



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação
antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-
dihidroxi-4-metilcumarina

Botucatu
2017

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação
antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-
dihidroxi-4-metilcumarina

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia e Biotecnologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Financiadoras:
FAPESP (Proc. 13/19138-2)
CAPES

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Co-orientadora:
Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza

Botucatu
2017

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

Tanimoto, Alexandre.

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina / Alexandre Tanimoto. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Coorientador: Fátima Pereira de Souza
Capes: 21001006

1. Intestinos - Inflamação. 2. Doenças inflamatórias intestinais. 3. Antioxidantes. 4. Stress oxidativo. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: 4-mestilescoletina;
6,7-dihidroxi-4-metilcumarina; Doença Inflamatória Intestinal; Estresse oxidativo; Inflamação intestinal.

Alexandre Tanimoto

Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi
Professor Titular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Co-orientadora: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
Professora Adjunta do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi
Professor Titular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Prof. Dr. Marinonio Lopes Cornelio
Professor Livre Docente do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – UNESP

Profa. Dra. Tereza Pereira de Souza
Pesquisadora Associada do *Department of Earth and Planetary Sciences of Faculty of Arts and Sciences* – HARVARD

Prof. Dr. Ramon Kaneno
Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior
Professor Assistente do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Financiamento

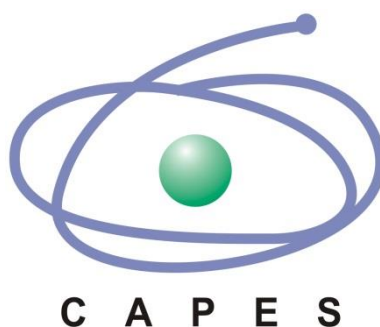


Proc. 13/19138-2
(Bolsa de doutorado: Alexandre Tanimoto)

Proc. 11/50824-4
(Bolsa de pós-doutorado: Dra. Aline Witaicenis Fantinati)

Proc. 11/50512-2
(Auxílio à Pesquisa Regular: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi)

Proc. 09/53989-4
(Auxílio à Pesquisa - Programa Equipamentos Multiusuários: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni)



Agradecimentos

Agradeço

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e minha co-orientadora Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza por terem passado seus conhecimentos acadêmicos, científicos e, principalmente, suas histórias de vida através da convivência e de exemplos de conduta;

A todos os co-autores e demais colegas de laboratório pela colaboração científica e técnica para a realização do projeto de doutorado;

À FAPESP e à CAPES pelo auxílio financeiro e pela assessoria científica;

À banca examinadora por disponibilizar seu precioso tempo para colaborar e corrigir este trabalho.

Dedicatória

Esta tese de doutorado é fruto do árduo trabalho direto e indireto de inúmeras pessoas; no entanto, dedico este trabalho a todos os animais que deram suas vidas para que o que chamamos de ciência pudesse avançar um pouco mais.

Sou grato a todas as pessoas que cruzaram meu caminho antes e durante o doutoramento, pois nem eu conseguiria dizer o quão importante o exemplo que cada um ofereceu foi importante para o desenvolvimento do trabalho e para meu amadurecimento. Gostaria muito de poder citar todos os nomes que participaram da minha vida nestes últimos quatro anos, porém corro o enorme risco de me esquecer de vários nomes. Contudo, algumas pessoas merecem destaque pelas enormes colaborações pessoais e científicas que ofereceram.

Entre essas pessoas agradeço aos meus pais, Roberto e Luísa Tanimoto, que continuam a não medir esforços para que seus filhos possam ter as melhores oportunidades da vida, à minha irmã Marcela Tanimoto pela amizade fraterna e aos demais membros da minha família por sempre me mostrarem uma vida simples e feliz. Agradeço também ao meu namorado Wesley Rodrigues Venturin pelo apoio, companhia e imensurável ajuda; e à Júlia, Sílvia, Antônio, Zenaide e aos demais membros das famílias Rodrigues e Venturin que sempre me recebem com muito carinho.

Agradeço, imensamente, aos meus colegas e amigos do laboratório FitoFarmaTec Aline Witaicenis Fantinati, Celso Acácio Rodrigues de Almeida Costa, Juliana Severi, Leonardo Noboru Seito, Adriano Cressoni Araujo, Ana Elisa Valencise Quaglio, Luiz Domingues de Almeida Júnior, Alexandre da Silveira Chagas, Tainan Freitas Salmeron Curimbaba, Lesvi Moya Dalmau, Cristiane Mori, Erika Ferreira Costa, Késsien Regina Sander Oliva, Vinícius Marques Da Cruz, Ellen Cristina Souza de Oliveira, Eduardo Razza, Fernanda Fagali Franchi, Mariana Machado, Patrícia Kubo Fontes, Priscila Helena dos Santos, Ramon César Botigelli, Andressa Carvalho e Raquiel Bueno Rodrigues pela companhia e pela ajuda diária.

Sou muito grato aos colegas e amigos da UNESP de São José do Rio Preto Ícaro Putinhon Caruso, Fábio Rogério de Moraes, Hêmily Mutti Ruiz Piva, Gabriela de Campos Araújo, Fernanda Paulin Benzatti, Ana Karla Miranda Prado, Isabela Brunocci, Vitor Brassolatti Machado, Ernesto Tavares Neto, Giovana Cavaglia, Isabella Otonio Lourenço, Pedro Henrique Sobrinho, Paulo Henrique da Silva, Thiago Salem Peçonato Teixeira, Matheus Theodoro Semensatti, Giovani Tanzella, Karoline Sanches, Nayara Nathie Marques, Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey, Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio e Prof. Dr. Fernando Alves de Melo por me introduzirem, pacientemente, a um novo mundo científico fascinante!

Gratidão eterna a meus amigos Bianca Barbosa Gregório, Daniel Gavira Cembranelli, Danilo Flávio Moraes Riboli, Evandro Katsui Utsunomia, Camila Mitiko Inohue, Marcos Antenor Storion Júnior, Patrícia Péroloa Dantas, Thaís Bassi Cardoso, Yoko Hayashi, Diego Ferreira Marques, Marina Marques, Carlos Capelasso, Priscila Prado e Neide H. Gottshalk por sempre torcerem pelo meu sucesso profissional e ao mesmo tempo serem corresponsáveis de postergações, que curiosamente deixam-me mais produtivo. Reservo um espaço deste parágrafo para agradecer ao Pedro Proença, pela amizade nova e por saber se expressar de maneira tão bela e didática, pois isso me mostra que há uma conexão entre áreas de conhecimento e entre as diferentes facetas que compõe um ser humano.

Agradeço também ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), ao IBB, ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia, ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), ao IBILCE, à Pós-graduação em Biofísica Molecular e às bibliotecas do IBB e do IBILCE pelo ensino e serviços de qualidade durante esses anos; sou muito grato a todos os docentes, discentes e aos demais funcionários por fazerem parte desta etapa de amadurecimento.

Prólogo

A tese a seguir é um dos frutos do encontro das mentes curiosas, insatisfeitas e pró-ativas dos Professores Doutores Luiz Claudio Di Stasi e Marinônio Lopes Cornelio em uma reunião de coordenadores de pós-graduação da área Ciências Biológicas II. O Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec), que na época era Laboratório de Fitomedicamentos, enfrentava uma carência metodológica e de bons parceiros para responder às perguntas que foram geradas com os últimos projetos que, resumiam-se em esclarecer a relação estrutura-atividade de cumarinas para que assim, seus diferentes efeitos farmacológicos pudessem ser explicados com mais clareza. Por outro lado, o também ainda não nascido Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CEMIB) enfrentava dificuldades para encontrar substâncias com efeitos biológicos relevantes para estudar a interação molecular entre essas substâncias e alvos proteicos responsáveis pela saúde e doença dos organismos.

Quando assisti aos primeiros seminários e participei das reuniões dos dois grupos, nasceu em mim um fascínio para conhecer os limites dos novos horizontes que a junção das duas áreas proporcionou. Confesso que ainda parece que este horizonte é infinito e também admito que essa perspectiva ainda me encanta e me assusta; graças a minha ignorância que parece ser maior que os horizontes que estavam diante de mim, resolvi explorar os novos caminhos e aproveitar as oportunidades que estavam bem diante de mim.

Durante as disciplinas do Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular, comecei a me perguntar se seria capaz de terminar o doutoramento, pois o que estava na lousa não só parecia grego, mas era grego! Cheguei ao fim dos 48 meses e não sinto mais pânico ao estudar biofísica.

O desespero perante o imenso desconhecimento, os 10 mil quilômetros percorridos e as incontáveis horas que fiquei confinado dentro de um veículo nesses quatro anos foram ínfimos quando comparados ao crescimento pessoal e

profissional que nasceu da convivência em dois laboratórios de duas diferentes áreas do conhecimento. Na verdade, só tenho a capacidade para reconhecer o progresso realizado, as dificuldades que ainda precisam ser superadas e o valor do trabalho em equipe porque algumas dificuldades existiram.

Durante o período referente ao doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, pude desenvolver diversas atividades junto ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec) do Instituto de Biociências de Botucatu, e ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, que enriqueceram minha formação como doutorando. Dentre elas, listo:

1. Disciplinas cursadas

- 1.1. Laboratório de Didática em Farmacologia;
- 1.2. Tópicos Especiais em Farmacologia: Tópicos de Atualização em Farmacologia: Mediadores da Resposta Inflamatória (2 semestres);
- 1.3. Tópicos Avançados em Farmacologia e Biotecnologia (3 semestres);
- 1.4. Prática de Ensino de Farmacologia;
- 1.5. Tópicos Especiais em Farmacologia: Conhecimento para aprimorar a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e biomarcadores;
- 1.6. Tópicos Especiais em Farmacologia: Reproductive Immunopharmacology;
- 1.7. Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: Tópicos Integrados de Farmacologia e Biotecnologia da Doença Inflamatória Intestinal e Reprodução Bovina;
- 1.8. Análise de Dados Experimentais;
- 1.9. Tópicos Especiais: Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à Biofísica das Moléculas da Vida: Uma abordagem experimental, teórica e computacional.

2. Artigo publicado no período

- 2.1. COSTA, C.A.R.A.; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A.E.V.; ALMEIDA, L.D.; SEVERI, J.A.; DI STASI, L.C. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation: Experimental evidence. *International Immunopharmacology*, v. 28, p. 459-469, 2015.

3. Participação em eventos

- 3.1. II Semana Acadêmica da Biomedicina e II Semana Acadêmica da Farmácia, 2016.
- 3.2. Evento comemorativo do dia do Biomédico, 2016.
- 3.3. Simpósio de Ética e Integridade na Pesquisa, 2016.
- 3.4. XI FMR Legal: cidadania e meio ambiente, 2016.
- 3.5. XII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, 2016.
- 3.6. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016.
- 3.7. XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2016.
- 3.8. Evento comemorativo do dia do Biomédico, 2015.
- 3.9. I Semana Acadêmica da Biomedicina e I Semana Acadêmica da Farmácia, 2015.
- 3.10. Capacitação da plataforma Thomson Reuters Integrity, 2015.
- 3.11. V Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2015.
- 3.12. XII Congresso de Saúde e Espiritualidade de Botucatu, 2015.
- 3.13. XII Jornada de Plantas Medicinais, 2015.
- 3.14. XIV Workshop da Pós-Graduação, 2015.
- 3.15. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2015.
- 3.16. 2ª Escola de Biofísica Molecular: Ressonância Magnética Nuclear aplicada à Biofísica das moléculas da vida: uma abordagem experimental, teórica e computacional, 2014.

- 3.17. Ciclo de Palestras: Pesquisa e publicação Científica no Século XXI, 2014.
- 3.18. IV Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2014.
- 3.19. XIII Workshop da Pós-Graduação, 2014.
- 3.20. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2014.
- 3.21. I Curso de Inverno em Farmacologia, 2013.
- 3.22. II Simpósio Internacional: Plantas Medicinais em Psiquiatria, 2013.
- 3.23. X Congresso de Saúde e Espiritualidade de Botucatu, 2013.
- 3.24. III Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2013.

4. Trabalhos apresentados em congressos

- 4.1. TANIMOTO, A.; PIVA, H. R.; WITAICENIS, A.; FOSSEY, M. A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L.C. Molecular mechanisms involved in intestinal anti-inflammatory and antioxidant of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin. XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2016. (Painel)
- 4.2. TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L.C. Expressão de Ggt1, Gsr e Nef2l2 após tratamento com 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.3. COSTA, E. F.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da farinha dos frutos de *Musa spp* AAB. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.4. OLIVA, K. R. S.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Avaliação da atividade antioxidante e dos compostos secundários de *Hibiscus esculentus* L.. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).

- 4.5. CURIMBABA, T. F. S.; WITAICENIS, A.; MORI, C.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como potencial protetor da inflamação intestinal. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel e apresentação oral).
- 4.6. MORI, C.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, E. F.; OLIVA, K. R. S.; DALMAU, L. M.; CURIMBABA, T. F. S.; DI STASI, L. C. Caracterização fitoquímica, quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante do fruto verde de *Musa spp* AAA. XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016. (Painel).
- 4.7. TANIMOTO, A. Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina. V Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2015. (Painel)
- 4.8. TANIMOTO, A.; MORAES, F. R.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F. P.; DI STASI, L. C. Novel antioxidant mechanisms of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin in intestinal inflammation: involvement of glutathione and glutathione reductase. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2015. (Painel).
- 4.9. TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; SEVERI, J. A.; DI STASI, L. C. Comparação do perfil químico, determinação de polifenóis e análise da atividade antioxidante de extratos de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata*. XII Jornada de Plantas Medicinais, 2015. (Painel).
- 4.10. MORI, C.; QUAGLIO, A. E. V.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato hidroalcoólico de *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae). Congresso de Iniciação Científica, 2015. (Painel).
- 4.11. CALABRESI, M. F. F.; MELLO, F. P. F.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C.; MIRANDA, J. R. A. AC biosusceptometry to assess colonic

- motility in rats with ulcerative colitis. IIIVIII Brazilian Physical Society Meeting, 2015. (Painel).
- 4.12. WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; DI STASI, L. C. Evaluation of molecular markers and therapeutic targets in TNBS-model of intestinal inflammation. The 12th World Congress on Inflammation, 2015, v. 64. p. S145-S145.
 - 4.13. TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; SEVERI, J. A.; WITAICENIS, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; CHAGAS, A. S.; QUAGLIO, A. E. V.; STASI, L. C. Avaliação da atividade curativa da *Pfaffia glomerata* na inflamação intestinal. XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2014. (Painel).
 - 4.14. COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; STASI, L. C. Apresentação oral: ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*): avaliação da atividade adaptogênica e dos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Simpósio de plantas medicinais e nutraceuticos, 2014. (Apresentação oral).
 - 4.15. COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; STASI, L. C. Apresentação oral: ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*): avaliação da atividade adaptogênica e dos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Simpósio de plantas medicinais e nutraceuticos, 2014. (Painel).
 - 4.16. TANIMOTO, A. Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina. IV Simpósio de Farmacologia da UNESP, 2013. (Apresentação oral).
 - 4.17. WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; TANIMOTO, A.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; FONTES, P. K.; CASTILHO, A.; STASI, L. C. Effect of esculetin in experimental model of Inflammatory Bowel Disease. LATINFARMA, 2013. (Painel)
 - 4.18. COSTA, C. A. R. A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; Tanimoto, A.; WITAICENIS, A.; CHAGAS, A. S.; DI STASI, L. C.

Differential preventive and curative effects of brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-incuded intestinal inflammation. LATINFARMA, 2013. (Apresentação oral).

- 4.19. TANIMOTO, A. Avaliação dos mecanismos de ação antioxidantes envolvidos no efeito anti-inflamatório intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilesculetina. III SIMFAR, 2013. (Apresentação oral)

5. Palestras e minicursos ministrados

- 5.1. Palestra: “Plantas Medicinais” para os cursos de Biomedicina e Farmácia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE, 2016.
- 5.2. Palestra: “Interações Medicamentosas” para os cursos de Biomedicina e Farmácia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE, 2016.
- 5.3. Palestra: “Fosfoetanolamina: essa droga funciona?” na XI FMR Legal, 2016.
- 5.4. Minicurso: “Farmacologia: mitos e verdades” no XIV Workshop da Pós-graduação, 2015.
- 5.5. Palestra: “Desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas medicinais” na I Semana Acadêmica da Biomedicina e I Semana Acadêmica da Farmácia, 2015.
- 5.6. Aula Prática: “Produtos naturais: métodos de estudo” para o curso de Biomedicina da UNIP Bauru, 2015.
- 5.7. Minicurso: “Métodos de seleção de Plantas Medicinais para ensaios biológicos” na XII Jornada de Plantas Medicinais, 2015.

6. Atividades didáticas

- 6.1. Estágio docência na disciplina Farmacodinâmica junto ao Curso de Ciências Biomédicas do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (30 horas);

- 6.2. Estágio docência na disciplina Farmacologia junto ao curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP (30 horas);
- 6.3. Professor Assistente de Farmacologia I do curso de Fisioterapia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas);
- 6.4. Professor Assistente de Farmacologia II do curso de Fisioterapia da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas);
- 6.5. Professor Assistente de Bioquímica do curso de Educação Física da Faculdade Marechal Rondon – UNINOVE (40 horas).

7. Prêmios

- 7.1. Menção Honrosa, XXIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. TANIMOTO, A.; COSTA, C.A.R.A. SEVERI, J.A.; WITAICENIS, A.; ALMEIDA JÚNIOR, L.D.; CHAGAS, A.S.; QUAGLIO, A.E.V.; DI STASI, L.C. Avaliação da atividade curativa de *Pfaffia glomerata* na inflamação intestinal. 2014.
- 7.2. Menção Honrosa, XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. TANIMOTO, A.; MORAES, F.R.; WITAICENIS, A.; SOUZA, F.P.; DI STASI, L.C. Novel antioxidante mechanisms of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin in intestinal inflammation: involvement of glutathione and glutathione reductase. 2015.
- 7.3. Menção Honrosa, XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. TANIMOTO, A.; PIVA, H.M.R.P.; FANTINATI, A.W.; FOSSEY, M.A.; SOUZA, F.P.; DI STASI, L.C. Molecular mechanisms involved in intestinal anti-inflammatory and antioxidant effects of 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin. 2016.

RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal é uma doença crônica, cuja patogênese envolve uma interação complexa de fatores múltiplos. Entre os novos compostos estudados para o tratamento da inflamação intestinal, a 4-metilesculetina (4-ME) apresentou potentes atividades antioxidante e anti-inflamatória intestinal, porém estudos mais detalhados sobre o mecanismo de ação das cumarinas são necessários. Neste trabalho, foram verificados que os tratamentos com a 4-ME preveniram a depleção dos níveis de glutathione total, diminuíram a atividade de mieloperoxidase e glutathione peroxidase (GPX), preveniram a diminuição da atividade de glutathione redutase (GSR) e glutathione S-transferase. Além disso, os tratamentos com a 4-ME preveniram a redução da abundância relativa de RNAm de γ -glutamyl transferase 1, glutathione redutase e fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 causada pela inflamação intestinal. A investigação da interação entre a 4-ME e GSR, GPX ou proteína inibitória κ B (I κ B) mostrou que a 4-ME interage com a GSR e I κ B por um processo predominantemente estático, enquanto a interação entre a 4-ME e GPX ocorre por um processo dinâmico. As forças de van der Waals e as pontes de hidrogênio possuem papel fundamental na formação e na estabilização do complexo GSR/4-ME, por outro lado interações hidrofóbicas determinam as interações da 4-ME com a GPX e a I κ B. Adicionalmente, os resultados indicam que o grupo metila do carbono C-4 é o segundo epítipo mais próximo na interação GSR/4-ME. Portanto, esses dados mostram claramente que a 4-ME não é um simples sequestrador de radicais livres, mas um composto natural com mecanismos de ação específicos que envolvem a modulação da atividade enzimática e da expressão de genes chave no sistema antioxidante.

Palavras-chave: 4-metilesculetina; 6,7-dihidroxi 4-metilcumarina; Doença Inflamatória Intestinal; Estresse oxidativo; Inflamação intestinal.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disorder; its pathogenesis involves a complex interplay of multiple factors. Among new candidates to treat intestinal inflammation, 4-methylesculetin (4-ME) showed potent intestinal anti-inflammatory and antioxidant activity, however detailed research on the mechanisms of action of coumarins are needed. In this work, treatments with 4-ME prevented depletion of total glutathione content, decreased myeloperoxidase and glutathione peroxidase (GPX) enzyme activities, prevented diminishment of activity of glutathione reductase (GSR) and glutathione S-transferase. Furthermore, treatments with 4-ME prevented mRNA abundance downregulation caused by intestinal inflammation of γ -glutamyl transferase 1, glutathione reductase and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. Investigation of interactions between 4-ME and GSR, GPX or inhibitory protein κ B (I κ B) showed 4-ME interacts with GSR and I κ B through a static quenching mechanism, GPX/4-ME interactions occurs by a dynamic quenching mechanism. Van der Waal forces and hydrogen bonds are essential for formation and stabilization of GSR/4-ME complex, on the other hand hydrophobic interactions are responsible for interactions between 4-ME and GPX or I κ B. Additionally, results indicate C-4 methyl group is the second most buried epitope on the GSR/4-ME interaction. Therefore, these data clearly show 4-ME is not a simple free radical scavenger, but a natural compound with specific mechanisms of action involving modulation of enzyme activities and gene expression with key roles on antioxidant system.

Keywords: 4-methylesculetin; 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin; Inflammatory Bowel Disease; Oxidative stress; Intestinal Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

τ_0	Tempo de vida médio de emissão da fluorescência
[L]	Concentração de ligante
[L _f]	Concentração de ligante livre
[L _t]	Concentração de ligante total
[P]	Concentração de proteína
4-ME	6,7-dihidroxi-4-metilcumarina ou 4-metilesculetina
Actb	Gene da β -actina
ANOVA	Análise de variância de uma via
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-benzeno
COX	Ciclo-oxigenase
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
F	Intensidade de fluorescência na presença de ligante
F ₀	Intensidade de fluorescência na ausência de ligante
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
Gapdh	Gene do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGT	Gama-glutamyl transferase (proteína)
Ggt1	Gene da γ -glutamyltransferase 1
GPX	Glutathione peroxidase
Gpx1	Gene da glutathione peroxidase 1
Gpx2	Gene da glutathione peroxidase 2
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione redutase
Gsr	Gene da glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
Gstm1	Gene da glutathione S-transferase μ 1
Gstp1	Gene da glutathione S-transferase π 1
Gstt1	Gene da glutathione S-transferase θ 1
Hprt	Gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Proteína inibitória κ B
IL	Interleucina
I _{off}	Intensidade do sinal do espectro sem a saturação da proteína

I_{on}	Intensidade do sinal do espectro da proteína saturada
K_b	Constante de associação
K_D	Constante de dissociação
K_q	Constante de supressão da biomolécula
k_{sat}	Constante de saturação
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
LOX	Lipo-oxigenase
MPO	Mieloperoxidase
Mpo	Gene da mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nfe12	Gene do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NF- κ B	Fator nuclear κ B
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PDB	Protein Data Bank
RCU	Retocolite ulcerativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
STD-AF	Fator de amplificação do STD
STD-RMN	Diferença de transferência de saturação por RMN
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilenediamina
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 SUBSTÂNCIA DE ESTUDO, PROTEÍNAS E REAGENTES	6
3.2 ANIMAIS	6
ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	7
3.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO INTESTINAL INDUZIDO POR TNBS EM RATOS E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA 4-ME	7
3.3.1 <i>Avaliação do processo inflamatório intestinal</i>	8
3.3.1.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase	8
3.3.1.2 Determinação do conteúdo total de glutathione	9
3.3.1.3 Determinação da atividade de glutathione redutase	9
3.3.1.4 Determinação da atividade de glutathione peroxidase	10
3.3.1.5 Determinação da atividade de glutathione S-transferase	10
3.3.1.6 Determinação da atividade de superóxido dismutase	11
3.3.1.7 Determinação da atividade de catalase	11
3.3.1.8 Determinação da atividade de ciclo-oxigenase	11
3.3.1.9 Determinação da atividade de lipo-oxigenase	12
3.3.1.10 Expressão gênica relativa por PCR em tempo real	12
<i>Estudos in vitro</i>	16
3.3.2 <i>Investigação da formação do complexo proteína/ligante</i>	16
3.3.2.1 Espectroscopia de fluorescência	16
3.3.2.2 Medidas espectrofotométricas e equipamentos	16
3.3.2.3 Experimento de supressão de fluorescência para verificação da interação proteína-ligante	17
3.3.2.4 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear	19
3.3.2.5 <i>Docking</i> Molecular do complexo GSR/4-metilesculetina	21
3.3.3 <i>Análise estatística e análise dos resultados</i>	22

3.3.3.1 Processo inflamatório intestinal	22
3.3.3.2 Expressão gênica	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MACROSCÓPICA	23
4.1.1 Análises bioquímicas	24
4.1.2 Análises de biologia molecular	33
4.2 INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO PROTEÍNA/LIGANTE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	40
4.2.1 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por espectroscopia de fluorescência	41
4.2.2 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear.....	48
4.2.3 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por docking computacional	50
5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 Anexos.....	62
7.1 ANEXO 1	62
7.2 ANEXO 2	63

1 INTRODUÇÃO

As duas formas principais da Doença Inflamatória Intestinal (DII), a Doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), são caracterizadas por um processo inflamatório idiopático, crônico e recidivante do trato gastrointestinal, cuja patogênese envolve uma complexa interação de múltiplos fatores (Fiocchi, 2012; Di Stasi et al., 2015; Danese et al., 2016).

Até o momento, a etiologia da DII não é completamente compreendida e muitas teorias que envolvem desde infecções a mecanismos psicossomáticos, sociais, metabólicos, vasculares, genéticos, alérgicos ou autoimunes estão em discussão (Xavier e Podolsky, 2007; Fiocchi, 2013; Vezza et al., 2016). Apesar da etiologia não ser totalmente compreendida, há um consenso de que a DII ocorre em indivíduos com predisposição genética que exibem uma disfunção na barreira epitelial (Vezza et al., 2016), a qual pode ser afetada pelo estresse oxidativo e liberação excessiva de radicais livres formados (Pavlick et al., 2002; Moura et al., 2015; Souza e Fiocchi, 2015).

De fato, há inúmeras evidências clínicas e experimentais de que a inflamação intestinal crônica está diretamente associada a uma altíssima produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e diminuição de antioxidantes endógenos (Biasi et al., 2011; Zhu e Li, 2012), envolvendo a alteração da atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases, redutases e redoxinas (Sánchez de Medina et al., 2004; Zhu e Li, 2012; Biasi et al., 2013).

Um dos fatores mais agravantes da DII é que não existe uma cura definitiva, nem mesmo por processos cirúrgicos (Fiocchi, 2012). Portanto, os principais objetivos dos tratamentos farmacológicos disponíveis são induzir a remissão dos sintomas e mantê-la. A fim de alcançar os dois objetivos citados, aminossalicilatos (sulfassalazina e

mesalazina), corticoesteroides (prednisona e prednisolona), imunomoduladores (azatioprina, metotrexato e ciclosporina) e anticorpos monoclonais (infliximab e adalimumab) são utilizados para interferir em vários estágios da cascata inflamatória (Bernstein, 2015). Contudo, o uso crônico dos tratamentos citados é limitado devido aos possíveis efeitos adversos graves e elevado custo (Siegel, 2011).

A literatura relata que aproximadamente 45%, 55%, 15% e 10% dos pacientes apresentaram efeitos adversos após início do tratamento com aminossalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e anticorpos monoclonais, respectivamente. Entre os efeitos adversos mais frequentes, podemos citar dor abdominal, náusea, vômitos, anorexia, cefaleia, hemólise, infertilidade masculina, agranulocitose, hepatite, pancreatite (Moum, 2008), aumento do apetite e do peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, osteonecrose, retardo de crescimento, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, infecções, miopatia, catarata, atrofia de pele, estrias, esquimose, esteatose, diabete, hipertensão, glaucoma, *rash* cutâneo, diarreia e depressão da medula óssea (Moum, 2008; Siegel, 2011; Dalal e Cohen, 2015). Além disso, cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento com corticosteroides (Siegel, 2011) com alto risco do desenvolvimento de dependência de corticosteroides e, 51% dos pacientes pode ter o tratamento com anticorpos anti-TNF α descontinuado por falta de resposta primária ou por perda secundária de resposta (Dalal e Cohen, 2015).

Desta maneira, há uma demanda de novas estratégias terapêuticas que sejam efetivas e mais seguras para a DII. Entre os novos compostos estudados para o tratamento de inflamação intestinal experimental, a utilização de compostos naturais antioxidantes poderia ser útil para minimizar os sinais e sintomas da DII (Luchini et al., 2008).

Diversos estudos propõe que os efeitos benéficos observados com o consumo de produtos naturais provêm da atividade antioxidante de alguns compostos, como os flavonoides (Medina et al., 1996; Sánchez de Medina et al., 2004; Romier et al., 2009) e as cumarinas e seus derivados (Di Stasi et al., 2004; Luchini et al., 2008; Witaicenis et al., 2010, 2012, 2013).

Em estudos anteriores, a 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina ou 4-metilesculetina (4-ME) produziu efeito anti-inflamatório intestinal pela inibição da atividade de mieloperoxidase (MPO), por evitar a depleção dos níveis de glutathione total, pela redução do conteúdo de malondialdeído *in vivo* e pela inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-8, IL-2 e interferon gama (IFN- γ) *in vitro* (Witaicenis et al., 2012), mostrando-se um interessante candidato para o tratamento da DII. De fato, a 4-ME (5 mg/Kg) apresentou atividade antioxidante e anti-inflamatória intestinal numa dose dez vezes menor que a da sulfassalazina (50 mg/Kg) e numa dose 2,5 vezes maior que a da prednisolona (2 mg/Kg) (Witaicenis et al., 2012).

Recentemente, as atividades antioxidante e anti-inflamatória da 4-ME foram atribuídas à presença do grupo metila no carbono C-4 (Witaicenis et al., 2012), visto que a 4-ME foi capaz de induzir a remissão do quadro inflamatório e prevenir recidivas induzidas por múltiplas administrações de TNBS e a esculetina, um derivado cumarínico que difere da 4-ME apenas pela ausência do grupo metila em sua estrutura (Figura 1), foi apenas capaz de induzir a remissão da inflamação (Witaicenis et al., 2012). Além disso, derivados cumarínicos que contêm *o*-dihidroxição e metilação em sua estrutura demonstraram atividade antioxidante maior que outros derivados cumarínicos (Hoult e Payá, 1996; Witaicenis et al., 2014), corroborando com os efeitos da 4-ME encontrados pelo nosso grupo de pesquisa. Porém estudos mais detalhados

sobre o mecanismo de ação da 4-ME que verificam a relação estrutura-atividade desta molécula são necessários.

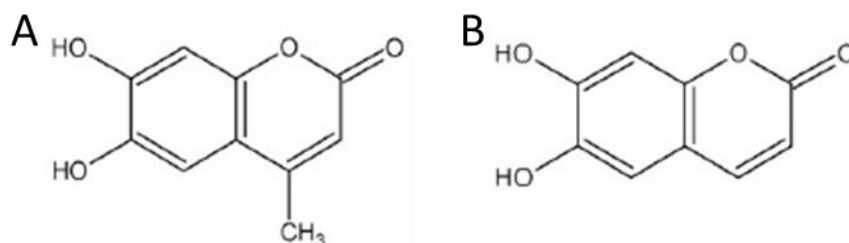


Figura 1: Fórmulas estruturais da (A) 4-metilesculetina e (B) esculetina.

No processo inflamatório intestinal, o estresse oxidativo é principalmente modulado pelas enzimas relacionadas à glutatona, como a glutatona redutase (GSR), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S-transferase (GST); fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2 ou Nrf2), γ -glutamyl transferase (GGT) e MPO (Esworthy et al., 2001; Kruidenier e Verspaget, 2002; Khor et al., 2006). O estresse oxidativo e diversos mediadores inflamatórios estimulam a degradação da proteína inibitória κ B (I κ B) e aumentam a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B), que estimulará a produção de mediadores pró-inflamatórios que resultarão em dano tecidual e maior liberação de radicais livres; caracterizando um processo pró-oxidante e pró-inflamatório que se autoalimenta (Figura 2).

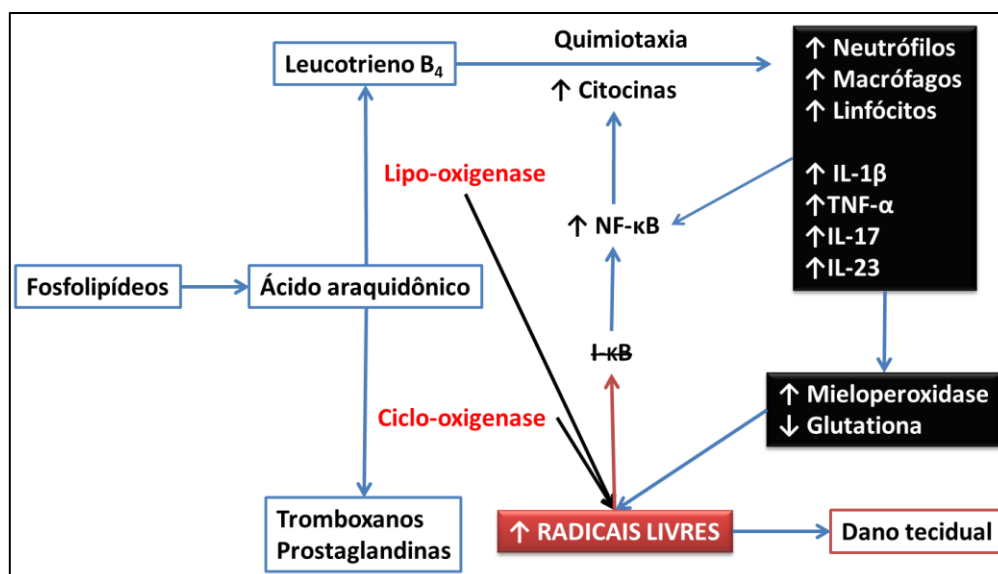


Figura 2: Esquema que ilustra, resumidamente, a interação entre mediadores inflamatórios e oxidantes na inflamação intestinal.

Baseado nas informações apresentadas, estudos são necessários para auxiliar a compreensão do mecanismo de ação de novos candidatos para o tratamento da DII. A 4-ME já demonstrou potente atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS (Witaicenis et al., 2010, 2012) e por sulfato de dextrano sódico (dados não publicados, FAPESP Proc. 13/01297-7), porém poucos estudos sobre seus mecanismos moleculares foram realizados. A elucidação dos mecanismos moleculares de ação da 4-ME e de suas interações intermoleculares pode ser a chave para o entendimento de diversos processos biológicos no organismo (Mayer e James, 2004), além do mais, modelos animais são essenciais para elucidar a patogênese da DII (Danese et al., 2016).

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos identificar os mecanismos de ação antioxidantes que participam da resposta anti-inflamatória intestinal produzida pela 4-ME no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos e caracterizar por

técnicas de biofísica molecular se existe interação direta deste composto com os principais mediadores do estresse oxidativo envolvidos com o processo inflamatório intestinal, como a glutathione redutase (GSR), glutathione peroxidase (GPX) e a proteína inibitória κ B (I κ B).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Substância de estudo, proteínas e reagentes

A 4-ME, as proteínas GPX, GSR, I κ B, e os demais reagentes foram obtidos da empresa *Sigma-Aldrich*[®].

3.2 Animais

Ratos Wistar machos (200 a 250g, n=8) provenientes da ANILAB Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA, aclimatados às condições do biotério do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia do Departamento de Farmacologia sob temperatura (21 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlados. Os animais foram pesados diariamente e alimentados com ração peletizada da empresa Presence[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n° 42/04-CEEA e n° 695/2015 submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Estudos *in vivo*

3.3 Processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos e atividade anti-inflamatória da 4-ME

Imediatamente antes do início dos tratamentos, os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo branco: animais sem indução do processo inflamatório intestinal e sem tratamento;
- Grupo controle: animais com indução do processo inflamatório intestinal e sem tratamento (receberam somente o veículo);
- Grupos experimentais: animais com indução do processo inflamatório intestinal e tratados com 4-ME nas doses de 5 e 10 mg/kg;

Após a separação dos animais em grupos, todos os animais receberam seus respectivos tratamentos 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da administração de TNBS e foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório. A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris et al. (1989), com as seguintes modificações. A administração intracolônica de 0,25 mL de uma solução de 40 mg/mL de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% (v/v) através de um cateter de 2 mm de diâmetro, introduzido pelo ânus até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação da solução até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com a administração de solução salina em substituição ao TNBS.

3.3.1 Avaliação do processo inflamatório intestinal

Durante o período de manipulação, os animais foram avaliados quanto ao consumo de ração, evolução da massa corporal e presença de diarreia.

Após a morte dos animais, os cólons foram extraídos e analisados quanto aos danos intestinais, considerando-se parâmetros macroscópicos. Após avaliação macroscópica, tiras longitudinais foram coletadas para análises bioquímicas e moleculares.

Na análise macroscópica foram avaliados: a relação entre o peso e o comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da gravidade, extensão e características do dano intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell et al. (1995) (dados não apresentados).

3.3.1.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi realizada pelo método de Krawisz et al. (1984). As tiras dos cólons foram homogeneizadas em tampão HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (v/v) em tampão fosfato sódico 50 mM; pH 6,0), colocadas em banho com ultrassom por 10 segundos e posteriormente submetidas a triplo ciclo de congelamento e descongelamento. Após centrifugação, foi adicionada uma solução que contém peróxido de hidrogênio e *o*-dianisidina, tal solução permite a detecção da atividade de MPO devido à mudança de cor causada pela formação de radicais livres. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de mieloperoxidase por grama de tecido (U/g de tecido), onde 1 unidade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio

por minuto a 25 °C. A atividade da mieloperoxidase é utilizada como marcador de infiltração neutrofílica.

3.3.1.2 Determinação do conteúdo total de glutathiona

A quantificação de glutathiona total foi realizada pelo método descrito por ANDERSON (1985). O protocolo é baseado na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra para a sua forma oxidada (GSSG), através da incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando assim, um ciclo, no qual a velocidade de redução do DTNB é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH + GSSG). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de nmoles de glutathiona total por grama de tecido (nmoles de glutathiona/g de tecido).

3.3.1.3 Determinação da atividade de glutathiona redutase

A determinação da atividade de GSR foi feita pelo *glutathione reductase assay kit* (item 703202 da Cayman[®]), que determina a atividade da enzima pela mensuração da taxa de oxidação de NADPH em NADP^+ na presença de glutathiona oxidada (GSSG). A oxidação de NADPH é acompanhada por um decréscimo na absorbância a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade de GSR na amostra. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de GSR por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de GSR é definida como aquela que oxida 1 nmol de NADPH em NADP^+ por minuto a 25 °C.

3.3.1.4 Determinação da atividade de glutathione peroxidase

A determinação da atividade de GPX foi feita pelo *glutathione peroxidase assay kit* (item 403102 da Cayman[®]), que determina a atividade da GPX indiretamente por uma reação acoplada com a GSR. A GSSG produzida pela reação de hidroperóxidos (hidroperóxido cumene) com a GPX é reciclada em glutathione reduzida (GSH) pela GSR na presença de NADPH. A oxidação de NADPH em NADP^+ é acompanhada por uma diminuição na absorbância a 340 nm. Sob circunstâncias em que a taxa de atividade de GPX é limitada, a taxa de decréscimo na A_{340} é diretamente proporcional à atividade de GPX na amostra. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de GPX por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de GPX é definida como aquela que oxida 1 nmol de NADPH em NADP^+ por minuto a 25 °C.

3.3.1.5 Determinação da atividade de glutathione S-transferase

A determinação da atividade de GST foi feita pelo *glutathione S-transferase assay kit* (item 403302 da Cayman[®]), que determina a atividade total de GST (citossólica e microsomal) ao medir a conjugação de 1-cloro-2,4-benzeno com a GSH. A conjugação é monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm. A taxa de aumento da absorbância é diretamente proporcional com a atividade das GSTs. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de GST por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de GST é definida como aquela conjuga 1 nmol de CDNB com GSH por minuto a 25 °C

3.3.1.6 Determinação da atividade de superóxido dismutase

A determinação da atividade de SOD foi feita pelo *superoxide dismutase assay kit* (Item 706002 da Cayman[®]), que utiliza um sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da dismutação do radical superóxido. O ensaio de SOD mensura todos os tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e FeSOD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de SOD por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para a dismutação de 50% de radicais superóxidos.

3.3.1.7 Determinação da atividade de catalase

A determinação da atividade de CAT foi feita pelo *catalase assay kit* (Item 707002 Cayman[®]), que utiliza a função peroxítica da CAT para determinação da atividade enzimática. O método se baseia na reação da enzima com metanol na presença de H₂O₂. O formaldeído produzido é mensurado colorimetricamente com 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. O Purpald forma um heterocíclico com aldeídos especificamente, o qual após oxidação muda de transparente para roxo, detectável a 540 nm. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de CAT por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de CAT é definida como aquela que causa a formação de 1 nmol de formaldeído por minuto a 25 °C.

3.3.1.8 Determinação da atividade de ciclo-oxigenase

A determinação da atividade de COX foi feita pelo *COX activity assay kit* (Item 760151 Cayman[®]), que mensura a atividade peroxidase da COX. Tal atividade pode ser

monitorada, colorimetricamente, pela oxidação do N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilenediamina (TMPD) a 590 nm. As amostras foram separadas em três alíquotas, uma alíquota foi tratada com um inibidor de COX-2 (DuP-697), outra com um inibidor de COX-1 (SC-560) e a outra foi utilizada sem a adição de inibidores. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de COX por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de COX é definida como aquela que causa a formação de 1 nmol de TMPD por minuto a 25 °C.

3.3.1.9 Determinação da atividade de lipo-oxigenase

A determinação da atividade de LOX foi feita pelo *lipoxygenase inhibitor screening assay kit* (Item 760700 Cayman[®]) com algumas modificações. O kit detecta e mensura hidroperóxidos produzidos na peroxidação lipídica da LOX da amostra. Os reagentes cromógenos do kit permitem que os hidroperóxidos formados a partir do ácido araquidônico sejam detectáveis a 490 nm. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. de unidades de LOX por mililitro (U/mL), onde 1 unidade de LOX é definida como aquela que causa a formação de 1 nmol de hidroperóxidos por minuto a 25 °C.

3.3.1.10 Expressão gênica relativa por PCR em tempo real

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo Trizol Invitrogen[®]. Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-1000, NANODROP).

A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR em tempo real. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen[®]), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total. A este volume, foi adicionado 1 µl de tampão DNase, 1 µl de DNase I (1 unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10 µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µl de EDTA (25 mM) e incubada a 65 °C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen[®]), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8 µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1 µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500 µg/ml), 1 µl de dNTP Mix (10 mM) e 3 µl de água estéril. Essa solução foi incubada a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minutos. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4 µl de tampão “First Strand” 5X, 1 µl de DTT (0,1 M) e 1 µl de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/µl). Na sequência, foi acrescido 1 µl (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e se iniciou a incubação, primeiramente a 50 °C por 50 minutos, depois a 70 °C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20 °C para utilização na PCR.

Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos correspondentes (Tabela 1).

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra em questão utilizando o software “LinRegPCR” (Ramakers *et al.*, 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo quatro pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram delimitados e a média desses valores determinou o Threshold para cada gene. Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão do gene GAPDH que foi considerado o melhor controle endógeno. A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência (Pfaffl, 2001); o controle calibrador foi uma amostra de cDNA de cada gene analisado. Três genes endógenos foram mensurados: Gapdh, beta-actina e Hprt. O Gapdh foi o gene endógeno mais estável. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada amostra analisada (Pfaffl, 2001). Controles negativos (água mili-Q, no lugar de amostras) foram analisados, concomitantemente, em cada placa.

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos para PCR em tempo real.

Gene	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração de oligo (nM)	Tamanho do fragmento (pb)	Concentração de amostra cDNA µL	Referência NCBI
Gapdh	F: 5'-TGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA-3' R: 5'-ACGACATACTCAGCACCAGCATCA-3'	60	200	142	1	NM_017008.3
Actb	F: 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA-3' R: 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT-3'	60	100	159	1	NM_031144.2
Hprt1	F: 5'-AGGGAAGTGACAATCTACCTGACG-3' R: 5'-GAAATGTCTGTTGCTGCGTCCCTT-3'	60	100	81	0,250 (1:4)	AA900579.1
Ggt1	F: 5'-GCCCCAATACCACAACAGTAGA-3' R: 5'-CCTGAACCACAGCGATGAA-3'	60	200	110	0,250 (1:4)	NM_053840.2
Gpx1	F: 5'-CAGTTCGGACATCAGGAGAATG-3' R: 5'-CACCTCGCACTTCTCAAACA-3'	60	200	114	0,250 (1:4)	NM_030826.3
Gpx2	F: 5'-CCACCTTCAGTCTTACCCAAA-3' R: 5'-GGGAGAATGGGTCGTCATAAG-3'	60	200	108	0,250 (1:4)	NM_183403.2
Gsr	F: 5'-AAGGCCGACTTCGACAATAC-3' R: 5'-CTTGATTGGTTCTCCAGAG-3'	60	200	129	0,250 (1:4)	NM_053906.2
Gstm1	F: 5'-AGAACCAGGTCATGGACAAC-3' R: 5'-CATCTTCTCAGGGATGGTCTTC-3'	60	200	104	0,250 (1:4)	NM_017014.1
Gstp1	F: 5'-CTATGCCACCGTACACCATT-3' R: 5'-GCCTTGAAGCCAGACATCTAT-3'	60	200	128	0,250 (1:4)	NM_012577.2
Gstt1	F: 5'-AAGAAGGTACCAGCCATGAAG-3' R: 5'-CCAGTGGTCAGGAACCTTATAC-3'	60	200	99	0,250 (1:4)	NM_053293.2
Mpo	F: 5'-GGCATCACTACCGTGTCTAAG-3' R: 5'-CCAGGAAGCCAGATTCAATT-3'	60	200	102	1	NM_001107036.1
Nfel2	F: 5'-CTTCCTCTGCTGCCATTAGT-3' R: 5'-CAGTGTGCTTCTGGTTGAAAG-3'	60	200	102	0,250 (1:4)	NM_031789.2

γ -glutamyl transferase 1 (Ggt1), Glutathione peroxidase 1 (Gpx1), Glutathione peroxidase 2 (Gpx2), glutathione reductase (Gsr), glutathione S-transferase μ 1 (Gstm1), Glutathione s-transferase π 1 (Gstp1), Glutathione s-transferase θ 1 (Gstt1), Myeloperoxidase (Mpo) e Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfel2)

Estudos *in vitro*

3.4 Investigação da formação do complexo proteína/ligante

3.4.1 Espectroscopia de fluorescência

As amostras das proteínas obtidas da empresa Sigma Aldrich foram mantidas no momento do experimento no mesmo tampão informados em suas especificações. As soluções estoque de 4-ME foram preparadas em etanol absoluto PA.

3.4.2 Medidas espectrofotométricas e equipamentos

As medidas de espectroscopia de UV-Vis foram obtidas com espectrofotômetro Cary-3E spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA) em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico equipado com sistema de controle de temperatura Neslab RTE-221, nas seguintes condições: velocidade de varredura 600 nm/min, intervalo de 1 nm, abertura de fenda 2,0 nm, na temperatura de 25 °C para a determinação correta da concentração de ligante e proteína.

A solução estoque de 4-ME foi preparada em etanol PA; a GPX e a GSR foram preparadas em solução tampão pH = 7,4, 50 mM de fosfato de sódio e 200 mM de NaCl e; a proteína inibitória κ B foi preparada em 50 mM de tampão Tris-HCl e 150 mM de NaCl. Na determinação da concentração da solução estoque da 4-ME foi realizada utilizando o coeficiente de extinção molar de $3294 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a 4-ME a 280 nm; no cálculo da concentração das proteínas foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar de $52050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a GSR; de $17210 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a GPX e $68925 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a I κ B a 280 nm (Expasy-ProtParam). As concentrações das soluções eram de 8,4 mM para a 4-ME e 2 μ M para as proteínas.

3.4.3 Experimento de supressão de fluorescência para verificação da interação proteína-ligante

As medidas de fluorescência foram realizadas com espectrofluorímetro ISS PC1 de estado estacionário (Champaign, IL, USA), equipado com sistema de controle de temperatura Neslab RTE-221, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, nas temperaturas de 25 e 37 °C. A abertura das fendas de excitação e de emissão foi ajustada em 8,0 nm. O comprimento de onda de excitação foi de 290 nm e o de emissão foi coletado entre 300 – 500 nm, que foi corrigido subtraindo a fluorescência do tampão e para efeitos de filtros internos.

Os experimentos de supressão de intensidade de fluorescência foram realizados com titulações de 4-ME nas soluções de proteínas pela adição de pequenas alíquotas de 4-ME na solução de cada proteína (2,0 mL), variando de 0 a 24 µM com incrementos de 1,6 µM em 25 °C e 37 °C.

A intensidade de fluorescência do grupo flavina do cofator dinucleótido de flavina e adenina (FAD) que está ligado à GSR foi excitado em 350 nm e seu espectro de emissão foi coletado entre 485 – 700 nm na ausência e presença de 4-ME e NADPH (controle positivo), ambos a 24 µM.

A intensidade de fluorescência de uma macromolécula pode diminuir devido a uma variedade de interações com outros compostos moleculares: rearranjo molecular, transferência de energia, supressão devido a colisões, dentre outros (Lakowicz, 1999). Tal decréscimo da fluorescência é denominado supressão ou “quenching” e é descrita pela relação de Stern–Volmer, através da seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[L] = 1 + k_q \tau_0 [L] \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo que F_0 e F são as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante, respectivamente. K_q , K_{SV} , τ_0 , e $[L]$ são a constante de supressão bimolecular, a constante de Stern–Volmer, o tempo de vida médio de emissão da fluorescência do fluoróforo na ausência de ligante (da ordem de $\tau_0=10^{-8}$ s) e a concentração de ligante (supressor), respectivamente. Neste modelo (Eq. 1) a concentração de supressor (ligante total) é admitida como sendo igual à concentração de supressor livre, pois esta não é conhecida no experimento. Com este objetivo, os experimentos realizados serão utilizadas razões ligante/supressor superiores a 1, o que torna esta aproximação válida.

Admitindo que a concentração de ligante na solução é maior que a concentração de proteína, portanto $[L_t] \cong [L_f] = [L]$, pode-se então relacionar a fração de fluorescência com a concentração de ligantes através da seguinte relação (Caruso et al., 2014):

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + n \log([L]) \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo que F_0 e F são as fluorescências antes e após a adição de ligante $[L]$

Através do gráfico $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log([L])$, no qual se observa uma dependência linear, pode-se obter os valores relativos ao número de sítios de ligação (n) da proteína e a constante de ligação K_b relativa à interação dos ligantes com as proteínas.

Para elucidar a ligação entre a 4-ME e as proteínas, a variação na entalpia foi calculada pela equação de van't Hoff:

$$\ln\left(\frac{K_{b1}}{K_{b2}}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo que K_{b1} e K_{b2} são constantes de ligação nas temperaturas absolutas T_1 e T_2 , que são 298 K (25 °C) e 310 K (37 °C), respectivamente. R corresponde à constante

universal dos gases. A variação de energia livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) para os complexos proteína/ligante foram calculados pelas seguintes equações:

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad (\text{Eq. 3'})$$

$$\Delta S = -\frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (\text{Eq. 3''})$$

3.4.4 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear

O experimento de diferença de transferência de saturação por RMN (STD-RMN) foi aplicado para o estudo de interação entre a GSR e a 4-ME. Nesse caso, as soluções preparadas contêm 7,5 μM de GSR com concentrações variadas de ligantes, em uma titulação. A proteína foi diluída em água deuterada (D_2O) com 50 mM de tampão fosfato mono-sódico e 200 mM de NaCl. Primeiramente, a solução contendo apenas a amostra de proteína GSR 10 μM , sem ligantes, foi utilizada para encontrar a melhor condição de saturação. Foram testadas diferentes frequências de saturação seletiva da proteína em -0,5, -1,0 e -1,5 ppm, enquanto que a frequência de *off-resonance* utilizada foi mantida em 20 ppm. A escolha da frequência a ser utilizada na amostra com os ligantes leva em conta a porcentagem de saturação observada no espectro de diferença e também os sinais relativos de artefatos, ou seja, possíveis contaminantes, sendo que a condição a ser escolhida consiste naquela em que nenhum sinal de contaminante e com maior porcentagem de saturação da proteína. Cada condição foi testada com tempos de saturação da proteína variando entre 1s e 4s, coletando 1024 *scans* com 4 *dummyscans*.

O ligante 4-ME foi previamente solubilizado em etanol deuterado na solução estoque e foi adicionado separadamente seguindo uma titulação entre 100–650 μM e

utilizando 4 tempos de saturação diferentes para cada ponto da titulação. Para experimentos com ligantes foi adicionado um filtro de *spin lock* de 50 ms para filtrar os sinais de proteínas do espectro.

O efeito STD foi determinado usando o fator de amplificação STD-AF de acordo com a seguinte equação:

$$STD - AF = \frac{I_{off} - I_{on}}{I_{off}} \frac{[L]}{[P]} \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo que I_{on} é a intensidade do sinal do espectro da proteína seletivamente saturada (*on-ressonance*) e I_{off} é a intensidade do sinal do espectro registrada sem a saturação da proteína (*off-ressonance*), $[L]$ é a concentração de ligante (4-ME) e $[P]$ é a concentração da proteína. Seguindo a metodologia de análise proposta por Angulo e colaboradores (Angulo et al., 2010), a resposta do sistema a diferentes tempos de saturação é utilizada para o cálculo da constante de saturação k_{sat} seguindo a equação:

$$STD - AF(t) = STD - AF_{max} [1 - \exp(-k_{sat} \cdot t)] \quad (\text{Eq. 5})$$

Na qual $STD - AF_{max}$ é o valor máximo observado para STD-AF.

Por fim, a constante de dissociação K_D é obtida utilizando a cálculo do fator de amplificação STD inicial $STD - AF_0$ através das equações:

$$STD - AF_0 = STD - AF_{max} \cdot k_{sat} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$STD - AF_0([L]) = STD - AF_{max} \frac{[L]}{[L] + K_D} \quad (\text{Eq. 7})$$

A metodologia proposta resulta em estimativas da K_D que está de acordo com o valor obtido por outras técnicas, como ITC e fluorescência.

Além de fornecer informações valiosas sobre a afinidade do processo de interação proteína-ligante, os experimentos de STD por RMN fornecem dicas sobre a possível orientação do ligante no sítio de interação da proteína. Chamados de mapeamento de grupos de epítomos (*Group Epitope Mapping*, GEM) (Mayer e Meyer, 2001), a intensidade relativa dos sinais dos ligantes no espectro de diferença em relação ao espectro de *off-resonance*, indica quais átomos estão mais enterrados no interior da proteína. Tal informação é vital importância para a conexão de resultados experimentais com técnicas de *docking* e dinâmica molecular *in silico*.

Estudos computacionais

3.5 Docking Molecular do complexo GSR/4-metilesculetina

A estrutura cristalina da glutathione redutase GSR (*Saccharomyces cerevisiae*) e a estrutura molecular da 4-ME foram obtidas do PDB (código: 2HQM) e do servidor PRODRG (Schüttelkopf e Van Aalten, 2004), respectivamente. A adição de átomos de hidrogênio e cargas parciais para o dímero de GSR foi feita utilizando o servidor PDB2PQR (Unni et al., 2011). O software AutoDockTools (ADT) (Sanner, 1999) do programa MGL Tool 1.5.4 foi utilizado para finalizar a preparação dos arquivos de entrada da proteína e do ligante para os cálculos de *docking*. A caixa de pesquisa do programa Autogrid 4.2 foi centralizada na flavina do cofator FAD da proteína com 100x100x100 pontos com espaçamento de 0,375 Å. O algoritmo de busca utilizado foi o Lamarckian Genetic Algorithm (LGA), com população de 250, 25 milhões de avaliações

de energia, tolerância de RMSD (*root-mean-square distance*) para análise de cluster de 2,0 Å, gerando 100 conformações diferentes. Para a análise e visualização dos complexos gerados foi utilizado o software ADT e ferramenta PLIP (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) (Wallace et al., 1995). O visualizador PyMOL (Schrodinger LLC, 2015) foi utilizado para representação das figuras do complexo gerado.

3.6 Análise estatística e análise dos resultados

3.6.1 Processo inflamatório intestinal

Os dados paramétricos estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. Todas as análises foram feitas pelo software *GraphPad Prism*[®] com nível de significância mínimo de $p < 0,05$ comparados ao grupo controle.

3.6.2 Expressão gênica

A análise dos dados foi realizada pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra utilizando o software “LinRegPCR” (Ramakers et al., 2003) que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram delimitados e a média desses valores determinará o *Threshold* para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada amostra analisada. Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de

expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno. A expressão relativa dos genes foi analisada pelo método de Pfaffl (2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação clínica e macroscópica

No presente estudo, foi identificado que o efeito anti-inflamatório intestinal da 4-ME é, intimamente, relacionado com suas propriedades antioxidantes, corroborando com os dados prévios obtidos em nosso laboratório (Witaicenis et al., 2010, 2012). Contudo, foi possível também demonstrar que a 4-ME afeta a expressão gênica e a atividade de diversos mediadores antioxidantes, principalmente de enzimas relacionadas à glutathione.

Durante o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e alimento, o consumo de ração e a massa corporal dos animais foram monitorados diariamente. Após a instilação do TNBS, os animais do grupo controle apresentaram diarreia pastosa com presença de sangue, perda de peso e diminuição no consumo de ração (dados não apresentados). Durante a colectomia dos animais do grupo controle, foi observada aderência do cólon a órgãos adjacentes (dados não apresentados).

O processo inflamatório intestinal induzido por TNBS também é caracterizado por lesão necrótica intensa no cólon, com migração de leucócitos, sobretudo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Torres et al., 1999), com consequentes alterações na atividade enzimática e de mediadores da resposta inflamatória.

4.1.1 Análises bioquímicas

A MPO é liberada após estimulação por imunocomplexos, catecolaminas ou morte celular (Bos et al., 1978). Esta enzima constitui o sistema antimicrobiano mais importante e mais eficiente dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, atuando como catalizador da oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e um halogênio: $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$ (Kato et al., 2003), que resulta na ligação H_2O_2 -halogênio-MPO, um sistema altamente tóxico para micro-organismos (Oberge et al., 1983; Pedro et al., 2003).

Apesar da importante capacidade antimicrobiana da MPO, a ativação do sistema imune em excesso causa dano tecidual pela liberação dos radicais livres formados (Bos et al., 1978; Oberge et al., 1983; Pedro et al., 2003), principalmente radicais tirosila, peroxila e hipoclorito, que por sua vez podem causar peroxidação lipídica, tirosilação de HDL (high density lipoproteins) e reação cruzada com outras proteínas (Kato et al., 2003), provocando consequentemente, maior liberação de mediadores pró-inflamatórios. A correlação entre atividade de MPO e doenças inflamatórias já é constatada (Kato et al., 2003) e sua inibição pode prevenir danos teciduais. A diminuição dos danos teciduais provocados pela MPO e outros mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes é importante para a busca de novos tratamentos de doenças inflamatórias crônicas (Kruidenier e Verspaget, 2002; Karp e Koch, 2006; Iborra et al., 2011).

Neste sentido, as cumarinas são capazes de sequestrar radical hipoclorito, hidroxila, peroxila e ânions superóxidos (Payá et al., 1992). Além do mais, os tratamentos com a 4-ME diminuíram a atividade de MPO em ambas as doses administradas (Figura 3). A inibição da MPO por cumarinas, inclusive pela 4-ME, já está descrita na literatura (Witaicenis et al., 2010, 2012, 2014); contudo a determinação deste mediador inflamatório era necessária para validar o sucesso da indução da

inflamação intestinal e verificar a reprodutibilidade da atividade anti-inflamatória intestinal da 4-ME.

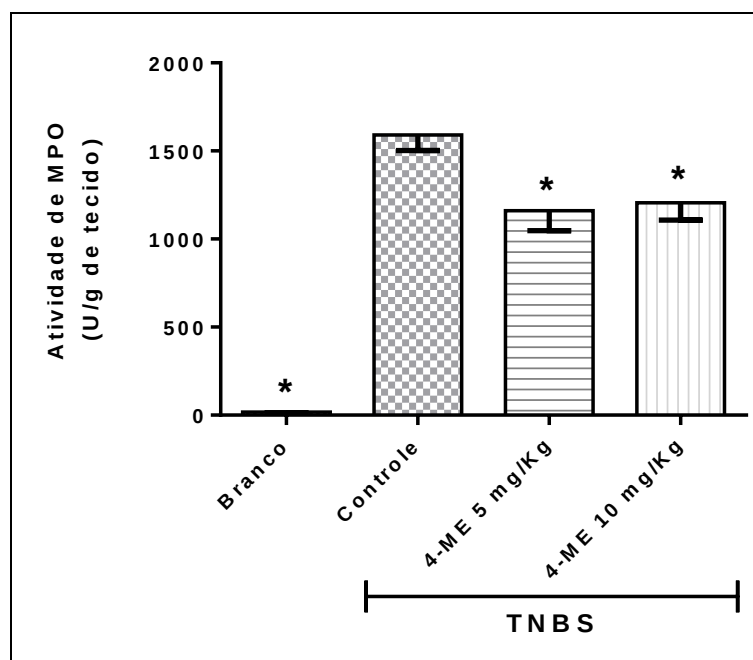


Figura 3: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de mieloperoxidase colônica de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Em condições fisiológicas, o sistema antioxidante nato neutraliza os radicais livres. Este sistema é constituído por diversas enzimas antioxidantes e numerosos compostos endógenos, tais como a glutathione e, outros antioxidantes provenientes da dieta (Huber et al., 2008; Roberts e Sindhu, 2009). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GSR), glutathione peroxidase (GPX) e muitas outras constituem a defesa antioxidante enzimática primária do organismo; enquanto o ácido ascórbico, o tocoferol, β -caroteno e outras numerosas substâncias químicas presentes em alimentos e bebidas, como flavonoides (Vezza et al., 2016) e cumarinas (Lake, 1999), fazem parte da defesa antioxidante não enzimática do organismo (Roberts e Sindhu, 2009).

Radicais livres também podem ser originados da respiração celular, atividade física, alimentação inadequada, tabagismo entre outros. Eles originam o radical superóxido que é metabolizado pela SOD, que dá origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode ser transformado em água e oxigênio pela CAT, ou transformado em água pela GPX na presença de glutathiona (GSH), ou ainda originar o radical hidroxila ($OH^\cdot$) que causa dano ao DNA, lipídeos e proteínas. Portanto, se este sistema enzimático exceder sua capacidade, a presença de substâncias antioxidantes não enzimáticas endógenas ou exógenas para neutralizarem os radicais livres torna-se necessária (Figura 4) (Roberts e Sindhu, 2009).

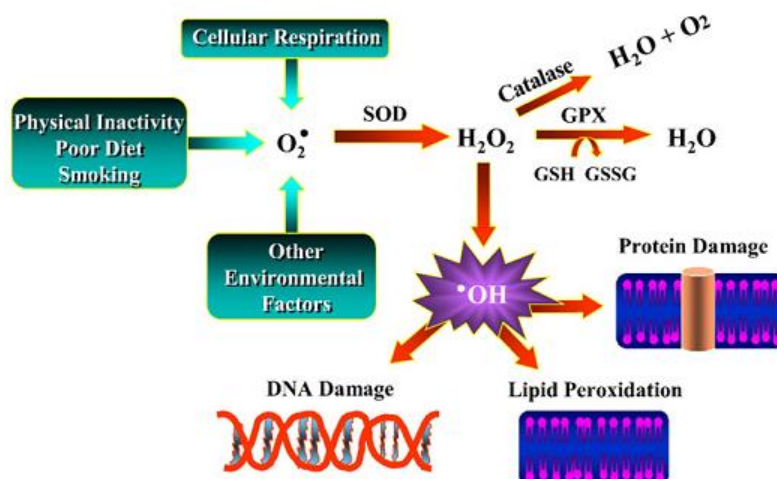


Figura 4: Esquema que representa a formação de radicais livres e a neutralização dos mesmos pelo sistema antioxidante (Roberts e Sindhu, 2009).

A atividade de CAT pode variar em modelos animais de inflamação intestinal induzida por TNBS, pois sua atividade pode aumentar ou diminuir de acordo com o tempo após a indução do quadro inflamatório e também com a espécie do animal de estudo (Yao et al., 2016; Zarzecki et al., 2016). Em humanos com doença de Crohn, a atividade enzimática de SOD e GPX está aumentada em pacientes com doença ativa e diminuída durante a remissão dos sintomas, porém a CAT permanece inibida tanto em pacientes com doença ativa e em remissão dos sintomas (Iborra et al., 2011).

Curiosamente, a administração de TNBS nos ratos resultou em diminuição da atividade da SOD (Figura 5) e aumento da atividade das enzimas CAT (Figura 6) 48h após a instilação do TNBS, enquanto que nenhum dos tratamentos com a 4-ME preveniu as alterações nas atividades de SOD (Figura 5) e CAT (Figura 6). Portanto, os efeitos antioxidantes produzidos pela 4-ME nos modelos de inflamação intestinal ocorrem por outros mecanismos, por exemplo, atuando na atividade enzimática e na expressão gênica de enzimas relacionadas com a glutathione, como a glutathione redutase, glutathione S-transferase e glutathione peroxidase, ou ainda alterando vias de fatores transcricionais sensíveis a óxido-redução, como o fator nuclear κB (NF- κB) e fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2).

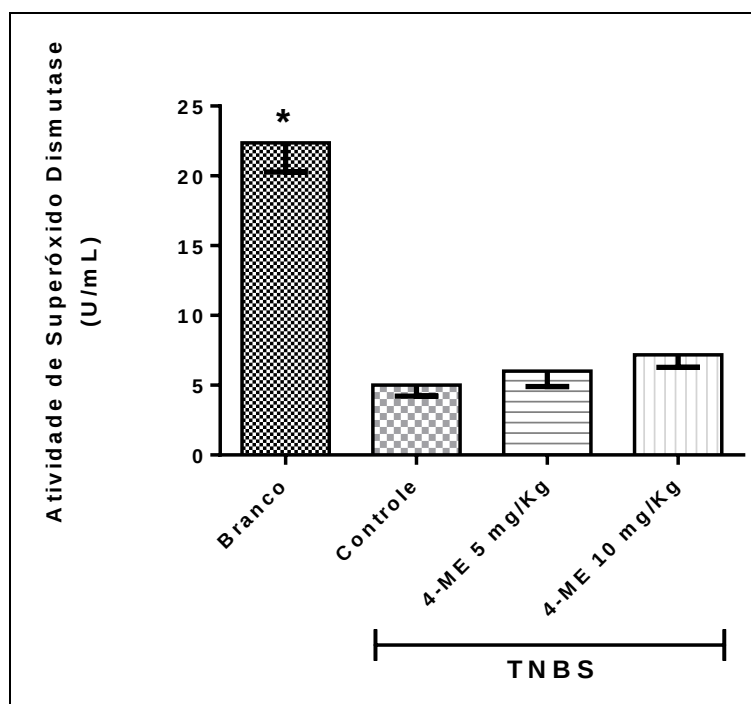


Figura 5: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de superóxido dismutase de cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

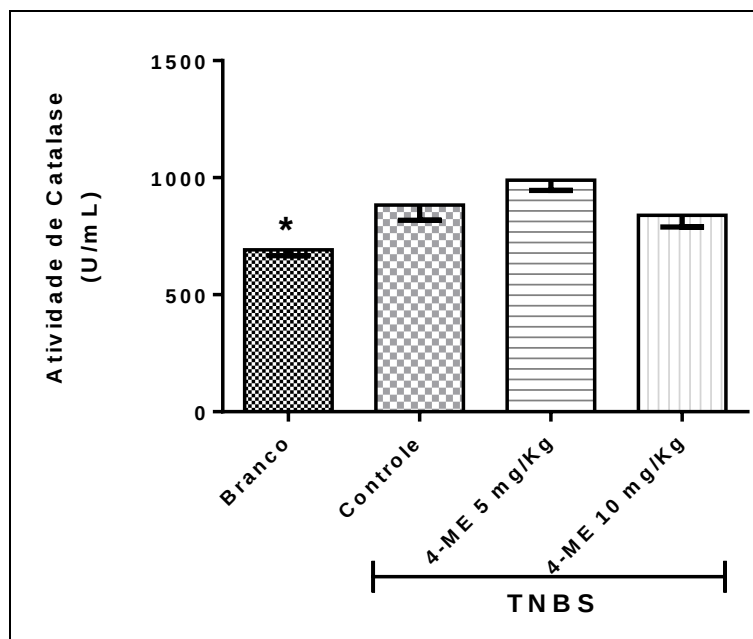


Figura 6: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de catalase de cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina ou glutathiona é um tripeptídeo ubíquo de baixo peso molecular, que é biologicamente ativo em sua forma reduzida (Circu e Aw, 2012). A reação entre radicais livres e glutathiona reduzida resulta na neutralização dos radicais livres e aumento da forma oxidada da glutathiona no citoplasma; a glutathiona oxidada, por difusão, sai da célula com mais facilidade, portanto quadros patológicos que produzem grandes quantidades de radicais livres, como a DII, podem esgotar os níveis de glutathiona intracelular (White et al., 1994; Karp e Koch, 2006).

A indução de DII por TNBS diminui significativamente os níveis de glutathiona no cólon (Sánchez de Medina et al., 2004; Karp e Koch, 2006; Chouchana et al., 2012), como também observado em nosso estudo (Figura 7). Contudo substâncias com alto potencial antioxidante podem evitar a depleção de glutathiona (Luchini et al., 2008; Witaicenis et al., 2012). De fato, tratamentos com a 4-ME na dose de 5 mg/Kg mantiveram os níveis de glutathiona total nos animais que receberam TNBS (Figura 7), corroborando com resultados anteriores do laboratório (Witaicenis et al., 2010, 2012).

Há evidências na literatura que a suplementação de GSH melhora a inflamação intestinal induzida por TNBS (Loguercio et al., 2003), portanto, a manutenção dos níveis de GSH após tratamento com a 4-ME pode ser de fundamental importância para sua atividade anti-inflamatória intestinal.

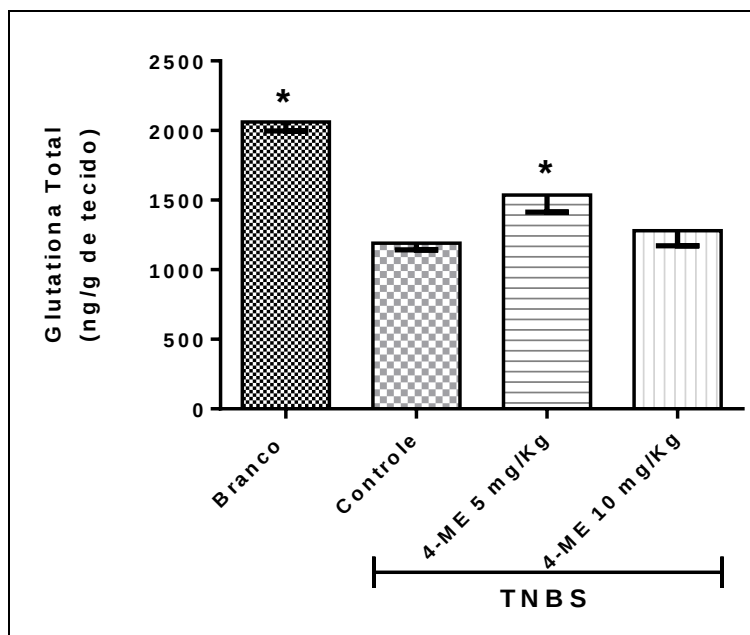


Figura 7: Efeitos da 4-metilesculetina no conteúdo de glutathione total de cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A GSH é utilizada para metabolizar hidroperóxidos, como o H_2O_2 , pela glutathione peroxidase (GPX) que, conjuntamente, com a SOD e CAT neutraliza espécies reativas de oxigênio (ROS). Após a redução das ROS, um dímero de glutathione oxidada (GSSG) é produzido (Townsend et al., 2003). A GSSG pode ser reciclada em GSH pela glutathione redutase (GSR) na presença de NADPH. A expressão e a atividade da GSR estão alteradas em situações onde há formação excessiva de ROS, como no câncer e no envelhecimento (Townsend et al., 2003). A expressão aberrante de GPX está associada a diversas doenças, como hepatite, HIV e câncer de pele, rins, intestino e mama (Townsend et al., 2003).

A GSH também participa na inativação de fármacos e tóxicos através de uma enzima chamada glutathione S-transferase (GST) (White et al., 1994). A GST atua na biotransformação de xenobióticos através da conjugação com a GSH e neutralização dos sítios eletrofílicos, deixando as moléculas mais solúveis em água para facilitar sua excreção (Boylard e Chasseaud, 1969). Portanto, a manutenção da atividade de GST é fundamental para defender as células contra compostos mutagênicos, carcinogênicos e tóxicos.

Em 1978 um estudo *in vitro* descreveu que o TNBS inibiu a GSR em concentrações baixas ($IC_{50\%} = 0,05 \mu M$) (Carlberg e Mannervik, 1979). De fato, o quadro inflamatório diminuiu a atividade enzimática de GSR e GST, além de, aumentar a atividade de GPX do grupo controle (Figura 8); corroborando com os dados da literatura (Townsend et al., 2003). Além de evitar o aumento da atividade de GPX, os tratamentos com a 4-ME na dose de 5 mg/Kg preveniram a inibição da atividade das enzimas GSR e GST. Os tratamentos com a 4-ME na dose de 10 mg/Kg preveniram a diminuição da atividade de GSR e evitaram o aumento da atividade de GPX (Figura 8). Tais resultados explicam a manutenção dos níveis de glutathione nos cólons de animais tratados com a 4-ME e submetidos ao processo inflamatório (Figura 7).

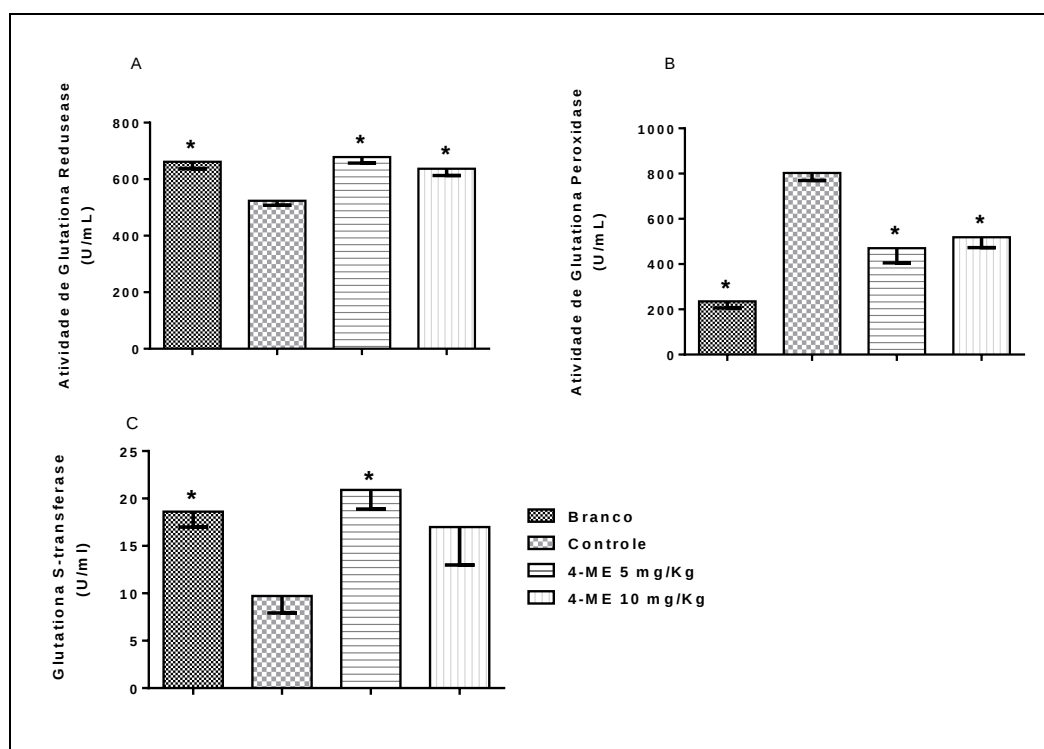


Figura 8: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de glutathione redutase (A), glutathione peroxidase (B) e glutathione S-transferase de cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A complexa resposta imune observada na DII e em seus modelos experimentais é mediada principalmente pelo aumento da expressão de lipo-oxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX) que geram tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, que induzem a quimiotaxia de polimorfonucleados, macrófagos e linfócitos, os quais desencadeiam uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (eicosanoides, fator de agregação plaquetária, TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-23) e pró-oxidantes como as enzimas MPO e a óxido nítrico sintetase tipo II (iNOS) presentes no cólon (Bouma e Strober, 2003).

As isoenzimas da COX, COX-1 e COX-2, são enzimas pró-oxidantes porque possuem atividade do tipo ciclo-oxigenase e de peroxidase. Inúmeros estudos evidenciaram que a expressão de COX-2 está elevada na inflamação intestinal (Khor et al., 2006; Maehata et al., 2011; Arab et al., 2014), contudo inibidores seletivos de COX-

2 podem exacerbar inflamação intestinal experimental (Fiocchi, 1998; Maehata et al., 2011).

Diferentemente dos estudos citados acima que avaliaram a expressão de COX por ELISA ou imunohistoquímica; avaliamos a atividade da COX por reações bioquímicas colorimétricas de seus metabólitos. A administração de TNBS não resultou em alterações da atividade da COX (Figura 9). Também é importante citar que ao realizar os ensaios bioquímicos na presença de um inibidor de COX-2, a atividade enzimática não foi detectável e na presença de um inibidor de COX-1, a atividade enzimática não sofreu alterações das apresentadas na Figura 9. Ou seja, a atividade de COX-2 é predominante nos cólons dos animais neste modelo experimental.

Apesar de relatos de que cumarinas são potentes inibidores da COX e LOX (Hoult et al., 1994; Kaneko et al., 2003b), os tratamentos com a 4-ME não reduziram a atividade da COX e LOX nas condições experimentais deste trabalho (Figura 9 e Figura 10).

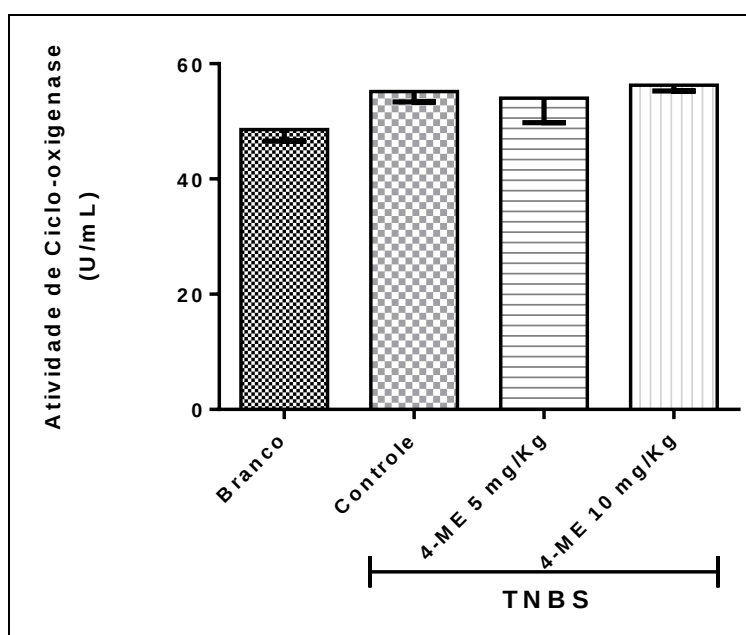


Figura 9: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de ciclo-oxigenase total em cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média

± erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

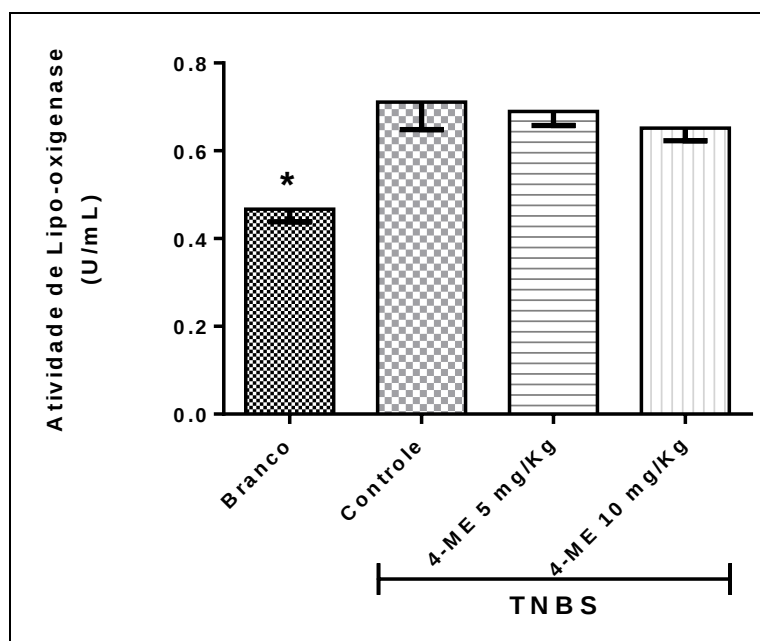


Figura 10: Efeitos da 4-metilesculetina na atividade de lipo-oxigenase de cólons de ratos submetidos ao processo inflamatório intestinal agudo induzido por TNBS. Dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por análise de uma variância (ANOVA) seguida pelo teste de *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett com * para $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.1.2 Análises de biologia molecular

A pesquisa de novos candidatos para o tratamento da DII deve abranger estudos bioquímicos, de biologia molecular, imunológicos e da microbiota (Fiocchi, 2012), tendo em vista avaliar o potencial anti-inflamatório intestinal de um novo candidato para o tratamento da DII e, concomitantemente, gerar novos dados sobre fisiopatologia da doença.

Além dos estudos bioquímicos apresentados neste estudo, a abundância relativa de RNAm colônico de genes chave para a manutenção das defesas antioxidantes e anti-inflamatórias do organismo foi quantificada por RT-PCR em tempo real. Os genes analisados foram a γ -glutamyl transferase 1 (Ggt1), glutathione peroxidase 2 (Gpx2), glutathione reductase (Gsr), glutathione s-transferase μ 1 (Gstm1), π 1 (Gstp1) e θ 1 (Gstt1), mieloperoxidase (Mpo) e fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2).

A administração de TNBS diminuiu, significativamente, a abundância relativa de RNAm de Ggt1 (Figura 11), Gpx2 (Figura 12), Gsr (Figura 13), Gstp1 (Figura 14), Gstt1 (Figura 14) e Nef2l2 (Figura 15), os demais genes não apresentaram alterações entre o grupo branco e o grupo controle (Figura 12 e Figura 14), enquanto que a abundância relativa de RNAm de Mpo não foi detectada nos cólons dos ratos; ou seja, toda a MPO encontrada no cólon não é produzida no intestino, mas provém da migração de células inflamatórias para o local da inflamação. Estes dados reforçam que o estresse oxidativo tem papel fundamental na patogênese da DII.

A γ -glutamil transferase ou γ -glutamil transpeptidase está localizada no lado luminal da membrana das microvilosidades dos colonócitos. Esta enzima degrada GSH e GSSG em aminoácidos γ -glutamil que são transportados para o interior das células, onde são utilizados para a ressíntese de GSH (Sido et al., 1998). Estudos mostram que a atividade da γ -glutamil transferase diminui consideravelmente durante a inflamação da mucosa, explicando parcialmente a depleção de GSH de intestinos inflamados (Sido et al., 1998; Biasi et al., 2013). O tratamento com a 4-ME na dose de 10 mg/Kg preveniu a redução da abundância relativa de RNAm de Ggt1 causada pela inflamação intestinal (Figura 11).

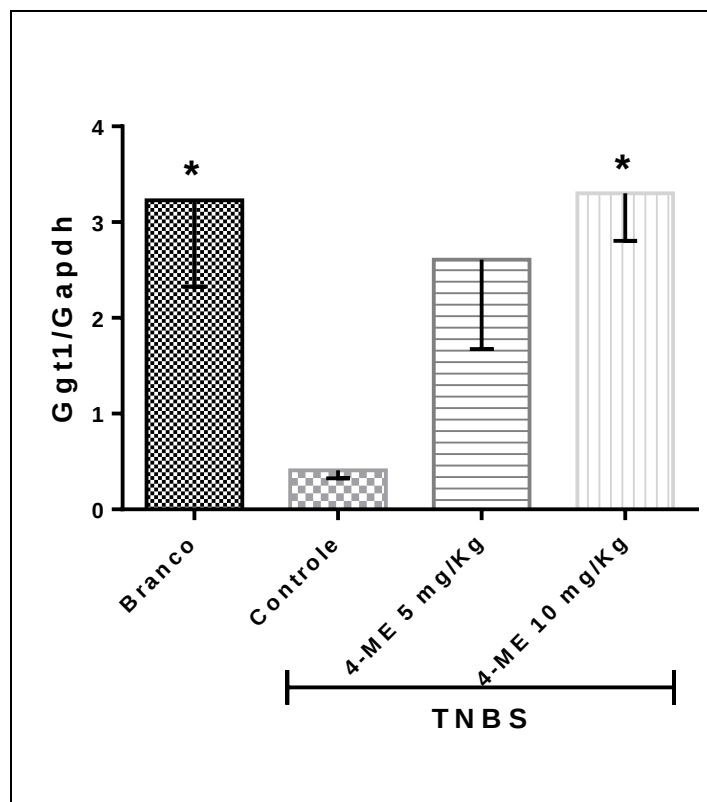


Figura 11: Efeito da administração de TNBS e do tratamento com 4-ME sobre níveis de relativos e RNAm de Ggt1. A abundância relativa de RNAm foi quantificada por reação de cadeia de polimerase em tempo real após transcrição reversa. Dados estão expressos em média $\pm$ e.p.m referente a uma amostra normalizadora pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência. * para $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle TNBS.

As glutathiona peroxidases são expressas ubiquamente no organismo, contudo suas isoformas são distribuídas de maneiras diferentes nos tecidos. A Gpx1 está mais expressa em eritrócitos, rins e fígado, enquanto a Gpx2 é encontrada no epitélio do trato gastrointestinal (Esworthy et al., 2001; Townsend et al., 2003).

A expressão aberrante de glutathiona peroxidases está associada a diversas doenças, como hepatite, HIV e câncer de pele, rins, intestino e mama (Townsend et al., 2003). Contudo, camundongos com *knockout* para os genes Gpx1 e Gpx2 apresentam sintomas e sinais consistentes com os apresentados por pacientes com DII (Esworthy et al., 2001), sugerindo que a GPX é essencial para a prevenção da DII.

A administração de TNBS diminuiu a abundância relativa de RNAm de Gpx2, sem produzir efeitos sobre a abundância de Gpx1. No entanto, os tratamentos com a 4-

ME não preveniram a redução da abundância relativa de Gpx2 causada pelo processo inflamatório (Figura 12).

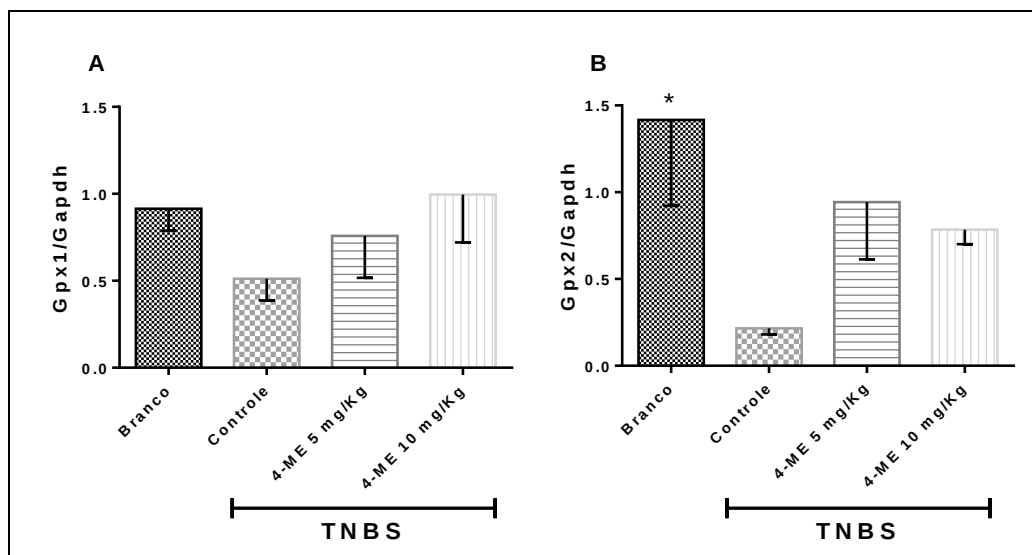


Figura 12: Efeito da administração de TNBS e do tratamento com 4-ME sobre níveis de relativos e RNAm de glutatona peroxidase 1 (A) e glutatona peroxidase 2 (B). A abundância relativa de RNAm foi quantificada por reação de cadeia de polimerase em tempo real após transcrição reversa(RT-PCR em tempo real). Dados estão expressos em média $\pm$ e.p.m referente a uma amostra normalizadora pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência. * para $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle TNBS.

A expressão e a atividade da glutatona redutase estão alteradas em situações onde há formação excessiva de ROS, como no câncer e no envelhecimento (Townsend et al., 2003). Os resultados apresentados na Figura 8 e na Figura 13 mostram que a inflamação intestinal induzida por TNBS também altera a atividade e a expressão de glutatona redutase. Os tratamentos com a 4-ME na dose de 5 mg/Kg preveniram a redução da abundância relativa de Gsr (Figura 13) e também evitaram a inibição da atividade de GSR (Figura 8), resultantes da instilação de TNBS.

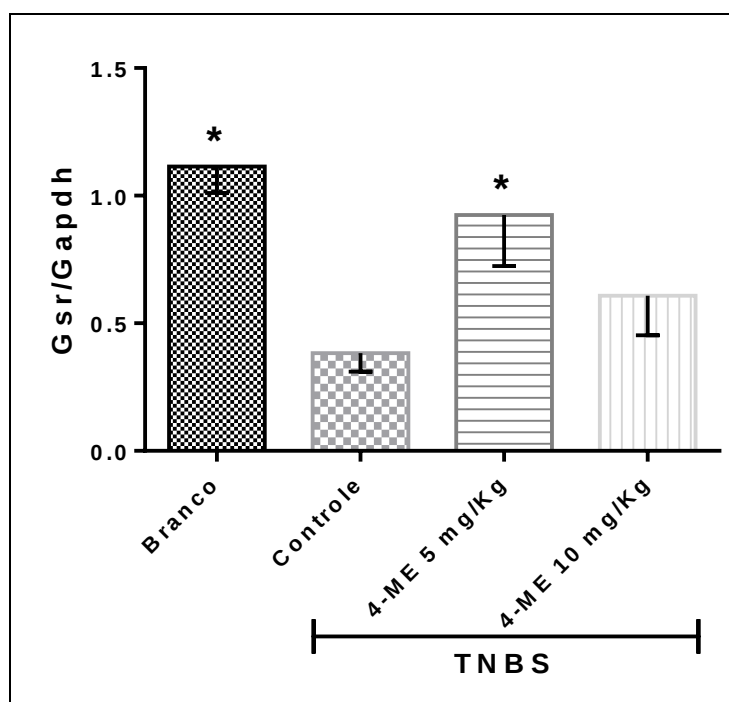


Figura 13: Efeito da administração de TNBS e do tratamento com 4-ME sobre níveis de relativos e RNAm de glutathione redutase. A abundância relativa de RNAm foi quantificada por reação de cadeia de polimerase em tempo real após transcrição reversa(RT-PCR em tempo real). Dados estão expressos em média $\pm$ e.p.m referente a uma amostra normalizadora pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência. * para $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle TNBS.

As GSTs pertencem à família de enzima da fase II da biotransformação, participando do metabolismo endógeno de leucotrienos e prostaglandinas. Além de neutralizar peróxidos lipídicos, as GSTs são responsáveis de catalisar a conjugação de GSH com compostos eletrófilos endógenos e exógenos (Hemshkhar et al., 2013). As GSTs citosólicas podem ser subdivididas em seis classes: alfa ($GST\alpha$), mi ($GST\mu$), ômega ($GST\omega$), pi ($GST\pi$), teta ($GST\theta$) e zeta ($GST\zeta$); que são produzidas, respectivamente, pelos genes *Gsta*, *Gstm*, *Gsto*, *Gstp*, *Gstt* e *Gstz* (Townsend et al., 2003).

Dentre os genes citados anteriormente, a presença de um polimorfismo que gera genótipos nulos de *Gstm1* e *Gstt1* estão associados com o desenvolvimento de DII em humanos; sendo que a ausência da atividade de $GST\mu1$ está correlacionada com o aparecimento de DII severa em jovens (Zhu e Li, 2012). A $GST\pi$, por sua vez, possui

papel fundamental na regulação da apoptose e da proliferação celular através da formação de um complexo com JNK (c-Jun N-terminal kinases) (Circu e Aw, 2012).

Nenhum dos tratamentos com a 4-ME foi capaz de prevenir a redução da abundância relativa de RNAm de *Gstp1* e *Gstt1* causada pela administração de TNBS (Figura 14).

Estudos adicionais são necessários para caracterizar as funções dos diversos genes, alelos e polimorfismos descritos na família da glutathione S-transferase, pois, polimorfismos e alelos diferentes podem estar associados a fenótipos totalmente contraditórios, podendo estar correlacionados com a maior ou menor ocorrência de câncer (Townsend et al., 2003). Estudos de farmacogenética mostram que polimorfismos da glutathione S-transferase podem prever a resposta a fármacos, como a azatioprina e a sulfassalazina (Linares et al., 2009; Stocco et al., 2014)

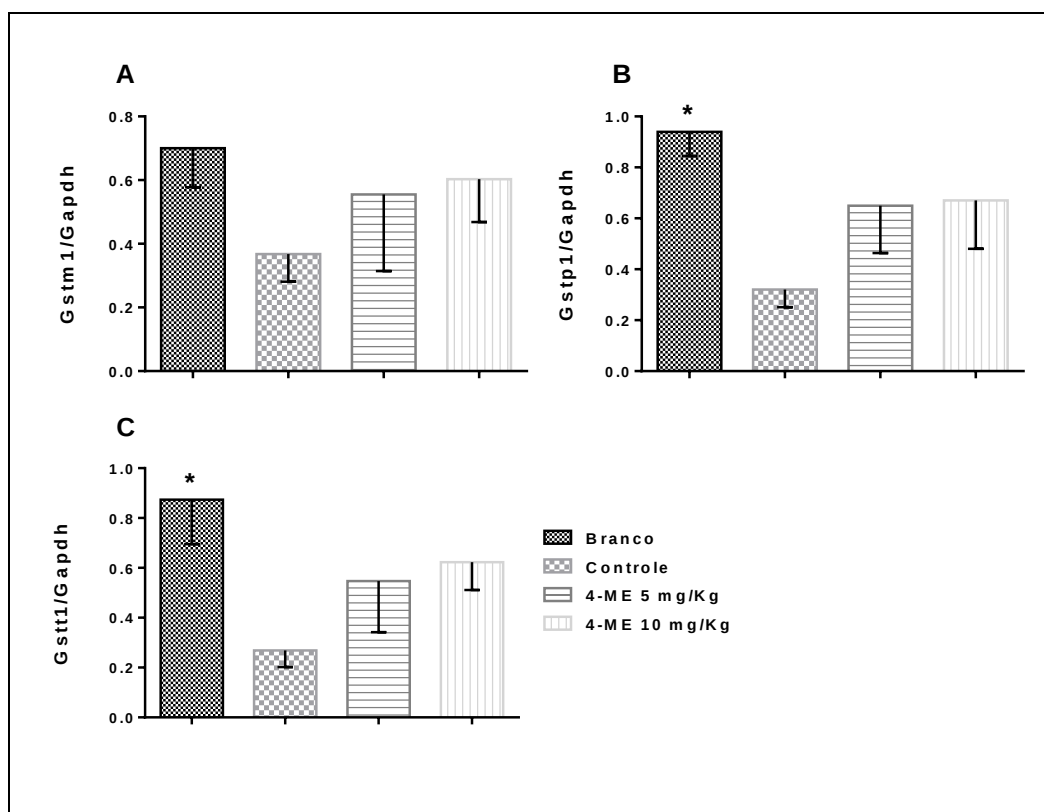


Figura 14: Efeito da administração de TNBS e do tratamento com 4-ME sobre níveis de relativos e RNAm de glutathione S-transferase $\mu 1$ (A), glutathione S-transferase $\pi 1$ (B) e glutathione S-transferase $\theta 1$ (C). A

abundância relativa de RNAm foi quantificada por reação de cadeia de polimerase em tempo real após transcrição reversa(RT-PCR em tempo real). Dados estão expressos em média $\pm$ e.p.m referente a uma amostra normalizadora pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência. * para $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle TNBS.

O último gene analisado foi o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2 ou Nrf2). O Nrf2 é um fator transcricional que possui um papel crucial para a citoproteção contra a inflamação e estresse oxidativo (Khor et al., 2006), pois estimula a ativação de mais de doze genes envolvidos na atividade anti-inflamatória, desintoxicante e antioxidante do organismo, entre eles podemos citar o elemento de resposta antioxidante e enzimas relacionadas com a síntese, conjugação e o ciclo da glutathiona (Moura et al., 2015).

Assim como os animais com deficiência nos genes Gpx1 e Gpx2 apresentam inflamação intestinal (Esworthy et al., 2001), animais *knockout* Nrf2^{-/-} são mais susceptíveis à inflamação intestinal causada por sulfato de dextrano sódico (DSS) (Khor et al., 2006). O Nrf2 possui atividade anti-inflamatória pela atenuação da fosforilação da proteína inibitória κB (I κ B), que mantém o fator nuclear κB (NF- κB) inativo (Moura et al., 2015).

Os resultados mostram que no grupo controle houve grande diminuição da abundância relativa de Nrf2 (Figura 15), o que explica o aumento de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes acompanhados pela diminuição de mediadores anti-inflamatórios e antioxidantes neste modelo experimental (Witaicenis et al., 2010, 2012, 2014). A prevenção da redução da abundância relativa de Nrf2 observada no grupo tratado com a dose de 5 mg/Kg de 4-ME pode explicar os melhores efeitos observados nos animais tratados com 5 mg/Kg de 4-ME quando comparados com os animais tratados com a dose de 10 mg/Kg.

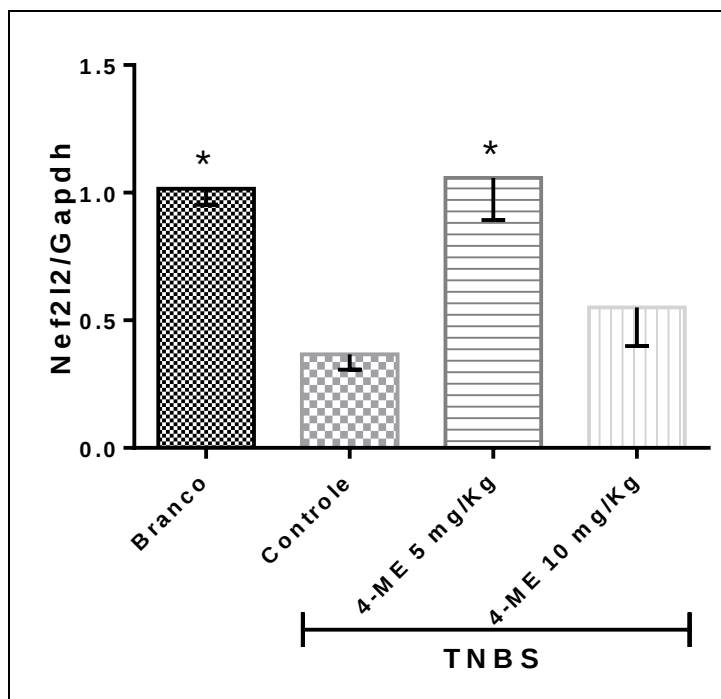


Figura 15: Efeito da administração de TNBS e do tratamento com 4-ME sobre níveis de relativos e RNAm de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2. A abundância relativa de RNAm foi quantificada por reação de cadeia de polimerase em tempo real após transcrição reversa(RT-PCR em tempo real). Dados estão expressos em média $\pm$ e.p.m referente a uma amostra normalizadora pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção pela eficiência. * para $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle TNBS.

Em resumo, os tratamentos com a 4-ME preveniram a depleção dos níveis de glutathiona total, diminuíram a atividade de MPO e GPX e preveniram a diminuição da atividade de GSR e GST. Além disso, os tratamentos com a 4-ME preveniram a redução da abundância relativa de RNAm de Ggt1, Gsr e Nrf2 causada pela inflamação intestinal.

4.2 Investigação da interação proteína/ligante por espectroscopia de fluorescência

O sucesso do desenvolvimento de novas terapias para a DII depende de diversas áreas do conhecimento (Fiocchi, 2012; Yau et al., 2013) e está claro que o controle do estresse oxidativo é fundamental para o sucesso destas terapias (Biasi et al., 2011; Zhu e Li, 2012). Com a tentativa de promover estudos interdisciplinares, nosso grupo se

integrou com pesquisadores do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP – São José do Rio Preto para aprofundar a investigação de mecanismos de ação molecular deste e de outros compostos, com o objetivo de identificar a interação entre a 4-ME com alvos moleculares relacionados ao estresse oxidativo, assim como encontrar a constante de ligação e o número de sítios de ligação da cumarina com diversos mediadores anti-inflamatórios sensíveis a redoxidação, tais como a GSR, GPX e IκB através de técnicas espectroscópicas, o que permitiu obter importantes dados para a descrição do mecanismo de ação antioxidante envolvido na resposta anti-inflamatória intestinal da 4-ME.

4.2.1 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por espectroscopia de fluorescência

Os resultados obtidos no experimento de supressão de fluorescência, a intensidade de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano de GSR (Figura 16a), GPX (Figura 17a) e IκB (Figura 18a) diminuíram com a titulação de 4-ME, indicando que este derivado cumarínico interage nas proximidades dos resíduos de triptofano da proteína. A supressão de fluorescência observada na titulação de 4-ME em soluções de GSR, GPX e IκB pode ser devido a reações com o estado excitado das moléculas, rearranjo molecular, transferência de energia, formação de um complexo no estado fundamental ou supressão por contato ou colisões. Tais mecanismos podem ser classificados em dinâmicos ou estáticos, dependendo de sua dependência com a temperatura ou com o tempo de vida do fluoróforo (Lakowicz, 1999).

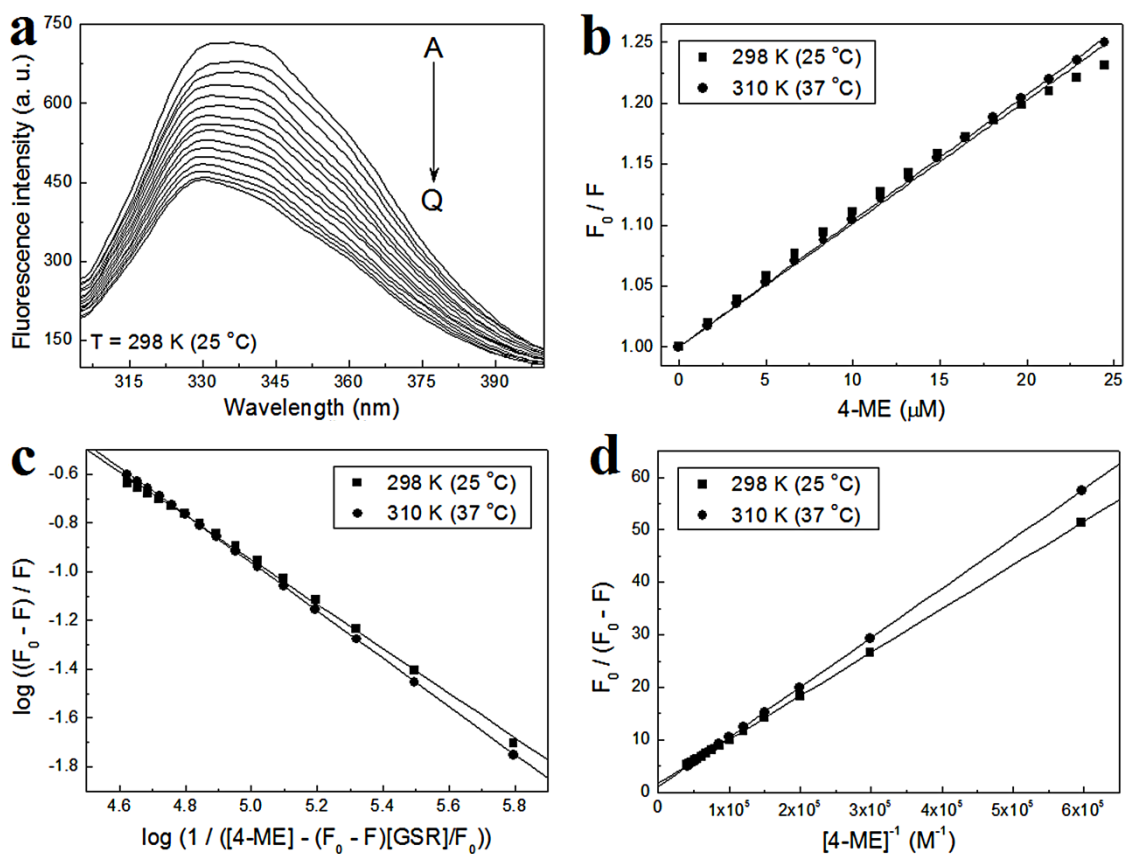


Figura 16: (a) Espectro de emissão da glutathione redutase (GSR) obtido na ausência de 4-metilesculetina (4-ME) e com incrementos de 4-ME ($\text{pH} = 7,0$, $T = 290 \text{ K}$, $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $[\text{GSR}] = 2 \mu\text{M}$, $0 - 25 \mu\text{M}$ com incrementos de $0,8$). (b) Gráfico de Stern-Volmer das titulações de 4-ME na solução de GSR em duas temperaturas diferentes (298 e 310 K) monitoradas pela supressão de fluorescência de resíduos de triptofanos. (c) Gráfico da análise de duplo-log da supressão de fluorescência de GSR por 4-ME em $\text{pH} = 7,0$ e 298 e 310 K. (d) Gráfico da equação de Stern-Volmer modificada da supressão de fluorescência de GSR por 4-ME em $\text{pH} = 7,0$ e 298 e 310 K.

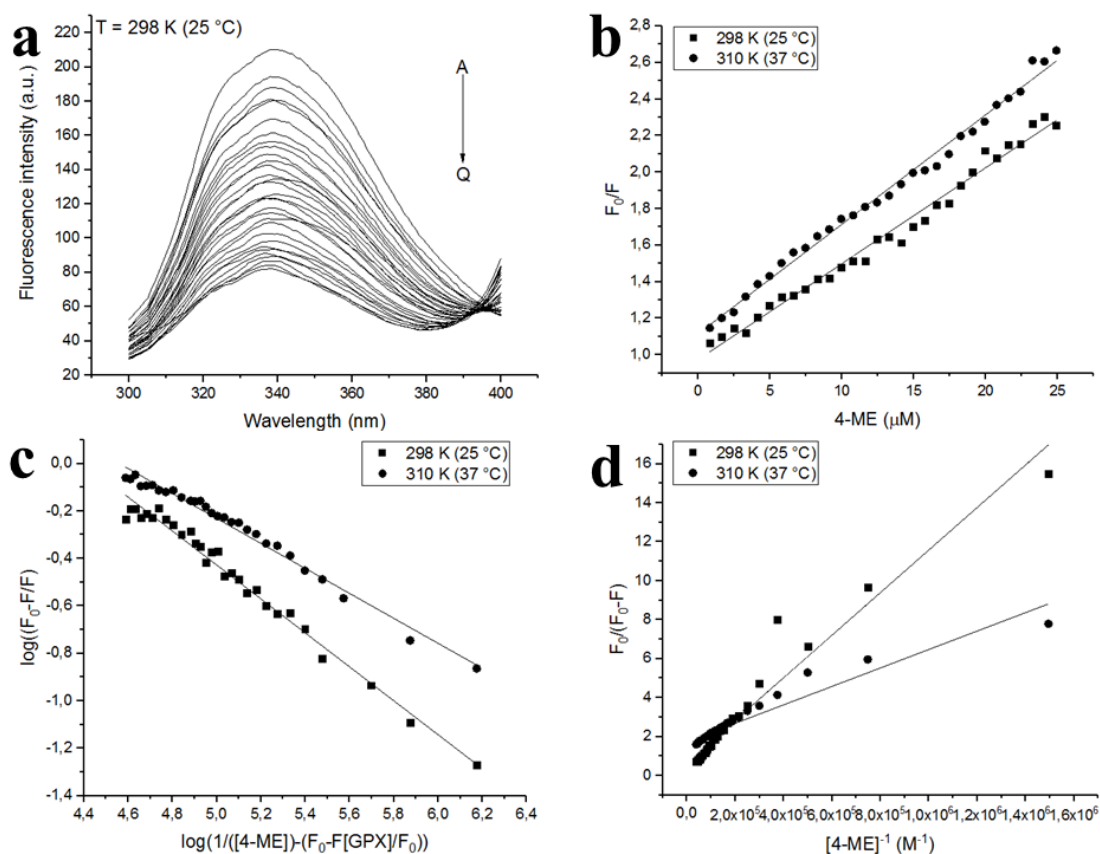


Figura 17: (a) Espectro de emissão da glutathione peroxidase (GPX) obtido na ausência de 4-metilesculetina (4-ME) e com incrementos de 4-ME (pH = 7,0, T = 290 K, $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$. [GPX] = 1,98 μM , 0 – 25 μM com incrementos de 0,8. (b) Gráfico de Stern-Volmer das titulações de 4-ME na solução de GPX em duas temperaturas diferentes (298 e 310 K) monitoradas pela supressão de fluorescência de resíduos de triptofanos. (c) Gráfico da análise de duplo-log da supressão de fluorescência de GSR por 4-ME em pH = 7,0 e 298 e 310 K. (d) Gráfico da equação de Stern-Volmer modificada da supressão de fluorescência de GPX por 4-ME em pH = 7,0 e 298 e 310 K.

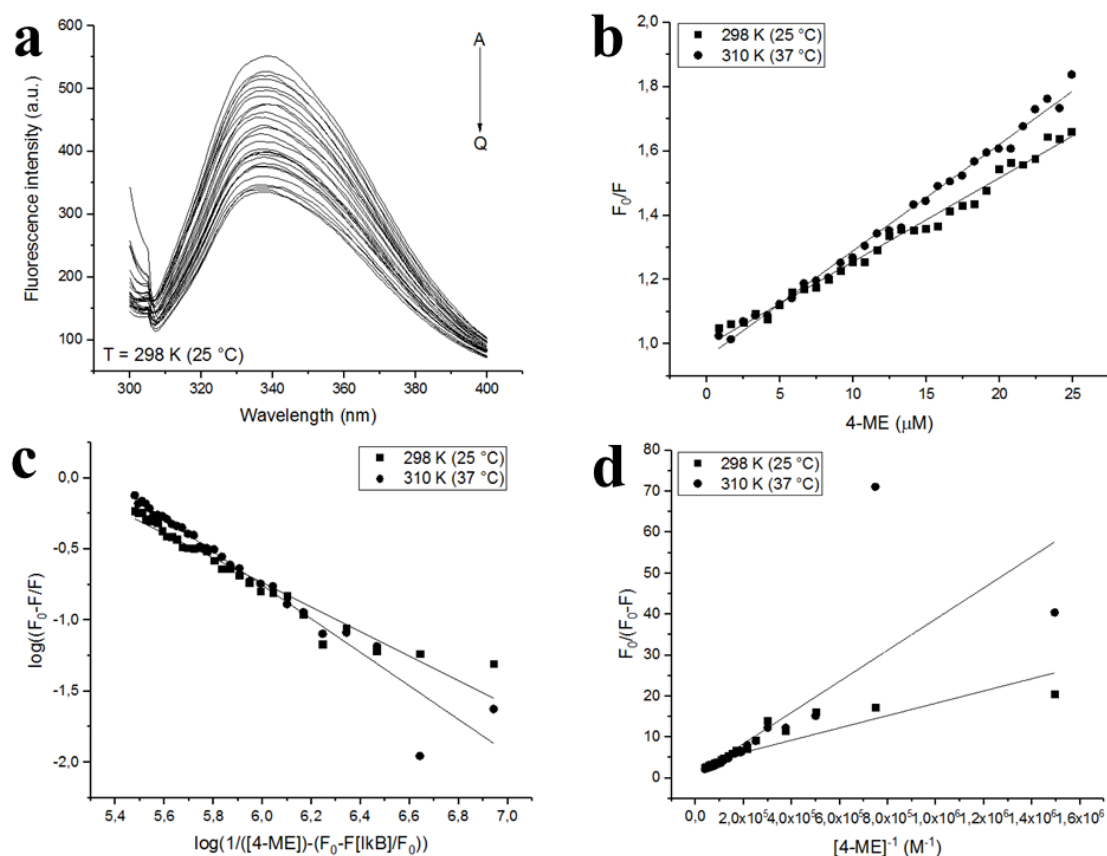


Figura 18: (a) Espectro de emissão da proteína inibitória κB (IkB) obtido na ausência de 4-metilesculetina (4-ME) e com incrementos de 4-ME (pH = 7,0, T = 290 K, λ_{ex} = 290 nm, [IkB] = 5,4 μM , 0 – 25 μM com incrementos de 0,8. (b) Gráfico de Stern-Volmer das titulações de 4-ME na solução de IkB em duas temperaturas diferentes (298 e 310 K) monitoradas pela supressão de fluorescência de resíduos de triptofanos. (c) Gráfico da análise de duplo-log da supressão de fluorescência de IkB por 4-ME em pH = 7,0 e 298 e 310 K. (d) Gráfico da equação de Stern-Volmer modificada da supressão de fluorescência de IkB por 4-ME em pH = 7,0 e 298 e 310 K.

A equação de Stern-Volmer (Eq. 1) foi utilizada para analisar o processo de supressão de fluorescência a 298 e 310 K (Figura 16b, Figura 17b, Figura 18b). Os resultados demonstrados na Tabela 2 indicam que as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) são praticamente independentes do aumento da temperatura para a interação da 4-ME com a GSR e a IkB; portanto, a avaliação das constantes de supressão bimolecular (K_q) e o espectro de absorção do fluoróforo foram realizados para elucidar o processo de supressão de fluorescência envolvidos na interação da 4-ME com a GSR e IkB. Por outro lado, a K_{SV} da interação entre a 4-ME e a GPX foi diretamente proporcional ao aumento de temperatura (Tabela 2), indicando um mecanismo dinâmico para o processo de supressão de fluorescência (Lakowicz, 1999).

Tabela 2: Constante de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de ligação (K_b), constante bimolecular (K_q) e número de sítios de ligação (n) da interação entre 4-metilesculetina e GSR, GPX ou IkB em pH = 7,0 e 298 e 310 K.

	[Ligante] ($\times 10^{-6} \text{M}^{-1}$)	T (K)	n	K_{SV} ($\times 10^4 \text{M}^{-1}$)	K_b ($\times 10 \text{M}^4 \text{s}^{-1}$)	K_q ($\times 10^{12} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
GSR	2,0	298	0,91	3,37	0,99	3,37
		310	0,98	3,47	1,06	3,47
GPX	1,98	298	0,69	3,52	2,73	3,52
		310	0,43	6,20	3,50	6,20
IkB	5,4	298	1,02	1,74	1,88	1,74
		310	1,15	2,23	2,63	1,15

Os valores de K_q das interações entre a 4-ME e a GSR, GPX e IkB são maiores que $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, que representam a taxa de colisão máxima por difusão de vários supressores com biopolímeros (Lakowicz, 1999). Adicionalmente, o espectro de absorção da GSR foi alterado na presença de 4-ME (Figura 19). Desta forma, o mecanismo de supressão dos complexos GSR/4-ME e IkB/4-ME deve ser por um processo predominantemente estático, ou seja, há formação de complexos no estado fundamental não fluorescentes entre supressor e fluoróforo.

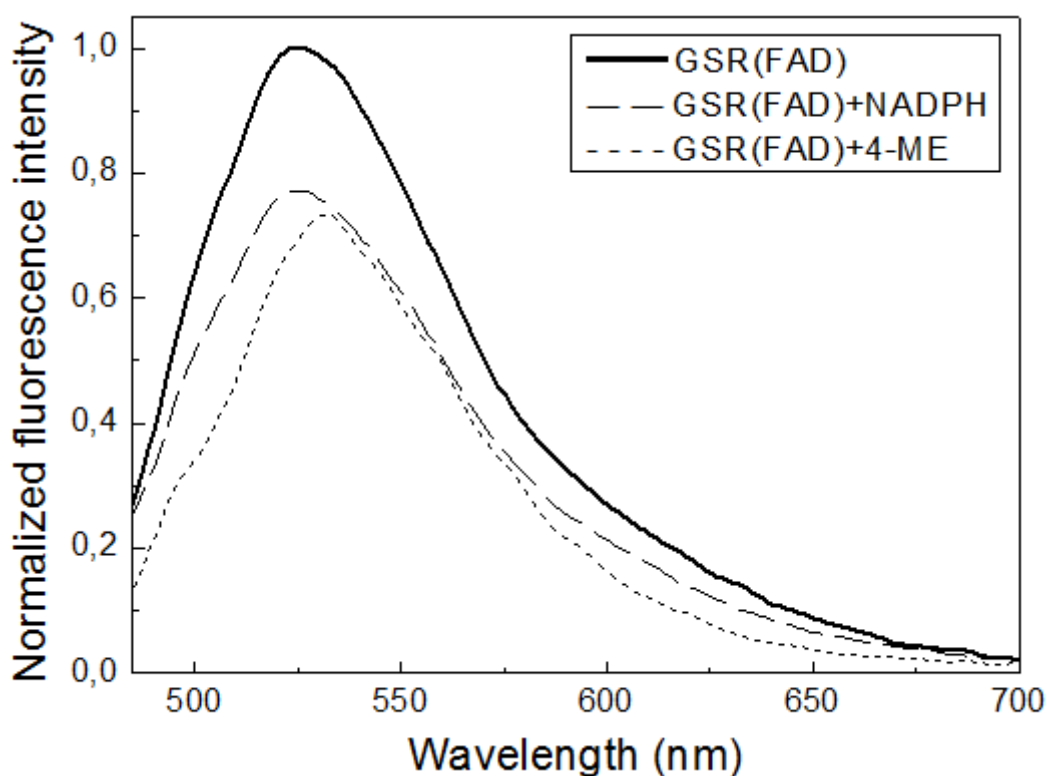


Figura 19: Espectro de fluorescência do cofator FAD da glutatona redutase (GSR) na ausência e na presença de 4-metilesculetina (4-ME) e NADPH (controle positivo).

Para o mecanismo de supressão estática e dinâmica, a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) podem ser calculados pela Eq. 2 (Tabela 2), mostrando uma dependência linear na análise pelo método de duplo-log (Figura 16c, Figura 17c e Figura 18c).

Os valores de K_b apresentam mudanças com o incremento da temperatura, corroborando com os valores de K_{SV} (Tabela 2). O número de sítio de ligações entre a 4-ME e a GSR é aproximadamente 1, indicando a interação de uma molécula de 4-ME para cada monômero de GSR. Para a interação entre 4-ME e GPX, o n é de aproximadamente 0,7 a 25 °C e 0,5 a 37 °C, enquanto que o complexo IkB/4-ME possui aproximadamente n de 0,66 a 25 °C e de 0,97 a 37 °C.

Os parâmetros termodinâmicos para as interações GSR/4-ME, GPX/4-ME e IkB/4-ME estão na Tabela 3. Valores $\Delta G < 0$ indicam que o processo de interação é espontâneo, enquanto $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ sugerem que a reação de ligação é exotérmica e entalpicamente impulsionada. Além disso, as pontes de hidrogênio e as forças de van der Waals podem exercer um papel fundamental na formação e na estabilização dos complexos GSR/4-ME (Ross e Subramanian, 1981). Por outro lado, a interação GPX/4-ME e IkB/4-ME possui $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, indicando que as interações hidrofóbicas possuem papel fundamental nas interações GPX/4-ME e IkB/4-ME (Ross e Subramanian, 1981).

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos dos complexos GSR-4-ME, GPX-4-ME e IkB-4-ME em pH = 7,0 a 298 e 310 K.

	[GSR] ($\times 10^{-6} \text{M}^{-1}$)	T (K)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)
GSR	2,0	298	-39,1	-24,6	-48,7
		310	-39,1	-24,1	-48,4
GPX	1,98	298	13,89	-25,2	39,1
		310	13,89	-23,9	40,8
IkB	5,4	298	21,34	-30,0	51,5
		310	21,34	-32,0	53,6

Adicionalmente, a fluorescência da flavina do FAD, que é um cofator firmemente ligado à GSR, foi utilizada como sonda para investigar a localização do sítio de ligação da 4-ME na GSR. Este experimento foi necessário, pois a GSR adquirida da empresa Sigma Aldrich continha um FAD por GSR. Na presença de 4-ME, a intensidade de emissão do FAD foi suprimida com magnitude similar à exercida pelo NADPH, que foi utilizado como controle positivo (Figura 20).

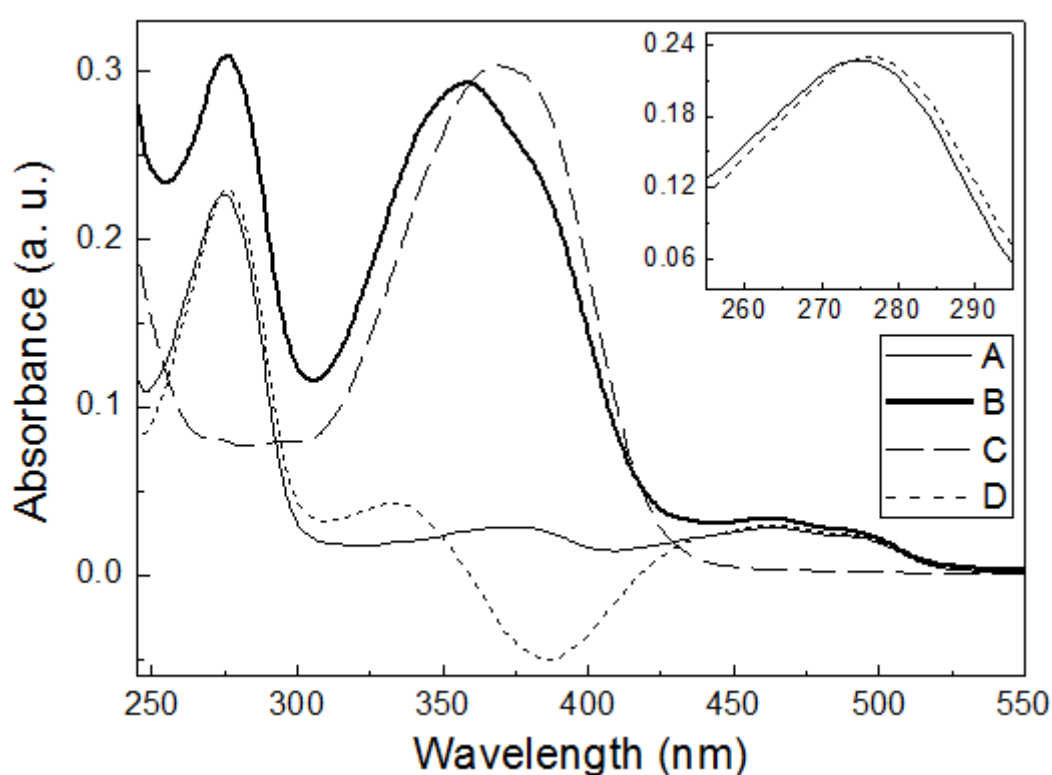


Figura 20: Espectros de absorção de GSR (A), GSR(FAD) (B), GSR(FAD) + NADPH (C) e GSR(FAD)+4-ME.

O NADPH interage num local próximo ao do cofator FAD em glutathione redutase de *Escherichia coli* (ID PDB: 1GET), que apresenta estrutura similar com a GSR de mamíferos, RMSD de 0,706 Å para a cadeia A do dímero (Figura 21).

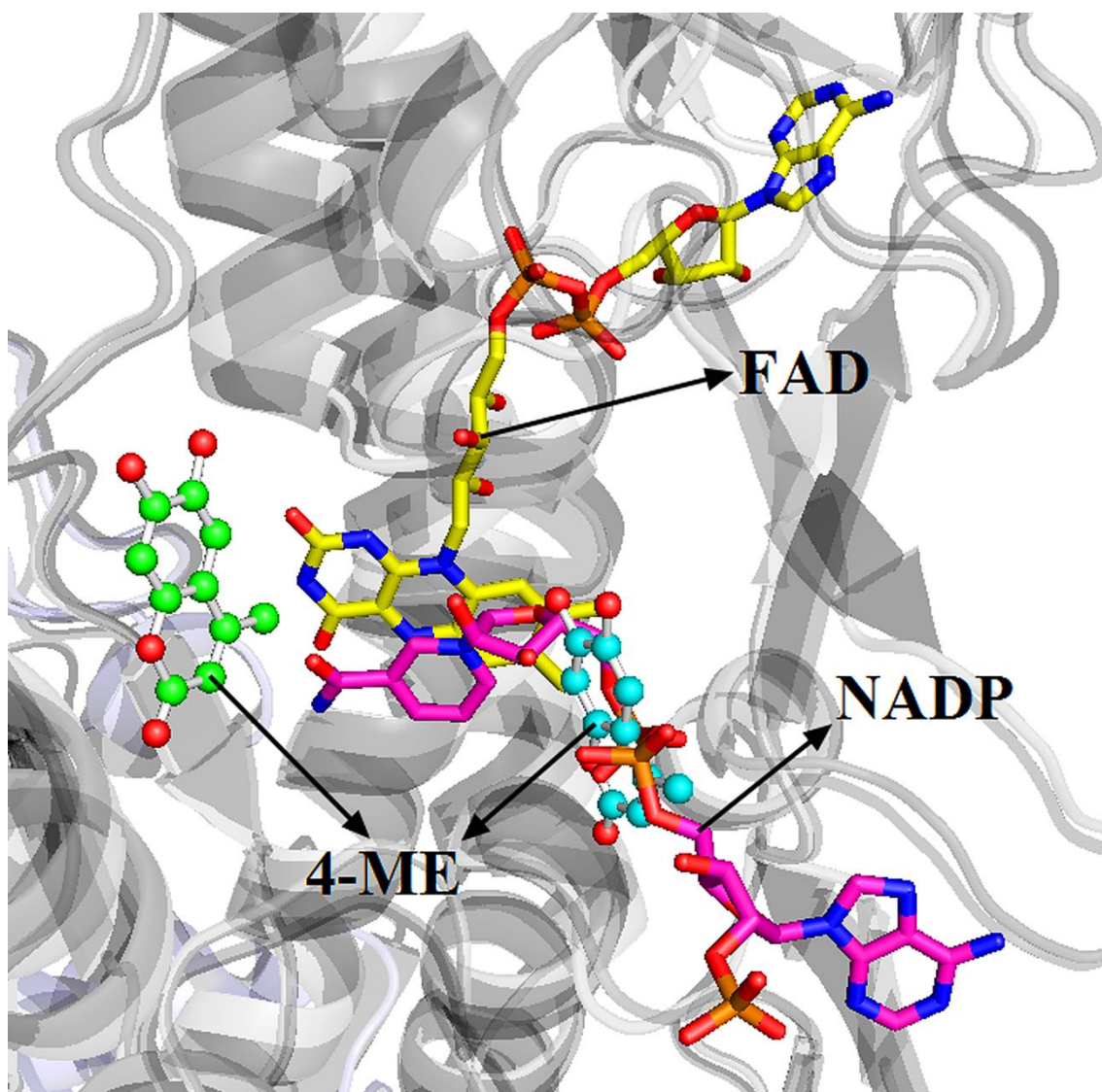


Figura 21: Detalhes dos sítios de ligação do FAD, NADPH e 4-ME na cadeia A do dímero de GSR, RMSD de 0,706 Å.

4.2.2 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por ressonância magnética nuclear

Os fenômenos físico-químicos resultantes das interações intermoleculares são a chave para o entendimento dos processos biológicos (Mayer e James, 2004). Neste contexto, a ressonância magnética nuclear (RMN) se tornou uma técnica crucial para os estudos de interações entre proteína-ligante. Os epítomos ou a superfície de contato macromolécula-ligante podem ser mapeados por diversos experimentos, entre eles o *Saturation Transfer Difference* (STD-RMN) (Figueiredo e Marsaioli, 2007).

Os estudos de STD-RMN foram realizados para determinar os valores de STD- $AF_{\max}$ e k_{sat} , que estão na Tabela 4 e também para calcular o valor de $K_d = 235 \mu\text{M}$ entre a 4-ME e a GSR. A espectroscopia por RMN permite mapear quais epítomos da 4-ME estão mais próximos da enzima. A porcentagem dos epítomos mais próximos da GSR estão listados na Figura 22; tais valores representam que o carbono C-3, o grupo metila do carbono C-4, os carbonos C-5 e C-8 estão mais próximos à GSR.

Tabela 4: Cálculos do efeito STD-RMN em diferentes tempos de saturação da proteína.

[L] (μM)	STD- $AF_{\max}$	k_{sat} (s^{-1})	STD- AF_0
100	3,0547	0,6021	1,8391
221	5,7907	0,9530	5,5187
353	10,9533	0,5572	6,1036
456	13,2016	0,7027	9,2771
511	15,5704	0,7231	11,2595
572	19,9574	0,5609	11,1932
614	20,1288	0,6794	13,6754

Os resultados apresentados na Figura 22 reforçam a importância do grupo metila do carbono C-4, já que este é o segundo epítomo mais próximo da GSR. Como descrito anteriormente, a atividade antioxidante da 4-ME é correlacionada com a presença do grupo metila e de duas *o*-hidroxilações (Payá et al., 1992; Witaicenis et al., 2010), porém é a primeira vez que podemos afirmar que o grupo metila participa diretamente na interação intermolecular da GSR/4-ME.

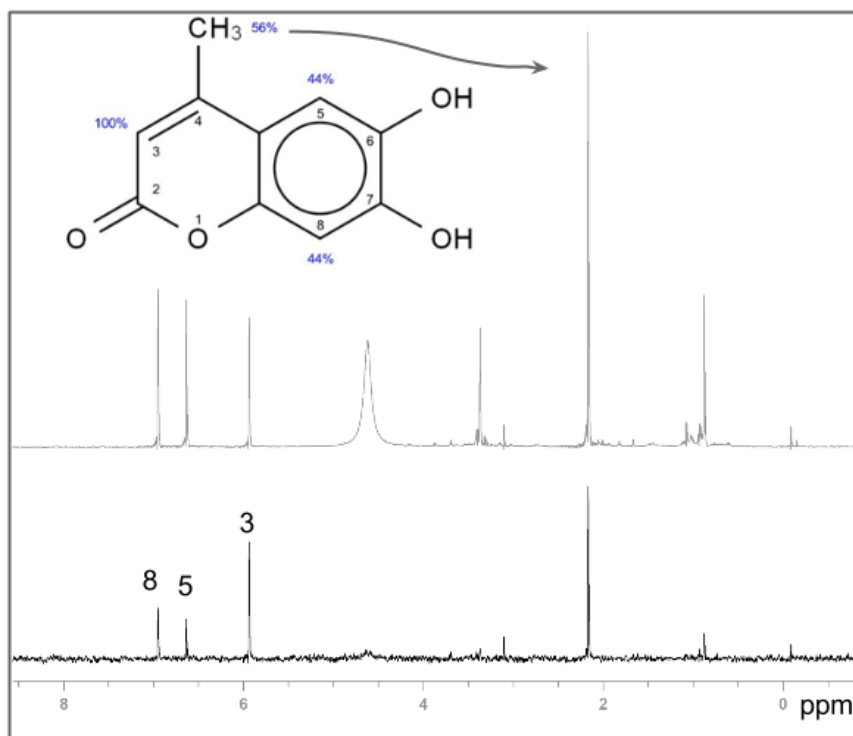


Figura 22: Espectros de RMN da interação entre a glutathione redutase e a 4-metilesculetina. O espectro superior é o espectro de referência (*off-resonance*) e o espectro inferior é a diferença entre os espectros *off-resonance* e *on-resonance*.

4.2.3 Investigação da formação do complexo proteína/ligante por *docking* computacional

Os cálculos do *docking* computacional foram feitos com base nos resultados experimentais de fluorescência e de RMN para o levantamento de sete *clusters* (Figura 23). Entre estes, os primeiros dois são predominantes que possuem o mesmo tamanho de população. A Figura 24 mostra os resultados do *docking* com a conformação de menor energia de ligação dos dois primeiros *clusters* maiores. A energia de ligação entre a GSR e a 4-ME do primeiro e do segundo cluster obtidas através do *docking* foram de -17,77 kJ/mol e -17,68 kJ/mol, respectivamente.

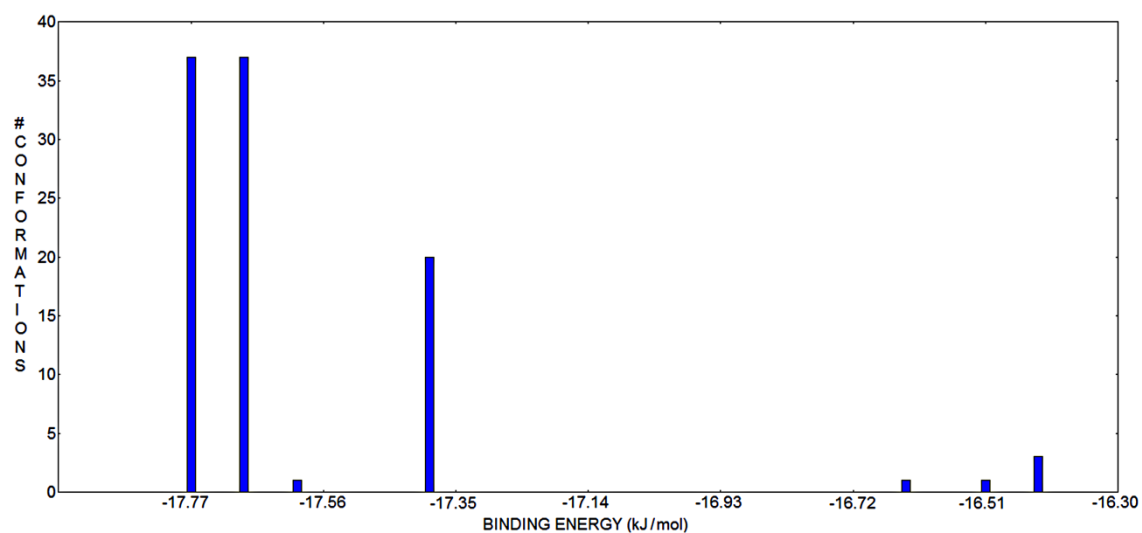


Figura 23: Levantamentos dos *clusters* por cálculos de *docking* computacional com base nos resultados experimentais de fluorescência e RMN.

A Figura 24a e a Figura 24b mostram duas representações diferentes da 4-ME na cavidade próxima ao sítio de ligação do cofator FAD. Tais posições nos bolsões de ligação são similares aos do NADP, corroborando com os resultados de espectroscopia de fluorescência.

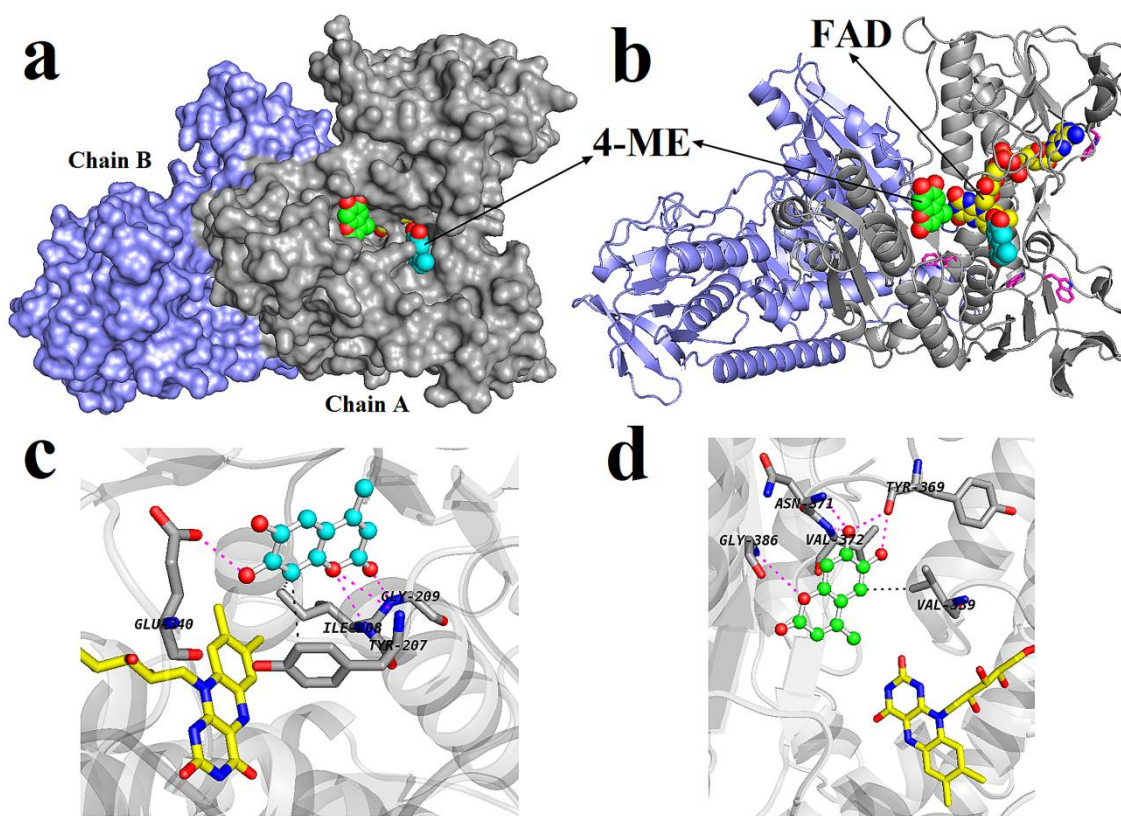


Figura 24: Localização e detalhes dos sítios de ligação da 4-ME, FAD e NADPH na GSR obtidas por *docking* computacional com conformação de menor energia de ligação dos dois primeiros *clusters*.

A Figura 24a e a Figura 24b mostram com maiores detalhes as interações envolvidas no microambiente do sítio de ligação da 4-ME na GSR para o primeiro e o segundo *cluster* determinado pelo servidor PLIP, respectivamente. Para o primeiro *cluster* (Figura 24c), quatro pontes de hidrogênio e dois contatos hidrofóbicos são formados entre a 4-ME e os resíduos Tyr207, Ile208, Gly209 e Glu340 da GSR. Há três pontes de hidrogênio formadas com a cadeia principal dos resíduos Try207, Ile208 e Gly209, enquanto uma ponte de hidrogênio é formada com a cadeia lateral de Tyr207 e Ile208. Para o segundo *cluster* (Figura 24d), há cinco pontes de hidrogênio formadas entre a cumarina e os resíduos de Try369, Asn371, Val372 e Gly386 da proteína, enquanto um contato de hidrogênio é formado com a cadeia lateral de Val339.

Os sítios de ligação do primeiro e do segundo *cluster* possuem características similares constituídos por resíduos apolares, polares neutros e polares na cadeia lateral.

No entanto, as orientações das conformações dos dois *clusters* são diferentes, a 4-ME do primeiro *cluster* possui o carbono C-3 e o grupo metila do carbono C-4 expostos para o solvente, enquanto no segundo *cluster* os mesmos átomos estão envolvidos pela GSR, corroborando com os resultados de STD-RMN.

Desta forma, o segundo *cluster* representa a conformação mais provável para a ligação entre a 4-ME e a GSR, pois está de acordo com os dados obtidos experimentalmente. Adicionalmente, os cálculos de *docking* para a conformação do segundo *cluster* mostra que as pontes de hidrogênio são importantes para a estabilidade do complexo GSR/4-ME, seguido por interações hidrofóbicas, corroborando com as análises termodinâmicas.

Estudos da interação da 4-ME e GPX utilizando técnicas de RMN e *docking* estão em andamento. A verificação dos epítomos de interação entre a IκB e a 4-ME não é possível por RMN, pois a proteína adquirida da Sigma Aldrich contém tampão Tris-HCl em sua solução e a presença deste tampão influenciaria nos espectros de ressonância, portanto apenas estudos computacionais do complexo IκB/4-ME serão realizados.

Os dados experimentais *in vitro* e computacionais da interação da 4-ME com a GSR, GPX e IκB corroboram com os resultados experimentais *in vivo*. A ligação entre a 4-ME e a GSR ocorre perto do sítio de interação do NADPH com a GSR; portanto, podemos sugerir que a 4-ME atua como doador de elétrons para a reciclagem de GSSG em GSH.

Os experimentos fluorimétricos da titulação de 4-ME na solução de GPX mostram que há interação entre as duas moléculas do tipo colisional, hidrofóbica e exotérmica; outros resultados apresentados neste trabalho também mostram que a

administração de 4-ME nas doses de 5 e 10 mg/Kg diminuíram a atividade de GPX causada pelo quadro inflamatório induzido por TNBS (Figura 8). Como a literatura relata que a 4-ME e outros compostos fenólicos são conhecidos por inibirem a atividade de peroxidases e hidropoxidases (Kaneko et al., 2003a; Witaicenis et al., 2010, 2012; Vezza et al., 2016); os resultados de interação indicam que a interação entre a 4-ME e a GPX iniba a atividade enzimática da GPX.

Por fim, os tratamentos com a 4-ME na dose de 5 mg/Kg foram capazes de manter a abundância relativa de RNAm de Nrf2 (Figura 15), contribuindo para diminuir a degradação da I κ B (Moura et al., 2015). Contudo a I κ B é uma proteína extremamente sensível a óxido-redução, sendo assim, a interação entre a 4-ME e a I κ B pode resultar em fosforilação desta proteína e consequente aumento de níveis de NF- κ B, corroborando com dados não publicados do laboratório que mostraram que os tratamentos com a 4-ME não modificam a expressão gênica de dois membros da família do NF- κ B, RelA (p65) e NF- κ B1 (p50) (FAPESP proc. 07/54516-7, proc. 11/50512-2 e proc. 11/50824-4), quando comparados com o grupo controle.

A fosforilação de I κ B após a interação com a 4-ME também justifica, parcialmente, os níveis de TNF- α de animais tratados com 4-ME serem, estatisticamente, semelhantes aos níveis de TNF- α dos animais do grupo controle TNBS (Witaicenis et al., 2012). Contudo, estudos adicionais são necessários para explicar como a administração de 4-ME diminui mediadores pró-inflamatórios que são estimulados pelo TNF- α e também o aumento de mediadores anti-inflamatórios que são inibidos pelo TNF- α .

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi verificado que a atividade antioxidante da 4-ME está envolvida com a prevenção da depleção dos níveis de glutathiona total e diminuição da atividade de MPO promovidas pela administração de TNBS. A 4-ME também foi capaz de diminuir a atividade de GPX e prevenir a redução da atividade de GSR e GST. Além disso, os tratamentos com a 4-ME preveniram a redução da abundância relativa de RNAm de Ggt1, Gsr e Nrf2 causada pela inflamação intestinal. Os efeitos da 4-ME sobre a atividade enzimática e expressão gênica estão relacionados com a interação direta entre a 4-ME e GSR, GPX e IκB. Uma vez que a 4-ME interage com a GSR e IκB por um mecanismo estático, enquanto a interação entre a 4-ME e GPX ocorre por um processo colisional. As forças de van der Waals e as pontes de hidrogênio possuem papel fundamental na formação e na estabilização do complexo GSR/4-ME, por outro lado interações hidrofóbicas determinam as interações da 4-ME com a GPX e a IκB. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o grupo metila do carbono C-4 é um epítopo importante na interação GSR/4-ME.

Portanto, nossos dados mostram claramente que a 4-ME não é um simples sequestrador de radicais livres, mas um composto natural com mecanismos de ação específicos que envolvem a modulação da atividade enzimática e da expressão de genes chave da defesa antioxidante.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson M. Glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985;113:548–555.
- Angulo J, Enríquez-Navas PM, Nieto PM. Ligand-Receptor Binding Affinities from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: The Binding Isotherm of STD Initial Growth Rates. *Chem - A Eur J.* WILEY-VCH Verlag; 2010;16:7803–7812.
- Arab HH, Al-Shorbagy MY, Abdallah DM, Nassar NN. Telmisartan attenuates colon inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of experimental inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2014;9:e97193.
- Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol.* 1995;268:G622–G630.
- Bernstein CN. Treatment of IBD: Where We Are and Where We Are Going. *Am J Gastroenterol.* 2015;110:114–126.
- Biasi F, Astegiano M, Maina M, Leonarduzzi G, Poli G. Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. *Curr Med Chem.* 2011;18:4851–65.
- Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, Poli G. Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal.* 2013;0.
- Bos a, Wever R, Roos D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1978;525:37–44.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:521–33.
- Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1969;32:173–219.
- Carlberg I, Mannervik B. Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol. *FEBS Lett.* 1979;98:263–6.
- Caruso ÍP, Vilegas W, De Souza FP, Fossey MA, Cornélio ML. Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. *J Pharm Biomed Anal.* Elsevier B.V.; 2014;98:100–106.
- Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35:15–36.
- Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:1767–77.
- Dalal SR, Cohen RD. What to Do When Biologic Agents Are Not Working in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2015;11.

- Danese S, Fiocchi C, Panés J. Drug development in IBD: from novel target identification to early clinical trials. *Gut*. 2016;65:1233–1240.
- Di Stasi LC, Camuesco D, Nieto A, Vilegas W, Zarzuelo A, Galvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med*. 2004;70:315–20.
- Di Stasi LC, Costa CARA, Witaicenis A. Products for the treatment of inflammatory bowel disease : a patent review (2013 -- 2014). *Expert Opin Ther Pat*. Informa UK, Ltd.; 2015;1–14.
- Esworthy RS, Aranda R, Martín MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281:G848–G855.
- Figueiredo IM, Marsaioli AJ. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ^1H utilizando detecção do ligante. *Quim Nova*. SBQ; 2007;30:1597–1605.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115:182–205.
- Fiocchi C. Towards a “cure” for IBD. *Dig Dis*. 2012;30:428–33.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: evolutionary concepts in biology, epidemiology, mechanisms and therapy. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29:347–9.
- Hemshekhkar M, Sunitha K, Thushara RM, Sebastin Santhosh M, Shanmuga Sundaram M, Kemparaju K, Girish KS. Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. *Biochimie*. Elsevier Masson SAS; 2013;95:1326–35.
- Hoult JR, Forder R a, de las Heras B, Lobo IB, Payá M. Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation. *Agents Actions*. 1994;42:44–9.
- Hoult JR, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol*. 1996;27:713–22.
- Huber P, Almeida W, Fátima Â de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim Nova*. 2008;31:4–7.
- Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, Beltrán B. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn’s disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39:1102–6.
- Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2003a;142:239–54.
- Kaneko T, Tahara S, Takabayashi F. Suppression of lipid hydroperoxide-induced oxidative damage to cellular DNA by esculetin. *Biol Pharm Bull*. 2003b;26:840–4.

- Karp SM, Koch TR. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis Mon.* 2006;52:199–207.
- Kato Y, Nagao A, Terao J, Osawa T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:1136–9.
- Khor TO, Huang M-T, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong A-N. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* 2006;66:11580–4.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984;87:1344–50.
- Kruidenier L, Verspaget H. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:1997–2015.
- Lake BG. Coumarin Metabolism , Toxicity and Carcinogenicity : Relevance for Human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:423–453.
- Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy [Internet]. Null, organizador. J. Biomed. Opt. Springer; 1999.
- Linares V, Alonso V, Albina ML, Bellés M, Sirvent JJ, Domingo JL, Sánchez DJ. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology.* 2009;256:152–156.
- Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio Blanco C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Dig Liver Dis.* 2003;35:635–41.
- Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Pellizzon CH, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1343–1350.
- Maehata Y, Esaki M, Morishita T, Kochi S, Endo S, Shikata K, Kobayashi H, Matsumoto T. Small bowel injury induced by selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a prospective, double-blind, randomized clinical trial comparing celecoxib and meloxicam. *J Gastroenterol.* 2011;
- Mayer M, James TL. NMR-Based Characterization of Phenothiazines as a RNA Binding Scaffold. *J Am Chem Soc.* 2004;126:4453–4460.
- Mayer M, Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc.* 2001;123:6108–17.
- Medina FS de, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278:771–779.

- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96:795–803.
- Moum B. Which are the 5-ASA compound side effects and how is it possible to avoid them? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:S212–S213.
- Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JCF, Araújo ORP, Goulart MOF. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biol*. 2015;6:617–639.
- Oberg G, Lindmark G, Moberg L, Venge P. The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy. *Br J Haematol*. 1983;55:701–708.
- Pavlick K, Laroux F, Fuseler J. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:311–322.
- Payá M, Halliwell B, Hoult J. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1992;44:205–214.
- Pedro AJ, Siqueira MC, Silva M, Silva Z, Fontes G, Rocha P, Grima N, Pinto HC, Bicho M, Ramalho F, Moura MC. Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. *J Port Gastreterologia*. 2003;10:209–214.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Moore JD, Stenning K, organizadores. *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press; 2001;29:e45.
- Ramakers C, Ruijter JM, Lekan R, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.-Updated in *Nucl. Acids Res.*, Vol. 37, No. 6. (1 April 2009), e45. *Neurosci Lett*. 2003;339:62–66.
- Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009;84:705–12.
- Romier B, Schneider Y-J, Larondelle Y, Durrant A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev*. 2009;67:363–78.
- Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 1981;20:3096–3102.
- Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:2317–26.
- Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*. 1999;17:57–61.
- Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.

- Schüttelkopf AW, Van Aalten DMF. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2004;60:1355–1363.
- Sido B, Hack V, Hochlehnert a, Lipps H, Herfarth C, Droge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998;42:485–492.
- Siegel CA. Review article: Explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:23–32.
- Souza HSP De, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD : current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2015;13:13–27.
- Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: A role for glutathione-S-transferase? *World J Gastroenterol*. 2014;20:3534.
- Torres MI, García-Martin M, Fernández MI, Nieto N, Gil a, Ríos a. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. *Dig Dis Sci*. 1999;44:2523–9.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003;57:145–155.
- Unni S, Huang Y, Hanson RM, Tobias M, Krishnan S, Li WW, Nielsen JE, Baker NA. Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *J Comput Chem*. NIH Public Access; 2011;32:1488–91.
- Veza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J. Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review [Internet]. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016. p. 211.
- Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. Ligplot - a Program To Generate Schematic Diagrams of Protein Ligand Interactions. *Protein Eng*. 1995;8:127–134.
- White A, Thannickal VJ, Fanburg BL. Glutathione deficiency in human disease. *J Nutr Biochem*. 1994;5:218–226.
- Witaicenis A, Luchini AC, Hiruma-Lima C a, Felisbino SL, Garrido-Mesa N, Utrilla P, Gálvez J, Di Stasi LC. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. *Chem Biol Interact*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;195:76–85.
- Witaicenis A, Luchini AC, Hiruma-Lima CA, Felisbino SL, Justulin Jr. LA, Garrido-Mesa N, Utrilla P, Gálvez J, Di Stasi LC. Mechanism and effect of esculetin in an experimental animal model of inflammatory bowel disease. *Eur J Inflamm*. 2013;11:433–446.
- Witaicenis A, Seito LN, da Silveira Chagas A, de Almeida LD, Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari SH, Di Stasi LC. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory

- effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*. Elsevier GmbH.; 2014;21:240–246.
- Witaicenis A, Seito LN, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Interact*. Elsevier Ireland Ltd; 2010;186:211–218.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–434.
- Yao J, Cao X, Zhang R, Li Y-X, Xu Z-L, Zhang D-G, Wang L-S, Wang J-Y. Protective Effect of Baicalin Against Experimental Colitis via Suppression of Oxidant Stress and Apoptosis. *Pharmacogn Mag. Medknow Publications*; 2016;12:225–34.
- Yau Y, Leong RW, Zeng M, Wasinger VC. Proteomics and Metabolomics in Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;
- Zarzecki MS, Bortolotto VC, Poetini MR, Araujo SM, de Paula MT, Roman SS, Spiazzi C, Cibin FWS, Rodrigues OED, Jesse CR, Prigol M. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Effects of p-Chloro-phenyl-selenoesterol on TNBS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mice. *J Cell Biochem*. 2016;
- Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237:474–80.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1



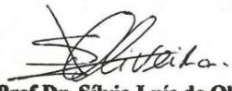
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP - fone (014) 6802 6014/ 6802 6013 - fax(014)68213744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 042/04-CEEA, sobre *“Inflamação intestinal aguda, crônica com recidiva induzida por Ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos”*, sob a responsabilidade de **LUIZ CLAUDIO DI STASI**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado nesta data “Ad referendum” **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**.

Botucatu, 15 de junho de 2004.


Prof.Dr. Silvio Luís de Oliveira
Presidente - CEEA


Nádja Jovêncio Cotrim
Secretária - CEEA

7.2 Anexo 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação dos mecanismos moleculares e biofísico de ação antioxidante envolvidos na resposta anti-inflamatória intestinal da 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina", Protocolo nº 695-CEUA, sob a responsabilidade de **Luiz Claudio Di Stasi**, 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) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Vigência do Projeto: *Início: 01/4/2015*

Término: 27/02/2017

Espécie/linhagem: *Rato Wistar albino*

Nº de animais: *80*

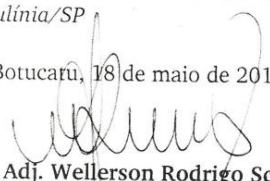
Peso: *180-250g*

Idade: 40 dias

Sexo: *Macho*

Origem: *Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda.
Paulínia/SP*

Botucatu, 18 de maio de 2015.


Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: seculta@ibb.unesp.br