

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**Efeitos do extrato de *Baccharis dracunculifolia*
DC em diferentes mediadores da inflamação
intestinal induzida por TNBS em ratos**

Alexandre da Silveira Chagas

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi
Co-orientadora: Aline Witaicenis

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

Botucatu
2013

Dados Curriculares

Nome: Alexandre da Silveira Chagas

Data de Nascimento: 10/09/1988

Formação:

Graduação em Ciências Biomédicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (2007-2010).

Atividades realizadas durante o Mestrado (2011-2012)

Matrícula nº: 121122-2

Disciplinas Cursadas

Disciplina	Ano	Carga horária	Frequência (%)	Conceito
Farmacologia Avançada	2011	75	81	B
Interação das vias metabólicas nos estados nutricionais	2011	60	100	A
Abordagem estatística em farmacologia I – Fundamentos	2011	15	100	A
Abordagem estatística em farmacologia II – Aplicabilidade	2011	30	100	A
Classificação de receptores farmacológicos	2011	45	100	B
Plantas medicinais: Abordagens de estudo interdisciplinares	2012	90	100	B
Tópicos de atualização em farmacologia: Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais	2012	45	100	A
Tópicos de atualização em farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória	2012	30	100	A
Tópicos de atualização em farmacologia: Abordagem experimental e computacional para investigar a estrutura e função de macromoléculas biológicas e suas interações	2012	30	100	A
Tópicos de atualização em Farmacologia: Mediadores da resposta inflamatória	2012	30	100	A

Total de carga horária em disciplinas = 450

Total de carga horária em atividades complementares = 142,5

TOTAL GERAL = 592,5

Participação em Congressos e Eventos

- 2012 XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 18 a 21 de Setembro de 2012, Bento Gonçalves-RS.
- 2012 International Congress on Natural Products Research-ICNPR 2012, 27 de Julho a 01 de Agosto de 2012, Nova Iorque, NY, EUA.
- 2012 II Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 22 a 23 de Junho de 2012, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2011 II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB. 28 e 29 de Novembro de 2011, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.
- 2011 I Simpósio de Farmacologia da UNESP – SIMFAR. 03 a 04 de Junho de 2011, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus de Botucatu.

Participação em minicursos

- 2012 Mini Curso: Métodos para avaliação farmacológica pré-clínica de plantas medicinais. (3 horas) 2012. (XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil).
- 2011 Mini Curso: Princípios em Microscopia Confocal. (1h 30min) 2011. (II Simpósio do Centro de Microscopia Eletrônica).

Trabalhos apresentados em congresso

- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Effects of ethyl acetate of *Baccharis dracunculifolia* DC in TNBS-induced colitis in rats. *Apresentação:* Painel. *Autores:* **CHAGAS, A. S.**; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; WITAICENIS, A.; TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.; QUAGLIO, A. E. V.
- 2012 *Nome do Evento:* International Congress on Natural Products Research-ICNPR 2012, 27 de Julho a 01 de Agosto de 2012, Nova Iorque, NY, EUA. *Título:* Ethyl acetate extract of *Baccharis dracunculifolia* DC inhibits TNF- α production in TNBS-induced colitis in rats. *Apresentação:* Painel, *Autores:* **CHAGAS, A. S.**; WITAICENIS, A.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; TANIMOTO, A.; COSTA, C. A. R. A.; STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* II Simpósio de Farmacologia da Unesp – SIMFAR. *Período:* 22 e 23 de Junho de 2012. *Título:* Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatória intestinal de *Baccharis dracunculifolia* DC. *Apresentação:* Painel. *Autores:* **CHAGAS, A. S.**; DI STASI, L. C.
- 2011 *Nome do Evento:* I Simpósio de Farmacologia da Unesp – SIMFAR. *Período:* 03 e 04 de Junho de 2011. *Título:* Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatório intestinal de *Baccharis dracunculifolia* DC. *Apresentação:* Oral. *Autores:* **CHAGAS, A. S.**; DI STASI, L. C.

Co-autoria em trabalhos

- 2012 *Nome do Evento:* III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos. *Período:* 14 a 19 de Outubro de 2012. *Título:* O fim de uma panaceia: Efeito negativo da *Pfaffia paniculata* no modelo de colite induzida por TNBS. *Apresentação:* Painel. *Autores:* COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A. W.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; **CHAGAS, A. S.**; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos. *Período:* 14 a 19 de Outubro de 2012. *Título:* O fim de uma panacéia: Efeito negativo da *Pfaffia glomerata* no modelo de colite induzida por TNBS. *Apresentação:* Painel. *Autores:* COSTA, C. A. R. A.; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A. W.; QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; **CHAGAS, A. S.**; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Avaliação dos efeitos do extrato de *Bidens pilosa* L. no modelo experimental de doença inflamatória intestinal. *Apresentação:* Painel. *Autores:* QUAGLIO, A. E. V.; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; **CHAGAS, A. S.**; TANIMOTO, A.; WITAICENIS, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* A comparative study of the effects of Esculetin, Esculin and 4-Methylesculetin in acute experimental model of inflammatory bowel disease. *Apresentação:* Painel. *Autores:* WITAICENIS, A. W.; **CHAGAS, A. S.**; ALMEIDA JUNIOR, L. D.; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A. E. V.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.
- 2012 *Nome do Evento:* XXII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil. *Período:* 18 a 21 de Setembro de 2012. *Título:* Avaliação dos efeitos preventivos de *Physalis angulata* L. e prednisolona no modelo experimental de doença inflamatória intestinal. *Apresentação:* Painel. *Autores:* ALMEIDA JUNIOR, L. D.; **CHAGAS, A. S.**; TANIMOTO, A.; QUAGLIO, A. E. V.; WITAICENIS, A.; COSTA, C. A. R. A.; DI STASI, L. C.

Colaboração em outros projetos de pesquisa

1. Caracterização da droga vegetal *Pfaffia paniculata* como adaptógena e anti-inflamatória intestinal.
2. Atividade anti-inflamatória intestinal da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.
3. Impacto do estresse físico e psicogênico sobre a ingesta alimentar, ganho de peso e aparência geral da pele: modulação nutrigenômica, proteômica e metabolômica por extratos de plantas e alimentos funcionais.
4. Estudos de mecanismo de ação de *Bidens pilosa* L. e de seus efeitos sobre a atividade anti-inflamatória intestinal da sulfassalazina, prednisolona e azatioprina.

5. Avaliação dos mecanismos de ação anti-inflamatória intestinal de esculetina, 4-metilesculetina e esculina sobre novos marcadores moleculares.

Auxílio Financeiro:



(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)



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

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil-e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein



Dedicatória

Primeiramente a Deus, por toda graça alcançada em minha
vida;

Ao meu pai Carlos Alberto e a minha mãe Elô, pelos
ensinamentos, educação, cuidados e pelo apoio incondicional
para a realização dos meus sonhos;

Aos meus amigos e irmãos da República Só- Kanela, pela
amizade e união de todos esses anos em que estamos juntos;

A todos os meus amigos, que mesmo estando longe, sempre
torcem pelo meu sucesso.

Agradecimientos



Aos meus amigos do laboratório, Kita, Ana, Adriana, Ju Severi, Juliana, Celso, Bira, Luiz, Camila, Tainan, Tarina, Laura, Adriano e Leo pelo apoio, diversão e muitos ensinamentos;

A minha co-orientadora Dra Aline Witaicenis pela parceria e dedicação a este trabalho;

Ao professor Dr Jairo Kenupp Bastos pelo fornecimento do extrato de *Baccharis dracunculifolia* DC;

Aos amigos do departamento de Farmacologia, especialmente a Patrícia;

A todos os professores e funcionários do departamento de Farmacologia;

Aos funcionários da Pós Graduação;

A todos que auxiliaram de alguma maneira a realização deste trabalho.

Ao professor Dr Luiz Claudio Di Stasi por todos os momentos de paciência, compreensão e competência na elaboração deste trabalho...

Lista de Figuras e tabelas

Figura 1. Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/número de animais.....	35
Figura 2. Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em Δ peso corporal.	36
Figura 3 .Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	37
Figura 4 .Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	39
Figura 5. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	40
Figura 6 .Avaliação dos níveis de TNF- α em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	41
Figura 7. Avaliação dos níveis de INF- γ em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	42
Figura 8 Avaliação dos níveis de IL-1 β em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, comparados ao grupo Controle-TNBS.....	43
Figura 9 Avaliação dos níveis de IL-10 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle-TNBS.	44
Figura 10 Avaliação da expressão relativa de HSP70 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$	46
Figura 11 Avaliação da expressão relativa de HPRT em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$	48

Figura 12 Avaliação da expressão relativa de Heparanase em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M.	49
Figura 13 Avaliação da expressão relativa de NF- κ B em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M.	51
Tabela 1 Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.....	23
Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos utilizados para a amplificação dos genes alvos.	29
Tabela 3 Média das eficiências de amplificação individuais de cada amostra analisada	30
Tabela 4 Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato de <i>B. dracunculifolia</i> nas doses de 5mg/kg e 50mg/kg e azatioprina 2mg/kg no modelo experimental agudo da doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. ...	34



Sumário

<i>Introdução</i>	1
1. Doença Inflamatória Intestinal	2
2. Epidemiologia.....	3
3. Etiologia	4
4. Principais fármacos utilizados na Doença Inflamatória Intestinal	5
4.1. Glicocorticóides	6
4.2. Aminossalicilatos.....	7
4.3. Imunossuppressores	8
4.4. Terapia Biológica.....	9
5. Busca por novos compostos para o tratamento da Doença Inflamatória Intestinal	10
5.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i> De Candolle (Asteraceae)	11
6. O modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	12
<i>Material e Métodos</i>	15
1. Animais.....	18
2. Fármaco e Produto Vegetal	18
3. Delineamento experimental.....	19
4. Determinação da atividade sequestradora de radicais livres <i>in vitro</i> pelo reagente DPPH.....	20
5. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal.....	21
6. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal <i>in vivo</i>	23
6.1. Avaliação macroscópica	23
6.2. Determinações bioquímicas	24
6.2.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase	24
6.2.2. Determinação do conteúdo de glutatona total.	25
6.2.3. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina.	26
6.2.4. Determinação dos níveis de TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-10	26
6.3. Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen®)	27
6.4. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real	28
7. Análise estatística	30
<i>Resultados e Discussão</i>	31
1. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo reagente DPPH	32
2. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal	32
3. Avaliações Macroscópicas	33
4. Avaliações Bioquímicas	36
5. Avaliações Moleculares.....	45
<i>Conclusão</i>	32
<i>Bibliografia</i>	53



Resumo

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença com etiologia desconhecida e sem terapêutica curativa disponível, englobando, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU), ambas caracterizadas por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados com remissão dos sintomas, cujo tratamento com os fármacos disponíveis apresentam sérios efeitos colaterais. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que combinem eficácia e segurança é uma importante meta na terapia da DII. A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC (família Asteraceae) é uma planta medicinal brasileira usada popularmente contra úlceras, inflamação e problemas hepáticos e tem sido amplamente reconhecida como a principal fonte botânica da resina e dos constituintes químicos da própolis brasileira (própolis verde), a qual tem sido incorporada em alimentos e bebidas para a melhora da saúde. Estudos mostram que as inúmeras atividades biológicas da própolis verde decorrem exclusivamente dos constituintes presentes em *Baccharis dracunculifolia*, a qual possui várias atividades biológicas, especialmente agindo como imunomoduladora, anti-inflamatória e anti-inflamatória intestinal, sequestradora de radicais livres, antiúlcera e analgésica. A atividade anti-inflamatória intestinal está associada à presença de diferentes ácidos fenólicos presentes na espécie, tais como ácidos cafeico, *p*-cumárico, 3-prenil-*p*-cumárico (drupanina), 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepilina C), bacarina e metil-éster de aromadendrina. Estes compostos possuem íntima associação biossintética com os derivados cumarínicos também ativos na doença inflamatória intestinal, justamente por fazerem parte de sua rota biossintética. Com base nestas informações, o objetivo do presente estudo foi identificar os possíveis alvos farmacológicos da ação anti-inflamatória do extrato de *B. dracunculifolia* sobre mediadores do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos. Nossos resultados mostraram que o extrato de *B. dracunculifolia* diminuiu a atividade da enzima mieloperoxidase, reduziu os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α e aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, além de evitar o aumento da expressão relativa da HSP 70 e, que sua atividade protetora está relacionada à redução do estresse oxidativo que se instala no processo inflamatório intestinal.



Abstract

The Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a disease with unknown etiology and no curative treatment available, encompassing essentially two distinct diseases: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both characterized by chronic inflammation of the intestine, with periods of exacerbation followed by long intervals with symptom remission whose treatment with available drugs have serious side effects. Therefore, the development of new treatment strategies that combine effectiveness and safety is an important goal in the treatment of IBD. The species *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is a Brazilian medicinal plant popularly used against ulcers, inflammation and liver problems and has been widely recognized as the main botanical source of the resin and the chemical constituents of Brazilian propolis (green-propolis), which has been incorporated in foods and beverages to improve health. Studies show that the numerous biological activities of green propolis derived exclusively from the constituents present in *Baccharis dracunculifolia*, which has several biological activities, especially acting as immunomodulatory, anti-inflammatory and anti-inflammatory intestinal free radical scavenging, antiulcer and analgesic. The intestinal anti-inflammatory activity is associated with the presence of different phenolic acids in this specie, such as caffeic acid, p-coumaric acid, 3-prenyl-p-coumaric (drupanina), 3,5-diprenyl-p-coumaric acid (C artepilina) bacarina and methyl ester aromadendrin. These compounds have a close association with the biosynthetic coumarin derivatives also active in inflammatory bowel disease, just by being part of their biosynthetic pathway. Based on this information, the aim of this study was to identify potential pharmacological targets of anti-inflammatory action of the extract under *B.dracunculifolia* mediators of intestinal inflammation induced by TNBS in rats. Our results showed that the extract of *B dracunculifolia* decreased activity of the enzyme myeloperoxidase, reduced levels of pro-inflammatory cytokine such as TNF- α and increased levels of anti-inflammatory cytokine IL-10, and avoid increasing the relative expression of HSP 70 and that its protective activity is related to the reduction of oxidative stress that installs in intestinal inflammation.



Introdução

1. Doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcada pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação (Singh *et al.*, 2003), no entanto, ocorrem algumas diferenças quanto às características e distribuição do processo inflamatório.

A Doença de Crohn é uma inflamação transmural do trato gastrointestinal (TGI) que pode afetá-lo por completo, desde a boca até o ânus. Normalmente se apresenta de forma descontínua em várias porções do TGI e pode promover complicações como estenoses, abscessos ou fístulas. Esta doença caracteriza-se ainda pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose (Collins & Croitoru, 1994; Baumgart & Sandborn, 2007).

Já a Retocolite Ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal restrita ao cólon e que dependendo da extensão e localização da inflamação pode ser classificada em proctite (parte inferior do cólon e reto), colite distal (cólon sigmóide com ou sem envolvimento do cólon descendente) ou pancolite (envolvimento de todo o cólon) (Baumgart & Sandborn, 2007). Histologicamente, a inflamação na retocolite ulcerativa se restringe a camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos e granulócitos e presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos (Collins & Croitoru, 1994).

Clinicamente, a RCU é caracterizada pela ocorrência de diarreia severa com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal e perfuração. Porém, na doença de Crohn, a apresentação clínica depende do local da

inflamação, podendo incluir dor abdominal intensa, diarreia, febre, ocorrência de estreitamento do lúmen intestinal (estenoses), desenvolvimento de fístulas e até mesmo sinais de obstrução intestinal (Bouma & Strober, 2003; Baumgart & Sandborn, 2007).

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

2. Epidemiologia

A epidemiologia da Doença Inflamatória Intestinal está sendo analisada em diversos estudos e apesar das tendências para o aparecimento da DII estarem mudando, certos padrões demográficos parecem ser semelhantes. As taxas de incidência são maiores em países desenvolvidos e mais industrializados, como no nordeste Europeu, Reino Unido e América do Norte, indicando a urbanização como um fator de risco (Lakatos, 2006). Porém, nos últimos 20 anos, esse panorama está mudando e os países em desenvolvimento estão apresentando taxas de incidência de DII cada vez maiores (Cosnes *et al.*, 2011). Dados mundiais indicam que a prevalência está em um range de 120-200 casos de RCU e 50-200 casos de DC para cada 100.000 habitantes (Cosnes *et al.*, 2011); nos Estados Unidos estima-se que 1.4 milhões de pessoas apresentem a doença (Abraham & Cho, 2009).

No Brasil, poucos estudos analisam os aspectos epidemiológicos da DII, sendo que a maioria apenas descreve os aspectos clínicos e a frequência de admissão em hospitais em função dessa enfermidade, sem qualquer tipo de referência quanto à incidência ou prevalência na população. Um estudo de Souza *et al.* (2002) realizado em um hospital público de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, mostrou que a admissão em hospitais em função da DII é mais frequente para casos de DC e que ocorreu um aumento nas doenças inflamatórias intestinais

de 40 para 61 casos para cada 10.000 atendimentos realizados, em um período de cinco anos.

Victoria *et al.* (2009) constataram no hospital da Universidade Estadual Paulista – Botucatu –SP que a maioria dos pacientes atendidos era caucasiana e morava em centros urbanos e que a incidência de RCU chegava a 65% dos atendimentos enquanto que de DC era de aproximadamente 25%.

Apesar de no Brasil esses números serem menores do que a taxa mundial, essa doença vem se tornando cada vez mais importante no nosso sistema de saúde pública e privada.

A Doença de Crohn se mostra mais presente em mulheres enquanto a Retocolite Ulcerativa é mais comum em homens. Além disso, DC e RCU são mais comuns em populações caucasianas do que em outras etnias (Thukkani *et al.*, 2010).

3. Etiologia

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida e um único agente ou mecanismo isolado não parecem ser suficientes para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais (dieta, fármacos, tabagismo e fatores psicológicos), em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa células de origem imune e não-imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal, deste modo, sua etiologia é considerada multifatorial (Su *et al.*, 2009). Por meio de uma resposta imune exagerada e inapropriada da mucosa à flora intestinal normal, a qual é facilitada por alterações na barreira epitelial intestinal e mediada principalmente por células T da mucosa, se desencadeia uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanóides, fator de agregação plaquetária e inúmeras citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-12. Neste sentido, está descrito um grande

aumento na síntese colônica de leucotrieno B₄ (Wallace, 1994), o qual devido sua capacidade quimiotática e ativadora de neutrófilos pode ser o responsável por grande parte da destruição celular e necrose que caracterizam a DII. A destruição celular e necrose, por sua vez, ocorrem devido à secreção de mieloperoxidase e distintas proteases, especialmente das metaloproteinases, assim como da geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio, os quais tem sido implicado em diferentes fases do processo inflamatório (Miller e Grisham, 1995; Kubes e Wallace, 1995).

Os radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção da DII, sendo que alguns estudos comprovam a existência de alterações nos níveis oxidativos em biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade (Lih-Brody et al., 1996). Este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (Loguercio, 1996), especialmente dos níveis de glutathione total. O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana celular e a conseqüente morte da célula.

4. Principais fármacos utilizados na Doença Inflamatória

Intestinal

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores (Yamamoto-Furusho, 2007) e a terapia biológica (Morrison *et al.*, 2009). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII e os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os corticosteróides, e/ou são de alto custo,

como por exemplo, o infliximabe, aspectos que limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes.

4.1.Glicocorticóides

Os glicocorticóides tais como prednisolona, prednisona e outros são utilizados na terapia primária para DII moderada a severa, no entanto a dependência e os efeitos colaterais causados com o uso destes compostos influenciam diretamente a segurança e a tolerabilidade desses agentes (Navarro & Hanauer, 2003).

Jani *et al.* (2002) mostraram que a taxa de remissão em pacientes com RCU chegou a 75% para casos mais moderados e em casos mais severos a apenas 31% de remissão, porém a manutenção da remissão não é efetiva. Diversos estudos mostram que após um ano de tratamento, 50% a 60% dos pacientes mantidos com glicocorticóides voltaram a apresentar a doença.

Em adição, vários efeitos colaterais de curto e longo prazo surgem, como por exemplo, retenção de líquidos, ganho de peso, instabilidade emocional e visão turva. Efeitos a longo prazo mais sérios, que podem se desenvolver em função da administração repetida ou prolongada, incluem catarata, osteoporose e miopatias (Jani *et al.*, 2002; Navarro & Hanauer, 2003).

O mecanismo geral de ação destes fármacos consiste na ligação da molécula dos glicocorticóides com os receptores intracelulares que controlam a transcrição gênica. O complexo receptor-glicocorticóide promove a formação de dímeros que migram para o núcleo da célula e ligam-se ao DNA, modificando a transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas, como por exemplo, a lipocortina-1, e inibindo a síntese de outras, como da AP-1 e do NF- κ B (Marx, 1995). Devido a este mecanismo, os glicocorticóides afetam a função de várias células envolvidas no

processo inflamatório e conseqüentemente a expressão de várias citocinas, quimiocinas, cininas, diminuição das moléculas de adesão, do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e da ciclooxigenase (COX-2) (Rogler, 2010).

Sabe-se também que a administração de glicocorticóides reduz de maneira significativa a incidência de diarreia, provavelmente devido a capacidade de melhorar a absorção de sódio e de água no cólon de pacientes colícticos (Sandle *et al.*, 1986).

4.2.Aminossalicilatos

Os aminossalicilatos (5-ASA), sulfassalazina, olsalazina e mesalazina representam a primeira terapia de escolha no tratamento da doença inflamatória intestinal leve a moderada, assim como para a manutenção da remissão na RCU. Os derivados do 5-ASA são menos efetivos em manter a remissão em pacientes com DC e por isto menos utilizados nesses casos (Duricova *et al.*, 2010). A sulfassalazina é amplamente prescrita em função de seu baixo custo, eficácia comprovada e boa tolerabilidade deste agente e assim como de outros derivados do grupo, seu efeito depende principalmente da concentração do agente no lúmen intestinal (Ryan *et al.*, 2003).

Apesar desta classe de medicamentos ser considerada o tratamento de primeira escolha, estas preparações têm o potencial de causar efeitos adversos em todo o organismo. Os efeitos mais comuns, que chegam a levar a intolerância, incluem dores de cabeça, dispepsia, náuseas, vômitos, anorexia e fadiga em até 45% dos pacientes. Estas ocorrências parecem estar relacionadas com a dose administrada e com predisposições genéticas e os efeitos adversos podem ser diminuídos pela administração da medicação com alimento, pela redução temporária da dose e reintrodução gradual de doses maiores, ou ainda pela

substituição por outros tipos de formulações farmacêuticas (Navarro & Hanauer, 2003).

Sulfassalazina é um pro-fármaco que contém o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) ligado a uma sulfapiridina por meio de uma ligação azo chegando intacta ao intestino. No cólon, a ligação azo é quebrada por bactérias azo-redutases liberando sulfapiridina e o 5-ASA. A sulfapiridina é absorvida sistemicamente e é a principal responsável pela toxicidade e efeitos colaterais apresentados pelo fármaco. O 5-ASA é o composto antiinflamatório ativo (Jani *et al.*, 2002).

Os derivados do 5-ASA são compostos anti-inflamatórios que agem inibindo as vias da ciclooxigenase e da 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, resultando em redução nos níveis de leucotrieno B4 e prostaglandinas (Jani *et al.*, 2002; Whittle *et al.*, 2010).

Apesar de se não saber o mecanismo preciso pelo qual os aminossalicilatos agem na inflamação intestinal, acredita-se que possam apresentar também alguns efeitos imunomodulatórios. Estudos mostram que podem agir inibindo a produção de imunoglobulinas, IL-1, IL-2 e NF- κ B, além de prejudicarem a função de linfócitos e monócitos e agirem como sequestradores de radicais livres (Jani *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2003; Whittle *et al.*, 2010).

4.3. Imunossupressores

A eficácia dos análogos de purina Azatioprina e 6-mercaptopurina já está bem estabelecida na DII. A azatioprina é uma pró-droga rapidamente clivada a 6-mercaptopurina, após exposição com nucleófilos como a glutatona. Como produto resultante, a 6-mercaptopurina age como um antagonista de purinas, inibindo a síntese de proteínas, RNA e DNA, dessa forma inibindo o crescimento celular (Ardizzone & Porro, 2002).

Cuffari *et al.*, (2001) demonstram que o tratamento com Azatioprina ou 6-mercaptopurina é eficaz em manter a remissão em 70% dos pacientes de DC dependentes de corticóides e é capaz de eliminar a necessidade de glicocorticóides em aproximadamente 75% dos pacientes. Quando em combinação com prednisolona, é capaz de induzir a remissão, mais rápida e mais frequentemente, utilizando-se doses muito menores do glicocorticóide. Seus efeitos imunossupressores melhoram a qualidade de vida de pacientes com DC através da diminuição das complicações perianais (Cuffari *et al.*, 1996; Derijks *et al.*, 2006).

Apesar desse importante efeito imunossupressor, aproximadamente 20% dos pacientes tratados com os análogos das purinas têm que interromper o tratamento em função da ocorrência de efeitos adversos (Derijks *et al.*, 2006), tais como reações alérgicas, infecções, hepatites, supressão medular e pancreatites (Cuffari *et al.*, 1996).

4.4.Terapia Biológica

Os agentes anti-TNF, também denominados de terapia biológica compreendem outra classe de fármacos, atualmente utilizadas para o tratamento da DC. Dentre os mais utilizados estão o infliximab, adalimumab e o certolizumab (Yun & Hanauer, 2009). Esses fármacos são anticorpos monoclonais quiméricos, anti-TNF que tem demonstrado eficácia na indução e manutenção da remissão da DC, bem como no tratamento das fístulas (Navarro & Hanauer, 2003). O mecanismo de ação inclui a neutralização do TNF, lise das células imunes ativadas e indução de apoptose de células T e macrófagos ativados (Probert *et al.*, 2003). Os principais efeitos colaterais consistem em desenvolvimento de autoimunidade, aumento do risco de infecções, ocorrência de tuberculose e reações durante a infusão que podem ser desde dores no peito, falta de ar, dispnéia, dores de cabeça e febre, até reações anafiláticas (Navarro & Hanauer, 2003). Além dos efeitos colaterais, existem pacientes que não respondem, param de responder ou desenvolvem intolerância a essa terapia biológica (Yun & Hanauer, 2009), sem

contar o alto custo desses medicamentos, o que inviabiliza o seu uso pela maioria dos pacientes da população brasileira.

5. Busca por novos compostos para o tratamento da Doença

Inflamatória Intestinal

Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII, sendo que os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais e/ou são de alto custo e em vários casos os pacientes não respondem a nenhum dos tratamentos.

Recentemente, novos procedimentos terapêuticos têm sido propostos, especialmente com produtos naturais com atividade antioxidante e/ou imunomoduladora e de produtos reconhecidos como prebióticos, capazes de melhorar a resposta das células colônicas ao processo inflamatório que se instala. De fato, há ainda a necessidade de estudos para a obtenção de novas estratégias terapêuticas que maximizam a eficácia dos fármacos, enquanto minimizam sua toxicidade (Scribano, 2008).

Está claramente reconhecido que a inibição ou neutralização de radicais livres, juntamente com uma ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, poderia ser benéfico no tratamento da DII e na diarreia. De fato, intensos esforços na descoberta de novos antioxidantes como candidatos úteis para o combate e tratamento destas doenças têm sido realizados. Nestas pesquisas, constituintes minoritários, especialmente alimentos baseados em espécies vegetais, são importantes candidatos, especialmente aquelas espécies ricas em compostos polifenólicos com comprovada atividade anti-inflamatória intestinal, entre os quais se destacam os flavonóides como a quercetina, quercitrina, morina, hesperidina e rutina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2001; Gálvez *et al.*, 1995) entre outros, vitamina E (Abad-Lacruz *et al.*, 1988; Fernandez-Bañares e Gassull, 1994) e as cumarinas (Di Stasi *et al.*, 2004; Luchini *et al.*, 2008, Witaicenis *et al.*, 2010).

Com base no exposto extratos de plantas que apresentem atividade antiinflamatória e/ou antioxidante demonstram-se como potenciais para o tratamento da DII, por isso a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC foi selecionada para o presente estudo.

5.1. *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (Asteraceae)

O grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas é a família Asteraceae, possuindo cerca de 1100 gêneros e 25000 espécies. São plantas de aspecto variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e, raramente, árvores (Heywood, 1993). Aproximadamente 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, sendo encontradas em vários tipos de habitat, especialmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul (Joly, 1967).

O gênero *Baccharis* está representado por mais de 500 espécies distribuídas em áreas tropicais da América do Sul, como Brasil, Argentina, Colômbia e Chile (Malagarriga Heras, 1976). No Brasil estão descritas pelo menos 120 espécies de *Baccharis*, em sua maioria no sudeste do país (Verdi *et al.*, 2005).

A espécie *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo, é um arbusto que cresce espontaneamente no cerrado brasileiro. A infusão de suas folhas é utilizada na medicina tradicional como um anti-inflamatório para o tratamento de doenças gastrintestinais, úlceras estomacais, para combater o cansaço físico, inapetência, febre, debilidade orgânica e desordens do fígado (Menezes, 2005; Mors *et al.*, 2000; Silva Júnior, 1997; Queiroga *et al.*, 1990).

Essa espécie tem sido amplamente reconhecida como a principal fonte botânica da resina e dos constituintes químicos da própolis brasileira (própolis verde), a qual tem sido incorporada em alimentos e bebidas para a melhora da saúde (Bankova *et al.*, 2000; Kumazawa *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004). Estudos mostram que as inúmeras atividades biológicas da própolis verde decorrem exclusivamente dos constituintes presentes em *B. dracunculifolia*, a qual possui

várias atividades biológicas, especialmente agindo como imunomoduladora, anti-inflamatória, sequestradora de radicais livres, anti-úlceras e analgésica (Lemos *et al.*, 2007; Missima *et al.*, 2007; Paulino *et al.*, 2008; Nakanishi *et al.*, 2003). Tais efeitos estão associados aos diferentes ácidos fenólicos presentes na espécie, os quais possuem íntima associação biossintética com os derivados cumarínicos também ativos, justamente por fazerem parte de sua rota biossintética.

De fato, estudos preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa com a espécie *Baccharis dracunculifolia* DC demonstraram que o extrato acetato de etila de partes aéreas padronizado em ácidos fenólicos, como ácidos cafeíco, *p*-cumárico, 3-prenil-*p*-cumárico (drupanina), 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepilina) e bacularina apresentaram uma importante atividade anti-inflamatória intestinal devido sua capacidade de inibir a atividade da fosfatase alcalina e mieloperoxidase, com isto reduzindo a infiltração de neutrófilos, além de atuar inibindo a peroxidação lipídica e impedir a redução de glutatona, um sequestrador endógeno de radicais livres (Cestari *et al.*, 2011).

Devido a isto, optou-se em continuar os estudos com esta espécie, tendo em vista aprofundar os conhecimentos sobre seu mecanismo de ação, visto que tal produto poder ser incorporado na dieta e potencialmente produzir efeitos benéficos e complementares no controle da DII.

6. O modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS)

Esse modelo experimental consiste na indução da inflamação intestinal por um processo químico. A ideia inicial deste modelo baseou-se na hipótese de que na DII ocorre um aumento na permeabilidade da mucosa, que facilita a entrada de um antígeno luminal na lâmina própria, o qual não é adequadamente eliminado pelo sistema imunológico.

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

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

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

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

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

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



Objetivo

Com base nestas informações o objetivo do presente trabalho é:

Estudar os efeitos do extrato de *B.dracunculifolia* sobre diferentes mediadores do processo inflamatório colônico, induzido por TNBS em ratos



Material e Métodos

1. Animais

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

2. Fármaco e Produto Vegetal

Os compostos azatioprina, obtido da Sigma, e tween 80 (1%) obtido da Veltec foram utilizados nos experimentos. Água desmineralizada foi obtida no local, em deionizador de água Ação Científica.

A espécie vegetal selecionada para a obtenção do extrato bruto foi fornecida pelo prof. Dr. Jairo Kennup Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-RP e a exsicata foi depositada no Herbário do departamento de biologia da universidade de São Paulo (FFCLRP) em Ribeirão Preto-SP, Brasil, sob o número (SPFR 06143). Após a coleta do material vegetal, este foi seco e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40°C e submetido à moagem em moinho de facas previamente limpo. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à extração por maceração utilizando-se 300 mL de acetato de etila PA por 24 horas a

temperatura ambiente. A solução extrativa foi concentrada por evaporação à pressão reduzida e levada a secagem completa em capela de exaustão. O extrato bruto resultante foi caracterizado quimicamente e padronizado em termos de compostos fenólicos, conforme procedimento descrito por Cestari *et al.*, 2011

3. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com o método descrito por Morris *et al.*, 1989, com pequenas modificações. Antes da indução, os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e, posteriormente, anestesiados com halotano. O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) foi preparado a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v), onde 0,25 mL de uma solução de 10 mg de TNBS em etanol a 50% (v/v). O TNBS foi administrado via retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia, quando devolvidos às caixas de manutenção. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de salina em substituição ao TNBS.

Nos estudos de fase aguda do processo inflamatório intestinal, todos os animais foram previamente tratados. Os tratamentos com fármaco (azatioprina 2mg/Kg) e o extrato de *B.dracunculifolia* na dose de 5 e 50 mg/Kg foram realizados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica. Os tratamentos foram realizados às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite. Como padrão de comparação foi utilizado o grupo controle (com colite e sem tratamento farmacológico) e o grupo Branco (sem colite e sem tratamento farmacológico). Os animais dos grupos controle e branco receberam por via oral Twen 80 (1%)

utilizado também na dissolução dos produtos testes. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite. Neste protocolo foram analisados os efeitos preventivos dos diferentes produtos teste.

Na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais (n=7):

1. Animais Não Colíticos:

Branco: animais sem tratamento

2. Animais Colíticos:

Controle-TNBS: animais sem tratamento

azatioprina: animais tratados com 2 mg/Kg

B. dracunculifolia: animais tratados com 5 mg/Kg

B. dracunculifolia: animais tratados com 50 mg/Kg

4. Determinação da atividade sequestradora de radicais livres *in vitro* pelo reagente DPPH

A determinação da atividade sequestradora de radicais livres do extrato de *B. dracunculifolia* foi realizada pelo método descrito por Blois (1958) e Brand-Willians (1995), que está baseado no sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil; PM: 394,32 g/mol).

As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 517 nm. Soluções metanólicas do extrato foram preparadas nas concentrações de 0–100 µg/mL. Em cada cavidade da microplaca adicionou-se 100 µL das amostras-testes, 200 µL da solução de DPPH (40 µg/mL) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. A mistura de água (100 µL) com DPPH (200 µL) foi utilizada como controle (Ac), enquanto que o ácido gálico foi usado como padrão positivo (0–3 µg/mL) para fins de comparação. Decorrido o período de incubação, realizou-se a leitura

espectrofotométrica em 517 nm. Os testes foram realizados em triplicata. O percentual de atividade sequestradora de radicais livres (ASRL) é então determinado com base no decaimento da absorvância das amostras e do controle, segundo a equação:

$$\% = [(A_c - A_{\text{amostra ou padrão}}) / A_c] \times 100$$

Onde:

A_c = Média da absorbância do DPPH + Metanol e $A_{\text{amostra ou padrão}}$ = Média da absorbância da amostra analisada.

A apresentação dos resultados foi na forma de gráfico de dispersão, onde no eixo das coordenadas (y) consta a porcentagem de atividade antioxidante e no eixo das abscissas (x) a concentração da amostra ou padrão. A partir da curva exponencial de primeira ordem (%DPPH *versus* concentração) de cada amostra/padrão, também foi calculado o EC₅₀ (Concentração Eficiente), refere-se à quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%.

5. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal

O doseamento de compostos fenólicos totais no ST foi realizado empregando-se o método com o reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton e Lamuela-Raventos, 1999), adaptado para microplaca de 96 poços. O reagente é constituído por uma mistura os ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico. Nesta solução o molibdênio e o tungstênio encontram-se em estado de oxidação 6+. Na presença de certos agentes redutores, como substâncias fenólicas, o estado de oxidação média destes metais fica entre 5-6, adquirindo coloração azul, que pode ser monitorada em 750 nm.

As medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (Power wave 340, Bio-TEK) no comprimento de onda 750 nm. Soluções aquosas do extrato foram

preparadas nas concentrações de 0–800 µg/mL. Em cada cavidade da microplaca adicionou-se 50 µL de água, 12,5 µL das amostras-testes, 12,5 µL do reagente Folin (2N) e as misturas reacionais foram mantidas ao abrigo da luz por 5 minutos. Decorrido o período de incubação, adicionou-se 125 µL de Na₂CO₃ 7% e uma incubação adicional de 1,5h ao abrigo da luz. Em seguida, realizou-se a leitura em 750 nm. O composto ácido gálico foi usado como controle (0–3 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenóis totais (FT) é determinado por interpolação da absorvância da amostra-teste contra a curva de calibração construída com ácido gálico e expresso como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g de extrato, segundo a equação:

$$FT = \frac{[F]}{[A]} \times 1000$$

onde:

FT: teor de fenóis totais

[F]: concentração de fenóis da amostra-teste (µg/mL), obtida pela leitura da absorvância da amostra e posterior interpolação da [] pela curva de calibração do padrão

[A]: concentração da amostra-teste (µg/mL)

6. Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal *in vivo*

6.1. Avaliação macroscópica

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

Na análise macroscópica foram avaliados peso e comprimento do cólon, existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995 (Tabela 1).

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

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

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em sete fragmentos longitudinais, três deles foram congelados a -80°C para determinação de proteínas e atividade da fosfatase alcalina, avaliação da atividade da mieloperoxidase e

determinação dos níveis de glutathiona total. Este último fragmento foi pesado e congelado em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson, 1985). Os fragmentos restantes foram armazenados a -80°C para determinação dos níveis de TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-10; além de um fragmento transversal, com 200 μ l de Trizol – Invitrogen® armazenado a -80°C para as análises moleculares.

6.2.Determinações bioquímicas

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

6.2.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase

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

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

6.2.2. Determinação do conteúdo de glutathiona total.

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985) que está baseado na oxidação total do glutathion reduzido (GSH) presente em uma amostra a sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. O GSSG gerado é reduzido por ação da enzima glutathion redutase na presença de NADPH. O GSH formado se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu consequente incremento de absorbância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG).

Para efetuar a determinação do conteúdo de glutathiona total, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As

amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando um homogeneizador Heidoph. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 2000G por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante se utilizou 20µl que foi colocado em uma placa de 96 canais, onde se adicionou 140µl de NADPH, 5µl de PBS e 20µl DTNB. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30°C. Após este período adicionou-se 15µl de glutatión redutase e registrou-se o incremento de absorbância a 412nm no espectrofotômetro. A concentração de glutatión foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em uma curva padrão realizada com Glutathione (GSH) e os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

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

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foram realizadas pelos métodos clássicos descritos por Smith *et al.*, (1984) e Bessey *et al.*, (1946).

6.2.4. Determinação dos níveis de TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-10

Os níveis de TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-10 foram determinados a partir de amostras de cólon coletadas, pesadas e homogeneizadas em solução de PBS (tampão fosfato sódico), pH 7.2, na proporção de (1:5) peso/volume a 4°C. Após homogeneização as amostras foram agitadas em banho-maria à 37°C durante 20 minutos e após isso foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer -80°C até a realização da dosagem. Os níveis de TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-10 foram determinados por kit de imunoenensaio (ELISA), e os valores obtidos foram expressos em pg/mg de proteína (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002).

6.3.Extração de RNA (Protocolo Trizol – Invitrogen®) e reação de transcrição reversa (Protocolo Superscript III - Invitrogen ®)

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. 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 1 μ g de RNA total. A este volume, foi adicionado 1 μ l de tampão DNase, 1 μ l de DNase I (1unidade/ μ l) e água "RNase free" suficiente para completar 10 μ l. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 μ l 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 μ l da solução de RNA total tratada com DNase, 1 μ l de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500 μ g/ml), 1 μ l de dNTP Mix (10nM) e 3 μ l 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 4µl de tampão "First Strand" 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de "RNase OUT Inhibitor" (40unidades/µl). Na sequência, foi acrescido 1µl (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 no PCR.

6.4. Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

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 2).

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. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada amostra analisada (tabela 3).

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno (GAPDH, HPRT ou β -actina). A expressão relativa dos genes analisados foi determinada pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores murino-específicos utilizados para a amplificação dos genes alvos.

Gene	Seqüência	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração de oligo (nM)
GAPDH	F TGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA R ACGACATACTCAGCACCAGCATCA	60	200
β -actina	F TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA R ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT	60	100
HPRT	F AGGGAAGTGACAATCTACCTGACG R GAAATGTCTGTTGCTGCGTCCCTT	60	100
HSP70	F ACTCCTTCGTTCCGGTCTGCAATCA R CTGGGAATGCAAAGCACACGTGAA	60	200
Heparanase	F TGTC AAGAGTGAAAGGCCAGACA R GCAGCTTCAAGTGCTTGGTGACAT	60	200
NF- κ B	F AAACCAAAGCCCTGAAAGGCCATC R TCGGAAGGCCTCGAATGACATCAA	60	200

Tabela 3 Média das eficiências de amplificação individuais de cada amostra analisada
Eficiência dos genes alvos

Genes	Eficiência (%)
GAPDH	99
β -actina	100
HPRT	97
Heparanase	99
HSP70	98
NF- κ B	97

7. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Dados descontínuos foram analisados pelo teste χ^2 . Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. Software GraphPad Prism 5.



Resultados e Discussão

1. Determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo reagente DPPH

A produção das espécies reativas de oxigênio é essencial para a manutenção da homeostasia, no entanto, a produção excessiva de ROS está relacionada com a patologia de várias doenças, dentre estas a DII. O organismo é protegido do estresse oxidativo, induzido pelas ROS, por sistemas de defesas antioxidantes endógenos, como a glutatona peroxidase (GPx), catalase e superóxido dismutase. Dentre as várias funções destes são destacadas: a redução do peróxido de hidrogênio bem como o sequestro de radicais livres e o reparo do dano celular (Nikis, 2011).

Em nossos estudos, a atividade sequestradora de radicais livres pelo uso do DPPH mostrou que o extrato de *B. dracunculifolia* apresentou EC₅₀ 63,5 µg/mL vs 1,89 µg/mL do padrão de ácido gálico, sugerindo ser uma fonte de compostos com atividade antioxidante.

Segundo Cestari *et al*, 2011 o extrato acetato de etila de *B. dracunculifolia* também apresenta atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico em membrana de cérebro de ratos, com valores de IC50 de 26,33 µg/mL vs 1,51 µg/mL de quercetina. Ambos estudos demonstram a importante atividade antioxidante do extrato de *B. dracunculifolia*.

2. Doseamento de compostos fenólicos no extrato vegetal

O teor de compostos fenólicos no extrato acetato de etila de *B. dracunculifolia* foi de 161,23 mg de EAG/g de amostra, mostrando que o extrato é rico em fenóis, dado que foi semelhante ao trabalho de Guimarães *et al*, 2012. Alguns alimentos da nossa dieta, como vegetais e frutas, são ricos em

compostos fenólicos; estes são produtos do metabolismo secundário das plantas e a literatura mostra que compostos fenólicos exibem diversas atividades biológicas, principalmente em doenças relacionadas com o aumento exacerbado das espécies reativas do oxigênio, como a DII. (Blanch and Visioli, 2012; Hur, 2012). Essa abundância de compostos fenólicos pode estar relacionada com a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato de *B.dracunculifolia* no modelo de colite induzido por TNBS.

3. Avaliações Macroscópicas

A administração intracolônica de TNBS resulta em inflamação no epitélio colônico que pode ser evidenciada após 48 horas pelo aparecimento de necrose na camada mucosa onde essa lesão estende-se por 2,8 – 3,6 cm ao longo do cólon e promove a ocorrência de espessamento e hiperemia na parede intestinal. Esses parâmetros foram analisados e expressos em forma de escore, e os resultados podem ser observados na tabela 4. Somente os animais do grupo branco tiveram o escore, extensão da lesão e relação peso/comprimento significativamente diferentes dos animais do grupo controle, os tratamentos não foram capazes de promover melhora significativa nos parâmetros macroscópicos, tal fato pode ser explicado pela severidade da lesão induzida pelo TNBS após 48 horas. Cestari *et al*, 2011, estudando o mesmo extrato padronizado observou que ambas as doses diminuiu significativamente o parâmetro escore.

Tabela 4 Avaliação dos parâmetros macroscópicos dos efeitos do extrato de *B. dracunculifolia* nas doses de 5mg/kg e 50mg/kg e azatioprina 2mg/kg no modelo experimental agudo da doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

	Escore (0-10)	Extensão lesão(cm)	Peso/comprimento (mg/cm)	Diarréia (%)	Aderência (%)
Não colítico	0**	0**	83,83±2.7**	0	0
Controle-TNBS	7,5 (5-10)	3,5±0.21	146,8±3.5	88,8	57,14
Azatioprina	8,0(5-9)	3,1±0.28	143,5±6.7	100	57,14
Baccharis 5 mg/kg	8,0(5-9)	2,8±0.33	156,0±9.3	100	42,8
Baccharis50 mg/kg	8,0(6-8)	3,1±0.25	156,0±8.4	85,7	57,14

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

Após a administração do TNBS, o consumo de alimento ficou reduzido, sendo que os animais do grupo branco reestabeleceram o consumo após o jejum e diferiram na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle.

Os animais tratados com *B. dracunculifolia*, nas doses de 5mg/kg e 50mg/kg, e com azatioprina aumentaram o consumo de alimento ao longo dos dias, porém não diferiram do grupo controle. (Figura 1).

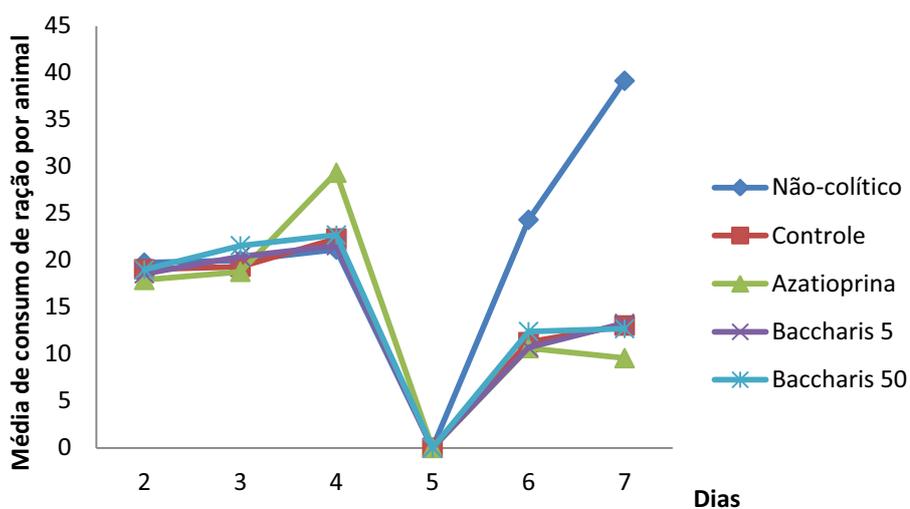


Figura1. Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais.

Após a indução do processo inflamatório de maneira geral, ocorre perda de peso corpóreo. Nossos resultados mostraram que os animais ganharam peso até o dia anterior à indução de colite, mas perderam peso após a indução do processo inflamatório. Houve, conforme esperado, o restabelecimento do peso corpóreo dos animais saudáveis (Figura 2). O tratamento com o extrato de *B. dracunculifolia* e azatioprina não se mostrou efetivo na recuperação do peso corporal dos animais.

Ainda, vale ressaltar que, os animais tratados com o extrato de *B. dracunculifolia* na dose de 50mg/kg tiveram um delta peso positivo no ultimo dia, porém não significativamente diferente dos demais grupos (Figura 2).

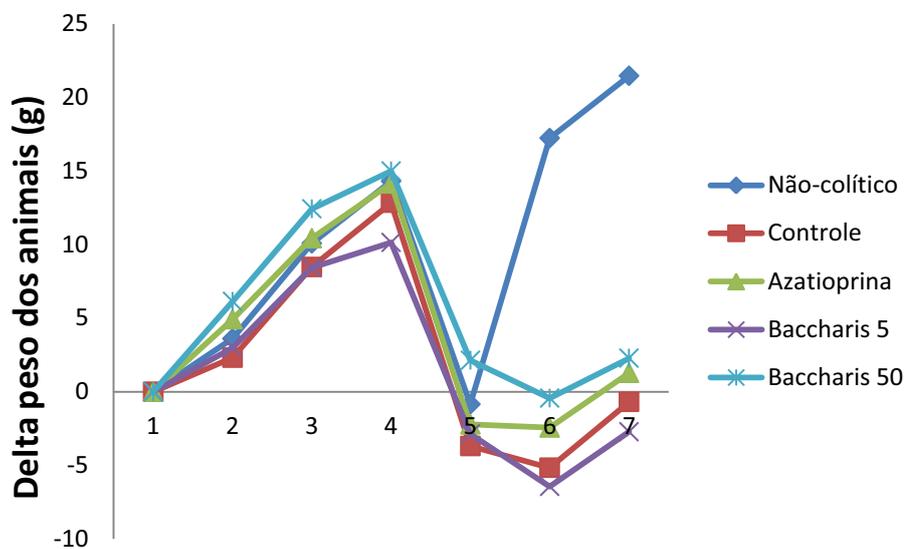


Figura 2. Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em Δ peso corporal.

4. Avaliações Bioquímicas

Os mediadores inflamatórios estão em maior atividade após a administração do TNBS nos animais do grupo controle, dados que podem ser observados pelo aumento na atividade das enzimas MPO (figura 3) e fosfatase alcalina (FA) (figura 5), além do aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (figura 6), INF- γ (figura 7) e IL-1 β (figura 8), quando comparados aos animais do grupo branco. Estes resultados são acompanhados por uma significativa redução no conteúdo de glutathiona colônica (figura 4) como consequência do estresse oxidativo ao qual o cólon está submetido.

A enzima mieloperoxidase é produzida e armazenada principalmente pelos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo considerada um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração desse tipo celular assim como a inflamação tecidual (Navab, 2004). Esta enzima também é responsável pela produção de ácido

hipocloroso, uma espécie reativa que induz o desacoplamento da óxido nítrico sintetase colônica, gerando o radical livre superóxido, cuja função é essencial na fisiopatologia da DII (Karakas e Koenig, 2012). A redução da atividade da MPO pode ser interpretada tanto como uma propriedade anti-inflamatória de um determinado composto, por gerar uma diminuição da infiltração de neutrófilos para a área inflamada, assim como pela redução do estresse oxidativo tecidual (Krawisz *et al.*, 1984, Karakas e Koenig, 2012). Nossos resultados sugerem que a administração do extrato de *B. dracunculifolia* nas doses de 5mg/kg ou 50mg/kg, foi capaz de diminuir a atividade dessa enzima, revertendo as alterações induzidas pelo TNBS e essa diminuição mostrou-se semelhante àquela promovida pelo tratamento com azatioprina (figura 3).

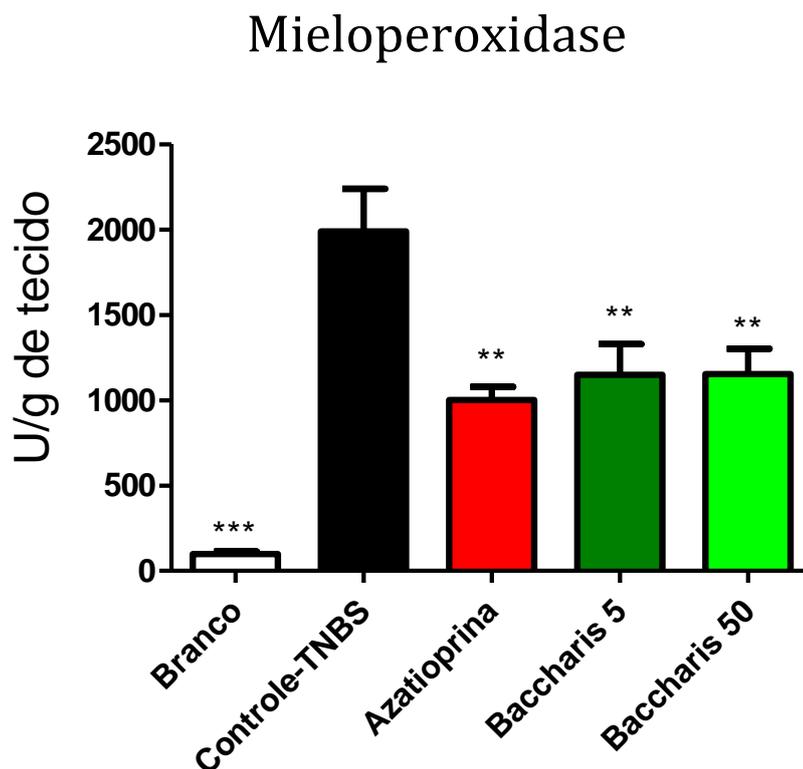


Figura 3 .Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.**

Outro parâmetro avaliado neste estudo foram os níveis de glutathiona total. O GSH é um tripeptídeo linear constituído por glutamato, cisteína e glicina; é considerada a primeira defesa antioxidante intracelular do organismo contra os produtos tóxicos do oxigênio gerados pelo estresse oxidativo, os quais induzem oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, o que resulta na perda de função das membranas biológicas. Após a exposição da GSH em sua forma reduzida ao agente oxidante (ROS) ocorre sua oxidação à sua forma oxidada (GSSG), catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx). A recuperação da GSSG é feita pela enzima glutathiona redutase (GSHred), na presença de NADPH, constituindo assim um ciclo redox essencial para a manutenção da integridade do sistema protetor celular. Quando o sistema de óxido-redução está íntegro há recuperação de GSH, porém sob o excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre desequilíbrio entre o consumo de GSH e produção de GSSG. Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela glutathiona total (GSH+GSSG) (Da Costa *et al*, 2012; Nikki, 2011).

Como pode-se observar na figura 4, nenhum dos tratamentos utilizados, seja com o extrato ou com o fármaco de referência, mostrou-se efetivo na manutenção dos níveis de glutathiona total, demonstrando que após 48 horas da indução do processo inflamatório os tratamentos não foram capazes de impedir a depleção de GSH observada por Cestari *et al.*, 2011.

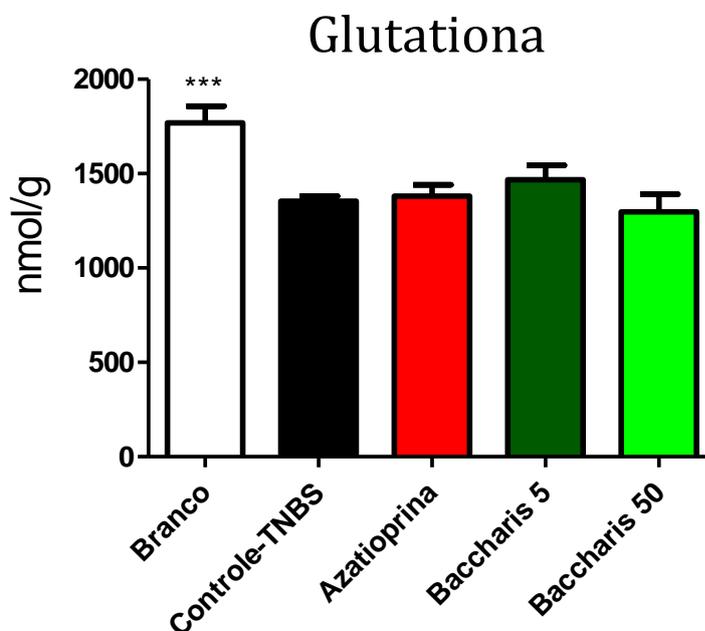


Figura 4 .Avaliação dos níveis de glutaciona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.**

A fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e compreende uma família de enzimas que quelam radicais fosfato em pH alcalino. Essa enzima pode ser encontrada em diferentes tipos celulares, incluindo os neutrófilos (Karlsson *et al.*, 1995) e leucócitos (Smith *et al.*, 1984). Sua função fisiológica é ainda desconhecida, mas sabe-se que esta enzima fica aumentada no processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 2004). Desta forma, a redução na atividade da fosfatase alcalina pode ser interpretada como uma manifestação da atividade anti-inflamatória das substâncias em estudo (Sanchez de Medina *et al.*, 2004). Os tratamentos com as doses de 5mg/kg ou 50mg/kg do extrato ou com o fármaco de referência não diminuiram a atividade da fosfatase alcalina após a administração do TNBS (figura 5).

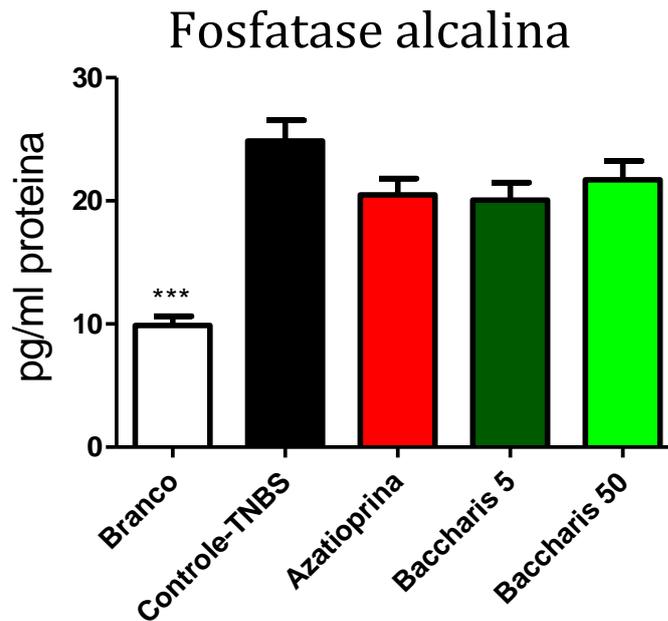


Figura 5. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.**

Citocinas são moléculas do sistema imune indispensáveis para a manutenção da homeostase intestinal. O desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e INF- γ , e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, é visto como o mecanismo central na modulação e mediação do processo inflamatório intestinal em resposta à exposição aos diversos patógenos presentes no intestino. A DC apresenta um perfil de resposta inflamatória mediada por citocinas produzidas por linfócitos T-helper 1, enquanto a RCU apresenta um perfil de resposta T-helper 2 (Hur, 2012).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina pertencente a superfamília de proteínas TNF, que consiste de 18 membros e que pode se ligar a receptores de membrana bem como aos seus receptores solúveis. Agonistas de receptores de TNF desencadeiam vias intracelulares que são diretamente envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência de alguns tipos celulares, como macrófagos e células dendríticas (Múzes, G. *et al*, 2012). O TNF- α é uma das

citocinas pró-inflamatórias mais importantes na DII, capaz de influenciar diretamente o tecido epitelial intestinal e sua secreção promove o rompimento da barreira epitelial, indução da apoptose e secreção de quimiocinas por outras células do sistema imune intestinal (Hur, 2012). Liu e Wang, 2008 mostraram que o TNF- α liberado dos macrófagos durante a resposta inflamatória inicial possui um papel importante no modelo de DII induzida por TNBS. Como pode-se notar na figura 7, o tratamento com a dose de 50mg/kg do extrato de *B. dracunculifolia* foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α quando comparados ao grupo Controle-TNBS, demonstrando que o extrato possui uma atividade anti-inflamatória intestinal por modulação dos níveis de TNF- α (figura 6). De fato, um dos mais recentes tratamentos utilizado na DII, consiste de um anti-anticorpo monoclonal anti-TNF- α , como por exemplo o infliximab, e que tem demonstrado importante melhora nos sintomas da doença (Navarro & Hanauer, 2003).

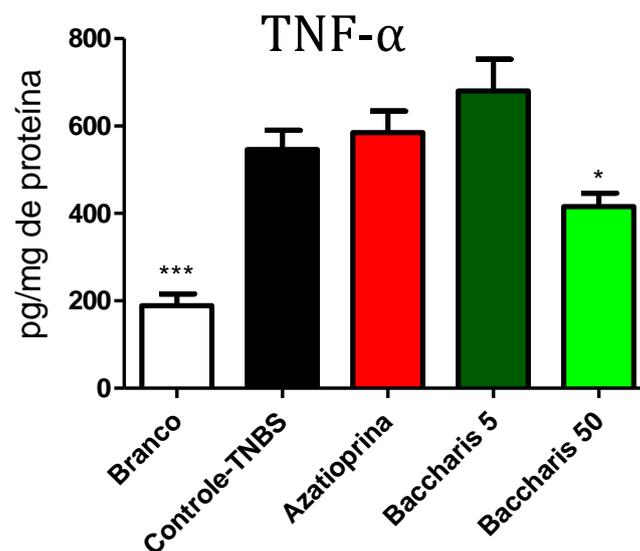


Figura 6 .Avaliação dos níveis de TNF- α em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, comparados ao grupo Controle-TNBS.

Já os interferons são citocinas que desempenham um papel central e complexo na resistência à patógenos nos mamíferos. Os interferons do tipo I (INF- α e INF- β) são secretados por células infectadas por vírus, enquanto os inteferons do tipo II (INF- γ) são secretados por células T-helper-1 e células *natural killer*. O INF- γ regula vários aspectos do sistema imune intestinal, incluindo a estimulação da fagocitose pelos macrófagos, apresentação de antígenos pelo complexo de histocompatibilidade maior I e II (MHC I e MHC II), interação de células T com o endotélio, regula efeitos na proliferação celular e apoptose, além do aumento da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória intestinal, como o gene da STAT 1 (Boehm, 1997). Os tratamentos com as diferentes doses do extrato tratamento não foram capazes de diminuir os níveis de INF- γ , indicando que a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato de *B.dracunculifolia* e da azatioprina não esta relacionada com as vias mediadas pelo INF- γ (figura 7).

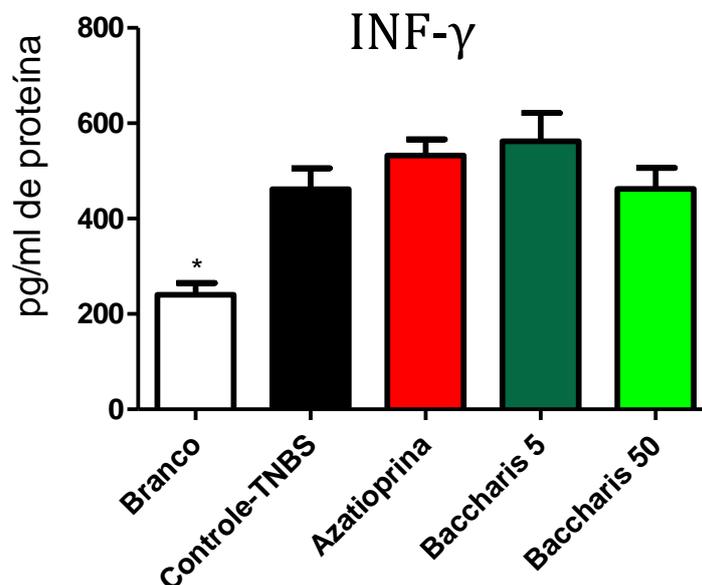


Figura 7. Avaliação dos níveis de INF- γ em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle-TNBS.

As citocinas da família IL-1 desempenham um importante papel na DII, e são representadas por duas formas distintas de citocinas, a IL-1 α e a IL-1 β , cujas propriedades mais importantes são a ativação de COX-2, óxido nítrico sintetase induzível e de fosfolipase A-2, produzidas por diferentes tipos celulares (Múzes, G. *et al*, 2012). O antagonista endógeno do receptor de IL-1 (IL-1Ra) regula a homeostase do intestino de modo que se pode fazer um paralelo entre o aumento da relação IL-1/IL-1Ra e a atividade da colite, enquanto, no tecido normal essa relação se mantém constante. Os macrófagos e os monócitos são os principais tipos celulares que produzem IL-1. A IL-1 β também está relacionada com a infiltração de células inflamatórias na mucosa intestinal, com o aumento da atividade de MPO, e com a necrose tecidual (Múzes, G. *et al*, 2012), características do modelo e verificadas no presente estudo. Os tratamentos com as diferentes doses do extrato de *B. dracunculifolia* não foram capazes de diminuir os níveis desta citocina, sugerindo que o extrato não exerce efeito modulador sobre IL-1 β , pelo menos nesse modelo e nestas condições experimentais. Em contraste o tratamento com o fármaco de referencia diminuiu os níveis dessa citocina (figura 8).

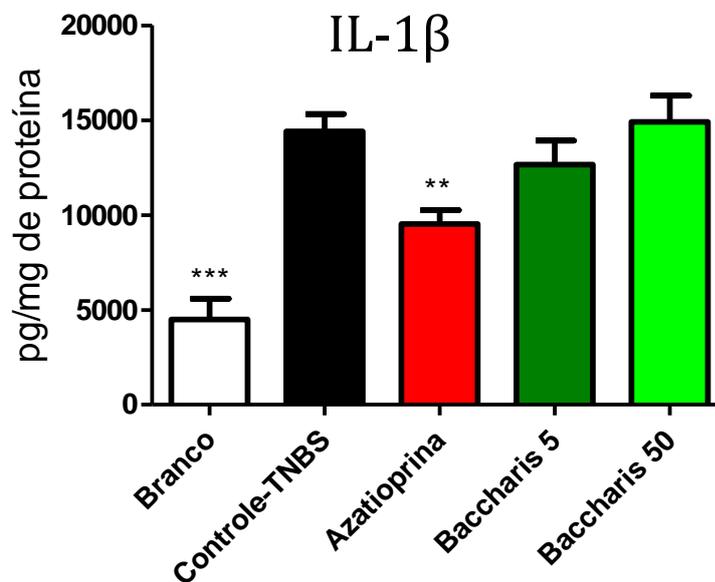


Figura 8 Avaliação dos níveis de IL-1 β em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, comparados ao grupo Controle-TNBS.

A interleucina 10 (IL-10) é considerada a citocina anti-inflamatória mais importante do sistema imune. Ela inibe a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando assim o processo inflamatório na mucosa intestinal. A IL-10 se liga aos receptores *toll-like* sendo os macrófagos e as células dendríticas as principais fontes de IL-10. O papel principal da IL-10 no sistema imune intestinal foi bastante estudado em camundongos *knockout* para esta citocina. Na RCU a expressão do RNAm de IL-10 está aumentada nas células T e também nas células T regulatórias, atuando na patogênese da DII (Múzes, G. *et al*, 2012; Hur, 2012). Com relação a IL-10 (figura 10), o tratamento com o extrato de *B.dracunculifolia* na dose de 5mg/kg aumentou de forma significativa os níveis desta citocina, quando comparados ao grupo controle-TNBS (figura 9), indicando que o extrato estimula a produção de uma citocina anti-inflamatória, o que auxilia a reversão do processo inflamatório intestinal.

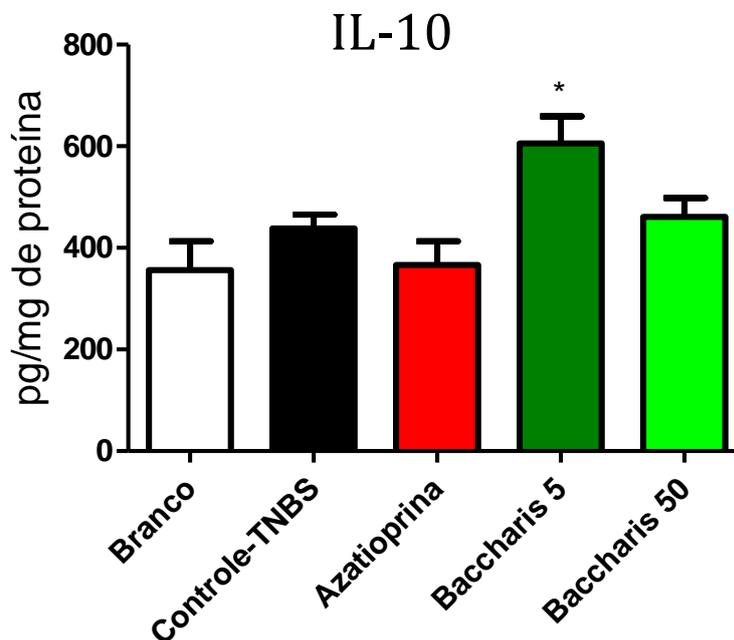


Figura 9 Avaliação dos níveis de IL-10 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, comparados ao grupo Controle-TNBS.

De forma resumida, podemos verificar que os efeitos protetores produzidos pelo extrato de *B. dracunculifolia* na lesão intestinal promovida por TNBS está relacionado à redução do estresse oxidativo via atividade sequestradora de radicais livres, diminuição da atividade enzimática da mieloperoxidase com consequente inibição da produção de ácido hipocloroso e inibição da peroxidação lipídica, conforme descrito por Cestari *et al.*, 2011, acompanhado de efeitos inibitórios sobre a produção de TNF- α e aumento de IL-10.

5. Avaliações Moleculares

A expressão relativa de alguns genes que regulam a produção de importantes mediadores associados ao processo inflamatório intestinal (HSP 70, heparanase, HPRT e NF- κ B) também foi avaliada no presente estudo. Estudos preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) demonstraram a participação destes genes no modelo experimental de DII induzida por TNBS em ratos, portanto tais genes foram selecionados para o presente estudo.

As *heat shock proteins* (HSPs) são proteínas altamente conservadas em quase todos os seres vivos, e estão relacionadas com diversas funções biológicas. As HSPs são divididas em duas categorias principais: as HSPs constitutivas e as HSPs induzíveis. As HSPs induzíveis, como a HSP 70, são sintetizadas a partir de condições de estresse, conferindo assim proteção celular por sua habilidade de estabilizar determinadas proteínas em situação crítica, prevenindo sua desnaturação e preservando suas funções.

A expressão colônica de HSP 70 é importante para a manutenção da homeostase intestinal, tornando as células da mucosa menos suscetível à injúria promovida pelo estresse externo causado por agentes químicos, infecções, inflamação e hipóxia, preservando assim as funções da mucosa intestinal (Hu, 2009).

Estudos demonstraram que a expressão do gene de HSP 70 está aumentada em pacientes com DC e RCU (Ludwig *et al.*, 1999; O Petrof *et al.*, 2004). Além disso, modelos experimentais de colite induzida por DSS mostraram que a síntese e a expressão do gene de HSP 70 estão maiores em relação aos animais não-colíticos (Tanaka *et al.*, 2007). Por outro lado, as células intestinais são mais resistentes ao estresse quando ocorre uma indução primária das *heat shock proteins*, comprovando assim sua função protetora, visto que a produção de HSP 70 recupera prontamente as proteínas danificadas pelo estresse, protegendo o tecido intestinal de maiores danos (Hu, 2009).

Em nosso estudo, similar ao observado por Tanaka *et al.*, 2007 no modelo de DSS, verificamos um aumento da expressão relativa do gene da HSP70 após a administração do TNBS. O pré-tratamento com azatioprina e com o extrato de *B.dracunculifolia* nas doses de 5 e 50mg/kg evitou o aumento da expressão deste gene provocado pelo TNBS, em relação aos animais do grupo controle-TNBS (figura 10), mostrando que a atividade anti-inflamatória do extrato pode estar envolvida com a regulação da expressão relativa do gene de HSP 70.

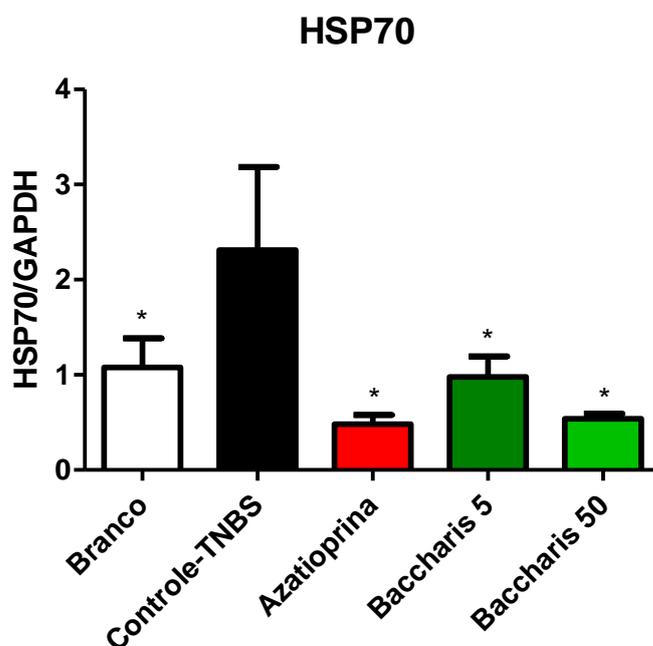


Figura 10 Avaliação da expressão relativa de HSP70 em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. * $p < 0,05$

Outro gene analisado foi o gene da Hipoxantina Fosforribosiltransferase (HPRT) que é uma transferase que cataliza a reação de conversão de hipoxantina e guanina à inosina-monofosfato e guanosina-monofosfato, respectivamente.

Em seres humanos a deficiência ou alteração funcional desta enzima está relacionada com a gênese de diferentes fisiopatologias observadas no sistema urinário, como a síndrome de Kelley-Seegmiller, e também com doenças do trato gastrointestinal. A literatura relata que o mau funcionamento da HPRT está intimamente relacionado com hiperuricemia, retardamento mental, coreoatose e um comportamento compulsivo de auto-mutilação (Ding *et al*, 2012).

Por outro lado, o bom funcionamento desta enzima garante o metabolismo saudável das tiopurinas, bem como a conversão de 6-mercaptopurina (6-MP) em seus metabólitos ativos (TGNs), garantindo assim a produção e reciclagem de bases purínicas auxiliando no metabolismo de células T, que por sua vez produzem citocinas pró-inflamatórias importantes para a manutenção da inflamação colônica (Ding *et al*, 2012). Após a administração do TNBS houve aumento significativo em relação à expressão relativa do gene da HPRT, demonstrando que o processo inflamatório intestinal induzido por TNBS envolve a expressão deste gene, cuja expressão, apesar de reduzida, não foi afetada de forma significativa por nenhum dos tratamentos utilizados (figura 11).

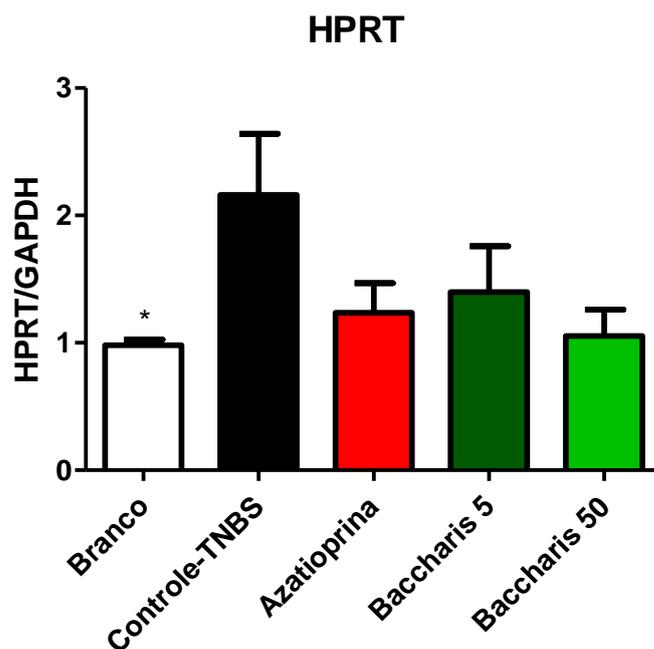


Figura 11 Avaliação da expressão relativa de HPRT em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$.

A Heparanase é uma endo- β -glucuronidase capaz de clivar cadeias laterais de heparan-sulfato de proteoglicanos presentes na matriz extracelular e nas superfícies das células, apresentando um importante papel na estrutura celular, na neurovascularização e processo de autoimunidade (Watermann *et al.*, 2007).

Segundo Zhang *et al.*, 2010 esta enzima é capaz de ativar fatores de crescimento que promovem a proliferação celular e a angiogênese. Estudos clínicos mostraram que a expressão da heparanase está aumentada em tecidos danificados por Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn (Watermann *et al.*, 2007).

Vários autores têm sugerido que a heparanase pode representar um importante alvo terapêutico para novos fármacos, especialmente em doenças crônicas e/ou autoimunes como a DII, outros processos inflamatórios e no câncer (Nasser, 2007; McKenzie, 2007). Apesar disso, nosso estudo não detectou nenhuma diferença significativa entre nenhum dos grupos analisados nesta fase do processo inflamatório intestinal (figura 12).

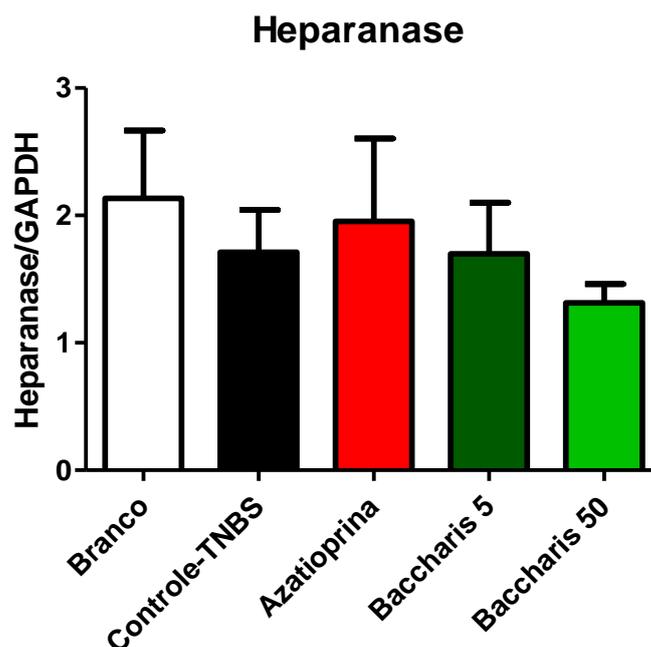


Figura 12 Avaliação da expressão relativa de Heparanase em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M.

O fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) faz parte de uma importante via sinalizadora com um papel crucial na regulação de um vasto número de genes envolvidos na resposta inflamatória e na sobrevivência celular, incluindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, apoptose, moléculas de adesão intercelular (ICAM, VCAM), COX-2 e NO (Hur *et al*, 2012). A ativação deste fator ocorre principalmente por duas vias de sinalização conhecidas como via clássica e via alternativa, essas vias são ativadas por citocinas pro-inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, estresse oxidativo e infecções virais. A primeira via afeta primariamente diversos dímeros do NF- κ B, dos quais o mais comum é o heterodímero Re1A(p65)-p50, por meio de fosforilação induzida por proteólise de quinases responsáveis pela ativação do NF- κ B, chamadas de quinases I κ -B (IKK), enquanto que a segunda via afeta somente a ativação do dímero Re1B-p52, por meio da fosforilação induzida por proteínas precursoras (Karin, 2005). Evidências sugerem que a via clássica é a mais importante para a iniciação e propagação da resposta inflamatória (Senftleben *et al.*, 2001), enquanto a segunda é mais importante para o desenvolvimento de

órgãos linfóides secundários e imunidade adaptativa (Bonizzi & Karin, 2004). Tem sido considerado improvável que a simples ativação da via clássica seja suficiente para a iniciação da resposta inflamatória, visto que muitos dos promotores estudados, tais como o INF- γ , necessitam da assistência de outros fatores (Karin, 2004). No modelo de colite induzida por TNBS a expressão deste fator de transcrição está elevada (Ouyang et al, 2012).

Uma estratégia terapêutica para o tratamento da DII seria atenuar a via do NF- κ B durante a cascata inflamatória por bloquear simultaneamente a expressão de vários genes de mediadores inflamatórios. Mesmo considerando a participação deste fator no processo inflamatório intestinal, nossos resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação à expressão relativa de NF- κ B. É importante considerar que apesar da expressão do gene deste fator não ter sido afetada, não se pode afirmar que o mesmo não esteja envolvido na resposta inflamatória, visto que o estresse oxidativo promovido especialmente por peróxido de hidrogênio é capaz de ativar o fator de transcrição NF- κ B (Bowie e O'Neill, 2000). No presente estudo foi avaliada apenas a expressão deste gene e não os níveis deste fator de transcrição (figura 13).

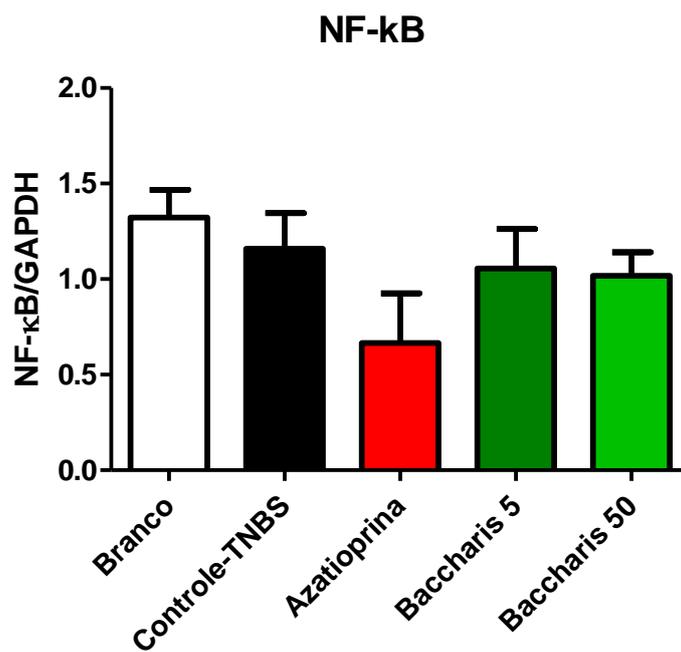


Figura 13 Avaliação da expressão relativa de NF-κB em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M.

Desta forma, se verificou que o tratamento com o extrato padronizado de *B dracunculifolia* interferiu apenas na expressão do gene da HSP70.



Conclusão

Com base no objetivo proposto e nos resultados e discussões apresentadas, foi possível concluir que:

1. A atividade anti-inflamatória intestinal do extrato de *B.dracunculifolia* está relacionada com a redução da atividade da enzima mieloperoxidase, redução nos níveis de TNF- α , aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e por evitar o aumento da expressão relativa do gene da HSP 70;
2. O efeito protetivo observado também está associado com a atividade sequestradora de radicais livres avaliada pelo método de DPPH e pela redução da atividade da mieloperoxidase.



Bibliografía

- ABAD-LACRUZ, A., *et al.* The effect of total enteral tube feeding on the vitamin status of malnourished patients with inflammatory bowel disease. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, vol. 58, p.428-435, 1988.
- ABRAHAM, C. & CHO, J.H. Inflammatory Bowel Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.361, p.2066-78, 2009.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods on Enzymology**, vol.113, p.548-555, 1985.
- ARDIZZONE, S. & PORRO G.B. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. **Journal of Internal Medicine**, vol.252, p.475-496, 2002.
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, vol.31, p.3-15, 2000.
- BAUMGART, D.C. & SANDBORN, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, Vol.369, pp.1641-57, 2007.
- BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**, vol.268, p.622-630, 1995.
- BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **Journal of Biological Chemistry**, vol.164, p-321-329, 1946.
- BLANCHA, G. C., & VISIOLI, F. Polyphenols and health: Moving beyond antioxidants. **Journal of Berry Research**, vol. 2, p.63-71, 2012.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, vol. 118, p. 1199-1200, 1958.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., AND HOWARD, J.C.. Cellular responses to interferon- γ . **Annual Review of Immunology**, vol.15, p.749-795,1997.
- BONIZZINI G. & KARIN M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, vol.25, p.280-288, 2004.
- BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.521-533, 2003.
- BOWIE, A. & O'NEILL, L. A. J. Oxidative Stress and Nuclear Factor- κ B Activation a Reassessment of the Evidence in the Light of Recent Discoveries. **Biochemical Pharmacology**, vol. 59, p.13-23, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 28, p. 25-30, 1995.
- CARTER, *et al.* Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, Vol.53: pp.v1-v16, 2004.
- CESTARI, S. H., BASTOS, J. K., DI STASI, L. C. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Baccharis dracunculifolia in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

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

COSNES, J. *et al.* Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, vol.140, p.1785–1794, 2011.

CUFFARI, C. *et al.* 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. **Gut**, vol.39, p.401-406, 1996.

CUFFARI, C. *et al.* Utilization of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimize azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, vol.48, p.642-646, 2001.

DA COSTA, L. A., *et al.* Nutrigenetics and Modulation of Oxidative Stress. **Annals of Nutrition & Metabolism**, vol.60, p.27-36, 2012.

DERIJKS, L.J.J. *et al.* Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacological Therapy**, vol.24, p.715–729. 2006.

DI STASI, L.C., *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, vol.70, p.315-320, 2004.

DING, L. *et al.* Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase Activity Is Related to 6-Thioguanine Nucleotide Concentrations and Thiopurine-induced Leukopenia in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**, vol.18, p.63-73, 2012.

DURICOVA, D. *et al.* 5-Aminosalicylic acid dependency in Crohn's disease: A Danish Crohn Colitis Database study. **Journal of Crohn's and Colitis**, vol.5, p. 575-581, 2010.

FERNANDEZ-BAÑARES, F., GASSULL, M.A. *Role of dietary management and artificial nutritional support in the treatment of inflammatory bowel disease* In: Gassul MA, Obrador A, Chantar C (eds.). **Management of Inflammatory Bowel Disease**, p.269-277, 1994.

FOLIGNÉ, B., *et al.* Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects. **Digestive Diseases and Sciences**, vol.51, p. 390–400, 2006.

GÁLVEZ, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA F.; JIMENEZ. J.; ZARZUELO. A. Studies in natural products chemistry. Bioactive natural products (Part f). **Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders**, vol. 25, p.607-49, 2001.

GÁLVEZ, J.P.; CRUZ, A.; ZARZUELO, F.; SANCHES DE LA CUESTA. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differ from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, vol.51, p.127-133, 1995.

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

GONÇALVES, C.C.M.; HERNANDES, L.; OLIVEIRA, N.L.B.; NATALI, M.R.M. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Ciência, Cuidado e Saúde**, vol.7, p.107-111, 2008.

GONZÁLEZ, R. *et al.* Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, vol.71, vol.4, p.243-50, 2001.

GUIMARÃES, N.S.S., *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, vol.50, p.1091-1097, 2012.

HEYWOOD, V. H. Flowering plants of the world. **New York: Oxford University Press**, 1993.

HU, S. *et al.* Inflammation-induced, 3-UTR-dependent translational inhibition of Hsp70 mRNA impairs intestinal homeostasis. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol.296, p.1003-1011, 2009.

HUR, S. J., *et al.* Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research**, vol. 32, p. 801 - 816, 2012.

JANI, N. *et al.* Medical therapy for ulcerative colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, vol.31, pp.147-166, 2002.

JOLY, A. B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1967.

JURJUS, A.R.; KHOURY, N.N.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, vol.50, p.81-92, 2004.

KARAKAS, M. & KOENIG, W. Myeloperoxidase Production by Macrophage and Risk of Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Report**, vol.14, p.277-283, 2012.

KARIN M. Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. **Proceedings of the American Thoracic Society**, vol.2, p.386-390, 2005.

KARIN, M., *et al.* Mitogen activated protein kinases as targets for development of novel anti-inflammatory drugs. **Annals of Rheumatic Diseases**, vol.63, p.62-64, 2004.

KARLSSON, A. *et al.* Neutrophil Alkaline Phosphatase Activity Increase in Bacterial Infections Is Not Associated with a General Increase in Secretory Vesicle Membrane Components. **Infection and Immunity**, vol.63, vol.3, p.911-916, 1995.

KRAWISZ, J.E., *et al.* Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology**, vol.87, p.1344-1350, 1984.

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

KUBES, P., Wallace JL. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. **Mediators of Inflammation**, vol.4, p.397-405, 1995.

KUMAZAWA, S., *et al.* Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol.51, p.740-742, 2003.

LAKATOS, P.L. *et al.* Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"? **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.12, p.1829-1841, 2006.

LEMOS, M., *et al.* Baccharis dracunculifolia, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol.59,p.603-608, 2007.

LIH-BRODY, L., *et al.* Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.41, p.2078-2086, 1996.

LIU X, WANG J. Anti-inflammatory effects of iridoid glycosides fraction of Folium syringae leaves on TNBS-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.133, p.780-787, 2011.

LOGUERCIO, C. *et al.* Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p. 1204-1211, 1996.

LUCHINI, A.C., *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol.37, p.1343-1350, 2008.

LUDWIG, D. *et al.* Enhanced Intestinal Expression of Heat Shock Protein 70 in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. **Digestive Diseases and Sciences**, vol.44,p.1440-1447, 1999.

MALAGARRIGA HERAS, R. D. P. Nomenclator Baccharidinarum Omnium. **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, vol.37, p.129-224, 1976.

MARX, J. How the glucocorticoids suppress the immunity. **Science**, vol.270, No.13, 1995.

MCKENZIE, E.A. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. **British Journal of Pharmacology**, vol.151, p.1-14, 2007.

MENEZES, H. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae). **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, vol.72, p.1-64, 2005.

MILLER, M.J.S., Grisham B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediators of Inflammation**, vol. 4,p.387-396, 1995.

MISSIMA, F., *et al.* Effect of Baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 59, p.463-468, 2007.

MORRIS, G.P., *et al.* Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, vol.96, p.795-803, 1989.

MORRISON, G. *et al.* Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, vol.38, 2009.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal plants of Brazil. **Michigan: Reference Publications**, Inc. Algonac, 2000.

MÚZES, G., MOLNÁR, B., TULASSAY, Z. & SIPOS, F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, vol.18, p.5848-5861, 2012.

NAKANISHI, I., *et al.* Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, vol.1, p.1452-1454, 2003.

NASSER, N.J. *et al.* Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol.354, p.33-38, 2007.

NAVAB, M. ET AL. **Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis** The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of lipid research*, vol. **45**, p. **993-1007** 2004.

NAVARRO, F. & HANAUER, S.B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. **The American Journal of Gastroenterology**, vol.98, No.12, 2003.

NIKI, E. Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? **Journal of Berry Research**, vol. 1, p. 169-176, 2011.

O'PETROF, E. *et al.* Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. **Chinese Journal of Digestive Diseases**, vol.5, p.45-50, 2004.

OUYANG, N. *et al.* MC-12, an Annexin A1-Based Peptide, Is Effective in the Treatment of Experimental Colitis. **Plos One**, 2012.

PARK, Y.K., *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol.52, p.1100-1103, 2004.

PAULINO, N., *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artemillin C, in Brazilian propolis. **European journal of Pharmacology**, vol.587, p.296-301, 2008.

PFAFFL, M. W. A New mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol.29, 2001.

PROBERT, C.S.J., *et al.* Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. **Gut**, vol.52, p.998-1002, 2003.

QUEIROGA, C.L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A.J. Composition of the essential oil of Vassoura. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol.1, p.105-109, 1990.

RAMAKERS, C., *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Vol.339, p.62-66, 2003.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E., *et al.* Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **Journal of Nutrition**, vol.132, p.3263-3271, 2002.

ROGLER, G. *et al.* Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol.24, p.157-165, 2010.

RYAN, B.M. *et al.* Aminosalicylates and Colorectal Cancer in IBD: A Not-So Bitter Pill to Swallow. **The American Journal of Gastroenterology**, vol.98, No.8, 2003.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol.278, p.771-779, 1996.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. **Life Sciences**, v.70, p.3097-3108, 2002.

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

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

SANDLE, G.I. *et al.* Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. **Gut**, vol.27, p.309-316, 1986.

SCRIBANO, M.L. Adverse Events of IBD Therapies. **Inflammatory Bowel Disease**, vol.14, p.210-S211, 2008.

SENFTLEBEN, U. *et al.* Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. **Science**, vol.293, p.1495-1499, 2001.

SILVA, I.D., *et al.* Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. **Mutagenesis**, vol.12, p.383-390, 1997.

SINGH, V. P. *et al.* Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & others Lipid Mediators**, v.71, p.163-175, 2003.

SINGLETON, V. L.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, vol. 299, p. 152-178, 1999.

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

- SOUZA, M.H.L.P. *et al.* Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.39, n.2, 2002.
- STROBER, W.; FUSS, I.J.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual Reviews of Immunology**, vol.20, p.495–549, 2002.
- STROBER, W.; LUDVIKSSON, B.R.; FUSS, I.J. The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. **Annals of Internal Medicine.**, vol.128, 1998.
- SU, L., *et al.* Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology**, v.136, p.551–563, 2009.
- TANAKA, K. *et al.* Genetic Evidence for a Protective Role for Heat Shock Factor 1 and Heat Shock Protein 70 against Colitis. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.282, p.23240–23252, 2007.
- THUKKANI, N., *et al.* Epidemiologic Characteristics of Patients with Inflammatory Bowel Disease Undergoing Colonoscopy. **Inflammatory Bowel Disease**, vol 6, p.1333-1337, 2010.
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, vol.28, p.85-94, 2005.
- VICTORIA, C.R.; SASSAKI, L.Y.; NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.46, p.20-25, 2009.
- WALLACE, J.L. Eicosanoids In: Targan SR, Shanahan F (eds.). **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**, p.123-132,1994.
- WATERMAN, M. *et al.* Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Modern Pathology**, vol.20, p.8–14, 2007.
- WHITTLE, B.J.R. & VARGA, C. New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosalicylates: the role of heme oxygenase. **Pharmacological Reports**, vol.62, p.548-556, 2010.
- WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions.**, v.186, p.211–218, 2010.
- YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, vol.13, p.1893-1896, 2007.
- YUN, L. & HANAUER, S. Selecting appropriate anti-TNF agents in inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, vol.3, p.235-48, 2009.
- ZHANG, Y. *et al.* Focus on Molecules: Heparanase. **Experimental Eye Research**, vol.91, p.476-477, 2010.

ZHENG, L.; GAO, Z.Q.; WANG, S.X. A chronic ulcerative colitis model in rats.
World Journal of Gastroenterology, vol.6, p.150-152, 2000.