aguda induzida por TNBS em ratos Wistar machos. Os tratamentos utilizados foram Tween 80 a 1% - 10 mL/kg (veículo) e o monoterpeno Citral nas doses 25, 100 e 300 mg/kg.

3.3. Avaliação do processo inflamatório intestinal (Escore)

Após a eutanásia, o cólon dos animais foi aberto, lavado e fotografado para realizar a análise macroscópica, assim como, avaliou-se a massa (g), comprimento (cm), severidade e extensão da lesão intestinal de acordo com o escore (tabela 1) já descrito na literatura (Bell et al., 1995).

Escore	CrITÉRIOS
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Tabela 1: Critério de determinação de escore de lesão cólica.

3.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Amostras de estômago e cólon, armazenadas a -80°C, foram pesadas e solubilizadas no Tampão HTAB (brometo hexadeciltrimetilamônio - proporção 1:20) para serem homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 4°C em 8300 rcf), descartado o sobrenadante e alíquotas das amostras (50 µl) foram transferidas para placa de leitura de 96 poços. Em seguida, adicionou-se em cada poço 150 µl de tampão de reação Cloridrato de o-dianisidina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e as placas foram levadas até o

espectrofotômetro, com a temperatura de 37°, a absorbância foi determinada em 495 nm e expressos como unidade de MPO/g de tecido (Krawisz et al., 1984).

3.5. Determinação de Glutathione Reduzida (GSH)

Para determinação do GSH no cólon, foi utilizado o composto 5,5-ditio-bis (ácido 2 nitrobenzóico) (DTNB). A reação enzimática foi constituída de amostra, a curva composta por L-glutathione reduzida e DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido (Faure & Lafond, 1995).

3.7 Determinação da malondialdeído (MDA)

O MDA foi determinado pelo método de Ohkawa et al. (1979), quantificando a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) em amostras de tecido. Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de água destilada, 200 µL de SDS a 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 foi medida a 532 nm em espectrofotômetro, e os resultados foram expressos em nmols de MDA/g de tecido (Ohkawa et al., 1979).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão médio (e.p.m) no caso de dados paramétricos e a mediana – dados não paramétricos. Para a comparação entre três grupos ou mais foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA), utilizando os pós teste de Dunnett ou Tukey. No caso de dados não paramétricos empregou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn. Foi adotado $p < 0.05$ como critério de significância estatística.

4. Resultado e discussão

O modelo clássico de indução da DII com administração de TNBS e etanol 50% foi utilizado nesse projeto no intuito de mimetizar o processo ulcerogênico agudo e o desencadeamento do processo inflamatório intestinal no animal. A literatura reporta que esse modelo representa grande similaridade com a condição biológica humana no início da doença (Nascimento et al., 2020). O etanol desempenha um papel essencial na gênese da inflamação, pois tem a capacidade de promover a quebra da barreira mucosa e o contato com o epitelial, possibilitando que o TNBS penetre no tecido. A partir disso, o ácido (TNBS) tem a capacidade de se conjugar com as proteínas transmembranas, aumentando seu potencial inflamatório e desencadeando uma resposta do sistema imune (Karaboga et al., 2017). Portanto, o pré-tratamento com o Citral, através da via oral, nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg tem como objetivo avaliar a capacidade desse terpeno em proteger o cólon dos agentes lesivos, assim como estudar um potencial de ação anti-inflamatória e antioxidante dessa substância.

Para caracterizar o processo inflamatório desse modelo nos animais, a evolução da massa corporal foi um dos parâmetros avaliados durante todo o período de experimento. Após a eutanásia, algumas análises macroscópicas dos cólons foram realizadas, como verificação do comprimento (cm), da massa relativa (mg) (Machado et al., 2021) e o escore das lesões, de acordo com Bell et al., (1995). Alguns órgãos que estão relacionados com o sistema imune, excretor e com o TGI foram pesados (estômago, intestino delgado, fígado, baço, rim e coração), para obter a relação massa do órgão/animal e avaliar se houve alguma alteração proveniente da administração do Citral e/ou TNBS, bem como uma possível ação tóxica que poderia ser evidenciada por essa análise.

O primeiro parâmetro investigado, após a eutanásia dos animais submetidos a um modelo de indução de DII, é a evolução da massa corporal em relação ao tempo (dia a dia). O resultado da evolução da massa corporal dos animais submetidos ao pré-tratamento com o Citral e ao TNBS, mostrou que, quando comparados entre eles, não houve diferença significativa entre os cinco grupos (Figura 5). Pode observar-se que há uma tendência na diminuição da massa corporal nos animais após a indução da inflamação com TNBS, porém essa diminuição não é estatisticamente significativa. Apesar dos artigos demonstrarem que no modelo de indução de DII por TNBS há uma perda de massa significativa dos animais submetidos a essa substância, esse resultado pode variar dependendo do animal (rato ou camundongo) utilizado e da dose empregada (varia de 3, 5 ou 10 mg de TNBS em 0.25 etanol 50%) na indução (Antonίου et al., 2016). Os dados obtidos

nesse trabalho podem indicar que a inflamação gerada pelo agente lesivo não foi suficientemente intensa para comprometer a evolução da massa corporal dos animais, ao longo do tratamento, e que o pós-tratamento com o Citral (nas 3 doses diferentes) não resultou no comprometimento do ganho de massa ao longo do procedimento, quando comparado ao animal sham (sem a inflamação).

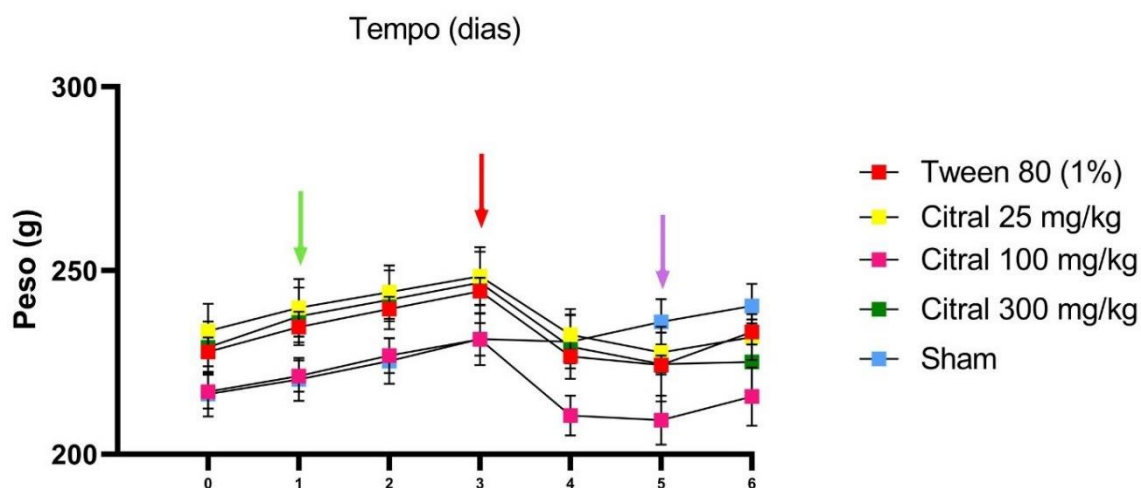


Figura 5: Evolução da massa corporal de ratos Wistar tratados com Citral no modelo de DII aguda induzida por TNBS. A seta verde indica o primeiro dia dos pré-tratamentos (início) e a roxa sinaliza o último dia de tratamento (final). A seta vermelha indica o dia da indução da lesão com TNBS e etanol. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey.

Para verificar se o TNBS e/ou Citral não tiveram um efeito sistêmico em decorrência da sua administração, foram analisados também a massa relativa dos principais órgãos (estômago, intestino delgado, fígado, baço, rim e coração) que poderiam ser indicativos de algum efeito tóxico dessa substância (Figura 6). O resultado indica que, dentre todos os órgãos analisados, somente o baço de todos os animais submetidos a administração com TNBS apresentou aumento da massa relativa quando comparado ao grupo sham. O tratamento dos animais com Citral (nas três doses) não foi capaz de alterar esse resultado. Tal resultado pode ser justificado com dados da literatura, pois o aumento da massa do baço é uma característica da DII (Wirtz et al., 2017). Estudos já demonstraram que a alteração no baço está diretamente relacionada a uma inflamação sistêmica e ao grau de severidade da doença (Hou et al., 2022; Ingawale et al., 2021). Outra hipótese para esse aumento da massa do baço é a ativação do sistema imune desencadeado pela administração

do TNBS, que por consequência, aumenta a produção de linfócitos Th1, promovendo maior a liberação de citocinas pró-inflamatória (Hou et al., 2022; Strober et al., 1988).

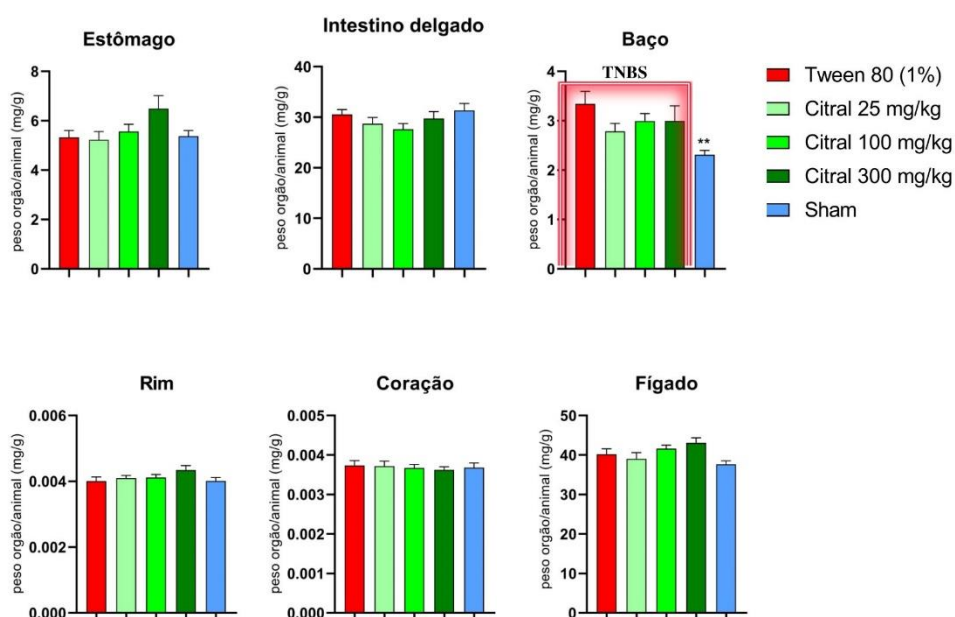


Figura 6: Massa relativa dos órgãos (massa órgão/animal - mg/g). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n = 7) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** p < 0.01 quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Devido a esse efeito sistêmico inflamatório desencadeado pelo TNBS, existem estudos, em modelos animais, que demonstram algumas disfunções no estômago. Pesquisa realizada por Moreels e colaboradores (2001), no modelo de ileíte induzida por TNBS, demonstrou que existem alterações na motilidade do TGI na fase aguda da doença, devido ao aumento da secreção de Th1 pelo tecido inflamado, que modula de uma forma diferente a função neuromuscular do estômago. A modulação causada pela disfunção neuromuscular gástrica, acarreta em uma distensão do fundo gástrico dos animais em consequência da alta inflamação no ílio. Essas mudanças que ocorrem devido a um efeito sistêmico desencadeado pela administração do TNBS, podem ser justificadas pela via do reflexo entérico que atinge a musculatura lisa do TGI (Moreels et al., 2001).

Estudos clínicos mais recentes demonstraram que pacientes com DII tendem a possuir múltiplas erosões e alterações granulares na maior curvatura do estômago e, através da análise histológica do tecido observa-se infiltrados de células inflamatórias no local (Hisabe et al., 2010; Yang et al., 2020). Outro dado importante que corrobora com os resultados acima é de pacientes acometidos com a DC, que podem desenvolver uma inflamação gastroduodenal decorrente da doença, com uma prevalência de 0,5% a 4% (Pharmacology, 2019). Esses trabalhos são

importantes pois demonstram que as alterações no estômago são consequência da alta inflamação nos tecidos intestinais, devido à alta secreção de citocinas pró inflamatórias e a conexão dos órgãos do TGI, desencadeando alterações inflamatórias em tecidos subjacentes.

Ao levar em consideração esses estudos, nesse trabalho foi avaliado a atividade da MPO no estômago dos ratos submetidos a indução por TNBS. Como resultado (Figura 7), foi observado que houve uma elevação significativa do infiltrado neutrofílico no tecido estomacal dos grupos que foram submetidos a administração do TNBS (quantificado no tecido glandular). Quando foi realizada a comparação entre o grupo sham (não colítico) com o grupo veículo (colítico), houve uma redução da atividade da enzima MPO nos animais do grupo sham. Porém, quando analisado o tratamento com o Citral durante os cinco dias, nas diferentes doses, se observou que o terpeno não foi capaz de prevenir o aumento da atividade da MPO, quando comparado aos animais não tratados (veículo) apesar da tendência de redução da atividade da MPO na maior dose do Citral (300 mg/kg).

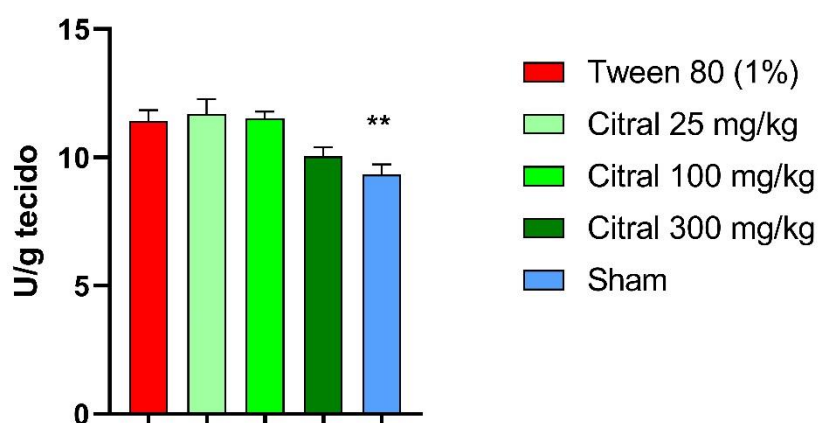


Figura 7: Atividade da MPO no estômago dos animais submetidos a DII induzida por TNBS. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** $p < 0.01$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Para avaliar outras alterações morfológicas causadas pelo modelo de DII aguda, foram analisados o comprimento, a massa do cólon e a relação entre esses dois parâmetros dos animais submetidos ao TNBS. A literatura reporta que ocorre a diminuição no comprimento do cólon em pacientes acometidos com DII devido às lesões e as infiltrações neutrofílicas no epitélio tecidual (Nascimento et al., 2020). O aumento da massa do cólon está relacionado ao espessamento da parede intestinal causado pela fibrose tecidual (Macias-Ceja et al., 2019). Os resultados (Figura

8) mostraram que todos os animais que foram submetidos ao TNBS apresentaram aumento da massa e também encurtamento desse órgão em comparação com o grupo sham (sem TNBS) – adotando $p < 0.05$. Porém, quando analisada a ação do tratamento com o Citral nas três doses, o terpeno não foi capaz de impedir essas alterações no cólon dos animais, quando comparado ao grupo não tratado (veículo).

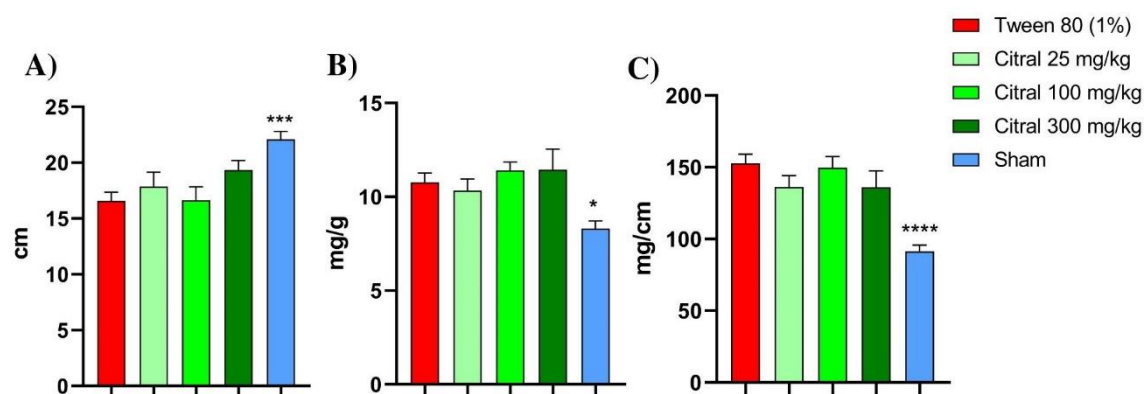


Figura 8: A) Comprimento do cólon dos animais; B) Massa relativa do cólon (massa órgão/animal); C) Relação do cólon massa/comprimento. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n = 7) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett, quando comparado com o grupo Tween 80 a 1%, sendo * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Outra característica macroscópica analisada foi o escore das lesões (Figura 9). Nesse sentido, nenhuma das três doses do Citral foi capaz de prevenir a inflamação e/ou necrose do cólon induzida pelo TNBS, demonstrando que, apenas cinco dias de tratamento com o Citral não foram suficientes para impedir as lesões decorrentes da administração do agente agressor quando comparado com o grupo veículo.

Em continuidade à investigação da inflamação nas DII, foi quantificado a atividade da enzima MPO no cólon dos animais para avaliar uma possível atividade anti-inflamatória do Citral neste modelo. A princípio, foi realizada a quantificação com amostras provenientes de parte do tecido contendo necrose e parte de tecido adjacente/borda (sem necrose) – na proporção 1:1 – de cada animal, e posteriormente, foi realizada a quantificação da atividade da MPO apenas no tecido adjacente (Figura 11). O que torna relevante a análise da atividade da MPO nessas duas regiões do cólon se deve pelo fato de que os tecidos necróticos são incapazes de manter sua integridade morfológica e suas células têm as membranas rompidas, acarretando em uma lesão celular irreversível e, conseqüentemente, a perda de suas funções. Outro fator que está relacionado com a necrose tecidual é a inflamação dos tecidos adjacentes, isso ocorre devido ao alto nível de morte celular e o recrutamento de células imunes que participam do processo inflamatório e liberam de citocinas pró-inflamatória nesta região, bem como enzimas que provocam degradação dos tecidos lesionados (Kumar et al., 2016).

Portanto, foi observado que houve diferença significativa na atividade da enzima MPO entre essas regiões anteriormente discriminadas (Figura 12). Como esperado, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que houve um aumento significativo da atividade da enzima MPO no tecido com necrose em comparação aos animais sem TNBS. Nesse tecido que apresenta necrose, não foi constatada diferença significativa na atividade enzimática entre os grupos tratados com Citral e o grupo tratado somente com veículo. Já na região adjacente, houve uma inibição de infiltração neutrofílica nos animais tratados com Citral na dose 300 mg/kg, que é consequência de uma menor inflamação. Vários trabalhos evidenciam a atividade anti-inflamatória do Citral no estômago (Périco et al., 2020), mas no modelo de DII ainda não existem relatos da ação farmacológica nessa doença. Analisando este resultado, é nítido o efeito anti-inflamatório do monoterpeno no tecido adjacente das lesões, demonstrando que existe uma relação do pré-tratamento com a proteção deste composto.

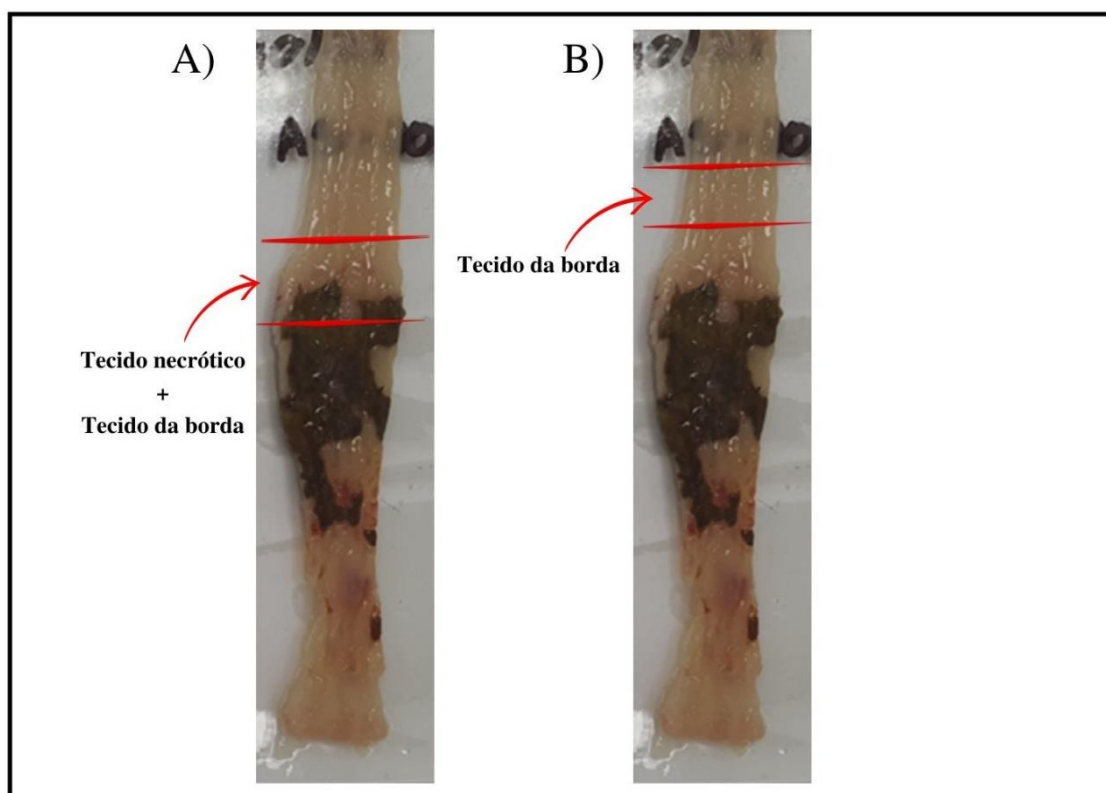


Figura 11: Áreas do tecido utilizado para quantificar a atividade da MPO do cólon dos animais. A) Tecido necrótico mais tecido da borda; B) Apenas tecido adjacente.

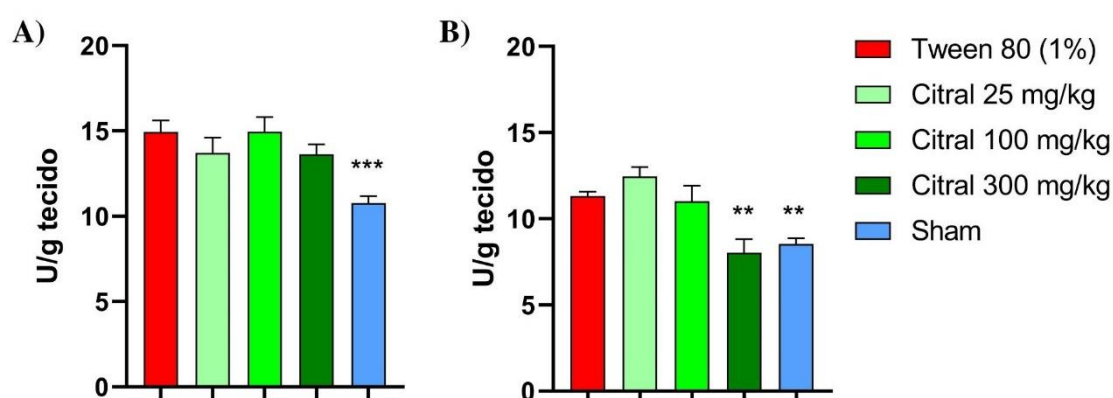


Figura 12: Quantificação da atividade da MPO no cólon dos animais submetidos à DII induzida por TNBS. A) atividade da MPO em tecido com necrose mais tecido adjacente; B) MPO apenas com tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

O estresse oxidativo nas DII, tanto em humanos quanto em modelo animal, desempenha um papel importante, devido ao aumento da peroxidação lipídica, a ação dos EROs e a liberação dos mediadores inflamatórios (Tan et al., 2017). Portanto, foi avaliado o nível da MDA nas duas regiões do cólon dos animais (Figura 13). Na região com necrose, quando comparado o grupo

saudável ao colítico (não tratado), houve uma diferença significativa, e quando comparou-se as três doses do Citral com o grupo não tratado, não houve diferença significativa. Já na região adjacente, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados (veículo e Citral) com o grupo sham (sem TNBS). Esses resultados demonstram que, no tecido adjacente a peroxidação lipídica não foi evidenciada, já no tecido com necrose, a necrose e a morte celular causada pelo TNBS elevou o nível da MDA. Porém, o tratamento dos animais com Citral, durante cinco dias, não promoveu redução nos níveis de MDA quando comparado ao grupo sham (saudável), demonstrando que o monoterpene, nas diferentes doses, não foi capaz de minimizar esse quadro causado pelo estresse oxidativo tecidual.

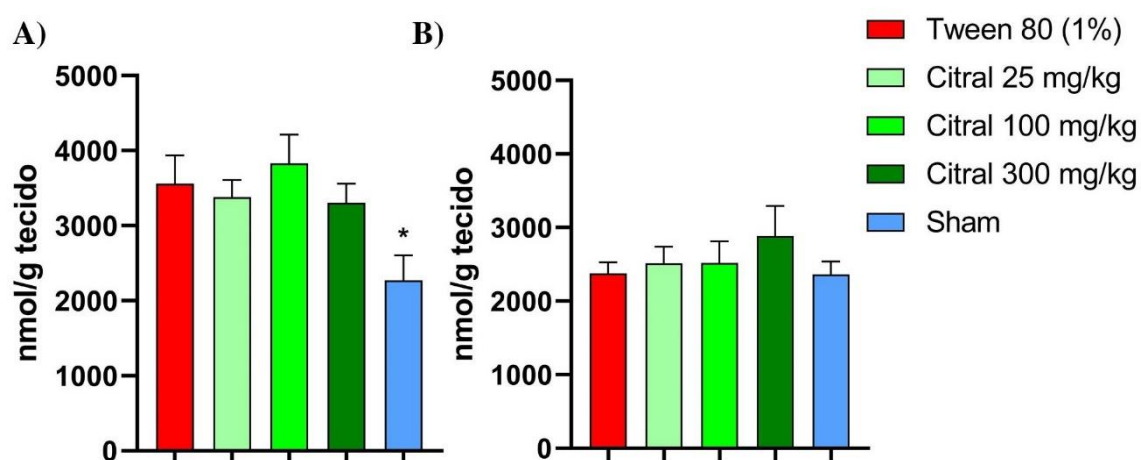


Figura 13: Quantificação do nível de MDA no cólon dos animais submetidos ao modelo de DII induzida por TNBS. A) nível de MDA no tecido com necrose mais tecido adjacente; B) nível de MDA no tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

Outra análise realizada foi a quantificação dos níveis de GSH nas duas porções do cólon dos animais (Figura 15). Para a região com necrose, ocorreu uma depleção no estoque de GSH no grupo colítico não tratado quando comparado ao saudável (sham). Como esperado, os animais não submetidos ao TNBS estão com o nível de GSH significativamente aumentado. Já nos animais submetidos a administração do Citral (nas 3 diferentes doses) durante 5 dias, também houve uma depleção dessa molécula antioxidante, pois não houve diferença estatística entre os grupos tratados com o grupo não tratado (veículo). Na região do tecido adjacente, também houve uma depleção nos níveis de GSH no grupo colítico em comparação ao grupo sham. Entretanto, os animais tratados com o Citral nas doses de 100 e 300 mg/kg, apresentaram uma elevação nos níveis de GSH estatisticamente significativa quando comparado com o grupo não tratado. O

resultado no tecido adjacente corrobora com o estudo de Ingawale e colaboradores (2021), que induziu colite ulcerativa empregando o modelo de TNBS e pré-tratou os animais três dias antes da indução com o produto natural Hecogenina. Foi relatado o aumento significativo da molécula não enzimática GSH em comparação aos animais não tratados, sugerindo uma ação antioxidantes desse composto natural, porém, não relataram qual região tecidual foi analisada (Ingawale et al., 2021).

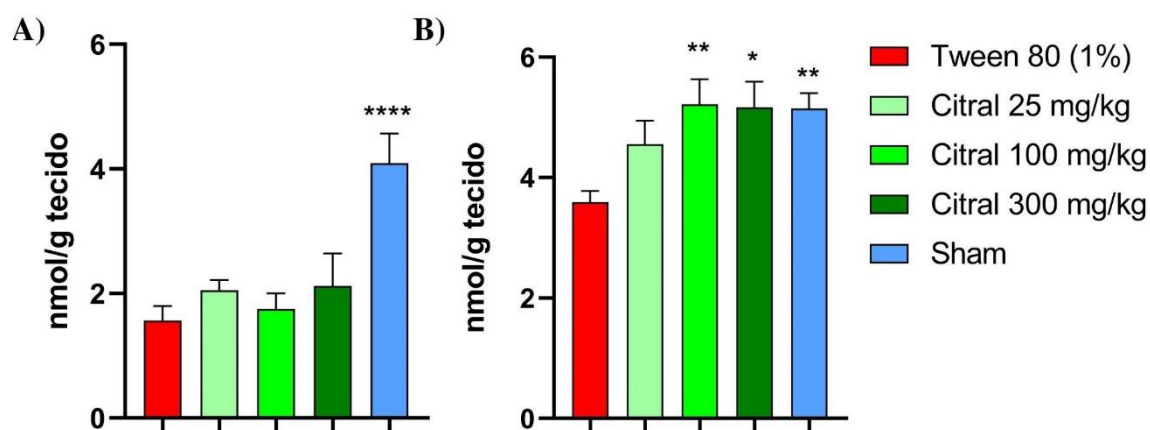


Figura 14: Quantificação do nível de GSH no cólon dos animais submetidos ao modelo de DII induzida por TNBS. A) Nível de GSH em tecido com necrose mais tecido adjacente; B) Nível de GSH apenas no tecido adjacente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m ($n = 7$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett, sendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ quando comparado ao grupo Tween 80 a 1%.

As DII são doenças caracterizadas por um processo inflamatório anormal no intestino, podendo acometer a porção tecidual do cólon de forma contínua e simétrica (UC) ou com focos de inflamação em toda porção intestinal, não se limitando apenas no cólon (DC) (Vindigni et al., 2016). Estudos recentes descrevem alteração sistêmica decorrente da inflamação e atividade imunológica descontrolada, podendo atingir todo o TGI e até mesmo órgãos adjacentes, como pâncreas, baço e pele (Jang et al., 2019; Rogler et al., 2021; Vavricka et al., 2015). Várias evidências indicam que o desequilíbrio imunológico e inflamatório acarreta elevação de EROs, cronificação da inflamação, edemas e até mesmo ulcerações intestinais (Nalle & Turner, 2015). Por mais que existam terapias para as DII, fica evidente que os fármacos utilizados são ineficientes e inespecíficos, pois focam apenas em manter o paciente em remissão e melhorar os sintomas, além de causarem efeitos colaterais e reduzirem a qualidade de vida dos pacientes (Torres et al., 2017; Vidal-Lletjós et al., 2017). O modelo utilizado neste trabalho foi através da indução por agente químico, o TNBS associado ao etanol, e por mais que esse método tenha seus contrapontos como gerar lesões agressivas com elevado grau de severidade, ainda sim é um

modelo que mimetiza o processo inflamatório e imunológico dessas doenças (Wirtz et al., 2017). O modelo com TNBS também é comumente usado para validar possíveis candidatos para uma terapia alternativa e mais específica no tratamento das DII (Antoniou et al., 2016).

Portanto, neste modelo foi possível analisar o processo inflamatória desencadeado pelo aumento da atividade da enzima MPO, assim como quantificar os marcadores do estresse oxidativo, o MDA e agente antioxidante como o GSH e avaliar o mecanismo de atuação do monoterpeno Citral como um tratamento preventivo. Outra característica mimetizada por esse método foi o MEI, já descrito na literatura como um fator agravante nos pacientes portadores de DII. Nesse estudo, o tratamento de cinco dias com Citral nas três doses 25, 100 e 300 mg/kg, não foi capaz de impedir o surgimento e o agravamento das lesões no cólon dos animais submetidos ao TNBS, tão pouco foi capaz de reverter o encurtamento e aumento da massa desse tecido. Os resultados obtidos, portanto, não corroboram os estudos já descrito na literatura utilizando outros monoterpenos como o limoneno, estruturalmente semelhante ao Citral. Em trabalho realizado por D'Alessio e colaboradores (2013), foi utilizado o modelo de indução com TNBS, na dose de 50 mg/mL em ratos Wistar fêmeas. Tais animais foram tratados três dias antes e cinco dias depois da indução, com administração via oral diariamente com o limoneno. Os resultados obtidos pelo grupo em relação a análise macroscópica e microscópica das lesões no cólon foi que o limoneno na dose de 10 mg/kg conseguiu impedir os danos causados pelo TNBS. Outro trabalho realizado com o monoterpeno alfa-fenchona, em ratos Wistar machos, tratados 48, 24, 1 hora antes e 24 horas após a indução com o mesmo agente químico (dose 10mg de TNBS em 0.25 de etanol 50%), demonstrou uma diminuição significativa na relação da massa do cólon pelo comprimento, quando comparado com animais não tratados (Elaine & Araruna, 2022).

A administração de TNBS interrompe a ação antioxidante e eleva o estresse oxidativo, assim como aumenta a peroxidação lipídica no tecido lesionado, resultando em uma maior produção do metabólito MDA (Li et al., 2011). Neste trabalho, quando analisada a região com necrose, observou-se uma elevação na peroxidação lipídica nos animais submetidos ao TNBS e redução nos níveis de GSH. Isso pode ser explicado devido ao rompimento da membrana celular causada pela necrose tecidual, aumentando os níveis da MDA e, conseqüentemente, a perda da função celular, reduzindo a ação da molécula antioxidante (GSH) (Kumar et al., 2016). Já no tecido adjacente, os níveis de MDA não se alteraram em comparação com animal saudável, demonstrando que não houve peroxidação lipídica nesta região. Em contrapartida, é notável que houve estresse oxidativo nesta área, devido a diminuição do estoque de GSH no grupo não tratado. Porém, a administração do Citral durante os cinco dias nos animais, nas doses de 100 e

300 mg/kg, resultou na manutenção dos estoques intracelulares da GSH, demonstrando uma ação antioxidante no tecido adjacente, já que está com os níveis próximos dos animais saudáveis.

Portanto, fica evidente que o modelo agudo de indução com TNBS, mimetiza algumas características das DII, como a inflamação e o estresse oxidativo no cólon, assim como, alterações em órgãos adjacentes do TGI. Reafirmando que as DII não são restritas apenas no intestino, e sim, acarretam MEI. Outro ponto importante a ser destacado sobre este modelo, é a região do cólon em que foram realizados os ensaios. Ao se analisar o estômago e tecido adjacente ao foco inflamatório dos animais nesse estudo, foi evidenciada a ocorrência de inflamação e/ou estresse oxidativo nesses locais. Quando foram realizadas comparações entre essas regiões dos animais colíticos tratados com veículo com aqueles sem colite, ficou evidente as diferenças estatísticas significativas entre eles. Esses resultados corroboram os estudos já existente na literatura.

5. Conclusão

O modelo de indução com TNBS utilizada neste estudo foi efetivo, isso porque não promoveu mortalidade nos animais e, adicionalmente, o parâmetro de massa corporal, que é um indicativo da severidade da lesão, não foi alterado. Os animais submetidos a administração do TNBS tiveram alterações em outros parâmetros, que são importantes indicativos da lesão, como redução no comprimento e aumento da massa do cólon, aumento do MPO em áreas adjacentes, e alterações em parâmetros do estresse oxidativo (MDA e GSH), quando se compara com o grupo saudável.

Apesar de não conseguir evidenciar o efeito do Citral como agente protetor em vários parâmetros analisados, é importante destacar que o tratamento com o Citral durante cinco dias, na dose de 300 mg/kg foi capaz diminuir a infiltração neutrofílica e manter os estoques intracelulares do antioxidante GSH no tecido adjacente. Importante ressaltar que os dois parâmetros chegaram a níveis próximos dos animais saudáveis. A dose de 100 mg/kg foi capaz de garantir que os níveis de GSH se mantenham elevados, impedindo a depleção e, por consequência, um menor estresse oxidativo do tecido adjacente. Mesmo que os tratamentos preventivos com o Citral não tenham sido capazes de alterar a massa e o comprimento do cólon, assim como, impedir lesões no epitélio e MEI, o monoterpeno é um possível candidato a terapia alternativa para as DII, por diminuir o estresse oxidativo e a inflamação local tecidual.

6. Referências

- Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 12, Issue 4, pp. 205–217). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34>
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., & Stange, E. F. (2014). Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(5), 1165–1179. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165>
- Antonίου, E., Margonis, G. A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., Papalois, A., & Pikoulis, E. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. In *Annals of Medicine and Surgery* (Vol. 11, pp. 9–15). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2016.07.019>
- Araruna, M. E., Serafim, C., Alves Júnior, E., Hiruma-Lima, C., Diniz, M., & Batista, L. (2020). Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Terpenes in Experimental Models (2010–2020): A Review. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules25225430>
- Arranz, E., León, A. J., Gómez, E., Garrote, J. A., Bernardo, D., Barrera, A., Marcos, J. L., Fernández-Salazar, L., Velayos, B., & Blanco-Quirs, A. (2009). High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators of Inflammation*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/580450>
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380(9853), 1590–1605. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60026-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60026-9)
- Bell, C. J., Gall, D. G., & Wallace, J. L. (1995). *Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.4.G622>
- Boncan, D. A. T., Tsang, S. S. K., Li, C., Lee, I. H. T., Lam, H. M., Chan, T. F., & Hui, J. H. L. (2020). Terpenes and terpenoids in plants: Interactions with environment and insects. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 19, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21197382>
- Chami, B., Martin, N. J. J., Dennis, J. M., & Witting, P. K. (2018). Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 645, pp. 61–71). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.012>
- Cheon, G. J., Cui, Y., Yeon, D. S., Kwon, S. C., & Park, B. G. (2012). Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic acid-induced colonic inflammation in mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 16(6), 437–446. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2012.16.6.437>
- Coward, S., Clement, F., Benchimol, E. I., Bernstein, C. N., Avina-Zubieta, J. A., Bitton, A., Carroll, M. W., Hazlewood, G., Jacobson, K., Jelinski, S., Deardon, R., Jones, J. L., Kuenzig, M. E., Leddin, D., McBrien, K. A., Murthy, S. K., Nguyen, G. C., Otley, A. R., Panaccione, R., Kaplan, G. G. (2019). Past and Future Burden of Inflammatory Bowel Diseases Based on Modeling

- of Population-Based Data. *Gastroenterology*, 156(5), 1345-1353.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.002>
- Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative Colitis. In *N Engl J Med* (Vol. 365).
- de Souza, H. S. P. (2017). Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: Today and tomorrow. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 33, Issue 4, pp. 222–229). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000364>
- Doherty, G., Katsanos, K. H., Burisch, J., Allez, M., Papamichael, K., Stallmach, A., Mao, R., Berset, I. P., Gisbert, J. P., Sebastian, S., Kierkuś, J., Lopetuso, L., Szymanska, E., & Louis, E. (2018). European Crohn's and colitis organisation topical review on treatment withdrawal [exit strategies] in inflammatory bowel disease. In *Journal of Crohn's and Colitis* (Vol. 12, Issue 1, pp. 17–31). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx101>
- Du, L., & Ha, C. (2020). Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 49, Issue 4, pp. 643–654). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.07.005>
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. In *Pharmacological Research* (Vol. 112, pp. 4–29). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Elaine, M., & Araruna, C. (n.d.). *UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA INTESTINAL DO ISÔMERO (-)-FENCHONA EM MODELOS ANIMAIS* JOÃO PESSOA 2022.
- Faure, P., & Lafond, J. (1995). *Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl*. 3–4.
- Garber, A., & Regueiro, M. (2019). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. In *Current Gastroenterology Reports* (Vol. 21, Issue 7). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0698-1>
- Gkouskou, K. K., Deligianni, C., Tsatsanis, C., & Eliopoulos, A. G. (2014). The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 4, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00028>
- Gonçalves, E. C. D., Assis, P. M., Junqueira, L. A., Cola, M., Santos, A. R. S., Raposo, N. R. B., & Dutra, R. C. (2020). Citral Inhibits the Inflammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K⁺ Channel Pathways. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01134>
- Han, P., Ma, X., & Yin, J. (2010). The effects of lipoic acid on soybean β -conglycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Archives of Animal Nutrition*, 64(3), 254–264. <https://doi.org/10.1080/17450391003625003>
- Hisabe, T., Matsui, T., Miyaoka, M., Ninomiya, K., Ishihara, H., Nagahama, T., Takaki, Y., Hirai, F., Ikeda, K., Iwashita, A., Higashi, D., & Futami, K. (2010). Diagnosis and clinical course of

- ulcerative gastroduodenal lesion associated with ulcerative colitis: Possible relationship with pouchitis. *Digestive Endoscopy*, 22(4), 268–274. <https://doi.org/10.1111/j.1443-1661.2010.01006.x>
- Ho, G. T., Porter, R. J., & Kalla, R. (2020). Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. In *F1000Research* (Vol. 9). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20805.1>
- Honmore, V., Kandhare, A., Zanwar, A. A., Rojatkhar, S., Bodhankar, S., & Natu, A. (2015). *Artemisia pallens* alleviates acetaminophen induced toxicity via modulation of endogenous biomarkers. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 571–581. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.934382>
- Hou, X., Zhu, F., Zheng, W., Jacques, M. L., Huang, J., Guan, F., & Lei, J. (2022). Protective effect of *Schistosoma japonicum* eggs on TNBS-induced colitis is associated with regulating Treg/Th17 balance and reprogramming glycolipid metabolism in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1028899>
- Ikeda, M., Takeshima, F., Isomoto, H., Shikuwa, S., Mizuta, Y., Ozono, Y., & Kohno, S. (2008). Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazalone-induced colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(7), 1869–1875. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0102-0>
- Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., & Patel, S. S. (2021). Hecogenin and fluticasone combination attenuates TNBS-induced ulcerative colitis in rats via downregulation of pro-inflammatory mediators and oxidative stress. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(2), 160–170. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1872617>
- Isik, F., Tunali Akbay, T., Yarat, A., Genc, Z., Pisiriciler, R., Caliskan-Ak, E., Cetinel, S., Altıntas, A., & Sener, G. (2011). Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(3), 721–730. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1333-z>
- Jang, H. J., Kang, B., & Choe, B. H. (2019). The difference in extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease for children and adults. In *Translational Pediatrics* (Vol. 8, Issue 1, pp. 4–15). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.01.06>
- Johansson, M. E. V. (2014). Mucus layers in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(11), 2124–2131. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000117>
- Johnson, A., & Loftus, E. (2021). Obesity in inflammatory bowel disease: A review of its role in the pathogenesis, natural history, and treatment of IBD. In *Saudi Journal of Gastroenterology* (Vol. 27, Issue 4, pp. 183–190). Wolters Kluwer Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/sjg.sjg_30_21
- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2016). Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. In *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 1, Issue 4, pp. 307–316). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30077-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30077-2)

- Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 152(2), 313–321.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>
- Karaboga, İ., Demirtas, S., & Karaca, T. (2017). Investigation of the relationship between the TH17/IL-23 pathway and innate-adaptive immune system in TNBS-induced colitis in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(8), 870–879. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.9108>
- Khan, I., Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., Che, T., & Zhang, C. (2019). Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. In *Pathogens* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030126>
- Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. In *Immune Network* (Vol. 17, Issue 1, pp. 25–40). Korean Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.25>
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(5), 598–625. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- Kobayashi, T., Siegmund, B., le Berre, C., Wei, S. C., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C. N., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., & Hibi, T. (2020). Ulcerative colitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x>
- 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(6), 1344–1350. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90202-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90202-6)
- Kumar, V., Pritzker, D. N., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (n.d.). *Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças 9ª EDIÇÃO*.
- Larabi, A., Barnich, N., & Nguyen, H. T. T. (2020). New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. In *Autophagy* (Vol. 16, Issue 1, pp. 38–51). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>
- Li, X., Yang, X., Cai, Y., Qin, H., Wang, L., Wang, Y., Huang, Y., Wang, X., Yan, S., Wang, L., Zhao, X., Li, W., Li, S., Chen, J., & Wu, Y. (2011). Proanthocyanidins from grape seeds modulate the NF-κB signal transduction pathways in rats with tnbs-induced ulcerative colitis. *Molecules*, 16(8), 6721–6731. <https://doi.org/10.3390/molecules16086721>
- Lima Martins, A., Volpato, R. A., & Zago-Gomes, M. da P. (2018). The prevalence and phenotype in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0822-y>
- Ma, X., He, P., Sun, P., & Han, P. (2010). Lipoic acid: An immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5086–5092. <https://doi.org/10.1021/jf904403u>
- Machado, F. D. F., Formiga, R. de O., Lima, G. R. de M., de Jesus, N. Z. T., Alves Júnior, E. B., Marinho, A. F., Tavares, J. F., Santos, F. A., Viana, A. F. S. C., Araújo, A. A., de Araújo Júnior,

- R. F., Pellizzon, C. H., & Batista, L. M. (2021). Hyptis suaveolens (L.) Poit protects colon from TNBS-induced inflammation via immunomodulatory, antioxidant and anti-proliferative mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113153>
- Macias-Ceja, D. C., Ortiz-Masiá, D., Salvador, P., Gisbert-Ferrándiz, L., Hernández, C., Hausmann, M., Rogler, G., Esplugues, J. v., Hinojosa, J., Alós, R., Navarro, F., Cosin-Roger, J., Calatayud, S., & Barrachina, M. D. (2019). Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunology*, 12(1), 178–187. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0087-3>
- Moreels, T. G., de Man, J. G., de Winter, B. Y., Timmermans, J.-P., Herman, A. G., & Pelckmans, P. A. (n.d.). *Effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced ileitis on the motor function of non-in-amed rat gastric fundus*.
- Nalle, S. C., & Turner, J. R. (2015). Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. In *Mucosal Immunology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 720–730). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.40>
- Nascimento, R. de P. do, Machado, A. P. da F., Galvez, J., Cazarin, C. B. B., & Maróstica Junior, M. R. (2020a). Ulcerative colitis: Gut microbiota, immunopathogenesis and application of natural products in animal models. In *Life Sciences* (Vol. 258). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118129>
- Nascimento, R. de P. do, Machado, A. P. da F., Galvez, J., Cazarin, C. B. B., & Maróstica Junior, M. R. (2020b). Ulcerative colitis: Gut microbiota, immunopathogenesis and application of natural products in animal models. In *Life Sciences* (Vol. 258). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118129>
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactive oxygen species. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 5, pp. 349–361). <https://doi.org/10.1038/nri3423>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Paone, P., & Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? In *Gut* (Vol. 69, Issue 12, pp. 2232–2243). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
- Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., & Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 104, pp. 75–103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048>
- 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. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10020265>
- Qin, H. Y., Wu, J. C. Y., Tong, X. D., Sung, J. J. Y., Xu, H. X., & Bian, Z. X. (2011). Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *Journal of Gastroenterology*, 46(2), 164–174. <https://doi.org/10.1007/s00535-010-0321-6>

- 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. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 35, Issue 4, pp. 259–264). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000534>
- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, Issue 1, pp. 155–165). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.013>
- Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. In *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 279–288). Korean Physiological Soc. and Korean Soc. of Pharmacology. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.279>
- Ribeiro, A. R. S., Diniz, P. B. F., Pinheiro, M. S., Albuquerque-Júnior, R. L. C., & Thomazzi, S. M. (2016). Gastroprotective effects of thymol on acute and chronic ulcers in rats: The role of prostaglandins, ATP-sensitive K⁺ channels, and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 244, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.004>
- Rogler, G., Singh, A., Kavanaugh, A., & Rubin, D. T. (2021). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment, and Implications for Disease Management. In *Gastroenterology* (Vol. 161, Issue 4, pp. 1118–1132). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.07.042>
- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A., & Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 27, pp. 4280–4288). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4280>
- Selvaratnam, S., Gullino, S., Shim, L., Lee, E., Lee, A., Paramsothy, S., & Leong, R. W. (2019). Epidemiology of inflammatory bowel disease in South America: A systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 25(47), 6866–6875. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i47.6866>
- Silva, I., Pinto, R., & Mateus, V. (2019). Preclinical study in vivo for new pharmacological approaches in inflammatory bowel disease: A systematic review of chronic model of TNBS-Induced Colitis. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 8, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm8101574>
- Sommer, K., Wiendl, M., Müller, T. M., Heidbreder, K., Voskens, C., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2021). Intestinal Mucosal Wound Healing and Barrier Integrity in IBD–Crosstalk and Trafficking of Cellular Players. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.643973>
- Strober, W., Discussants, ;, Ludviksson, B. R., & Fuss, I. J. (n.d.). *The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease*. <http://annals.org/>
- Tan, B. H., Pan, Y., Dong, A. N., & Ong, C. E. (2017). In vitro and in silico Approaches to Study Cytochrome P450-Mediated Interactions. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 20(1), 319–328. <https://doi.org/10.18433/J3434R>

- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10080, pp. 1741–1755). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10080, pp. 1756–1770). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
- Vavricka, S. R., Schoepfer, A., Scharl, M., Lakatos, P. L., Navarini, A., & Rogler, G. (2015). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. In *Inflammatory Bowel Diseases* (Vol. 21, Issue 8, pp. 1982–1992). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000392>
- Vidal-Lletjós, S., Beaumont, M., Tomé, D., Benamouzig, R., Blachier, F., & Lan, A. (2017). Dietary protein and amino acid supplementation in inflammatory bowel disease course: What impact on the colonic mucosa? In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9030310>
- Vindigni, S. M., Zisman, T. L., Suskind, D. L., & Damman, C. J. (2016). The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: A tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 9, Issue 4, pp. 606–625). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1756283X16644242>
- Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., Fichtner-Feigl, S., & Neurath, M. F. (2017). Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 12(7), 1295–1309. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.044>
- Yang, Y., Li, C. Q., Chen, W. J., Ma, Z. H., & Liu, G. (2020). Gastroduodenitis associated with ulcerative colitis: A case report. *World Journal of Clinical Cases*, 8(17), 3847–3852. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i17.3847>
- Yasukawa, K., Tokuda, H., Tun, X., Utsumi, H., & Yamada, K. I. (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 Radical Research*, 46(12), 1427–1436. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.732698>

7. Anexo

Certificado CEUA



Universidade Estadual Paulista/Instituto de Biociências

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da ação do citral no modelo agudo de colite induzida por TNBS em ratos", protocolada sob o CEUA nº 8243240622 (ID 000406), 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 01/08/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the action of citral in the acute model by TNBS-induced colitis in rats", utilizing 42 Heterogenics rats (42 males), protocol number CEUA 8243240622 (ID 000406), 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 08/01/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 07/2022 a 09/2022

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais (ANILAB-Animais de laboratório criação e comércio LTDA, Endereço: Rua Servidão quatro, 292, São Domingos, Paulínia-SP CEP:13140000, fone: 1938744538, e-mail: anilab@anilab.com.br, CNPJ: 65440612/0001-40)

Espécie: Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 6 a 8 semanas	N: 42
Linhagem: HanUnib:WH(Wistar)		Peso: 180 a 200 g	

Botucatu, 06 de janeiro de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



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

