

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE PROPOLIS VERMELHA NO MODELO DE
COLITE AGUDA**

GISLAINE BARBOSA BEZERRA

Aracaju
Março – 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE PROPOLIS VERMELHA NO MODELO DE
COLITE AGUDA**

Dissertação de Mestrado submetida à
banca examinadora para a obtenção do
título de Mestre em Saúde e Ambiente, na
área de concentração Saúde e Ambiente.

GISLAINE BARBOSA BEZERRA

Orientadores

Juliana Cordeiro Cardoso, Ph.D.

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph.D.

Aracaju
Março – 2016

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO
DA PROPÓLIS VERMELHA NO MODELO DE COLITE AGUDA**

Gislaine Barbosa Bezerra

“DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.”

Aprovada por:

Juliana Cordeiro Cardoso, Ph.D.

Orientadora

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph.D.

Orientador

Cassiano Francisco Weege Nonaka, Ph.D.

Universidade Estadual da Paraíba

Isabel Bezerra Lima-Verde, Ph.D.

Universidade Tiradentes

Sônia Oliveira Lima, Ph.D.

Universidade Tiradentes (suplente)

Aracaju
Março – 2016

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por seu amor incondicional.

Aos meus pais, Joaquim e Raimunda que nunca mediram esforços para apoiar a minha educação e me transformaram no que sou hoje. Ao meu marido Ricardo, por me apoiar e compreender as minhas ausências.

Aos meus orientadores por não terem desistido! mesmo em face as minhas dificuldades contribuindo assim para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido esta experiência na terra e por ter me proporcionado saúde e resiliência para lidar com as adversidades.

A minha família por nunca terem medido esforços para me proporcionar saúde e educação.

Ao meu marido, Ricardo por todo o amor demonstrado, pelo apoio integral, saiba que palavras nunca irão expressar meu amor e carinho por tudo que tem me proporcionado.

Agradeço a minha orientadora: Juliana Cordeiro por todo o apoio, compreensão e por acreditar que mesmo com todas as minhas limitações haveria condição de concluir este projeto.

Ao meu orientador Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior os meus sinceros agradecimentos por não desistir de mim e por não ter permitido que eu desistisse também. Obrigado por ter tido toda a paciência do Mundo em me inserir no mundo da inflamação e histopatologia e pela amizade também. Levarei comigo todos os seus exemplos de dedicação, ética e profissionalismo de um pesquisador e de um professor que tem por objetivo o desenvolvimento do aluno.

A professora Edna Aragão, por todo o apoio demonstrado por sempre ter uma escuta amiga, a você todo o meu carinho e meu muito obrigada.

Aos novos amigos formados no mestrado: Daniel Japa, Tessy, Mayanna, Bia, Kleber, Thiago, Alexandre, Beth, Ceci, Edlam, Vivi, Adriano, Dayse, Larissa, Nanda Eliana, Bel, Rosa e Andreia amiga e conselheiras. Aos fofíssimos do LBPME (Angela, Camilinha, Felipe, Fani, Erick, Sheila, Maria Fernanda, Dani, Bruno, Ailma e aos super: Reinaldo e Rafael) e um obrigado carinhoso por mais três amigas especiais que fiz no laboratório Rosenely, Marismar e Berna que mesmo em meio ao pouco tempo, sempre reservaram um tempo para me apoiar.

Aos professores da UFS: Dr. Enilton (Lafap) por ter contribuído com este projeto e Sandra Lauton, por ter me permitido usar as instalações da UFS e pelo apoio ao projeto

A Marília e Grace do Departamento Fisiologia UFS por não terem poupado esforços em apoiar este projeto.

Aos alunos de iniciação científica: Dilma, Luana e Rafael Valois obrigada por todo empenho e carinho, vocês caíram do céu para me ajudar, muito obrigada.

Aos professores que participaram das bancas de seminários e qualificação, muito obrigada pela leitura dedicada e todas as observações valiosíssimas que aprimoraram o trabalho.

As Nutris do HUSE por sempre terem me ajudado. Conviver com vocês é sem dúvida uma benção na minha vida. A Fernanda Roberto Araújo, minha chefe por toda a paciência dispensada não medindo esforços na adequação das escalas para que eu pudesse levar ao termo este projeto.

Aos amigos da FASE e em especial May, Adri, LiLi, Janaína, Marta Magalhães e Carla Bamberg, por compreenderem minha ausência em face desta experiência, por me apoiarem sempre.

As minhas amigas: Danielle Gomes Lyra, Elo e Flavia, por compreenderem a minha ausência nestes dois anos sem contudo modificar a nossa amizade.

Aos funcionários do biotério da Unit: Marcos, Carlos e Julia por me apoiarem também e a todos que diretamente e indiretamente me ajudaram, meu carinho e meu muito obrigada.

Aos funcionários do administrativo da Unit Alisson e Tais (Tata) sempre muito prestativos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Doença inflamatória intestinal (DII)	22
3.2 Fisiopatologia da DII	26
3.2.1 Alterações genéticas	26
3.2.2 Estimulação exacerbada do sistema imunológico	28
3.2.3 Desequilíbrio na produção e característica do muco	33
3.2.4 Disfunção luminal	34
3.2.5 Barreira epitelial	35
3.2.6 Radicais livres e Espécies Reativas de oxigênio	36
3.2.7 Papel do óxido nítrico na fisiopatologia da DII	40
3.3 Modelos Experimentais da Doença inflamatória intestinal	42
3.4 Tratamento da DII	47
3.5 Produtos Naturais testados em modelo de inflamação intestinal	48
3.6 Própolis vermelha	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55

4.1 Obtenção e caracterização do Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV). ...	56
4.1.1 Extração e Rendimento.....	56
4.1.2 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	56
4.2 Ensaio biológico	57
4.2.1. Aspectos Éticos.....	57
4.2.2. Delineamento experimental	57
4.2.3 Procedimentos de indução de colite química.....	58
4.3 Análise Anatomofológica	58
4.3.1 Eutanásia dos animais e exame macroscópico post-mortem.....	58
4.3.2 Análise microscópica	59
4.4 Ensaios antioxidantes e dosagem da mieloperoxidase	61
4.4.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase	61
4.4.2 Determinação da Lipoperoxidação	61
4.4.3 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase.....	62
4.4.4 Determinação da atividade da catalase	62
4.5 Expressão imunohistoquímica do óxido nítrico sintase induzida (iNOS)	63
4.6 Análise estatística	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Rendimento e caracterização química do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha	65
5.2 Análise macroscópica dos espécimes de colo.....	66
5.3 Avaliação do efeito de EHPV sobre os níveis teciduais de mieloperoxidase e estresse oxidativo	67
5.4 Análise histológica dos espécimes de colo	68
5.5 Análise da expressão imunohistoquímica da iNOS	70
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÕES	77
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
9 REFERÊNCIAS	81

10 ANEXO	93
10. 1 ANEXO A- Aprovação CEUA	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Diferenças morfológicas encontradas nas DC e UC.....	25
Quadro 2. Formação dos grupos experimentais de acordo com o pré-tratamento utilizado.....	58
Quadro 3. Análise macroscópica do dano a mucosa	59
Quadro 4. Parâmetros histológicos de caracterização da resposta inflamatória	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e quantificação dos principais compostos químicos da EHPV identificados de acordo com o tempo de retenção ou espectros de absorção.....	66
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variações genéticas e via de desenvolvimento da DII. Fonte: Adaptado de (KNIGHTS <i>et al.</i> , 2013).	27
Figura 2. Mecanismo de iniciação do processo inflamatório na DII. Adaptado de (ORDÁS <i>et al.</i> , 2012).	29
Figura 3. Teorias na perpetuação do processo inflamatório. Fonte: própria.	32
Figura 4. Apresentação da sequência de formação e detoxificação de ERO pelas enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Adaptada de FERREIRA, <i>et al.</i> (1997).	37
Figura 5. Análise cromatográfica de EHPV realizada em CLAE.	65
Figura 6. Gráfico de escores macroscópicos.	66
Figura 7. (A) Avaliação da massa, (B) comprimento (C) e relação massa/comprimento dos espécimes do colo.	67
Figura 8. (A) MPO, (B) MDA, (C) e catalase (D) SOD em amostras de tecido do colo dos diferentes grupos.	68
Figura 9. Fotomicrografias de cortes histológicos das amostras de colo (coradas em hematoxilina/eosina).	69
Figura 10. (A) Escores médios de intensidade da resposta inflamatória e (B) soma dos danos histológicos em amostras de colo dos diferentes grupos.	70
Figura 11. Fotomicrografias mostrando a expressão imuno-histoquímica da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em amostras de colo dos grupos experimentais.	70
Figura 12. Expressão imuno-histoquímica de iNOS em amostras de colo dos diferentes grupos.	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AA – Ácido Acético

A4βt – Integrina

APC – Células apresentadora de Antígenos

CARD 15 – Cromossomo ligado a Doença Inflamatória Intestinal

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CAT – Enzima Catalase

CD – Células Dendríticas

CD4+ – Célula do Sistema Imune Adaptativo

CD54 – Molécula de Sinalização Intracelular Auxiliar

CIAA – Colite induzida por ácido acético

CLX – Cicloxigenase

DC – Doença de Chron

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DSS – Dextrano Sulfato de Sódio

EHPV – Extrato Hidroalcoólico de Própolis Vermelha

EPEC – *Escherichia coli Enteropatogênica*

ICAM-1– Molécula de Adesão Intracelular

IL– Interleucina

iNOS- óxido nítrico induzida

INF-γ –Interferon γ

FIT – (fator intestinal trifóide)

LM – Lamina Própria

MAC – Macrófagos

MDCAM- Molécula de Adesão Adressina Vascular

MPO – Enzima Mieloperoxidase

MUC 2/MUC3 / MUC 17 – Tipo de muco

NFK-B – Fator Nuclear Kappa –B

NKT – Células Natural Killer

NO – Óxido nítrico

NOD – Receptor De Reconhecimento

REDOX – Quantidade equivalente entre substâncias oxidantes e anti oxidantes.

Sham – Animal Controle Sem Indução De Colite

SLI – Sistema Linfóide Intraperitoneal

TBARS – Substâncias reativa ao tiobarbitúrico

TGF – β – Fator de crescimento transformador Beta
Th – Célula Do Sistema Imunológico do Tipo Helper
TJS – “*Tight Junctions*”- Junções Intimamente Ligadas das Células Epiteliais
TLR – Receptor Do Tipo Toll Like
TNBS – Ácido 2,4,6- Trinitrobenzeno Sulfônico Hapteno Indutor de Colite
TNF α – Fator Tumoral Alfa
Tween 80 – veículo para diluição do EHPV
UC – Do inglês *ulcerative colitis*, designando colite ulcerativa.

AVALIAÇÃO DO EFEITO COLO PROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA NO MODELO DE COLITE AGUDA

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), representadas pela Colite ulcerativa (UC) e Doença de Chron (DC), são inflamações de natureza crônica que afeta todo ou parte do trato gastrointestinal. O tratamento atual das DII, baseado no uso de agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e/ou imomoduladores, provoca uma série de efeitos colaterais e não evita a reincidência da doença. Neste sentido, tem sido pesquisado o emprego de produtos naturais como potencial tratamento adjuvante ou alternativo das DII. Estudos tem relatado os efeitos anti-inflamatório, antioxidantes do extrato de própolis vermelha brasileira em diferentes modelos biológicos. No entanto, os efeitos quimioprotetivos destes extratos em modelo experimental de colite ulcerativa não foram relatados. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito quimiopreventivo do extrato hidroalcoólico de uma variedade de propólis vermelha (EHPV) coletada no nordeste brasileiro na colite ulcerativa induzida por ácido acético (CIAA) em modelo de roedor. Para tanto, o extrato hidroalcoólico foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em seguida, ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos : sham (sem indução de CIAA), veículo (CIAA tratados com Tween80) , P10 e P100 (com CIAA, tratados com EHPV 10 e 100 mg/kg respectivamente). O tratamento com veículo, EHPV foi realizado durante sete dias consecutivos e a colite foi induzida com administração retal de ácido acético no sétimo dia. Após 24 horas dos procedimentos de indução, os animais foram eutanasiados, realizado laparotomia com localização e excisão do intestino grosso, determinação da massa e comprimento do colo e escores de danos macroscópicos e histológicos, além da determinação de níveis teciduais de malonaldeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO), Catalase (CAT), Superoxido dismutase (SOD) e expressão imuno-histoquímica de óxido nítrico induzível (iNOS). Os compostos químicos majoritários encontrados no EHPV foram liquiritigenina (68,8 mg/g), formononetina (54,29 mg/g), biochanina A (30,97 mg/g) e daidzeína (19,90 mg/g). Os animais tratados com EHPV 10 mg/kg mostraram redução significativas nos níveis de MPO, bem como nos escores macroscópicos e histológicos de dano tecidual e na expressão imuno-histoquímica da iNOS ($p < 0,05$). O tratamento com EHPV na dose de 100 mg/kg mostrou redução significativa apenas nos níveis de MPO ($p < 0,05$) e escores histológicos ($p < 0,05$) de danos teciduais. Conclui-se que a administração oral do EHPV promoveu melhora expressiva na CIAA em ratos e que estes efeitos podem, provavelmente, ser resultados de uma atividade anti-inflamatória relacionada com a via de inibição da iNOS.

Palavras-chaves: colite ulcerativa; ácido acético; anti-inflamatório; antioxidante; propólis.

ASSESSMENT OF THE COLON PROTECTIVE EFFECT OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF RED PROPOLIS IN ACUTE COLITIS MODEL

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD), represented by ulcerative colitis and Crohn's disease, are chronic conditions that affect the gastrointestinal tract. Currently, the treatment of IBD is based on the use of anti-inflammatory agents, antioxidants and/or immunomodulators, causes a range of side effects and does not prevent recurrence of the disease. Thus, the use of natural products as potential adjunctive or alternative in the treatment of IBD has been studied. The anti-inflammatory and anti-oxidant effects of extract of red propolis from Brazilian northeast, have been reported in experimental models. However, its protective effects in experimental ulcerative colitis model have not been so far reported. Thus, the current study aimed to investigate the chemopreventive effect of HERP in acetic acid-induced colitis (AIC) in rodent model. Therefore, hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) was characterized by high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequently, male Wistar rats were randomly assigned into four groups: sham (with no AICC treatment with water), vehicle (with AIC, treated with tween 80), P10 and P100 (with AIC, treated with HERP at 10 and 100 mg/Kg, respectively). Treatment with vehicle and HERP was carried out for seven days and the colitis was induced with rectal administration of acetic acid at day seven. Animals were euthanized 24 h after colitis induction procedures and body weight, colon length, gross and histological scores of tissue damage, malondialdehyde (TBARS) and myeloperoxidase (MPO), superoxid dismutase (SOD) catalase (CAT) levels in colon tissue, as well as the immunohistochemical expression of (inducible nitric oxide synthase (iNOS), were assessed. Major compounds found in HERP were liquiritigenin (68.8mg/g), formononetin (54.29 mg/g), biochanin A (30.97 mg/g) and daidzein (19.90 mg/g). Rats treated with HERP at 10 mg/Kg showed significant decrease in MPO levels, gross and histological scores of tissue damage, and iNOS immunohistochemical expression ($p<0.05$). Treatment with HERP at 100 mg/Kg showed significant decrease only in MPO levels ($p<0.05$) and histological scores of tissue damage ($p<0.05$). In conclusion, we found that oral administration of hydroalcoholic extract of Brazilian northeastern red propolis ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats likely as a result of anti-inflammatory effects related to inhibition of iNOS pathway.

Key-words: ulcerative colitis, acetic acid, anti-inflammatory, antioxidant, propolis.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é caracterizada por inflamação de natureza crônica que pode acometer parte ou todo o trato gastrointestinal (TGI). De acordo com sua sintomatologia e a sua correlação com achados histopatológicos, a DII, pode ser classificada como colite ulcerativa (UC) ou Doença de Crohn (DC) (SARTOR, 2006).

A UC se apresenta como uma inflamação contínua, com área marcada por hiperemia e úlceras, estando restrita ao TGI, acometendo mais frequentemente o colo. Por sua vez, a DC se caracteriza por uma inflamação de natureza segmentada que pode acometer intercaladamente qualquer segmento do TGI sendo marcada por hiperemia, úlceras e granulomas (GONÇALVES *et al.*, 2008; SCHOFFEN, 2011).

Os sintomas clássicos da DII são diarreia frequente que pode ser acompanhada de sangue, perda ponderal de peso, dor, febre e êmeses. Esta doença não fica restrita somente ao TGI levando a instalação de outras comorbidades de natureza extra intestinal e, consequentemente, a necessidade de diversas internações e intervenções cirúrgicas (SARTOR, 2006; KIM *et al.*, 2014).

Desde 1950 observa-se elevação nas taxas mundiais de incidência e prevalência desta doença. No Brasil, a DII tem sido um achado frequente nas últimas décadas representando, um desafio para a saúde pública, visto que esta doença afeta principalmente a população na faixa etária 30-60 anos, ou seja pessoas em idade produtiva. Não obstante, a doença é marcada períodos de remissão e recidiva, não apresentando tratamento clínico definitivo, o que determina um prognóstico desfavorável. Os tratamentos atuais para o controle da doença além de custos consideráveis apresentam diversos efeitos colaterais e podem levar a tolerância (PINHO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2014).

Desta forma, diversos ensaios experimentais e clínicos têm sido realizados com a finalidade de buscar uma alternativa para o tratamento para a DII (VICTORIA *et al.*, 2009; PARENTE, 2015). Ahmad *et al.* (2014), em revisão sistemática, identificaram diversos produtos naturais com significativos resultados no tratamento da DII. Dentre os produtos naturais brasileiros, a própolis vermelha, oriunda do litoral nordestino é conhecida por sua atividade antioxidante e anti-inflamatória. Este tipo de própolis apresenta elevado conteúdo de substâncias como formononetina, biochanina A e liqueritigenina, diferenciando de outros tipos de própolis encontradas no Brasil e em outros países (RIGHI *et al.*, 2013; SALATINO *et al.*, 2013).

A própolis vermelha vem sendo testada em vários modelos experimentais de doenças que indicaram resultados significantes para atividades anti-inflamatória, antinoceptiva e antiulcerogênica podendo, por estes atributos servir como alternativa para o tratamento da DII (DA SILVA FROZZA *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2014; LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015; SILVA-CARVALHO *et al.*, 2015). Além dos efeitos anti-inflamatórios, ensaio de citotoxicidade realizado por Da Silva *et al.* (2015) verificou que a própolis vermelha alagoana é um produto de baixa toxicidade, portanto, o seu uso é seguro.

Não obstante, ensaios realizados com compostos majoritários da própolis demonstram propriedades imunológicas atuando na diminuição da produção de IL-1 β (interleucina 1- β) e óxido nítrico (NO). Estes resultados são de particular interesse, considerando que na fisiopatologia da DII é possível verificar que a doença se instala a partir de falhas nestes mecanismos imunológicos, com aumento de IL-1 β e NO (RINECKER *et al.*, 1999; URONIS *et al.*, 2009; YAO *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012; KALYANARAM, 2013; TUN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014).

Além das inúmeras atividades biológicas da própolis vermelha, a sua distribuição anual regular e o baixo investimento tecnológico para a sua obtenção justificam sua avaliação como um produto terapêutico adjuvante no tratamento da DII, sendo este o objetivo do presente trabalho. Adicionalmente, a necessidade de maior produção deste produto na região do Nordeste possibilita ainda ganhos econômicos, sociais para esta região, o que pode contribuir para a melhoria da qualidade de vida dessa população, justificando também a realização deste estudo.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre a colite induzida por ácido acético em modelo roedor.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e quantificar os principais compostos presentes no EHPV;
- Avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre as alterações macro e microscópicas colônicas em modelo experimental de UC;
- Avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre os processos oxidativo e inflamatório em modelo experimental de UC.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença inflamatória intestinal (DII)

A doença inflamatória intestinal (DII) pode ser classificada em colite ulcerativa ou Doença de Chron. A colite ulcerativa (UC) caracteriza-se por tecido marcado por sinais de hiperemia, edema e úlceras, perda de criptas intestinais e células caliciformes que afetam continuamente o segmento do intestino inferior. Já a Doença de Crohn (DC) apresenta-se como inflamação visualmente segmentada alternando tecidos saudáveis com outros marcados por hiperemia, ulcerações, granulomas, criptite e ou fístulas. A DC pode afetar desde a boca até o ânus acometendo mais frequentemente segmentos do íleo terminal e colo (PINHO, 2008).

A prevalência das DII nos países desenvolvidos é estimada em torno de 505 e 322 por 100.000 por pessoa/ano e a estimativa de incidência de ambas classificações da doença situam-se em 50 a 70 novos casos/1.000.000 habitantes ao ano. Verifica-se um padrão de emergência desta doença mundialmente, sobretudo em países em desenvolvimento como República Popular da China, Coreia do Sul, Índia, Líbano, Irã, Tailândia, o Ocidente francês, Índias, e Norte da África e América do Sul (PONDER; LONG, 2013; M`KOMA, 2013; PARENTE, 2015).

O aumento da incidência e prevalência da DII nos países em desenvolvimento, sobretudo em áreas urbanas sugere o envolvimento de fatores ambientais na etiologia desta doença a qual ainda é pouca elucidada. No Brasil, apesar da ausência de notificações oficiais da DII, na prática clínica as mesmas têm sido um achado frequente nas últimas décadas, período este, onde houve aumento no indicador de desenvolvimento humano associado a aumento da industrialização. A relação entre aumento dos índices de industrialização e o desenvolvimento da DII foi documentada em diversos trabalhos (NIELSEN *et al.*, 2008; SCHOFFEN, 2011; TORRES *et al.*, 2011; ORDÁS *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2014; CLEMENTE ACTIS, 2016).

Com relação ao sexo, a UC afeta em números proporcionais homens e mulheres, já a Doença de Crohn ocorre mais frequentemente no sexo feminino. Em relação a idade verifica-se que é mais predominante em jovens e adultos (20 a 40 anos), apresentando ainda um segundo pico de recorrência aos 60 anos. Há um forte componente genético no estabelecimento das DII, sendo que a manifestação é mais frequente em parentes de 1º

grau, em pessoas de origem judaica e de raça caucasiana (SCHOFFEN, 2011; MOURA *et al.*, 2015).

Além de fatores ambientais, industrialização e defeitos genéticos, outros estudos têm demonstrado associação entre incidência e prevalência de DII ligados ao estilo de vida como: consumo de alimentação rica em gordura e pobre em fibras, exposição a agentes patogênicos durante a infância, uso de anticoncepcionais e tabagismo. Estes fatores relativos ao estilo de vida parecem atuar modificando o equilíbrio na microbiota intestinal levando a uma alteração nos mecanismos protetores da barreira intestinal como aumento da permeabilidade, diminuição da produção do muco, disfunção nos mecanismos de ligações entre as células epiteliais e lipopolissacarídeos bacterianos (SARTOR, 2006; ORDÁS *et al.*, 2012; M'KOMA, 2013; CLEMENTE ACTIS, 2016).

Pesquisas também apontam para um desbalanço entre a microbiota residente e oportunista no desencadeamento da DII. De fato, é encontrado a presença de cepas patogênicas de bactérias do gênero *Micobacterium* em diversos pacientes com DII. (GONÇALVES *et al.*, 2008; PONDER ; LONG, 2013; BARBALHO *et al.*, 2016). Por outro lado, significativa parcela de acometidos por DII não guardam relação direta com a contaminação por bactérias patogênicas. Neste sentido, diversos ensaios têm demonstrado que bactérias residentes podem favorecer o processo inflamatório por erros de reconhecimento dos LPS destas bactérias por receptores da mucosa intestinal, iniciando o processo inflamatório (BIASI *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2014; O'NEILL *et al.*, 2015).

A DII aumenta significativamente o risco de desenvolver câncer de colo e reto. A mortalidade nesses pacientes quando comparado aos indivíduos que apresentam câncer de colo não associados à DII é maior (RANDHAWA *et al.*, 2014). Não obstante, a doença apresenta evolução desfavorável, marcada por instalação de doenças extraintestinais que culminam, com a necessidade de intervenção cirúrgica em 60 a 70% dos casos. Desses pacientes, 50% estarão sujeitos a novas intervenções cirúrgicas (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O diagnóstico da DII inclui análise da sintomatologia apresentada pelo paciente, a qual pode variar de acordo com o fenótipo predominante da doença e segmento intestinal afetado, podendo apresentar-se com características predominantemente inflamatória, estenosante e ou ulcerativa. A diarreia crônica, aliada a outros sintomas como distensão abdominal, emagrecimento, desnutrição e anemia são os sintomas mais frequentes; porém, no quadro de DII que atinge regiões como o reto e colo sigmoide, a diarreia sanguinolenta é o sintoma mais encontrado (HORN; UFERBERG; 2011).

Dada a suspeita clínica são solicitados exames laboratoriais, endoscópicos e biópsias. Nos exames laboratoriais marcadores inflamatórios como o exame de PCR-reativa

(Proteína C-reativa) e VHS (Velocidade de Hemossedimentação) apresentam-se alterados podendo demonstrar o estágio da atividade da doença. Cultura para *Clostridium difficile* e suas toxinas também são solicitados, uma vez que esta bactéria de natureza patogênica e oportunista frequentemente encontra-se presente em pacientes com DII. Além destes exames, são solicitados, ainda outros exames como videoendoscopia e ou videocolonosopia associada a biópsia para avaliar a extensão do dano inflamatório no trato gastrointestinal e para a avaliação do diagnóstico diferencial entre UC e DC (CABRAL; ABY, 2012; ORDÁS *et al.*, 2012).

No exame de biópsia o achado de granuloma é diferencial para DC, entretanto esta situação esta presente em somente 15% dos casos de biópsias e em 50% das peças cirúrgicas, limitando, portanto a precisão do diagnóstico (LISZKA *et al.*, 2006). Apesar dos grandes avanços nos exames diagnósticos, mais de dez por cento das endoscopias realizadas possuem achados teciduais semelhantes entre DC e UC não permitindo diagnosticar com precisão o tipo de DII, sendo comumente relatada em diagnóstico de imagem como colite indeterminada (PRAVDA *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2016).

A DC e UC exibem diferenças estruturais importantes que podem implicar caminhos distintos na sua patogenia apesar da semelhança clínica. A DC leva a perda praticamente total de um elemento protetivo tecidual importante, como as células caliciformes. As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco que entre outras atividades, previne a translocação bacteriana e secretam bacteriocina e fator trófico de crescimento para reparo e renovação de células intestinais. A ausência deste elemento celular oferece, portanto, oportunidades para perpetuação do dano inflamatório por maior acesso de antígenos, bem como dificuldades de reparação do tecido epitelial (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014).

Na DC há também o acometimento de todas as camadas teciduais do intestino (mucosa, submucosa e serosa) com presença de células do sistema imune como macrófagos que atuam na formação de granulomas além de hiperplasia tecidual. Dado ao maior dano tecidual, as fístulas são achados frequentes neste tipo de DII. Na UC existe o risco aumentado para adenocarcinoma intestinal, a inflamação é marcada pela presença de úlceras, há também a perda de células caliciformes, porém em quantidade menor (URONIS *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-SALAZAR *et al.*, 2015).

O Quadro 1 demonstra as principais alterações macroscópicas e histológicas entre DC e UC.

Quadro 1. Diferenças morfológicas encontradas nas DC e UC.

DII	Extensão da lesão	Tipo celulares Lâmina	Integridade cripta intestinal	Epitélio intestinal	Comprimento Colo intestinal	Característica Macroscópica
UC	Camada mucosa e submucosa	Infiltrados PMN	Distorção de cripta Fase tardia: abscesso	Presença de célula caliciforme (em quantidade menor na fase tardia)	Fase inicial Normal Fase tardia Pouca redução comprimento	Hiperemia Ulcerações Edemas
DC	Camada serosa, muscular própria, mucosa e submucosa	Infiltrados PMN	Distorção de cripta Hiperplasia nas células de criptas no tecido não acometido pela DC	Rara presença de célula caliciforme	Evidente redução do comprimento	Edema Granulomas Fissuras e fistulas

PMN: polimorfonucleares. Adaptado de: (SARTOR; 2006; GONÇALVES et al., 2008; SCHOFFEN, 2011).

O tratamento da DII utiliza diferentes classes de fármacos que incluem: aminossalacilatos, corticoides, imunomoduladores, antibióticos e terapia biológica. Estes recursos terapêuticos, além de depreenderem considerável necessidade de recursos financeiros, levam ao estabelecimento de graves efeitos colaterais. Além disso, durante o longo tempo de uso, podem levar à tolerância, demonstrando assim a necessidade de novas alternativas medicamentosas (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014).

Os modelos experimentais de indução de colite não conseguem representar todos os tipos de patogênese da DII, dado a natureza multicausal da doença. Contudo, nestes modelos experimentais é possível observar manifestações de sintomatologia clínica e metabólica, e alterações teciduais macroscópicas e histológicas compatíveis com aquelas encontradas em portadores de DII. Desta forma, os modelos experimentais de indução de colite se prestam como recurso para testes de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença (RANDHAWA et al., 2014).

Nos protocolos experimentais de DII por agente químico a instalação da DII pode ser manipulada para apresentação de diferentes intensidades da doença a qual pode ser leve, moderada, intensa, aguda ou crônica. Neste sentido, o tipo de agente químico empregado na indução da colite, bem como percentual de diluição e frequência de exposição dos animais ao agente químico empregado, induz diferentes respostas inflamatórias de variados

graus de intensidade. Nos exames histológicos dos animais induzidos a colite por agentes químicos são encontradas alterações histológicas marcadas por distorção de cripta, aumento de edema de submucosa presença de úlceras, destruição de células epiteliais e caliciforme, além da infiltração de neutrófilos e ou linfócitos e formação de abscesso a depender do agente químico utilizado. Em colorações com reativo de schiff e alcian blue é possível verificar também presença de sialomucinas sulfatadas ou não (AL REJAIE *et al.*, 2013; ALEISA *et al.*, 2014; RANDHAWA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3.2 Fisiopatologia da DII

3.2.1 Alterações genéticas

Devido à natureza multifatorial relacionada com o desenvolvimento da DII, diversas teorias tentam explicar os mecanismos de ação para o início e perpetuação do processo inflamatório intestinal. Entre os fatores mais estudados na etiologia da DII encontram-se as alterações genéticas as quais estão relacionadas com falhas na barreira de defesa intestinal e defeitos nos padrões de reconhecimento de antígenos por células do sistema imune. Independente da causa, as alterações genéticas levam o organismo a um estado de ativação do sistema imune com desregulação na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (KHOR *et al.*, 2011; ESBERARD, 2012; BIASI *et al.*, 2013; JAMONTT *et al.*, 2013).

Importante contribuição genética na elucidação da fisiopatologia da DII deve-se a descoberta de falhas na região pericentrométrica do *locus* 16 do gene CARD 15, denominado de *IBD 1*. Este gene codifica a proteína NOD 2 presente em receptores das células apresentadoras de antígenos (APCs) os quais entre outras atividades são, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos bacterianos. Falhas na produção da proteína NOD impedem o reconhecimento adequado de bactérias residentes e oportunistas. Desta forma há contínua super estimulação do sistema imune e a perpetuação do processo inflamatório. Cerca de 30% dos pacientes acometidos por DC apresentam esta alteração cromossômica, explicando, em parte, o desenvolvimento da DII (SARTOR, 2006; SARTOR; MAZMANIAN, 2012).

Além da falha genética do gene CARD 15, mais de cem outras alterações nos locus gênicos têm sido investigadas na DII. Estas falhas genéticas levam ao estabelecimento de diversos fenótipos clínicos da doença, que incluem: baixas respostas terapêuticas aos

medicamentos utilizados no controle da doença, falhas nos mecanismos protetores de barreira intestinal, início precoce no desenvolvimento da doença, susceptibilidade ao desenvolvimento da DII frente aos antígenos ambientais (KNIGHTS *et al.*, 2013). A figura 01 demonstra as alterações genéticas que tem sido objeto de investigação na DII e a sua relação com a disfunção celular e fenótipos de sintomatologia clínica observada.

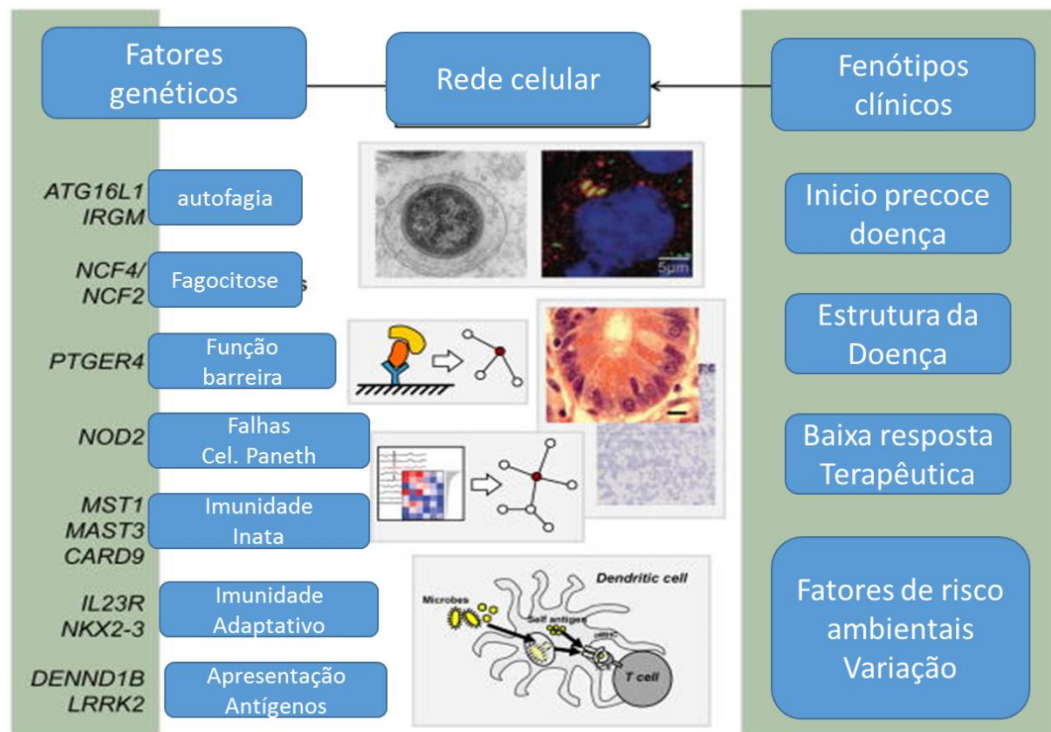


Figura 1. Variações genéticas e via de desenvolvimento da DII. Fonte: Adaptado de (KNIGHTS *et al.*, 2013).

Lista de genes alterados mais estudados na DII (esquerda) juntamente com as vias celulares sobre possíveis locais onde ocorrem a disfunção. Estas vias provavelmente interagem em redes celulares (centro), que, quando perturbadas, contribuem para os fenótipos clínicos da DII (direita).

Segundo Esberard (2012), alterações nos genes ATG16L1 e IRGM levam a dificuldade da célula de eliminar os produtos da degradação celular do citoplasma, o que determina lesão celular e desencadeia o recrutamento intermitente de linfócitos. A grande quantidade de linfócitos no tecido leva a consequente lesão tissular com infiltração de grande quantidade de células imunes nos tecidos e formação de granulomas em pacientes com DC. Alterações com polimorfismo no gene ATG16L1, também prejudicam o funcionamento das células de Paneth, impedindo assim a secreção de lisossimas bacterianas. A baixa secreção de lisossimas pelas células de Paneth, permite o acesso de bactérias na lâmina própria, desencadeando respostas inflamatórias intensas e contínuas.

3.2.2 Estimulação exacerbada do sistema imunológico

Alterações nos padrões de barreira intestinal, como aumento da permeabilidade, modificação na quantidade e composição do muco, depleção de células epiteliais, caliciforme e de Paneth estão relacionadas com aumento do contato de bactérias com células imunitárias e, por conseguinte com a exacerbação do processo inflamatório. Considerando ainda que no intestino são encontrados mais de três trilhões de bactérias, fica evidente o papel dos mecanismos de barreira na proteção do organismo. Várias teorias tentam explicar como estes mecanismos de defesa são afetados na DII e como há a superestimulação do sistema imune mesmo nos casos em que a doença encontra-se em remissão (ALVES *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; JAKOBSSON *et al.*, 2015; KIESLER *et al.*, 2015).

A figura 2 exhibe resumidamente os principais mecanismos de exacerbação do processo imune, relacionando a perda de mecanismos de barreiras como espessura, característica do muco protetor, deficiência nas junções intercelulares (tight junctions), defeitos nos receptores de reconhecimento das (APC) e super estimulação do sistema imune por ativação do sistema NFK- β e produção de interleucinas pró-inflamatórias.

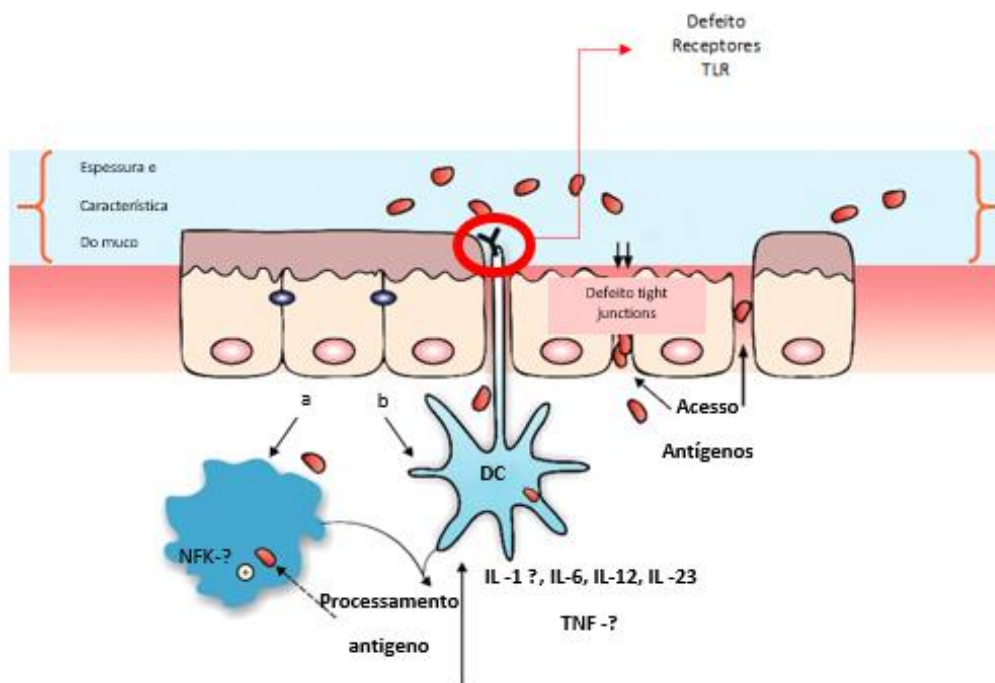


Figura 2. Mecanismo de iniciação do processo inflamatório na DII. Adaptado de (ORDÁS *et al.*, 2012).

NFK-B fator nuclear kappa beta; DC = células dendríticas; (a, b) células apresentadoras de antígenos respectivamente: macrófagos e células dendríticas respectivamente TLR – (receptores do tipo toll like) . Possíveis mecanismos de perpetuação do dano inflamatório : O contato de antígenos com as células do sistema imune inato sobretudo as apresentadoras de antígenos leva ao processamento de antígenos e aumento da expressão do fator nuclear kappa B com consequente aumento na produção de citocinas pró inflamatória IL-1,IL6,IL12-IL-23. Defeitos nos receptores do tipo toll presente nas células apresentadoras de antígeno não permitem distinção entre antígenos residentes e patogênicos também levam a contínua estimulação do sistema imune e cascata inflamatória. Entre as possíveis causas de falhas nos mecanismos protetivos situam-se falhas na quantidade e composição do muco, falhas nos defeitos nas claudinas da tight junctions que oferecem aderência basolateral as células epiteliais permitindo acesso livre dos antígenos ao interior da mucosa e falhas nos receptores de reconhecimento de antígenos por defeitos genéticos e alterações dos receptores causados por modificações na microbiota residente.

O contato entre antígenos e células do sistema imune inicia a cascata de processo inflamatório. Em situações comuns de inflamações em indivíduos normais, o sistema imune inato, o qual é composto por células epiteliais, células de Paneth, células dendríticas, neutrófilos, APC, além de pequenas quantidades de macrófagos residentes, atacariam o antígeno e finalizariam ali mesmo o processo. Por fim, o produto da finalização do sistema imune inato seria a ativação do sistema imune adaptativo. Isto se dá pela apresentação de fragmentos do antígeno pelas APC, as células T auxiliares, com sinalização para diferenciação em células B e produção de anticorpos específicos. A hipótese sobre a continuidade do processo inflamatório na ausência do agente agressor, seria que a resposta imune inata ao antígeno seja ineficaz, havendo a necessidade de acionar continuamente a resposta imune adaptativa que é tardia e com respostas mais agressivas a um antígeno já conhecido. A resposta imune adaptativa é derivada das células T (imunidade celular) e das

células B (imunidade humoral). Em pacientes com DII a produção de anticorpos mediados pelas células B ocorre tanto na mucosa quanto na corrente sanguínea e envolve imunoglobulinas como IgG, IgM, IgA que interage fortemente com os antígeno resultando em uma resposta inflamatória exacerbada (XU *et al.*, 2014).

Outra hipótese que visa explicar a perpetuação da inflamação na DII seria a expansão clonal dos linfócitos T previamente ativados pelas APC. Diferentes citocinas produzidas pela interação do antígeno com células epiteliais ou células do sistema imune produzem várias sinalizações para a diferenciação de células Th em células T efetoras do tipo Th 17. Esta última poderá, a depender do estímulo, produzir citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias. Neste sentido, propoe-se que na DC, as APC a partir da liberação de interleucinas (IL) IL-12 e IL 23 estimulariam a diferenciação das células T auxiliares nos linfonodos em células Th-1 e Th17. A partir de então, há um estímulo para produção de Interferon gama (INF-gama), IL 17 e IL 21. Na UC, as IL-12 e IL-23 estimulam a resposta para diferenciação das células T em Th-2 e Th17, com produção aumentada de interleucinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-13 e IL17. Assim, a DC ficou conhecida por muitos anos como uma doença mediada por células Th1 e Th17, enquanto que a UC seria mediada pelas células Th2 e Th17. Contudo, dada a presença de célula Th 17 nas duas formas da DII, verificou-se que esta diferenciação celular não é específica para o tipo de DII, mas sim ligada a fase da doença aguda e ou crônica (SARTOR, 2006; SARTOR; MAZMANIAN, 2012; DÍAS-PENÃ, *et al.*, 2015).

Os linfócitos Th2 desempenham importante papel na tolerância, pois eliminam linfócitos reativos através de mecanismos de ativação celulares e produção de citocinas como, fator de crescimento transformador B (TGF- β) e IL-10. As células Th17 são do tipo efetoras e promovem resposta inflamatória e rejeições a transplantes estando ligadas a diversas doenças de natureza auto imune.

Além das células Th, outro grupo de células investigadas na DII são as células Treg. Foram analisadas as proporções de células Th17 e células Tregse demonstraram que existe uma relação inversa entre a quantidade de células Th17 (maior) e de células Treg (menor) e que estão associadas a maior exacerbação da colite (DÍAZ PEÑA *et al.*, 2015).

Em ensaio realizado por Zhang *et al.* (2014), foi demonstrado que as células Th 17 com produção de citocinas pró-inflamatórias estão em quantidades maiores em detrimento às células Treg. Neste ensaio, correlacionou-se a atividade da doença com estímulos das células Th17 pela enzima hemeoxigenase em animais submetidos à indução de colite por DSS (Dextrano sulfato de sódio). Os resultados deste experimento demonstraram que os animais que foram sensibilizados pela presença de hemoxigenase produziram menor

estimulação de linfócitos Th17 com melhora da atividade da doença e maior produção de células Treg. Já nos animais que foram induzidos a colite sem a presença da hemeoxigenase, houve maior produção de células Th17 e menor de células Treg com consequente dano celular maior causando a colite. Desta forma, fica demonstrada a importância das células Treg na proteção do organismo.

A figura 3 demonstra resumidamente os diversos cenários propostos para perpetuação do dano inflamatório em DII.

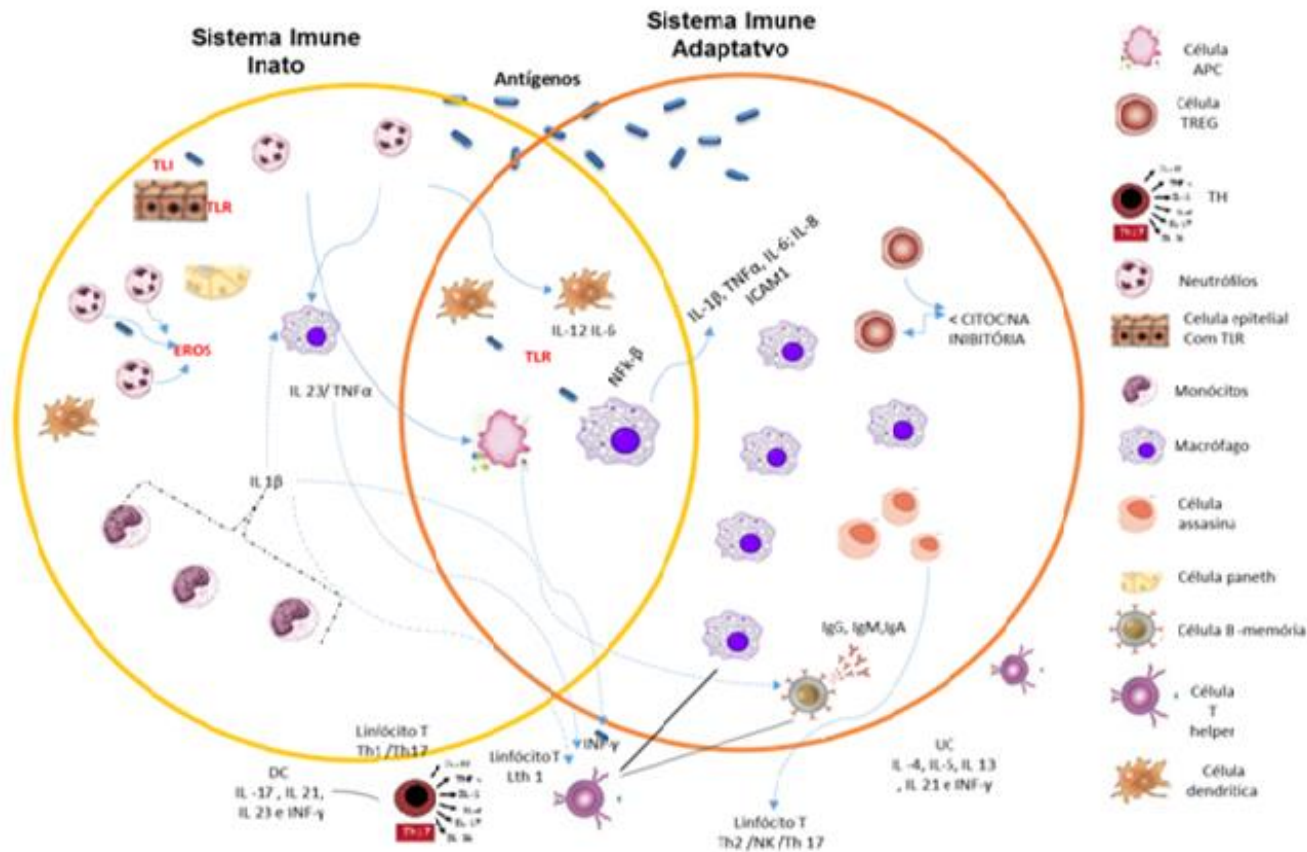


Figura 3. Teorias na perpetuação do processo inflamatório (Fonte: própria).

Sinalização inicial da relação do antígeno com receptores TLR de células epiteliais e macrófagos residentes aumentam recrutamento, adesão e rolamento de neutrófilos da periferia para o local da inflamação, estes por sua vez liberam uma série de espécies reativas de oxigênio para o meio com finalidade de eliminar o antígeno. Na DII, estes mecanismos parecem não ser suficiente para encerrar o processo inflamatório pois verifica-se na DII participação maior do sistema imune adaptativo em detrimento ao sistema imune inato. O contato do antígeno com diferentes células do sistema imune pode desencadear respostas diferentes. Teorias apontam que na DII há baixa participação de células do sistema imune inato ensejando na necessidade de buscar outras células do sistema imune adaptativo. Neste caso, na tentativa de conter a inflamação há uma super estimulação das células T ativadas pelo INF- γ advindo de células APC, bem como IL-1 β e TNF- α de macrófagos residentes e IL-1 β advindas também de monócitos, esta forte ativação leva a divisão em células do tipo Th para Th1 e Th17 com maior produção de IL pró inflamatórias como IL-17, IL-23 e IL-21 e diferenciação para transformação em Plasmático ou células de memória, com produção de anticorpos IgG, IgM, IgA, por outro lado as células Treg por motivos ainda desconhecidos ficam inibidas não produzindo quantidade suficiente de citocinas inibitórias perpetuando assim o dano. Antigamente acreditava-se que a UC era mediada por resposta Th2 e a DC pela Th1, porém com o advento de que ambas formas de doença apresentam resposta maior para Th17, correlacionou-se a Th1 e Th2 a fase da doença, respectivamente crônica e aguda.

3.2.3 Desequilíbrio na produção e característica do muco

Em indivíduos saudáveis, há um perfeito equilíbrio entre a microbiota residente e o sistema imune que pode, em parte, ser atribuída a camada de muco que recobre as células epiteliais. Defeitos na produção e característica do muco alteram a permeabilidade, e por consequência, permite acesso das bactérias ao interior da mucosa com consequente estimulação do sistema imune. Além do papel de seleção dos antígenos luminais por propriedades de permeabilidade atribuída ao muco, o mesmo possui ainda proteínas com característica microbiciocida como: β defensina 2 (HBD-2) e RegIII γ na sua constituição sendo este, mais um efeito protetor ligado a camada de muco (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010). Em uma situação saudável, a camada de muco exterior é colonizada por bactérias comensais enquanto que a camada de muco interior possui quantidade menor de bactérias (URONIS *et al.*, 2009; JAKOBSSON, *et al.*, 2015).

A camada de muco é produzida pelas células caliciformes. O muco é formado por cadeias higroscópicas de oligossacarídeo hidrofílico que dão origem a uma substância com característica de gel denominada de MUC2 (mucina 2). As células caliciformes secretam vários tipos de mucina (MUC2, MUC3 e MUC17) que são fortemente ligadas a membrana e outras glicoproteínas localizada no intestino delgado.

A importância das células caliciformes na produção de muco e gravidade da DII pode ser verificada no trabalho de Jakobsson *et al.* (2015) que analisaram biópsias de tecido intestinal de pacientes com DII. Os pacientes com UC leve e moderada tinham depleção moderada de células caliciformes e baixo teor de mucina (62,5% e 71,4%, respectivamente). Os pacientes com UC grave tinham esgotamento quase total das células caliciformes e pouca produção de muco. Trabalho experimental realizado com animais com alteração gênica para mucina-2 apresentaram deficiência na produção de muco pelas células caliciformes e, como resultado, os animais desenvolveram colite espontaneamente. Posteriormente, foram verificados que estes mesmos animais evoluíram para câncer retal e foram também os mais susceptíveis ao desenvolvimento de colite por indução química.

Propriedades advindas de proteínas microbiciocida como a RegIII γ e β defensina 2 guardam relação da proteção das mucinas contra antígenos luminais (WALKER *et al.*, 2013; COBO *et al.*, 2015).

Desta forma, as células caliciformes, produção de mucina e característica da mucina são importantes fatores protetores do organismo, bem como, demonstram que falhas nestes importantes mecanismos de proteção do intestino, podem levar ao desenvolvimento de DII.

3.2.4 Disfunção luminal

Os trabalhos apontam que a microbiota intestinal residente e /ou oportunista, bem como disbiose ou alterações funcionais nas bactérias residentes por defeitos genéticos podem iniciar ou manter determinado fenótipo da DII. Desta forma, ratos com deleção gênica para produção de IL-12 e 10 ou transfectado com gene HLA-27 (mutação genética associada ao desenvolvimento de DII) não desenvolvem DII quando coexistindo em ambiente livre de germes. Entretanto, quando restituído da sua microbiota intestinal normal, contraditoriamente desenvolvem DII demonstrando que a presença da microbiota intestinal é determinante para surgimento da DII (SELLON *et al.*, 1988; SARTOR; MAZMANIAN, 2012; TOMASELLO *et al.*, 2015).

O exato papel dos diversos gêneros de bactérias e sua relação na iniciação e propagação da inflamação ainda não é consensual, contudo já é conhecido que pacientes com DII apresentam redução dos gêneros *Eubacterium spp*, *Lactobacillus spp*, e *Bacteroides spp* bem como possuem aumento de bactérias do gênero *Proteobacteria*.

Acredita-se que maior adesão de bactérias patogênicas a mucosa bem como diminuição da produção de butirato (ácidos graxos de cadeia curta que servem como substrato para os colonócitos) estão relacionados ao desenvolvimento da doença (ALVES *et al.*, 2013). Em ensaios experimentais com animais com redução da diversidade da microbiana intestinal há maior inflamação crônica e presença de patógenos como *Escherichia coli virulenta*, *Bacteroides spp* e *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* e *Clostridium difficile*. Apesar de forte associação entre estes patógenos e a DII, ensaios com uso antibióticos clássicos como ciprofloxacina, metronidazol, rifaximina em animais infectados com estas cepas patogênicas apresentaram efeitos modestos na redução da atividade da doença e na remissão. Desta forma, demonstrou-se que não é somente a presença destes agentes patogênicos a causa da DII (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; NITZAN, 2016).

Outros experimentos demonstraram que os tipos de ligantes bacterianos de *Lactobacillus* e *Streptococcus* ativam receptores específicos de Macrófagos MGL-1 do inglês (Macrophage galactose-type lectin) com produção de respostas inflamatórias podendo ser esta mais uma via da resposta inflamatória exacerbada pelas bactérias entéricas na inflamação da DII (TOMASELLO *et al.*, 2015).

3.2.5 Barreira epitelial

A característica de barreira física pelas células epiteliais se dá pela sua configuração em forma apical, firmemente aderida uma a outra por proteínas denominadas de “tight junctions” como claudinas, caderina e ocludinas que impedem o livre acesso de micro-organismo ao sistema imune.

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que pacientes com DII apresentam disfunções na barreira epitelial com perda da permeabilidade paracelular, por redução da expressão de ocludinas e claudinas-4. Com isso, há aumento da permeabilidade intestinal e maior acesso de antígenos (XU *et al.*, 2014; GERLACH *et al.*, 2015; PÁSZTI-GERE *et al.*, 2015).

Outro elemento que atua contribuindo com formação de barreira intestinal é a produção do FIT (fator intestinal trefóide) por células caliciformes que situam-se abaixo das células epiteliais. O FIT atua auxiliando na renovação e reparo de células epiteliais, além de participar da produção da mucina (CATANZARO *et al.*, 2015; GERLACH *et al.*, 2015).

Postula-se que as disfunções no epitélio podem ocorrer devido a estresse oxidativo, Neste sentido, ensaios *in vivo* e *in vitro*, com uso de substâncias antioxidantes no tratamento de DII, demonstraram reparo das células epiteliais danificadas pelos agentes indutores de colite, demonstrando assim que o estresse oxidativo é um importante componente de disfunção da barreira intestinal. De forma semelhante, biópsia de colo de paciente com UC ativa apresentou produção maior de EROS (Espécies reativas de oxigênio) quando comparado a pacientes em quadro de remissão clínica (OZ *et al.*, 2005; LENOIR *et al.*, 2011; DE SÁ *et al.*, 2013; O’NEILL *et al.*, 2015).

Ensaios de paciente com UC ativa e em remissão possuíam também aumento dos níveis tanto de sintase do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e óxido nítrico (NO) em monócitos circulantes demonstrando que o estresse oxidativo age também aumentando a resposta inflamatória sistêmica (DIJKSTRA *et al.*, 2002).

O NO atua aumentando o trânsito paracelular entre as TJ’s permitindo assim maior acesso de antígenos ao interior do epitélio. Por outro lado, a produção aumentada de NO também está relacionada ao poder bactericida do mesmo, Desta forma, apesar desta dicotomia associa-se papel positivo do aumento da NO na colite aguda e a seu papel deletério na colite crônica (KALYANARAMAN, 2013).

A importância da integridade da barreira epitelial é realçada quando se considera que os principais modelos experimentais de colite aguda e crônica utilizam substâncias químicas

que agem modificando a arquitetura da barreira epitelial, permitindo assim a invasão bacteriana e consequentemente uma resposta inflamatória de natureza aguda e crônica. Apesar das evidências experimentais demonstrarem que a modificação da barreira epitelial é fator precipitante no desenvolvimento da DII, os mecanismos moleculares que desencadeiam o início da lesão nos diversos fatores de proteção da barreira epitelial ainda são incertos. Sugere-se que ação de radicais livres possa iniciar o processo (PRAVDA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2013; ALEISA *et al.*, 2014).

3.2.6 Radicais livres e Espécies Reativas de oxigênio

Durante os processos fisiológicos do organismo como o metabolismo de nutrientes, respiração e ativação do sistema imune são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como outras espécies reativas, a exemplo do nitrogênio e radicais livres (RL). As ERO cumprem importante papel na homeostasia, pois além de atuar em diversas cascatas fisiológicas do organismo, mantêm o estado redox celular e atuam na remoção de agentes invasores (FILMANN, 2007).

A ERO, por definição química, trata-se de átomo ou molécula altamente reativo devido a presença de um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica que por não estar emparelhado, confere a substância alto poder reativo, reagindo rapidamente com moléculas mais próximas que podem ser lipídeos, proteínas ou até mesmo bases de DNA (FILIPPIN *et al.*, 2008). As ERO modulam as respostas inflamatórias. Os mecanismos desta modulação na recuperação e fisiopatologia ainda são controversos, pois na inflamação a sinalização celular amplifica os danos teciduais (POEHLMANN *et al.*, 2013; KAYAMA; TAKEDA, 2015).

Dentre as diversas espécies reativas de oxigênio produzidas pelo organismo pode-se citar o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH^\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também conhecidas como radicais livres (RL) ou como formadores de radicais livres (THIPPESWAMY *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014).

A figura 4 apresenta a sequência de reações que levam a formação de ERO e alguns mecanismos antioxidantes endógenos como enzimas CAT (catalase) e SOD (superóxido dismutase) responsáveis por neutralizar o oxidante formado.

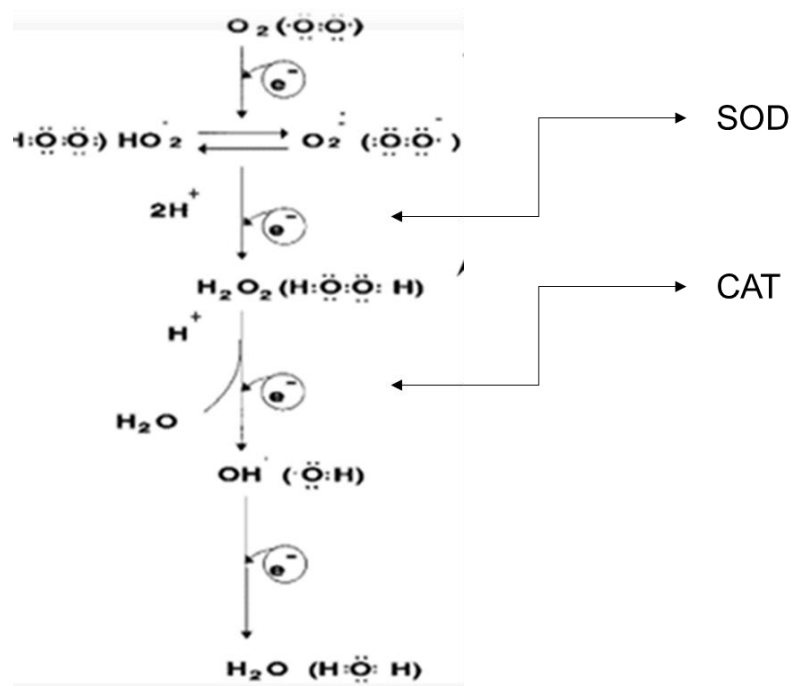


Figura 4. Apresentação da sequência de formação e detoxificação de ERO pelas enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Adaptada de FERREIRA, *et al.* (1997).

Conforme figura 4, na reação de redução do oxigênio existe a formação do radical superóxido $O_2^{\bullet -}$ ou $O_2^{\bullet}$. Este ocorre em quase todas as células aeróbicas e sua produção é aumentada durante processo de inflamação que ativam neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. O radical superóxido está associado também a lesão biológica secundária, a sistemas desencadeadores, seja de natureza química, fagocítica ou enzimática. Nesta mesma reação é formado radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), o qual é a forma protonada do radical superóxido. Este radical também está envolvido na destruição de membranas biológicas (FERREIRA *et al.*, 1997; RANA *et al.*, 2014).

No processo oxidativo há a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e (O_2) singlete. O peróxido de hidrogênio não é considerado um ERO, já que é isento de elétrons desemparelhados na última camada. Contudo, constitui-se de um metabólito altamente tóxico para as células, pois é convertido pela reação de fentol ao radical hidroxil $HO^{\bullet}$. O radical hidroxil é dotado de capacidade de atravessar camadas lipídicas das membranas celulares, possui tempo de vida útil superior a outros EROs e desta forma amplia os danos celulares (FILIPPIN *et al.*, 2008).

A quantidade de ERO ou desequilíbrio REDOX no organismo tem sido relacionado à patogênese da DII. Contudo a produção exacerbada ou deficiente de ERO no desenvolvimento da DII é ainda controversa. Diversos trabalhos tem relacionado à produção

exacerbada de ERO no mecanismo do desenvolvimento de doenças de natureza auto imune, a qual inclui a DII (PUNTEL *et al.*, 2007; TOPRCU-TARLADACALISIR *et al.*, 2013; BIASI *et al.*, 2014).

Pravda *et al.* (2005) identificaram a formação de ERO como possível mecanismo patogênico envolvido na lesão da barreira da mucosa do colo. Segundo os autores, em um primeiro momento da fisiopatologia a agressão celular ocorre por aumento da produção de ERO, através da modificação do metabolismo energético celular. O aumento de ERO causa a ruptura das barreiras de defesa permitindo assim a migração de bactérias e antígenos do lúmen intestinal para a submucosa. Em um segundo momento, a migração de neutrófilos para o local da inflamação aumenta o conteúdo de ERO aumentando a destruição tissular e atraindo mais células do sistema imune para o local da inflamação perpetuando o processo inflamatório. Apesar do aparente efeito deletério do ERO na DII, o seu papel é ainda controverso.

Kim *et al.* (2014) utilizaram ratos com produção deficiente das enzimas glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT), que produziam elevado nível de ERO. Neste ensaio foi verificado que a colite induzida com DSS foi atenuada, devido a hiperestimulação das células Tregs. Estas células diminuem a diferenciação celular a partir de células Th17, CD4+, diminuindo assim a produção de IL-6 e IL-17a. Desta forma, os autores concluíram que as células Tregs estimuladas pela maior quantidade de EROS são essenciais na prevenção das DII. Neste mesmo ensaio, a administração da N-acetilcisteína (potente antioxidante) nos animais, permitiu uma colite mais grave do que a induzida por DSS. Nesta ocasião foi observada a diminuição da função das células Treg, além da atenuação da diferenciação de células Th17, e diminuição da IL-6 e IL-17A após esta estimulação. Desta forma, os resultados demonstraram que o nível de ERO é fundamental na regulação da função Treg, e a DII pode ser atenuada em níveis adequadamente elevados de EROS. Ensaio *in vitro* realizado por De Sá *et al.* (2013) utilizando cepas *S. cerevisiae* selvagens e deficientes da enzima antioxidante SOD1 tratadas com extrato de própolis, apresentaram redução do número de ERO e aumento da peroxidação lipídica.

Os diversos grupos de sistemas enzimáticos do organismo estão implicados na DII, sendo os mais estudados a glutathione redutase (GSH), superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GSH-Px). Além dos sistemas enzimáticos, substâncias como as vitaminas C e E, sendo esta última constituinte das membranas celulares, também fazem parte dos mecanismos de reparação do organismo (BIASI *et al.*, 2013; KALYNARAMAN *et al.*, 2013; O'NEILL *et al.*, 2015).

A SOD existe sobre diversas formas contendo cobre-manganês ou cobre-zinco em seu grupo prostético, estando a primeira forma localizada na mitocôndria das células e a segunda no citosol. A SOD é uma enzima antioxidante que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água protegendo o DNA celular. Trabalhos utilizando modelos de inflamação intestinal correlacionam maior produção de SOD e menores efeitos inflamatórios. Em ensaio com a finalidade de verificar o papel terapêutico da SOD, bem como os seus mecanismos de ação subjacentes sobre a inflamação intestinal, Seguí *et al* (2004) verificaram que a administração dose dependente de SOD diminuiu significativamente a peroxidação lipídica no colo em um modelo de colite induzido pelo TNBS. Este efeito é provavelmente devido à redução no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas.

Em estudo com camundongos deficientes das enzimas GST/GPX, os mesmos apresentaram a geração de colite espontaneamente (DIETERICH *et al.*, 2000). Os resultados deste estudo indicaram que a GPX e GST atuam modulando a expressão de moléculas de adesão celular vascular por meio da sinalização do NF- κ B. Este fenômeno facilita a adesão leucocitária ao endotélio ativado e, por consequência, aumenta a transmigração celular.

O maior aporte de leucócitos na área de injúria vai determinar um aumento expressivo de EROs, que aumentam o dano tecidual. Em estudo semelhante, animais com deficiência de CAT e GPX, e com elevados teores de EROs se apresentaram mais susceptíveis ao desenvolvimento de colite por ativação das células TCD4. Esta célula é dependente da quantidade de ERO produzida (KIM *et al.*, 2014). Além da presença de células imunitárias no local da inflamação e consequente liberação de ERO, trabalhos demonstraram ainda, que os monócitos presentes no sangue periférico, bem como os isolados de macrófagos intestinais de pacientes acometidos com DII, produzem elevada quantidade de ERO que também perpetuam o dano tissular (SEGUÍ *et al.*, 2004; ISHIHARA *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2011).

A catalase (CAT) é uma hemoproteína de característica antioxidante residente na matriz peroxissoma e é responsável por catalisar a reação entre o peróxido de hidrogênio, a água e oxigênio, conforme ilustrado na figura 4. Trata-se de uma enzima dependente do sistema de NADPH. A CAT degrada o peróxido de hidrogênio e em conjunto com a glutathione peroxidase (GSH-Px) está envolvida na eliminação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, este último produto extremamente tóxico. Diversos trabalhos relacionam a falha na produção desta enzima ao desenvolvimento de colite, bem como demonstram que estimulação da produção de catalase age melhorando o quadro da colite (ISHIHARA *et al.*, 2009; LEONEL *et al.*, 2012; DEPONTE, 2013; POEHLMANN *et al.*, 2013).

Desta forma, fica evidente que há uma participação da modulação química no processo anormal da resposta imune, e que, portanto, produtos naturais com características antioxidantes podem constituir em importante mecanismo terapêutico no controle da DII. Esta teoria é reforçada pela ação encontrada em diversos extratos de produtos naturais com substâncias antioxidantes que foram testados em ensaios inflamatórios, sobretudo de colite e que apresentaram resultados significativos na prevenção e tratamento da DII (ISHIHARA et al., 2009; KUSHIMA, 2010; SOLIMAN, 2013; OKAMOTO et al., 2013a, AL-REJAIE et al., 2013, AWAAD et al., 2013; MOSSALAYI et al., 2014; ALEISA et al., 2014; MOSSALAYI et al., 2014; CATANZARO et al., 2015; LOPEZ et al., 2015).

3.2.7 Papel do óxido nítrico na fisiopatologia da DII

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com reatividade moderada em comparação com outras espécies reativas de oxigênio. Ele atua regulando diversas funções nos órgãos do corpo humano. É sintetizado pela ação de enzimas denominadas de óxido nítrico sintases sobre o aminoácido L-arginina. Existem isoformas de óxido nítrico: três formas constitutivas, de origem neuronal (nNos) ou endotelial (eNOS) e tecidual (c-NOS) e uma forma induzida que só é expressa após indução por citocinas, produtos bacterianos, óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Ao óxido nítrico, são atribuídas diversas propriedades biológicas essenciais como, manutenção adequada perfusão intestinal, permeabilidade seletiva epitelial e regulação das respostas imunes (KOLIOS *et al.*, 2004).

A produção de óxido nítrico por c-Nos é baixa e de curta duração sendo controlada pela mobilização de influxo de cálcio. Já a enzima iNOS sintase produz NO em quantidade elevadas quando comparada a c-NOS, sendo regulada pela transcrição a nível celular. A produção de NO por iNOS ocorre várias horas após o estímulo, porém pode se manter ativo por até 5 dias, demonstrando assim que outros fatores podem estar envolvidos mediando esta resposta. O papel do óxido nítrico no processo inflamatório é controverso e esta situação se deve a sua participação concomitante em reações diretas e indiretas nos processos fisiológicos e patológicos. Em reações diretas atua como molécula em alvo específico, e indiretamente reage com espécies reativas de oxigênio formando um novo composto (BIASI et al., 2013; RABELA et al., 2014).

Em reações diretas a NO atua na reação da proteína guanilato ciclase, conduzindo a formação de c-GMP que possui efeitos anti-inflamatórios como a regulação da vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e adesão de leucócitos. A detoxificação é

outra ação do NO que serve para proteger enzimas envolvidas na síntese da prostaglandinas como ciclo-oxigenase reduzindo a sua forma inativa (KOLIOS *et al.*, 2004).

O NO pode atuar também modulando a reação de oxidação, agindo como quelante de ferro, impedindo assim a reação de Fenton que produz oxidantes como radical hidroxila. Desta forma, estas observações são sugestivas de que o efeito direto do NO estaria envolvido principalmente nas atividades protetoras nos processos inflamatórios, porém não exclusivamente. O NO também exerce efeitos indiretos mediado por EROS e espécies reativas de nitrogênio na reação com o O₂ singlete dando origem ao estresse químico: que também se relacionam com a inflamação crônica e formação de tumores e de potentes agentes citotóxicos (DHILLON *et al.*, 2014).

A NO também está envolvido na produção de muco, estimula a secreção de eletrólitos na mucosa do colo, atua melhorando a produção local de prostoglandinas E2-. A NO constitutiva inibe a produção de neutrófilos e atua sobre mediadores reduzindo atividades que induzem respostas quimiotáticas como a produção IL-8 entre outros, reduzindo finalmente a quimiotaxia, adesão e recrutamento de leucócitos no tecido e modula a agregação de plaquetária nos vasos. Além destas funções, a NO modifica citocinas liberadas por macrófagos de modo que na sequência de uma resposta Th1 associada a citocinas são subreguladas enquanto que células do tipo Th2 são favorecidas (DHILLON *et al.*, 2014; KOLIOS *et al.*, 2004).

A produção de grande quantidade de isoforma de iNOS pode ser tanto benéfica quanto prejudicial, dependendo da quantidade, duração e localização da síntese. A iNOS pode agir modificando a síntese de enzimas chaves no ciclo de ácido cítrico nas mitocôndrias celulares, função essencial para manutenção celular. Pode ainda agir através da inativação de enzimas ribonucleicas impedindo síntese de DNA tendo assim efeitos citotóxicos e citostáticos. Do mesmo modo, o NO através da iNOS tem efeito microbicida agindo sobre grande espectro de bactérias patogênicas enteroinvasivas, Contudo na DII, o NO produzido seguido da regulação da iNOS tem sido associado ao início e manutenção do processo inflamatório. Nos modelos de colite experimental observa-se excesso de produção de óxido nítrico pelo iNOS e baixa produção pelo nNOS durante a fase aguda (RABELO *et al.*, 2014; CATANZARO *et al.*, 2015).

Trabalho realizado por Szalai *et al.* (2014) reforça o papel da iNOS na DII em modelo de colite experimental induzida por TNBS. Neste ensaio, ratos que praticavam atividades físicas regulares apresentaram menor dano macroscópico no colo quando induzidos a colite pelo TNBS em comparação a ratos sedentários (controles). Neste sentido, o exercício físico diminuiu a isoforma (iNOS) e aumentou produção a cNos (óxido nítrico

constitutiva) demonstrando que o exercício físico atua melhorando o estímulo do sistema imunológico por meio do aumento da forma cNOS. Os autores defendem que substâncias antioxidantes como os flavonoides, os quais tem efeito anti-inflamatório, atuam melhorando a DII através da redução da expressão de citocinas inflamatórias e mediadores como iNOS.

No trabalho de Wang *et al.* (2008) foi testado o uso da substância antioxidante derivada da planta *Polygonum multiflorum* em ratos utilizando o modelo de colite aguda por AA e em colite crônica induzida por mitomicina C-avaliada com 7 e 24 dias de indução. Neste ensaio os autores verificaram que a substância antioxidante melhorou os danos tissulares no modelo agudo e crônico, bem como diminuiu a expressão da MPO (mieloperoxidase enzima de natureza inflamatória produzida principalmente por neutrófilos, bem como a expressão de (MDA) malonaldeído (produto da degradação das membranas lipídicas), aumentou a expressão de SOD (enzima detoxificadora superóxido dismutase) e inibiu a expressão de iNOS (óxido nítrico induzida). Os resultados demonstraram que as substâncias antioxidantes atuam diminuindo a expressão de iNOS e com isso há diminuição dos danos tissulares típicos da DII.

Senol *et al.* (2015) testaram a capacidade protetiva do composto kefir (probiótico, de origem láctea contendo bactérias do gênero: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, bactérias acéticas e leveduras em um modelo experimental *in vivo* de colite crônica induzida por DSS. No referido ensaio, os autores observaram produção de MPO, TNF- α , iNOS além da diminuição dos índices de atividade de doença aliado a menores danos histológicos. Porém, contraditoriamente, na avaliação do malonaldeído as quantidades relatadas entre os animais submetidos a colite eram as mesmas que os animais controles não induzidos a colite. Segundo os autores, o modelo de inflamação proposto oferecem danos em parte da mucosa e o MDA é medido em toda espessura do tecido, podendo estar assim subestimada conforme edema. O resultado relativo a produção de iNOS apresentaram valores menores nos animais controle sem induzir a colite mas tratados com kefir. Segundo os autores algumas substâncias probióticas presentes no kefir já estão documentadas na literatura como capazes de aumentar a iNOS. Porém, neste ensaio, durante o agravo químico ocorrido, o kefir atuou diminuindo a iNOS e TNF- α , diminuindo os danos tissular e apoiando a resolução da inflamação, servindo por isso como alternativa no tratamento da DII.

3.3 Modelos Experimentais da Doença inflamatória intestinal

Compreender a complexidade dos mecanismos que envolvem a fisiopatologia da DII e buscar novas alternativas medicamentosas para esta doença de elevado crescimento

mundial só é possível através de modelos em animais que mimetizem a doença. Na DII, os diversos modelos animais tentam mimetizar a doença verificada em humano e incluem modelos de indução química, modelo de transferência adaptativa e geração de colite espontânea. Os modelos de indução química de colite são os mais utilizados nos modelos experimentais, devido a semelhança do quadro de DII verificada em humanos. Além disso, são facilmente reproduzidos, possuem mecanismos de ação conhecidos no desencadeamento da fisiopatologia e custos menores do que os modelos de transferência adaptativa e geração espontânea, os quais requerem técnicas de biologia molecular (ELSON *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2008; MOUSAVIDEH *et al.*, 2009; AL-REJAIE *et al.*, 2013; ALEISA *et al.*, 2014; SENOL *et al.*, 2015).

Entre os modelos mais utilizados encontra-se indução de colite por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), por dextrano sulfato de sódio (DSS), oxazolone e ácido acético (AA), além de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais como carragenina, peptidoglicano-polissacarideo (RANDHAWA *et al.*, 2014).

No modelo de indução química de colite por TNBS, o agente químico é introduzido via retal nos animais previamente anestesiados. O álcool, veículo no qual é diluído o TNBS age rompendo as membranas celulares, aumentando assim a permeabilidade do TNBS, que associado as proteínas teciduais, desencadeia resposta inflamatória semelhante a DC. A resposta inflamatória observada nos animais por meio desta técnica é do tipo crônica, podendo perdurar por até dois meses. A resposta inflamatória causada é marcada por formação de granulomas e infiltrado inflamatório transmural no colo distal. Este modelo criado por Morris *et al.* (1989) mimetiza a DC, através do aumento da permeabilidade da mucosa intestinal. Sinais como diarreia sanguinolenta, queda de pelo, perda de peso e desnutrição são encontrados nos animais induzidos a colite por este modelo. A magnitude dos sinais encontrados serve como um índice para atividade da doença, sendo compatível ao verificado em pacientes com DII (MORRIS *et al.*, 1989; BARBOSA, 2011; CROMER *et al.*, 2013).

No modelo de indução de colite por TNBS, a utilização de escala de danos histológicos tem sido utilizado para definir o índice de magnitude do processo inflamatório bem como determinar o perfil inflamatório (agudo/crônico). Neste modelo, a avaliação dos achados histopatológicos de amostras do colo permite que seja verificado no tecido a presença de granulomas, infiltrados de leucócitos, baixo número de células caliciformes e destruição de criptas vilositárias e ou neutrófilos após quatro dias de indução química, assemelhando-se a doença de Crohn (SZALAI *et al.*, 2014; TOMASELLO *et al.*, 2015; KIESLER *et al.*, 2015).

Com relação aos dados bioquímicos, a mieloperoxidase enzima presente principalmente nos neutrófilos e que indica o grau de inflamação no tecido danificado, apresenta-se em quantidade proporcional a magnitude do processo inflamatório (GONÇALVES *et al.*, 2013; KONDAMUNDI *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2015).

Outro agente químico muito utilizado nas induções de DII é o DSS. Este composto caracterizado como um polissacarídeo de alto peso molecular é adicionado a água de beber dos animais em teste, em concentração que variam de 1 a 4%. Este modelo tem a vantagem de produzir modelos de colite aguda, crônica e recidivante bastando para isso modificar a concentração de DSS e administrá-la em ciclos, sendo aplicáveis nas mais diversas linhagens de roedores (DE FAZIO, *et al.*, 2014; HARTMANN *et al.*, 2014).

Por este modelo é possível investigar a extensão da resposta inflamatória que pode ser verificada por sinais e sintomas como: fezes amolecidas, com muco e ou sangue, presença de diarreia com e ou sem sangue e perda de massa corporal dos animais. Na análise tecidual da mucosa verifica-se lesões histológicas com perda variável da arquitetura das criptas, presença de infiltração de células inflamatórias, espessamento da camada mucosa, depleção de célula caliciforme bem como formação de abscesso na cripta. As análises bioquímicas revelam níveis de citocinas pró-inflamatórias agudas como IL-1, IL-6 e TNF- α , bem como a enzima MPO. Além disso, a atividade de MPO pode ser medida servindo com índice de inflamação (BROWN; TAYAL, 2013; RANDHAWA *et al.*, 2014).

O DSS é um elemento tóxico para a célula e a propagação da inflamação ocorre pelo aumento da permeabilidade intestinal em função do comprometimento da “tight junctions” da barreira com perda e redistribuição de proteínas como ocludinas ZO-01, claudina-1,-3,-4,-5 além de apoptose epitelial. A perda de função de barreira da mucosa permite o acesso de antígenos luminiais aumentando a resposta inflamatória. Por este modelo é possível verificar por meio de análises histológicas já nas primeiras 24 horas de tratamento dos animais, alterações macroscópicas e histológicas significantes de processo inflamatório. Pode ser observado hiperemia, ulcerações moderadas, forte edema na camada submucosa infiltração de neutrófilos, com perda na arquitetura das criptas da mucosa intestinal, presença de ulcerações e aumento da infiltração de polimorfonucleados. Após um ciclo e em outros, é possível verificar na mucosa mudanças advindas do processo de regeneração, com encurtamento de criptas, modificações e desordem dos tecidos glandulares. Com quatro ciclos de 7 dias é possível verificar displasia celular associada a colite ou adenocarcinoma em 15 a 20% dos animais servindo também como um modelo para verificar a susceptibilidade de indivíduos com colite ulcerativa ao desenvolvimento de tumor (ELSON *et al.*, 1995b; ORDÁS *et al.*, 2012). Mediadores inflamatórios neste modelo de indução de DII se assemelham ao humano com aumento de ERO, produtos eicosanóides, óxido nítrico e

ativação do sistema complemento, além de modificações no perfil de citocinas expressas por células Th1/Th2 e TCM (células T memória central) (ELSON *et al.*, 1995a).

Outro agente químico utilizado na indução da colite por enema é a oxazalona. Este indutor químico apresenta como desvantagem o efeito de alta resistência verificado em algumas linhagens de animais, sobretudo em C57BL/6J e SJL/J. Estes animais necessitam de pré-sensibilização com administração intradérmica deste agente antes da indução por enema. Semelhante ao DSS, este agente químico modula a resposta imune Th2. Verifica-se com a indução da oxazalona micro-ulcerações epiteliais e produção de grave quadro de colite após cinco ou sete dias de indução (RANDHAWA *et al.*, 2014).

Colite de natureza mais amena e, portanto, com melhor condição de conforto para os animais pode ser realizada com uso da carragenina. A carragenina é um polissacarídeo de alto peso molecular e diferente grau de sulfuração. É obtida de algas vermelhas. Semelhante ao DSS, este agente é colocado dissolvido na concentração de 2% na água de beber dos animais durante 6 semanas. O desenvolvimento das alterações histomorfológicas aparecem nos animais entre 2 e 4 semanas de tratamento e são suprimidas após 8 semanas de tratamento. Este modelo apresenta como vantagem a possibilidade de acompanhar as alterações histopatológicas de forma gradual. Existe a hipótese que o seu mecanismo de indução de colite ocorra pela formação de EROS, além da via de óxido nítrico o qual se encontra muito aumentado por esta técnica (ELSON *et al.*, 1995a).

Um outro agente químico indutor de colite é a indometacina. A administração deste anti-inflamatório não esteroide dissolvido em álcool absoluto, e posteriormente em solução de bicarbonato de sódio, aplicado por via subcutânea induz a colite ulcerativa em dois dias pós administração (BROWN; TAYAL, 2013; RANDHAWA *et al.*, 2014).

Dentre todos os modelos de indução química disponível, a instalação de enema por ácido acético diluído em água em animais tem sido utilizado (ELSON *et al.*, 1995 b; AL-REJAIE *et al.*, 2013; ALEISA *et al.*, 2014). Este modelo apresenta características histológicas e perfil de mediador inflamatório compatível com o observado em humanos. A administração de ácido acético provoca inflamação com grande quantidade de PMN na lâmina própria, ulcerações, necrose massiva da mucosa e submucosa e dilatação vascular. Porém, apesar do elevado grau de inflamação tecidual ele não atinge todas as camadas da mucosa (GHATULE *et al.*, 2012; RANDHAWA *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do AA na indução da colite ainda é controverso. Especula-se que o processo da indução da doença, seja por indução do estresse oxidativo com liberação pelo ácido de íons protonados nos espaços intercelulares e consequentemente acidez do meio e destruição celular. Esta teoria é reforçada pela semelhança existente entre

sintomatologia e características histomorfométrica apresentada por animais induzidos a colite por este método e os achados histopatológicos e macroscópicos verificado em pacientes portadores de colite ulcerativa (ALEISA *et al.*, 2014; KONDAMUDI *et al.*, 2014).

Elson *et al.* (1995) e Kawada *et al.* (2007) em revisão sobre modelos de indução da doença inflamatória intestinal discorrem que o modelo de indução de colite por AA é inespecífica não agindo diretamente nas respostas imunes e sim através de reações de ácido orgânica específica. Segundo os autores, a lesão inicial ocorre pela ação direta dos ácidos orgânicos sobre a mucosa sem o envolvimento de mecanismos inflamatórios, visto que durante as quatro primeiras horas da indução da colite pela infusão do AA existe destruição maciça do epitélio, porém sem a presença de células inflamatórias. Após 12 horas de aplicação do AA verifica-se a presença de neutrófilos. Contudo em modelos que usaram anticorpos contra neutrófilos, os mesmos não atenuaram a permeabilidade da mucosa e não diminuíram os sinais de lesão como hiperemia e ou danos histológicos. Desta forma, a ação de lesão aguda verificada de dano tissular envolveria especificadamente a ação de ácido.

Randahawa *et al.* (2014), em uma revisão sobre mecanismos químicos de indução de colite, discorrem que o estress oxidativo pode estar envolvido no mecanismo de ação do AA sobre a colite. Segundo os autores, a ação do AA leva ao desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. A teoria dos autores corrobora ao fato documentado em literatura que a infiltração de neutrófilos leva a produção de ânion superóxido com iniciação de cascata para geração de várias espécies reativas, além de que os neutrófilos também liberam proteases e mediadores lipídicos que adicionalmente contribuem para a lesão intestinal.

Tem sido bem documentado que a infiltração de neutrófilos leva à produção de ânion superóxido e a iniciação de uma cascata para a produção de várias espécies reactivas. Isto pode levar à geração de radicais hidroxilo e peróxidos que contribuem significativamente para a progressão da disfunção do tecido e necrose da mucosa Além disso, os neutrófilos também liberam proteases e mediadores lipídicos que, adicionalmente, contribuem para a lesão intestinal (LEONEL *et al.*, 2012).

A indução da colite por AA é realizada por enema com auxílio de cânula em poliuretano diâmetro de 2 mm em animais anestesiados e em jejum de 12 a 24 hs instilada 6 ~ 8 cm proximal do reto. Após a infusão do AA, os animais são mantidos em em ângulo de 45° para evitar o refluxo do AA. Eventualmente para melhor espalhamento do ácido, alguns autores utilizam-se lavagem intestinal com solução fisiológica primeiramente antes da instalação do AA (ALEISA *et al.*, 2014; KIESLER *et al.*, 2015). A indução de colite por este método é restrita ao colo, reproduz uma inflamação de característica aguda, sendo um

modelo recomendável para avaliação e triagem de novas drogas para DII, pois permite verificar a recomposição também do epitélio (RANDHAWA *et al.*, 2014).

3.4 Tratamento da DII

O tratamento da DII utiliza vários recursos no controle da doença que envolve o uso de diferentes classes de fármacos: aminossalacilatos, corticoides, imunomoduladores, antibióticos e terapia biológica. Apesar dos recursos medicamentosos, a intervenção cirúrgica é um prognóstico esperado para 60-70% dos indivíduos acometidos. Destes pacientes, 50% estarão sujeitos a subsequente intervenção cirúrgica (GONÇALVES *et al.*, 2008) o que demonstra assim a necessidade de busca de outros fármacos para controle e/ou cura da doença.

Os aminossalacilatos, primeira linha de medicação, são utilizados para pacientes com DII e atuam inibindo a síntese da COX1 e COX2 e consequentemente a produção de prostoglandinas. Também inibem a síntese do receptor NK gerando diminuição na produção de citocinas (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014).

Os corticoides são potentes moléculas anti-inflamatórias reduzindo a proliferação clonal das células Th, através da diminuição da transcrição dos genes para IL-2. Atuam também na transcrição de outros genes que codificam as citocinas TNF- α e INF- γ e IL10, tanto na fase de indução quanto efetora. Contudo, o uso prolongado dos corticoides pode levar a efeitos colaterais e perda da efetividade farmacológica (PINHO *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2014).

Os imunomoduladores são utilizados em pacientes refratários aos tratamentos anteriores. Foram desenvolvidos a partir de compostos análogos a purinas (azatioprina e 6-mercaptopurina). Os imunomoduladores são utilizados na manutenção e recorrência clínica bem como em tratamento das fístulas. Estes compostos apresentam alta citotoxicidade nas células, infecções oportunistas e sintomas gastrointestinais (RODRIGUES, 2011).

Os anticorpos monoclonais anti-TNF α agem reconhecendo os ligantes e outras proteínas específicas, não permitindo a reativação da doença. Estes representam um avanço expressivo no controle da DII. Os representantes desta categoria de medicamento são o Infliximab® e Adalimumab®. Contudo, estes medicamentos estão relacionados a maior incidência de infecção respiratória, incidência de linfomas de Hodgkin e tuberculose além de eritemas e dispepsias. No tratamento da DII é comum associar o uso do antibiótico no controle das infecções oportunistas. Entretanto, sua utilização em longo prazo levam a

efeitos colaterais sistêmicos que limitam o seu uso (ORDÁS *et al.*, 2012). Além dos efeitos colaterais apresentados, os tratamentos medicamentosos existentes na DII costumam levar perder seu efeito durante uso crônico, possuem alto custo e não impedem a recidiva da doença. Portanto, faz-se necessário a busca de novas alternativas terapêuticas para esta doença que apresenta progressão mundial (JAKOBSSON *et al.*, 2015; STROBER, 2015).

3.5 Produtos Naturais testados em modelo de inflamação intestinal

Os resultados de pesquisas básicas, envolvendo o uso de plantas e substâncias de origem natural, têm demonstrado que estes podem se configurar como uma nova alternativa de tratamento da DII. Dentre as substâncias naturais estudadas, o óleo de copaíba, composto por grande quantidade de terpenos apresentou efeito protetor no colo dos animais previamente tratados e induzidos a colite. Além deste terpeno, outros produtos naturais investigados na prevenção e ou tratamento da DII também demonstraram resultados significativos (AWAAD *et al.*, 2014).

No trabalho de Rashidian *et al.* (2014) o óleo de gengibre administrado oralmente durante cinco dias foi testado em modelo de colo proteção, em ratos induzidos a CIAA. Neste ensaio, os autores verificaram que o óleo essencial de gengibre, em todas as doses testadas diminuiu o dano tissular provocado pelo AA através da melhora dos parâmetros macroscópicos, que envolveram menor edema e diminuição no número de úlceras bem e extensão destas na mucosa, além de menor dano histológico. Outro produto natural da classe dos terpenóides que também apresentou resultados no tratamento da colite é o Ginko biloba. Esta substância, possui como constituintes majoritários os terpenóides e bioflavonas, graças a estes constituintes figura-se como um potente antioxidante. A Ginko biloba apresentou importantes efeitos anti-inflamatório no modelo de colite crônica induzida por agente químico. Segundo os autores, os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatórias verificados netes produto, devem se possivelmente, a supressão das atividades de macrófagos, podendo ser utilizado como alternativa de tratamento da DII. Os estudos indicaram ainda que este produto atua também nos mediadores inflamatórios por via antioxidante. Destaca-se também o estudos com *Zataria multiflora* Bois, cujo princípio estudado é o resveratrol. Este fitofármaco composto por substâncias como timol, γ cravicol e terpenóides que também demonstrou resultados positivos no tratamento da colite crônica (AWAAD *et al.*, 2013).

Hartmann *et al.* (2014) verificaram importantes propriedade antioxidantes e anti-inflamatórias do tratamento do extrato de *Boswellia serrata*, rico em alcaloides,

terpenóides, triterpenos e fenóis dois dias antes e dois dias depois em ratos submetidos a colite por indução química de AA. Os autores, observaram melhora nos padrões de pressão do esfíncter anal, diminuição da lipoperoxidação, expressão de óxido nítrico e INOS além de menores danos macroscópicos e histológico dos animais.

A própolis verde, produto com elevada quantidade de ácido cafeíco, apresentou importante efeito modulador na resposta inflamatória em modelo de colite induzida em ratos (GONÇALVES *et al.*, 2008, 2013; OKAMOTO *et al.*, 2013a). Apesar dos grandes constituintes majoritários da própolis verde (ácido cafeico e flavonoides) apresentarem efeitos antioxidantes, a sua ação sobre os processos inflamatórios ainda são controversos. Gonçalves *et al.* (2013), utilizando o extrato de própolis verde no modelo de indução de colite química por TNBS, não observaram a redução da enzima mieloperoxidase nos primeiros 5 dias de tratamento dos animais. Com 12 dias de tratamento, os autores observaram redução do infiltrado inflamatório e MPO quando comparado ao controle positivo. Segundo os autores, a propópolis verde parece ter efeito mais lento, modulando o processo inflamatório.

Okamoto *et al.* (2013), utilizaram o extrato de própolis verde em animais induzidos a colite crônica pelo TNBS verificaram atividades anti-inflamatórias do extrato avaliado pelo índice de atividade da doença, análises histológicas e secreção de interleucinas anti-inflamatórias. Foi sugerido que a atividade anti-inflamatória do extrato seria devido a redução da diferenciação celular das células Th1 e por conseguinte secreção menor de IL-1 β por macrófagos. A IL-1 β é uma citocina pro-inflamatória responsável por inúmeras respostas locais e sistêmicas à injúria. Considerando que os mecanismos inflamatórios atuam em rede, os autores citam que efeito anti-inflamatório pode estar associado ainda com uma melhor resposta intestinal ao estresse oxidativo, devido à reduzida atividade da mieloperoxidase e aumento das defesas antioxidantes endógenas do tecido inflamado do colo, como glutatona a qual protege a mucosa inibindo a peroxidação lipídica.

Trabalhos anteriores que avaliaram o efeito anti-inflamatório de própolis em modelo de úlcera péptica ou colite demonstraram outras vias de ação anti-inflamatória, com redução das citocinas IL-1 β , IL-12 produzidas por monócitos e macrófagos e IL-4 produzidas por de linfócitos Th2. Contudo, a produção de TGF- β 1 por células Treg foi aumentada. Estes efeitos foram atribuídos a presença de éster de fenetilo ácido cafeico (CAPE), hesperidina e quercetina, compostos majoritários observados na própolis testada (AWAAD *et al.*, 2013).

Produtos ricos em flavonoides também têm sido investigados em modelo colo protetor ou no tratamento da DII, apresentando bons resultados. Neste sentido os efeitos benéficos da kolaviron, flavonoide extraído das sementes de *Garcinia kola*, foi investigado na DII em ratos induzidos a colite por DSS nas doses de 200 mg e 500 mg/kg. O resultado

deste teste indicou que kolaviron preveniu significativamente a colite induzida por DSS, sendo avaliado pelos critérios clínicos de perda de massa corporal, bem como a incidência de diarreia e melena em ratos. Estes efeitos foram conseguidos provavelmente devido à diminuição da produção de óxido nítrico do colo, mieloperoxidase e mediadores inflamatórios como interleucina-1B e TNF α . Histologicamente somente a DSS resultou em erosão epitelial, ausência total de células caliciforme e destruição de criptas, além de intensa presença de células mononucleares no tecido (FAROMBI *et al.*, 2013). A curcumina, outro flavonoide com propriedades antitumorais, antioxidante, anti-inflamatória foi testado em modelo de colo proteção, demonstrando efeitos protetores dos flavonoides na instalação de colite por agentes químicos (TOPCU-TARLADACALISIR *et al.*, 2013).

Extrato produzido com talho de madeira retirada da árvore *Moringa Olífera* Lam, rico em flavonoides, antocianinas e prostoancidinas, demonstrou efeito colo protetor desta em ratos submetidos a colite pela infusão retal de AA. Análises demonstraram que o extrato de *Moringa Olífera* Lam diminuiu a lipoperoxidação, bem como a produção de enzima mieloperoxidase. Resultados de análises macroscópicas e histológica revelaram que os animais pré tratados com o extrato da árvore e posteriormente induzidos a colite, apresentaram menores danos tissulares em comparação aos não tratados.

A classe dos flavonóides, também está sendo estudados na prevenção e ou tratamento da DII com bons resultados. Joo *et al.* (2015) estudaram o efeito do tratamento prévio até 48 horas e posterior de 24 horas de dois flavonoides eupatilin ou quercetina-3- β -D-glucopiranosídeo administrados oralmente em ratos induzidos a colite por TNBS. Os resultados deste experimento indicaram que ambos compostos tem ação dose dependente, através da redução da enzima mieloperoxidase, produção de óxido nítrico, fator de necrose tumoral α , malondialdeído, e aumento dos níveis de enzima detoxificadora como glutathione.

Manzo *et al.* (2015) testaram a geléia real, outro elemento rico em flavonoides no modelo de colite crônica induzida por agente químico em ratos. O resultado deste trabalho revelou que a geléia real tem ação no tratamento da DII atuando em vias antioxidantes, aumentando expressão de enzimas detoxificadoras em animais tratados e induzidos a colite. A geléia real auxiliou também, na recuperação do epitélio intestinal conforme pode ser verificada nas análises macroscópicas do segmento intestinal dos animais tratados e controle induzido a colite bem como nas análises histológicas.

Por todos os constituintes químicos presentes que levam a diversas atividades imunológicas e antioxidantes, os produtos naturais constituem - se como promissoras alternativas no tratamento da DII.

3.6 Própolis vermelha

A própolis vermelha é uma variedade de própolis encontrada no nordeste do país. Diferente outros tipos de própolis presentes no Brasil e em outros países, esta própolis apresenta-se distinta tanto pela coloração vermelha intensa, quanto pela presença de compostos de características apolar. A própolis vermelha apresenta ainda flavonoides considerados fitoestrógenos, tais como a formononetina e biochanina A, além de glicosídeos (RIGHI *et al.*, 2013).

Na composição química do extrato hidroalcólico de própolis vermelha foram identificados compostos tais como: quercetina, formononetina, daidzeina, biochanina A. Os componentes polares do extrato bruto de própolis foram avaliados com relação aos componentes antibacteriana e antioxidante, possuindo também ações biológicas (OLDONI *et al.*, 2011).

Com relação à atividade antioxidante, testes com uso de própolis vermelha em modelos de sequestros de radicais DPPH e inibição de oxidação do sistema β carotenóide/ácido linoleico indicam que esta é útil em inibir radicais livres gerados durante a peroxidação de ácido linoleicos. Benzofenonas isopreniladas presentes neste material possuem potencial antioxidante maior quando comparada a flavonoides (RIGHI *et al.*, 2013).

Ensaios realizados por Pinheiro *et al.* (2014), utilizando administração do extrato hidroalcólico de própolis vermelha (EHPV) em modelo de carcinogênese induzido por DMBA (17,1-2 dimetilbenzeno) em ratos, identificaram efeito quimioprotetor na dosagem de 100 mg/kg. Estes animais apresentaram menores índices de diferenciação de células e menor poder invasivo dos tumores. Neste ensaio, os autores realizaram caracterização do EHPV e encontraram alto teor de formononetina no extrato utilizado.

Da Silva Frozza *et al.* (2014) verificaram que a própolis vermelha induz também a apoptose em células cancerígenas, bem como reduz a mobilidade destas células em modelo de carcinoma de bexiga. Os autores sugerem também que o processo de apoptose pode estar relacionado com fator quimioprotetivo da própolis vermelha.

Ribeiro *et al.* (2014) realizaram um ensaio como uso da própolis vermelha em modelo de carcinogênese dérmica em ratos. Neste ensaio foi verificado que a própolis apresenta efeito quimioprotetivo em lesões carcinogênicas atribuindo esta ação as propriedades antioxidativas do constituinte formononetina, composto majoritário da própolis vermelha. Os achados antitumorais atribuídos a própolis vermelha em diversos modelos de

carcinogênese sugerem o teste desta substância na prevenção e tratamento da DII uma vez que existe forte associação entre a UC e câncer retal (MKÓMA, 2013).

O efeito bactericida do EHPV da própolis Sergipana foi testado por Siqueira *et al.* (2014) em dentes contaminados com o *E. fecaelis*. O resultado demonstrou atividade bactericida do EHPV nos dentes previamente contaminados e tratados posteriormente com EHPV. López *et al.* (2015) realizou testes antibacterianos in vitro do EHPV contra uma variedade de bactérias gram negativas e positivas. Neste trabalho o autores observaram uma melhor ação bactericida do EHPV em bactérias do tipo gram negativa, reforçando assim atividade bactericida deste tipo de própolis.

Em ensaios de cicatrização realizado por De Almeida *et al.* (2013) foi testado o efeito de membranas com EHPV no tratamento de queimadura dérmicas em ratos. O resultado do trabalho demonstrou que o EHPV favoreceu a atividade de cicatrização das queimaduras, possuindo atividade cicatrizante.

Em ensaio avaliando o potencial antinoceptivo e anti-inflamatório, Lima Cavendish *et al.* (2014) utilizaram EHPV e formononetina no modelo de edema de pata, induzido por carreginina em ratos. Os autores identificaram a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do EHPV, bem como da formononetina. Foram observados a diminuição da contorção abdominal dos animais e da formação de edema. Foi verificado também que o EHPV e a formononetina apresentaram resultados superiores para ação antinociceptiva quando comparados a medicamentos clássicos utilizados para esta finalidade. Os autores atribuem este efeito do EHPV pela inibição da migração de neutrófilos para o local da inflamação bem como atividade neurogênica. Estes resultados apoiam o uso da própolis vermelha no tratamento e ou prevenção de colite. Trabalho de análise do processo anti-inflamatório in vitro do EHPV fo realizado por Bueno Silva *et al.* (2015). Neste trabalho os autores estimularam as células de macrófagos a inflamação através da sensibilização por lipopolissacarídeos de *E. coli*. Foram avaliados parâmetros de produção de NO e interleucinas pelos macrófagos, além da expressão do NF-κB. Como resultado, foram relatados efeitos atenuantes do EHPV na menor dose 50μl sobre a produção de NO, a qual, segundo os autores ocorreram por menor expressão de citocinas inflamatórias IL-1 e IL-12, INF-γ β e inibição das vias de sinalização para o NF-kB nos macrófagos estimulados a inflamação, estes resultados indicam uma possível via de ação de mecanismo de ação do EHPV em processo inflamatório. De particular interesse, o fato do EHPV diminuir a a sensibilização dos macrófagos aos ligantes bacterianos, credenciam o teste do EHPV em modelo de colite, visto que uma das vias estudadas para perpetuação do processo inflamatório da DII é o aumento da sensibilização de macrófagos e células epiteliais ao estímulo de LPS.

Compostos isolados do EHPV, como formononetina, biochanina A e isoliquiritigenina estão sendo estudados em modelos experimentais de colite, apresentando resultados significativos. Estes ensaios são de particular relevância, pois podem indicar o possível composto químico responsável pelas propriedades anti-inflamatórias atribuída ao EHPV.

A biochanina A, um dos compostos presentes na própolis vermelha e em outros produtos naturais, foi testada *in vitro* contra bactérias patogênicas e normais da microbiota intestinal. Neste ensaio, os autores observaram uma seletiva ação da biochanina A contra micro-organismos enteropatogênicos e manutenção da microbiota residente normal, demonstrando que este composto além de não tóxica ao organismo é específico contra patógenos. Os autores ainda sugerem que a utilização da biochanina A em combinação com probiótico pode aumentar a eficácia das terapias antimicrobianas existentes e equilibrar a saúde da microbiota residente. Contudo, ainda são necessários a realização de novos ensaios que investiguem o mecanismo de ação da biochanina A (SKLENICKOVA *et al.*, 2010).

A daidzeína, substância presente na própolis vermelha e na soja foi testada em modelo de colo proteção. Nos ensaios realizados por Sakai *et al.* (2011), verificou-se que a daidzeína administrada durante sete dias antes da indução da colite por DSS a 4% preveniu a perda de massa excessiva quando comparada aos animais controle. O equol, produto do metabolismo de isoflavonas, também impediu a perda de massa dos animais. Neste mesmo experimento, foi verificado que o equol diminuiu a produção de IL-10, mas não diminuiu a produção de INF- γ , IL-4 e TNF- α .

Os efeitos anti-inflamatórios de liquiritigenina, flavonoíde que também é encontrado na própolis vermelha foi estudado no modelo colo protetor de colite induzida por de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos. Neste ensaio os autores verificaram que a liquiritigenina na maior dose promoveu menor perda de massa corporal dos animais com colite. A molécula atua inibindo o processo de redução do tamanho do colón e previne maiores danos histológicos a mucosa. Além destes efeitos foi observado que a maior dosagem de liquiritigenina diminuiu a atividade da mieloperoxidase e a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Estes efeitos provavelmente são decorrentes da redução na fosforilação no IKK β , p65, e I κ B- α (MIN *et al.*, 2015).

A formononetina, geralmente encontrada em maior proporção nos extratos hidroalcóolicos de própolis vermelha tem atividade antioxidante e anti-inflamatória bem documentada pela literatura. Em ensaio realizado por Zhanqiang *et al.* (2013) verificou-se o efeito da formononetina em ensaio de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos. Medidas de edema pulmonar, análises histológicas, atividade de

enzimas antioxidantes como SOD foram avaliados. A magnitude da inflamação foi mensurada pela MPO, além de níveis de mediadores inflamatórios como: TNF- α , IL-6. Neste ensaio os autores observaram que os animais tratados com formononetina tiveram diminuição do TNF α , IL-6 e MPO. As secções histológicas dos pulmões mostraram que após tratamento com formononetina os tecidos se apresentaram com menores danos em comparação com o grupo não tratado. Os resultados indicaram que a formononetina tem um efeito protetor na lesão pulmonar aguda por atuar impedindo o processo inflamatório induzida pela interação entre LPS e células endoteliais.

Trabalho de Wang *et al.* (2012) testou *in vitro* o tratamento com formononetina sobre células insulinêmicas do pâncreas avaliando parâmetros de produção de IL-1 β , apoptose celular e geração de iNOS. Neste trabalho foi verificado que a formononetina inibe o NFK- β , impedindo o aumento da citocina IL-1 β . Esta citocina tem o papel de induzir a produção de iNOS o qual é responsável por catalisar a geração intracelular de radicais livres. Desta forma, o efeito protetor é conferido provavelmente pela via do óxido nítrico.

Ramos *et al.* (2012) testaram *in vitro* e *in vivo* o potencial antioxidante e atividade anti-inflamatória da formononetina em edema de pata induzido por carragenina e migração de leucócitos. Neste ensaio, os autores verificaram efeitos anti-inflamatórios da formononetina devido a inibição de algumas enzimas envolvidas em vias de sinalização celular como ciclo-oxigenase (COX) e inibição da 5-lipoxigenase, enzimas estas também envolvidas na geração de ERO e na síntese de NO em DII.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e caracterização do Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV).

A própolis vermelha, proveniente da região Nordeste do Brasil foi coletada em Junho de 2011 no apiário na ilha do Porto (ilha da Lagoa Manguaba), no Município de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas-Brasil com coordenadas de S 9° 44'36,84288'' e O 35°52'3,632813''.

4.1.1 Extração e Rendimento

A amostra bruta de (14 g) de própolis vermelha foi mantida durante 1 h em bequer contendo 175 mL de álcool a 70%. Após este período, a solução foi submetida a banho de ultrasson durante 1 h. O extrato obtido foi filtrado e o solvente eliminado por evaporação em estufa a 50°C durante sete dias, obtendo-se o extrato seco. O rendimento da extração foi calculado através da relação entre massa do EHPV obtido das placas de petri em relação a massa bruta de própolis vermelha utilizada (100%). O EHPV foi mantido em frasco âmbar sob refrigeração até o momento do uso (DA SILVA *et al.*, 2015).

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise cromatográfica foi realizada com base na metodologia proposta por Alencar *et al.* (2007). Sendo assim, o EHPV foi dissolvido em uma solução de metanol/água (50:50) na concentração de 200 µg/mL. Esta solução estoque foi diluída para uma concentração final de 40 µg/mL e filtrada com membrana PTFE 0,45 µm (Milipore-HVHP, MA-ESA). Em seguida foi analisada em cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com degaseificador DGU-20A3, um amostrador automático SIL-20, duas bombas (A/B) LC-20AD e um detector de arranjo de diodos SPD-M20avp (DAD) com uma interface CBM-20A. Para a cromatografia, foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex/C18 de fase reversa de 250 X 4,6 mm (5 µm de tamanho da partícula), com razão de fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

O sistema de eluição foi realizado utilizando a fase móvel composta por ácido acético: água mili-q 1.0% (v/v) (A) e metanol (B). A eluição foi iniciada utilizando 40% de B por 10 min seguida por um aumento em gradiente para 50-55% de B até 15 min, 55-65% de B até 23 min, 65-70% de B até 35 min, 70 a 80% de B até 45 min.

A detecção foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. Foram utilizados padrões autênticos de flavonoides: formononetina, dadzeína, biochanina A, liquiritigenina (Sigma Aldrich Co, Sto.Louis, Mo, USA).

4.2 Ensaio biológico

4.2.1. Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa obedeceu as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes sobre o parecer consubstanciado nº 031014 (Anexo 1).

4.2.2. Delineamento experimental

Para o ensaio biológico foram utilizados 20 ratas *Novergiccus albinus*, da linhagem Wistar, fêmeas, com massa variando entre 190 e 250 g (aproximadamente 3 meses de idade), provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. Os animais foram mantidos em gaiolas com cinco animais em ambiente climatizado com temperatura média de 22°C +/- 2°C, **controle** de ciclo claro e escuro de 12 h, e com livre acesso a água e ração. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos (n=5) e tratados via oral por gavagem, durante sete dias, no período matutino Quadro 2. Após o período de tratamento os animais foram submetidos a enema com ácido acético para indução a colite ou por solução fisiológica conforme grupo de animais e tratamento descritos na tabela 2 e item 4.2.3.

Quadro 2. Formação dos grupos experimentais de acordo com o pré-tratamento utilizado

Grupos de animais (n=5)	Tratamento por (v.o)	Administração do enema
Sham (não induzido a colite)	Água	Solução fisiológica
Veículo	Solução Tween 80 a 5%	Ácido acético 4%
P10	EHPV 10 mg/ kg	Ácido acético 4%
P100	EHPV 100 mg/kg	Ácido acético 4%

4.2.3 Procedimentos de indução de colite química

A colite química foi induzida por meio de enema com ácido acético a 4%, conforme método descrito por Al-Rejaie *et al.* (2013). No oitavo dia, os animais foram pesados e submetidos a jejum de ração por 12 h com livre acesso a água. Os animais foram anestesiados com uso concomitante de relaxante muscular e tranquilizante (xilasina e ketamina, nas doses de 5 mg/Kg cada) via intraperitoneal. Os animais foram submetidos a dois procedimentos de enema. O primeiro enema constituiu-se de infusão retal com auxílio de cateter urinário pediátrico nº 06 contendo 2 mL de solução salina a 0,9% até 4 cm da altura do reto. Nesta ocasião procedeu-se a aspiração do conteúdo intestinal com auxílio de seringa de 20 mL acoplada ao cateter.

Em seguida, os animais foram submetidos a um segundo procedimento de enema utilizando ácido acético a 4% como solução de lavagem para os grupos testes (Veículo, EHPV10 e EHPV100) ou salina para o grupo Sham conforme Quadro 2. Ao final deste procedimento, os animais foram mantidos deitados em ângulo de 45° por 2 min para evitar retorno do conteúdo intestinal, para então serem devolvidos para as suas gaiolas sendo providos de água e ração.

4.3 Análise Anatomorfológica

4.3.1 Eutanásia dos animais e exame macroscópico post-mortem

Após 24 h da indução de colite, os animais foram submetidos a novo jejum de 6 h e submetidos à eutanásia através de anestesia profunda. Em seguida, foi realizada laparotomia na cavidade abdominal do animal, com localização e excisão das partes distais

e proximais de todo o intestino, seguida por remoção do conteúdo fecal por lavagem com solução salina a 0,9%. Posteriormente, as amostras teciduais foram separadas anatomicamente para análise macroscópica a fresco conforme critérios definidos na Quadro 03 conforme critério de Morris (1989).

Quadro 3. Análise macroscópica do dano a mucosa

Escore	Dano a mucosa
0	Sem dano, mucosa íntegra, tecido firme, cor característica, sem sinais de espessamento, hiperemia, necrose e ou úlceras
1	Hiperemia sem ulceração e inflamação
2	Úlcera linear localizada sem sinais de inflamação significativa.
3	Úlcera linear com inflamação em um único local.
4	Presença de até dois ou mais locais com ulceração menor que 1 cm e ou inflamação significativa
5	Dois ou mais locais com ulceração > 1,0 cm e inflamação com ao longo do comprimento do colo

A inflamação foi definida por regiões com hiperemia e espessamento da parede intestinal, observado por dois experimentadores de forma cega (sem conhecimento de qual grupo/amostra estava sendo avaliado).

Após avaliação macroscópica, os espécimes teciduais do colo foram seccionados em partes e congelados a -28°C para realização dos testes de atividade antioxidante in situ. Parte dos fragmentos seguiram para fixação em formol tamponado a 10% (pH 7,4) por 48 h e posterior processamento, inclusão em parafina, e microtomia e coloração em hematoxilina e eosina.

4.3.2 Análise microscópica

Após fixação, as amostras teciduais foram submetidas a etapas de processamento histológico de rotina, compostas de desidratação em concentrações crescentes de etanol (70°gL, 90°gL e 96°gL), diafanização em xilol, e emblocamento em parafina. A microtomia foi realizada em micrótomos semiautomáticos (Modelo MR14), regulado para 5 µm. Seis secções histológicas seriadas de cada bloco seriado foram obtidos de cada segmento anatômico

amostral e foram coradas em H&E (hematoxilina e eosina). A análise histológica foi procedida em microscópio binocular (modelo CX31, Olympus, São Paulo/SP, Brasil), nas magnificações de 40x, 100x e 400 x, de maneira cega.

Para análise da dinâmica da resposta inflamatória colônica foram utilizados os critérios definidos por Souza *et al.* (2013), apresentados na Quadro 4.

Quadro 4. Parâmetros histológicos de caracterização da resposta inflamatória

Escore	Parâmetros histológicos de caracterização da resposta inflamatória	
	Semiquantificação da intensidade da resposta inflamatória	Caracterização histológica do perfil inflamatório
0	Ausente	Ausente
1	Leve	Crônico (predomínio de células mononucleares)
2	Moderada	
3	Intensa	
4	Intensa	Subagudo (equilíbrio entre células polimorfo e mononucleares)
5	Intensa	Agudo (predomínio de células polimorfonucleares)

Para análise de outros danos histológicos da mucosa colônica foram considerados os seguintes critérios: distorção morfoarquitetural das criptas, criptite, ulceração, perda do parênquima glandular e edema intersticial. Todos os parâmetros foram analisados semiquantitativamente, de acordo com a seguinte classificação: 0 (ausente), 1 (leve, em menos de 10% do tecido examinado), 2 (moderado, entre 10 a 50% do tecido examinado) e 3 (intenso, em mais de 50% do tecido examinado). A seguir foi obtida a soma dos escores dos parâmetros avaliados e em seguida a média destes escores por grupo.

4.4 Ensaios antioxidantes e dosagem da mieloperoxidase

4.4.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da MPO foi avaliada através da pesagem dos tecidos seccionados do colo, seguido de homogeneização em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% (m/v) na proporção de 1 mL de HTBA para 50 mg de tecido durante 1 min.

Alíquotas de 1 mL da solução foram centrifugadas por 2 min a 14000 rpm. Cem μ L do sobrenadante obtido foram transferidos para placa com 96 poços e misturado a 0,196 μ L de solução de o-dianisidina preparada em tampão fosfato a 0,005% H_2O_2 . Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em 460 nm.

As alterações de leitura na absorbância foram anotadas e o valores expressos como unidade de MPO (UMPO) por mg de tecido, considerando 1 MPO equivale a quantidade de enzima que degrada 1 μ mol de tecido de H_2O_2 , conforme previamente demonstrado por Bradley *et al.* (1982).

4.4.2 Determinação da Lipoperoxidação

A lipoperoxidação tecidual foi realizada pelo método de TBAR's conforme descrito por Bose *et al.* (1989). As amostras do tecido do colo foram pesadas e homogeneizadas na proporção de 1 gr de amostra para 5 mL de tampão fosfato de sódio 1 mMol/L, pH 7,4 contendo 167 μ L butil-hidroxitolueno (BHT: 12 mMol/L) para cada mg de tecido em banho de gelo. Alíquotas de 200 μ L do homogenato foram adicionadas a solução de 400 μ L contendo: ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,37%, ácido tricloroacético (TCA) a 15% e ácido clorídrico a 0,25 N.

A amostra foi submetida a aquecimento a 90°C por 45 minutos seguida por centrifugação em temperatura ambiente por 5 min a 14000 rpm. 300 μ L de sobrenadante de cada amostra foram adicionadas de 300 μ L de solução saturada de cloreto de sódio e 300 μ L de solução de n-butanol para a extração do produto da reação. Ao final pipetou-se 100 μ L do sobrenadante em placas contendo 96 poços e realizou-se a leitura a 535 nm. Os valores foram expressos como nmol de MDA por mg de tecido utilizando para tanto um coeficiente de extinção molar.

4.4.3 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da (SOD) foi avaliada conforme modelo proposto por Modesh e Balasubrimanian (1998) por meio da reação de formação de oxigênio singlete na auto oxidação do pirogalol e inibição do sal tetrazolium. O tecido do colo foi homogeneizado em tampão fosfato (50 mMol/L) pH 7.4. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos (centrifuga Heal Force, neofuge 5R). A reação foi realizada homogeneizando em microplaca de Elisa com 96 poços, o sobrenadante obtido, tampão fosfato e tetrazolium (1,25 mMol/L) e pirogalol (100 µl/L) / Em seguida a microplaca foi agitada por 5 min, seguida por adição de 5 µl de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 570 nm (Biotek, El x100 absorbance microplate reader). A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por mg de proteína tecidual, conforme abaixo.

A determinação do teor de proteína totais foi determinada conforme método proposto por Lowry *et al.* (1951). 100 mg de amostra de tecido do colo foi misturado 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) (0.5 mol/L) e após 15 segundos acrescentou-se 1 mL 2% de Na₂CO₃, (carbonato de sódio) 1% de Sulfato de cobre (CuSO₄) e 2% de Tartato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆H₂) (100:1:1) ao final adicionou-se o reagente de Folin e após 30 minutos foi procedida a leitura de absorbância a 630 nm em espectrofotometro de placa (ELX800, Biotek instrumental). O teor de proteína foi determinado utilizando uma curva padrão obtida com albumina bovina (Sigma Adrich).

4.4.4 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi realizada de acordo com método proposto por Nelson e Kiesow (1972) e adaptada por Gioda *et al.* (2010). Segmentos do colo foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato e em seguida centrifugados (Heal force, Neofuge 15R) a 1200 rpm, 4°C durante 30 min. O homogenato foi diluído em 1 mL de tampão fosfato 50 mMol/L pH 7.0 (v/v) e a reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogenio 0,3 mol/L, seguida por medidas em espectrofotometro (Hitachi, Japão) em intervalo de 15 segundos, durante dois minutos em comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima foi expressa pela diferença da variação de absorbâncias (Delta E/min/mg de proteína).

4.5 Expressão imunohistoquímica do óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

Secções histológicas do segmento intestinal do colo descendente com 5 µm de espessura foram desparafinizadas em xilol, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70,80, 96°GL) e submetidas à recuperação antigênica em micro-ondas em potencial alto, imersas em tampão citrato 0,1 M, pH.6.0 (dois ciclos de 18 min). Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução H₂O₂ a 3% durante 30 min. Foi procedida então, a incubação com o anticorpo primário anti-iNOS (antígeno NOS 2, clone C-19, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, 1:100, 2h). Posteriormente foi efetuada a incubação com anticorpo secundário de coelho anti-camundongo associado ao complexo avidina-biotina-peroxidase (SABC, Vctor, 1:100, 2 h, São Paulo, Brasil). As reações foram reveladas com solução de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) (10 mg diluída em 20 mL de Tampão fosfato contendo H₂O₂ a 30%) e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck®). A expressão imunohistoquímica da iNOS foi semiquantificada em seis secções histológicas semisseriadas, com distância interseccional de aproximadamente 25 µm. Os casos foram considerados positivos para iNOS quando a coloração marrom era visível no citoplasma da célula conforme escores :0 (imunomarcacão em até 10% das células), 1 (imunomarcacão em 10 a 25% das células), 2 (imunomarcacão em 20 a 50% das células) e 3 (imunomarcacão em mais de 50% das células).

4.6 Análise estatística

Todos os dados ordinais obtidos neste estudo foram submetidos a análise de distribuição gaussiana (normalidade) por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram curva de distribuição gaussiana, diferenças significativas entre médias dos diferentes grupos foram analisadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey (testes paramétricos).

Quando os dados não apresentaram curva de distribuição gaussiana, ou quando as medianas foram obtidas a partir de escore, diferenças significativas entre médias dos diferentes grupos foram analisadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (testes não-paramétricos). O nível de significância adotado nestes testes foi de 5% e intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi realizada com apoio software Grapad Prism. Versão 5.0.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento e caracterização química do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha

O rendimento do processo de extração do EHPV foi 18,74%. A análise cromatográfica revelou cinco picos importantes no comprimento de onda de 280 nm representados por formononetina, liquiritigenina, daidzeína, e biochanina A, assim como um composto não identificado com tempo de retenção de 42,86 minutos (Fig. 5). Conforme demonstrado na Tabela 1 liquiritigenina e formononetina foram os compostos químicos com as concentrações mais elevadas no extrato.

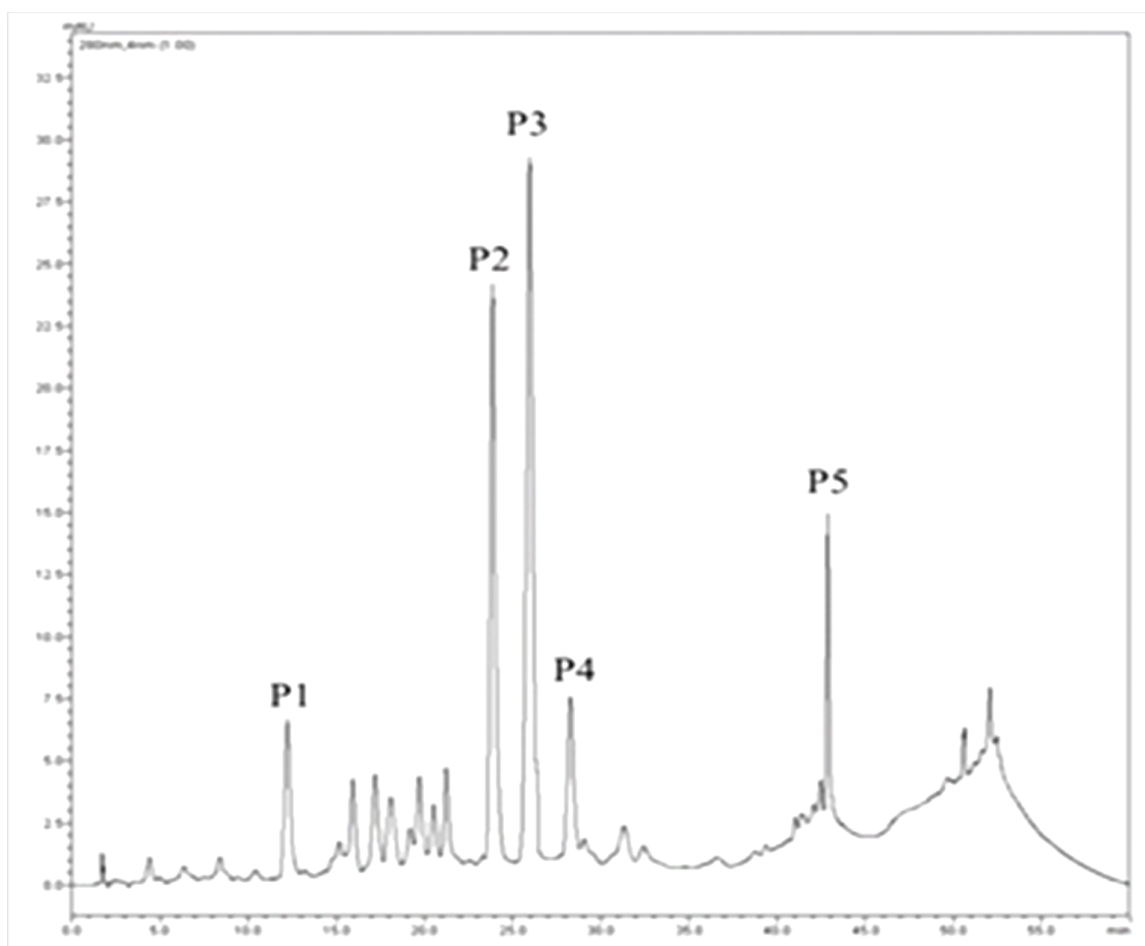


Figura 5. Análise cromatográfica de EHPV realizada em CLAE.

(P1) daidzeína, (P2) formononetina (P3) liquiritigenina, (P4) Biochanina A. (P5) composto não identificado (tempo de retenção de 42,86 min, absorção em λ 285 e 330 nm).

Na tabela 1 é demonstrada o rendimento dos 4 principais compostos identificado na amostra de EHPV;

Tabela 1. Identificação e quantificação dos principais compostos químicos da EHPV identificados de acordo com o tempo de retenção ou espectros de absorção.

Picos	Tempo de retenção (min)	Composto químico	Concentração (mg/g)
P1	12,22	Daidzeina	19,90
P2	23,85	Formononetina	54,29
P3	25,95	Liquiritigenina	62,80
P4	28,26	Biochanina A	30,97
P5	42,86	UV 285, 330 nm	-

5.2 Análise macroscópica dos espécimes de colo

Como demonstrado na Fig. 6, a administração retal de ácido acético provocou danos macroscópicos à mucosa do colo representados por hiperemia, ulceração e edema. A administração oral de EHPV em uma dose de 10 mg/kg reduziu significativamente os escores de danos macroscópicos quando comparado com animais tratados com veículo ($p < 0,0001$). Além disso, não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à massa, comprimento e razão massa/comprimento dos espécimes do colo (Fig. 7, $p > 0,05$).

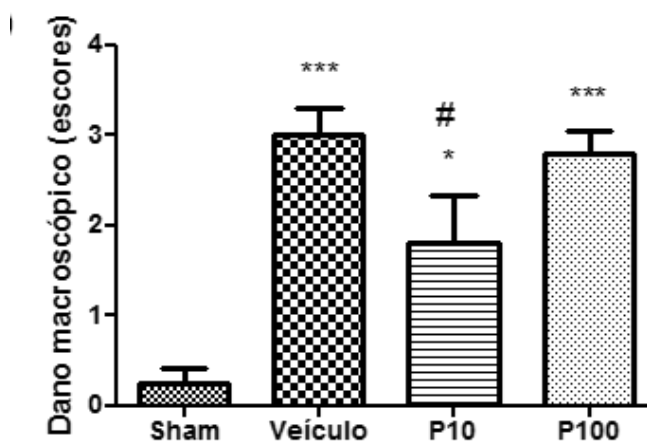


Figura 6. Gráfico de escores macroscópicos. Escores médios do dano tecidual observado nas amostras do colo dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença significativa do sham: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Diferença significativa do veículo: # $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn).

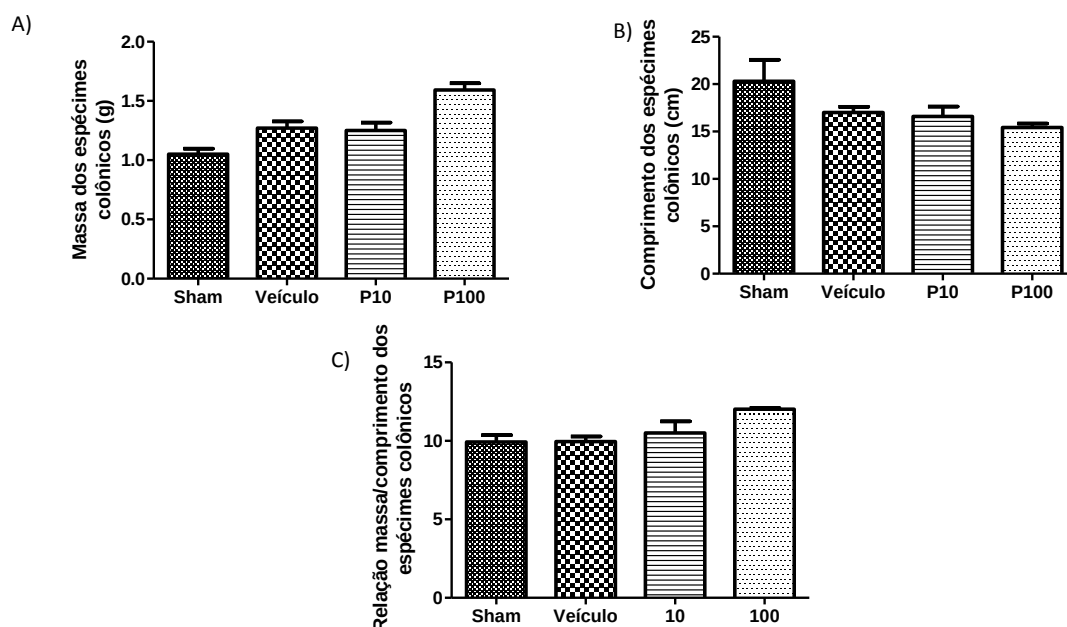


Figura 7. (A) Avaliação da massa, (B) comprimento (C) e relação massa/comprimento dos espécimes do colo. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Não foi observada diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

5.3 Avaliação do efeito de EHPV sobre os níveis teciduais de mieloperoxidase e estresse oxidativo

A administração oral de EHPV, em ambas as doses de 10 e 100 mg/kg, reduziu significativamente os níveis teciduais de MPO em comparação com a administração do veículo ($p < 0,01$), (Fig 8-A) embora o conteúdo de MPO nos grupos P10 e P100 tenha permanecido mais elevado nestes grupos do que no grupo sham ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

A análise da intensidade da peroxidação lipídica mostrou que todos os grupos com CIAA exibiram aumento significativo dos níveis de malonaldeído em comparação com o grupo sham ($p < 0,05$), independente da administração oral de EHPV. A atividade das enzimas (CAT) e (SOD), por sua vez, não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Fig.8-C e 8 D).

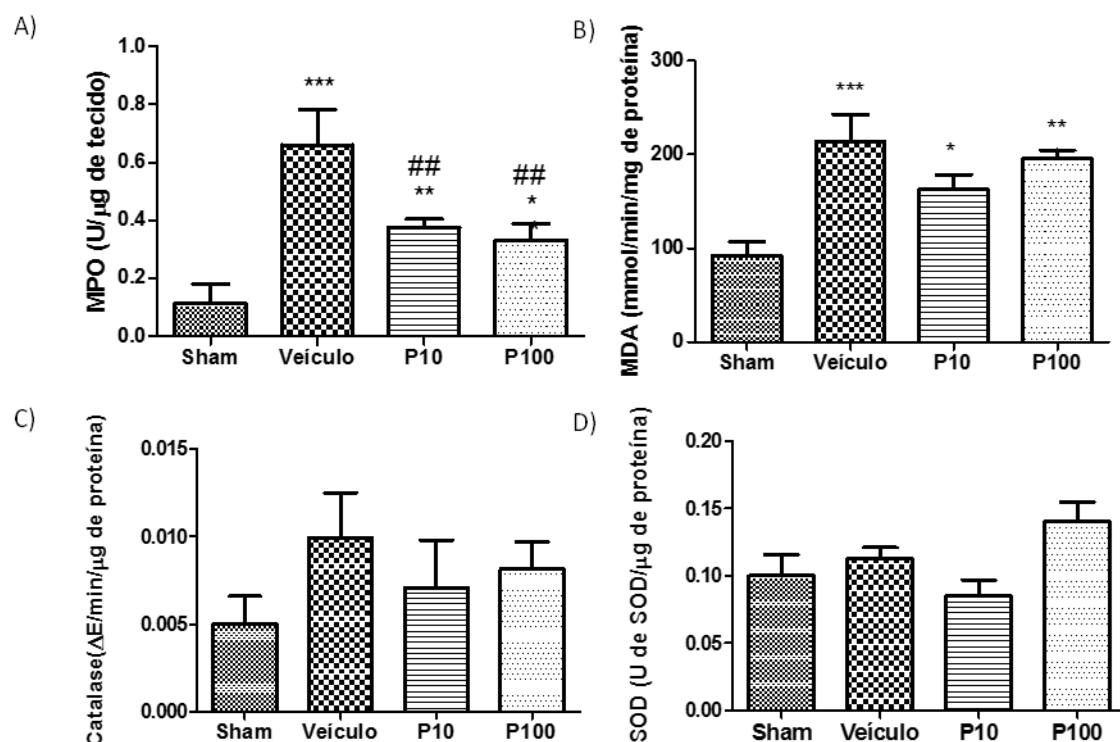


Figura 8. (A) MPO, (B) MDA, (C) e catalase (D) SOD em amostras de tecido do colo dos diferentes grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença significativa do Sham: * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$. Diferença significativa do veículo: ## $p < 0,01$ (ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey).

5.4 Análise histológica dos espécimes de colo

O tecido dos espécimes de colo no grupo sham exibiu características histológicas usuais. O grupo tratado apenas com o veículo (solução aquosa de tween 80) veículo exibiu marcada atrofia de glândulas de Lieberkühn, intenso infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), bem como extensas áreas ulcerativas da mucosa. Além disso, edema intersticial, áreas hemorrágicas, hiperemia profusa e inflamação inflamatória crônica (rica em linfócitos e histiócitos) foram observados na submucosa.

No grupo P10 (animais tratados com EHPV a 10 mg/kg) houve atrofia de glândulas Lieberkühn e os focos de ulceração foram menores além de infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos e histiócitos, com presença de polimorfonucleares limitada às áreas circunjacentes às ulcerações (Fig. 9).

As características histológicas observadas em P100 (animais tratados com EHPV a 100 mg/kg) foram semelhantes àsquelas observadas no grupo tratado com veículo, mas com lesões ulcerativas menos extensas. A análise da intensidade da resposta inflamatória nos

tecidos do colo (Fig. 10 A) revelou que o tratamento com EHPV na dose de 10 mg/kg reduziu significativamente a inflamação em comparação com animais tratados apenas com o veículo ($p < 0,01$). Além disso, o tratamento com EHPV na mesma dose também reduziu a soma das pontuações médias dos escores de danos histológicos observados nos tecidos do colo (Fig.10-B).

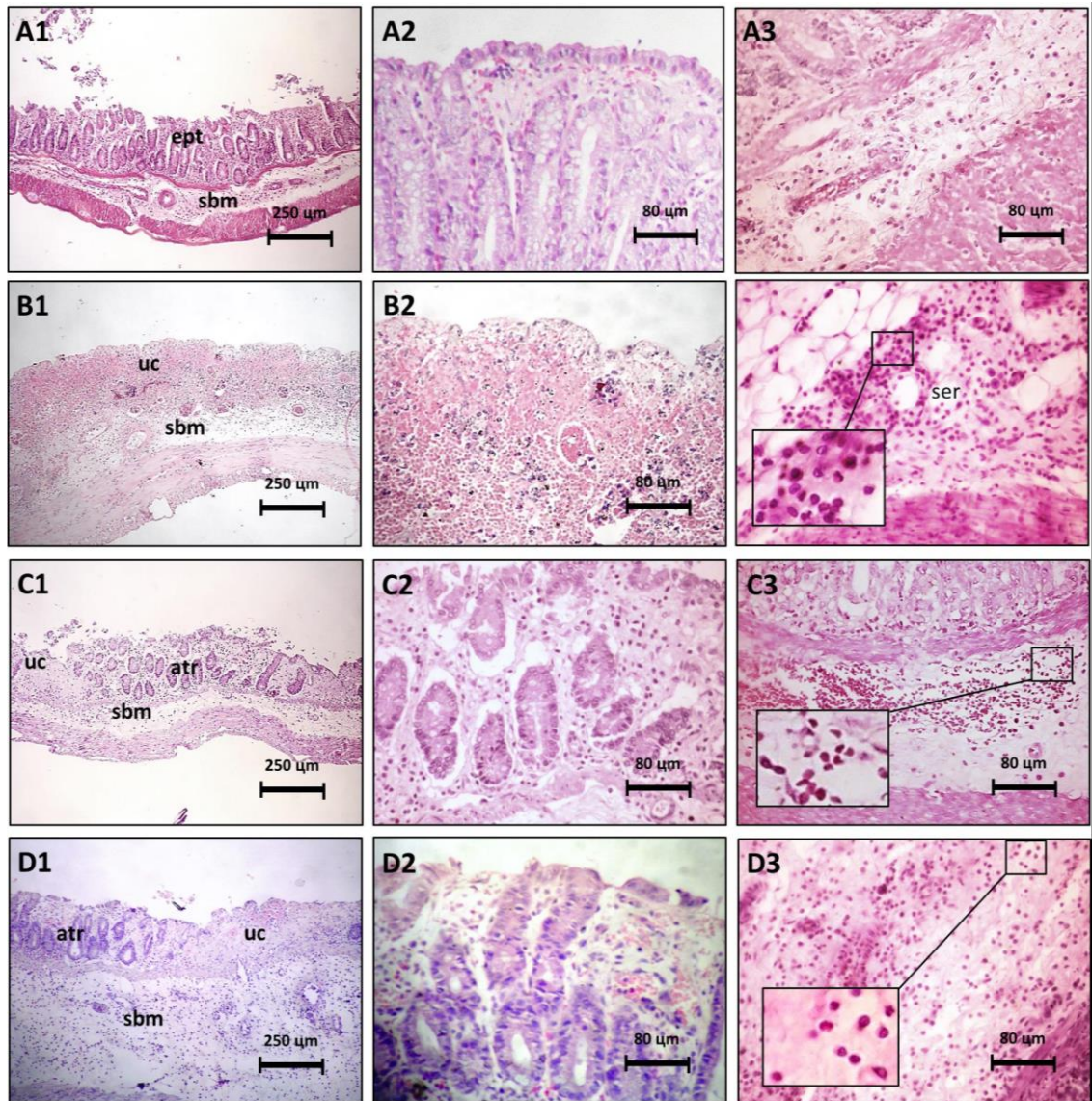


Figura 9. Fotomicrografias de cortes histológicos das amostras de colo (coradas em hematoxilina/eosina). Revestimento epitelial bem preservado (EPT) (A1/A2) e escassas células inflamatórias na submucosa (A3) são observados no grupo Sham. Extensa ulceração da mucosa (UC) (B1/B2), bem como presença de infiltrado de polimorfonucleares (B3) na submucosa (SBM), são observados no grupo veículo. Atrofia glandular (ATR) da mucosa e infiltração inflamatória da mucosa e submucosa (SBM) rica em linfócitos em P10 (C1/C2/C3), e em neutrófilos em P100 (D1/D2/D3).

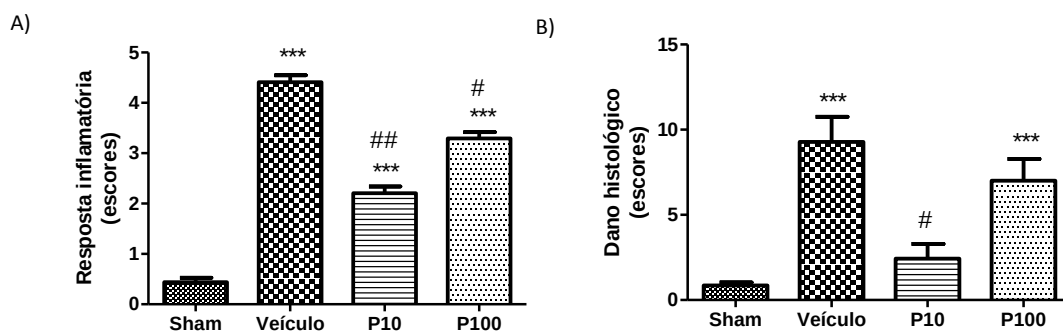


Figura 10. (A) Escores médios de intensidade da resposta inflamatória e (B) soma dos danos histológicos em amostras de colo dos diferentes grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença significativa do Sham: *** $p < 0,001$. Diferença significativa do veículo: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn).

5.5 Análise da expressão imunohistoquímica da iNOS

A expressão imunohistoquímica da iNOS foi fraca ou ausente no grupo controle (sham) e, quando presente, esteve associada a áreas de infiltração inflamatória. Nos grupos com colite induzida, foi observada imunomarcção no citoplasma das células epiteliais das criptas de Lieberkühn, mas se mostrou ausente nas células do epitélio colunar simples e células caliciformes do colo. Na submucosas, Imuno positividade foi evidenciada apenas em células inflamatórias (Fig. 11).

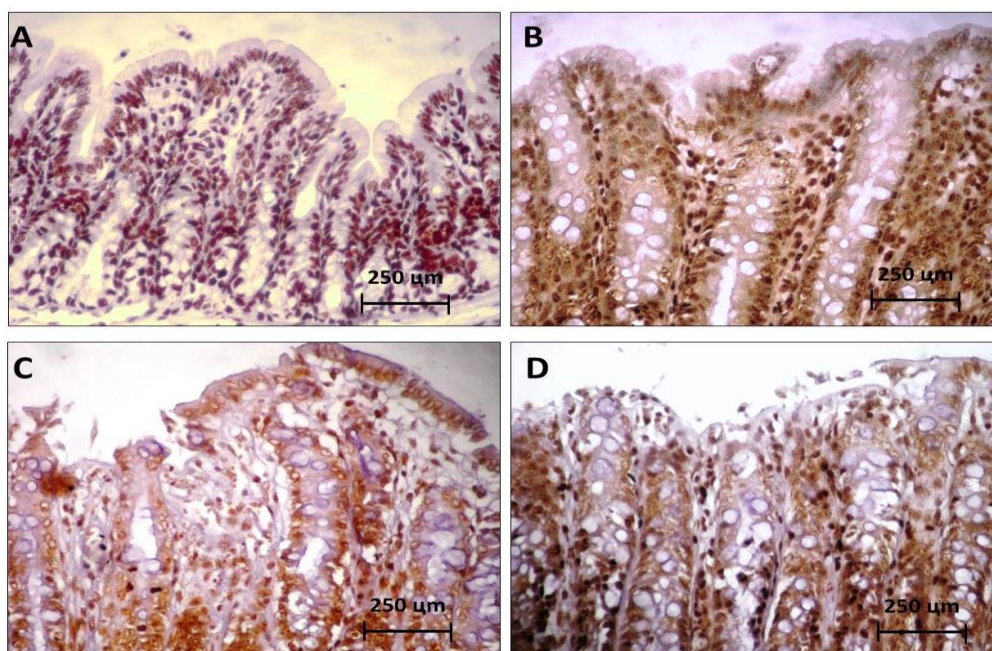


Figura 11. Fotomicrografias mostrando a expressão imuno-histoquímica da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em amostras de colo dos grupos experimentais. Ausência de imunomarcção no grupo sham (A), e forte positividade no grupo veículo (B) mas moderada em P10 (C) e P100 (D).

Como demonstrado na Fig. 12, a expressão imuno histoquímica de iNOS foi significativamente mais intensa em todos os grupos submetidos a indução da colite ($p < 0,001$). A administração oral de EHPV na dose de 10 mg/kg, ao contrário da de 100 mg/kg, reduziu significativamente a expressão de iNOS em comparação com o grupo tratado com veículo.

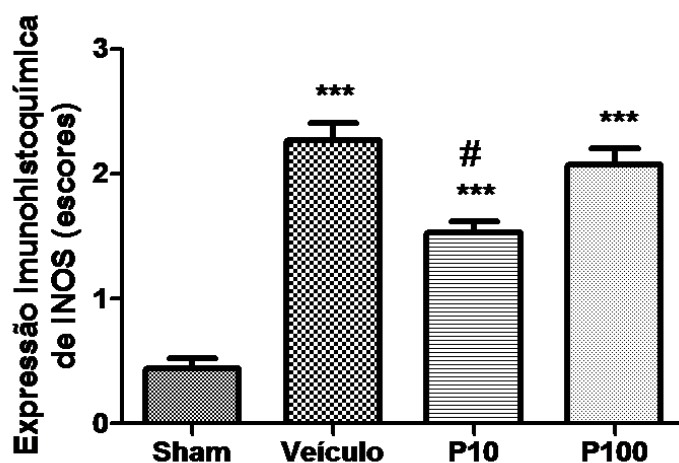


Figura 12. Expressão imuno-histoquímica de iNOS em amostras de colo dos diferentes grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Diferença significativa do Sham: *** $p < 0,001$. Diferença significativa em relação ao veículo: # $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A liquiritigenina e formononetina foram os principais compostos químicos identificados no EHPV, seguido de biochanina A e daidzeína. Os mesmos componentes também foram encontrados nos extratos etanólicos de própolis vermelha em estudos anteriores (LOPEZ *et al*, 2014; DA SILVA *et al*, 2015). O perfil químico dos componentes encontrados na presente amostra é semelhante àquele que caracteriza a variedade de própolis vermelha originada da *Dalbergia ecastophyllum*, sugerindo que elas podem ter a mesma origem botânica (DAUGSHS *et al.*, 2008).

O teor de liquiritigenina (62,80 mg/g) e formononetina (54,29 mg/g) encontrada no EHPV do presente estudo foram maiores do que aqueles previamente relatados por Daugshs (2008) (7,1 mg/g e 19,5 mg/g; respectivamente), e Mendonça *et al.* (2015) (13,8 mg/g e 9,7 mg/g), em amostras de própolis vermelha de diferentes estados do nordeste brasileiro, enquanto Lima Cavendish *et al.* (2015) obteve menor teor de formononetina (21,62 mg/g) em amostras de própolis vermelha adquirida obtida no mesmo local de coleta daquela utilizada no presente estudo, mas em época do ano diferente. Estas diferenças nos diversos compostos químicos presentes na própolis vermelha podem ser resultado de variações substanciais na composição química do EHPV devido a condições climáticas sazonais e variabilidade na composição do pasto apícola (DA SILVA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2015).

Os espécimes de tecido do colo de animais com colite mostraram características macroscópicas compatíveis com um quadro de lesão tecidual entérica, tais como hiperemia, edema e ulcerações. Alterações macroscópicas semelhantes também foram relatadas em outros estudos (AL-REJALE *et al.*, 2013; LATIFI *et al.*, 2015; MINAIYAN *et al.*, 2015; ANNASAHEB *et al.*, 2015; TANIDEH *et al.*, 2016), e o fato de que estas não foram encontradas no grupo sham atesta o sucesso do procedimento experimental de indução da colite. Foi demonstrado no presente estudo que a administração oral de EHPV a 10 mg/kg reduziu significativamente os escores médios de dano tecidual macroscópico, que se mostram estatisticamente menores que os observados no grupo veículo. Estes dados sugerem um possível papel quimiopreventivo desempenhado pelo EHPV sobre a progressão da CIAA em modelo de roedor.

Estudos anteriores sugeriram que o EHPV exibe atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais, tais como cicatrização de queimaduras (DE ALMEIDA *et al.*, 2013), lesão de nervos periféricos (BARBOSA *et al.*, 2015) e particularmente em ensaio de migração intraperitoneal de leucócitos através das células mesoteliais e edema de pata

(LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015). Além disso, tem sido demonstrado que extratos de própolis oriundas do Nordeste brasileiro exibem atividade antioxidante (MENDONÇA *et al.*, 2015b). Uma vez que a patogênese da colite parece estar relacionada a danos nos tecidos causados por estresse oxidativo e inflamação intensa (OZTURK *et al.*, 2015), especula-se que a administração oral de EHPV poderia minimizar os danos teciduais observados neste modelo experimental.

Na CIAA ocorre aumento dos níveis de íons protonados em células epiteliais do colo, que geram ERO e metabólitos do ácido araquidônico, resultando na destruição de diferentes tipos celulares, incluindo células do colo com consequente inflamação local (RANDHAWA *et al.*, 2014). Desta forma, no presente estudo foi investigado se um possível efeito inibitório sobre o estresse oxidativo e resposta inflamatória poderia estar envolvido nos efeitos quimiopreventivos promovidos pelo EHPV.

O estresse oxidativo pode ser causado por peroxidação lipídica induzida por ERO. Estes radicais livres atacam os ácidos graxos poli-insaturados (e.g. ácido oleico e linoleico), provocando rompimento dos fosfolipídios das membranas celulares. Além disso, ERO ativa fosfolipases que promovem lise de fosfolipídios e liberação de ácidos graxos insaturados, também trazendo como consequência a ruptura de membranas. A oxidação de lipídios insaturados promove a formação de resíduos químicos, tais como o malonaldeído (MDA), bem como degradação de constituintes da matriz extracelular, tais como proteoglicanos, elastina e colágeno (KALYANARAMAN *et al.*, 2013).

Partindo desta premissa, foi investigado no presente estudo o envolvimento de uma possível atividade antioxidante do EHPV na quimioprevenção por CIAA utilizando o teste TBARs, que quantifica o conteúdo de (MDA) nos tecidos. No entanto, embora tenha sido encontrado aumento dos níveis de MDA nos grupos com colite experimental em comparação com o grupo sham, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com EHPV e grupo tratado com veículo. Estes dados parecem sugerir que o controle do estresse oxidativo pode não representar um evento biológico fundamental para a atividade quimiopreventiva promovida pelo EHPV. Nesse sentido, tem sido relatado que a simples análise do teor de MDA formado poderia subestimar o efeito quimiopreventivo do extrato, uma vez que a magnitude do dano tecidual na colite induzida por ácido acético frequentemente excede o potencial preventivo e/ou terapêutico dos compostos químicos sobre o quadro de estresse oxidativo, particularmente em modelos experimentais de curto prazo (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Por outro lado, apesar dos teores significativamente reduzidos de MPO em P10 e P100, não foi observada diferença entre os grupos, incluindo o grupo sham, quanto à

atividade da CAT e SOD. Com isso, é possível sugerir que os níveis elevados de peroxidação lipídica, em grupos tratados e induzidos a colite poderiam estar relacionados com o tempo experimental de apenas 24 h, o que pode ter sido mais curto do que o necessário para que o organismo desenvolvesse uma resposta antioxidante eficaz. Desse modo, novos estudos, utilizando modelos experimentais em longo prazo, são necessários a fim de esclarecer a contento esta questão.

No presente estudo, também foi hipotetizado que as melhores características macroscópicas do colo observadas nos animais tratados com EHPV na dose de 10 mg/kg poderiam estar associadas a um efeito modulador sobre a intensidade da resposta inflamatória. Assim, foi investigado o envolvimento de uma possível atividade anti-inflamatória na quimioprevenção da CIAA promovida pelo EHPV por meio da análise do teor tecidual de MPO. Esta é uma enzima produzida por neutrófilos e é responsável pela catálise da conversão de íons cloreto em ácido hipocloroso altamente reativo. Tem sido relatado que o teor de MPO tecidual é diretamente proporcional à quantidade de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) presentes nos tecidos inflamados, sendo o aumento dos níveis de MPO frequentemente encontrado em distúrbios inflamatórios gastrointestinais (ANNASAHEB *et al.*, 2015; MIN *et al.*, 2015; LATIFI *et al.*, 2016).

Foi possível observar no ensaio da mieloperoxidase, que o tratamento com ambas as doses do EHPV reduziu significativamente os teores de MPO teciduais em amostras do colo de animais com colite, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório do extrato. Resultados semelhantes foram demonstrados em ensaios prévios utilizando produtos naturais ricos em flavonoides em modelos de colite ulcerativa experimental (MINAIYAN *et al.*, 2015; JOHN *et al.*, 2015; TANIDEH *et al.*, 2016). Além disso, outros estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória do EHPV do Nordeste brasileiro administrada na mesma dose de 10 mg/kg (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015). Corroborando estes dados, também foram encontradas, no presente estudo, evidências de menor infiltração de PMN nos tecidos colônicos no grupo tratado com EHPV a 10 mg/kg, bem como menos sinais histológicos de outros danos citomorfológicos, tais como criptite, edema e ulceração.

Os mecanismos exatos determinantes da atividade anti-inflamatória do EHPV não estão ainda totalmente esclarecidos. Tem sido relatado que as isoflavonas, tais como formononetina e liquiritigenina, principais compostos do EHPV, são capazes de inibir a síntese de NO (UPADHYAY; DIXIT, 2015). O NO é uma importante molécula de sinalização celular capaz de modular o tônus vascular, secreção de insulina, o tônus das vias aéreas, o peristaltismo, a angiogênese e desenvolvimento neural. As isoformas endoteliais (NOS3) e neuronais (NOS1) da sintase de óxido nítrico são consideradas constitutivas, enquanto que

a NOS2 é uma isoforma induzida (iNOS), que está envolvida na modulação da resposta imunoinflamatória (MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

No presente estudo, a expressão imuno-histoquímica de iNOS se apresentou diminuída em animais com colite tratados com EHPV na dose de 10 mg/kg. Este achado poderia estar relacionado com uma possível transição mais rápida da inflamação de uma fase aguda rica de PMN para uma fase crônica rica em linfócitos. Essa teoria parece ser ratificada pela considerável presença de linfócitos compondo o infiltrado inflamatório nos cortes histológicos do grupo P10 (animais tratados com EHPV a 10 mg/kg). Ainda em apoio a esta teoria, Kolios *et al.* (2004) demonstraram que o epitélio glandular é a principal fonte de iNOS na UC e citocinas produzidas pelas células T (IL-13 e IL-4) agem como reguladores intrínsecos da geração de óxido nítrico em modelos de inflamação intestinal.

Por outra ótica, embora o tratamento com EHPV na dose de 100 mg/kg tenha promovido diminuição dos teores teciduais de MPO, os demais resultados não foram tão expressivos quanto os obtidos com a dose mais baixa. Estes dados poderiam encontrar justificativa no fato de que, por ser um produto natural rico em muitos compostos, o aumento da dose poderia ter elevado substancialmente a concentração de constituintes químicos capazes de antagonizar os efeitos anti-inflamatórios do EHPV ou ainda exercido efeito pró-oxidante em células epiteliais da mucosa intestinal. No entanto, outras investigações se fazem necessárias para elucidar adequadamente esta hipótese.

No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento com EHPV do Nordeste brasileiro, especialmente na dose de 10 mg/kg, reduz os danos macroscópicos e as alterações histológicas associadas a UC induzida por ácido acético em modelo de roedor. Além disso, são obtidas evidências de que este fenômeno biológico pode estar relacionado com mecanismos anti-inflamatórios secundários a modulação da expressão de iNOS em epitélio glandular intestinal.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O EHPV é rico em isoflavonas e os compostos químicos majoritários são a liquiritigenina e a formononetina.

No modelo biológico utilizado e sob as condições experimentais testadas a administração oral do EHPV a 10 mg/kg minimizou os danos teciduais macroscópicos e microscópicos determinado provocados pelo enema de ácido acético. Os dados deste estudo também sugerem que este efeito pode estar relacionado a um provável efeito modulatório da reação inflamatória pela via do NO.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A colite aguda é utilizado como triagem para avaliação de potenciais medicamentos no tratamento da DII. Neste sentido, os resultados apresentados demonstram que o EHPV possui atividade anti-inflamatória portanto, com potencial terapêutico no tratamento da DII. Além disso, os achados da presente pesquisa alicerça a realização de estudos futuros com uso do EHPV no tratamento de colite crônica.

Também é importante ressaltar a necessidade de mais pesquisas direcionadas para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos associados aos efeitos biológicos do EHPV sobre as vias inflamatórias e oxidativas em situações de dano tecidual. Dentre estas, é possível citar estudos acerca da expressão de citocinas e IL-1 β , TNF- α , Fator de transcrição NF- κ B.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- AHMAD, B. A; MAHADEVA, R.U.S; ABDURRAZAQ, M; THANT, Z; HIDAYAH;M.N; SURYATI, M.K; Reviews of herbal and their secondary metabolites in the treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2014; 4(8): 80–90.
- ALEISA, A. M; AL-REJAIE, S.S; ABUOHASHISH,H.M; OLA,M; PARMAR, M.Y; AHMED, M.M; Pretreatment of *Gymnema sylvestre* revealed the protection against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *BMC complementary and alternative medicine*,2014; 14(1): 49-69.
- ALENCAR, S. M. OLDONI, T. L. C; CASTRO, L.M; CABRAL, I.S.R; COSTA NETO, C.M. CURY, J.A ROSALEN, P.L; IKEGAKI. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 113 (2) :278–283 .
- AL-REJAIE, S. S; ABUOHASHISH, H.M; AL-ENAZI, M.M; AL-ASSAF, A.H; PARMAR, M.Y; AHMED, M.M; Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2013; 19(34): 5633–5644.
- ALMEIDA E.B, CORDEIRO CARDOSO J, KARLA DE LIMA A, DE OLIVEIRA N.L, DE PONTES-FILHO N.T, OLIVEIRA LIMA S, LEAL SOUZA I.C, DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR R.L; The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *J Ethnopharmacol* 2013; 20(147):419-25.
- ALVES, A. C.; MARTINS, M.C.C; Efeitos de imunomoduladores na doença de crohn. *Revista Saúde Pública de Santa Catarina* 2013; 6(3):. 71–79.
- AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G. A Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi Chemical Society*; 2013; 17(1): 101–124.
- BARBALHO, M.S; GOULART, R.A; QUESADA, K; BECHARA, M.D. ALVES DE CARVALHO, A.C;. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *.Ann.Gastroenterol* 2016. 29(1), p.37-43.
- BARBOSA R.A ;NUNES T.L; PAIXÃO A.O; NETO R.B, MOURA S, ALBUQUERQUE JUNIOR R.L; et al., Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharm Biol.* 2015; 29 (1):1-12.
- BARBOSA, A. L. D. R.; Colite experimental induzida pelo ac TNBS em ratos reduz a resposta hipernociceptiva inflamatória. Papel das vias eucanobióides,opióides endógenos, no NO/GMPC/PKG/K+ atp. BRASIL [TESE]. Ceara: Universidade FederalFortaleza, 2011.
- BIASI, F. LEONARDUZZI, G; OTEIZA,P; GIUSEPPE,P;. Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. *Antioxidants & redox signaling* 2013. 9(14): 1711–47.
- BIASI, F. LEONARDUZZI, G; OTEIZA,P; GIUSEPPE,P; 2014 Wine consumption and intestinal redox homeostasis. *Redox Biology* 2014; 2 : 795–802.
- BROWN, W. R.; TAYAL, S;. Microscopic colitis. A review. *Journal of Digestive Diseases* 2013; 14(6) : 277–281.
- BALZOLA, F; BERNSTEIN, C; HO, G.T; LEES, C.Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Commentary Inflammatory Bowel Disease Monitor* 2010; 11(1): 21-29
- BATISTA, L. L. V;CAMPESATTO, E.A; ASSIS, M.L.B, BARBOSA ,A.P.F; GRILLO, L.A.P; DORNELAS, C.B.Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 2012; 39(6): 515–20.

BOSE, K.S.; CHMIELEWSKI, S.A.; ELDREDGE, P.A.; SINN, E.; ALVERILL, B.A.; 1989. New Mo-Fe-S cluster via oxidation decarbonylation reaction. *J. Am. Clin. Soc.* 1989; 111 : 8953-8974.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G.; Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology* 1982; 78(3): 206-209.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Anexo 06: Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 jan. 2001a.

BROWN, W. R.; TAYAL, S. Microscopic colitis. A review. *Journal of Digestive Diseases* 2013; 14(6): 277–281.

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.; MAYER, M.P.A. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS Activated Macrophages 2015, *Plos one*, 10(12): 1-14.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IGEKAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* 2009; 32 (6): 1523-1527.

CABRAL, M.; G.; ABBY; Diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto* 2012; 11(4): 17-21.

CATANZARO, D.; ORSO, G.; DALLÁCQUA, S.; BRUN, P.; GIRON, M.C.; CARRARA, M.; CASTAGLIULO, I.; RAGAZZI, E.; CAPARROTA, L.; MONTOPOLI; *Boswellia serrata* Preserves Intestinal Epithelial Barrier from Oxidative and Inflammatory Damage. *PloS one* 2015; 10(5): 405-415.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B.; Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo 2002; 17(6): 417-423,

CARMO, M.C.N.S.; CORREIA, M.I.T.D.; DAVISSON, M.I.T.; 2016. Inflammatory bowel disease : can omega-3 fatty acids really help ? *Ann. Journal of Gastroenterology* 2016; 29 (1): 37–43.

CARVALHO, F. A.; NALBANTOGLU, I.; ORTEGA-FERNANDEZ, S.; AITKEN, J.D.; SU, Y.; KOREN, O.; Interleukin-1 (IL-1) promotes susceptibility of Toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis. *Gut*. 2012; 61(3): 373-384.

CÉSAR, L.; NUNES, C.; GALINDO, A. B.; OLIVEIRA, S. RUFINI, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.; SATIRO, M.A.; Artigo Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha bioatividade em *Artemia salina*. *Rev. bras. farmacogn* 2009; 19(2b) 524:529

CLEMENTE ACTIS, G.; The Changing Face of Inflammatory Bowel Disease: Etiology, Physiopathology, Epidemiology. *Annals of Colorectal Research* 2016; 4(1): 1–6.

COBO, E. R.; KISSOON-SINGH, V.; MOREAU, F.; CHADEE, K.; Colonic MUC2 mucin regulates the expression and antimicrobial activity of β -defensin 2. *Mucosal Immunology* 2015; 4: 1–13.

CROMER, W. E.; GANTA, C.H.; PATEL, M.; TRAYLOR, J.; KEVIL, C.G.; ALEXANDER, J.S.; MATHIS, J.M.; VEGF-A isoform modulation in an preclinical TNBS model of ulcerative colitis: protective effects of a VEGF164b therapy. *Journal of translational medicine* 2013; 11(1) 207:217

CROIX, J.A.; GREENBERG, E.; GASKIN, H.R.; HONG, P.Y.; Pyrosequencing-Based Analysis of the Mucosal Microbiota in Healthy Individuals Reveals Ubiquitous Bacterial Groups and Micro-Heterogeneity. *Plos one* 2011; 6 (9): 1-10.

- DA SILVA, B. C; CASTRO, A.L; ROCHA, R; SANTANA, G.O. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology WJG* 2014 ;20(28): 9458–9467.
- DA SILVA FROZZA, C. O, DA SILVA, R.T; GAMBATO, G; MENTI, C; MOURA, S; PINTO, P.M. STAATS, C.C; *et al*; Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 2014, 63: 195–204.
- DA SILVA, R.O.; ANDRADE,V.M; BULLÉ-RÊGO,E.S; AZEVEDO-DÓRIO, G.A; SANTOS LIMA, B.S *et al*;. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2015;170 (66) :91-101.
- DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PARK,Y.K. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*.2008;5 (4):435-41
- DE MENDONÇA L.S; MENDONÇA F.M; ARAÚJO Y.L, ARAÚJO E.D, RAMALHO SA, NARAIN NARENDRA Chemical markers and antifungal activity of red propolis from *et al*; Sergipe, Brazil.*Food Science and Technology (Campinas)* 2015;35 (2): 291-298
- DE FAZIO, K; CAVAZZI, E; SPINISI,E; STRILLACCI, A; CENTANNI, M; CANDELA, M; PRATCÓ,C; CAMPIERI, M.R; VALERII, M.C. Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice.*Wourl gastroenterology* 2014; 28.(20):.2051-2061.
- DE ALMEIDA, E. B; CARDOSO, C.J; DE LIMA, A.K; DE OLIVEIRA, N.L; DE PONTES-FILHO, N.T; LEAL SOUZA, I.C; ALBURQUE-JÚNIOR, R.L.C; 2013The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 147(2):419–425.
- DE SÁ, R. A; CASTRO, F; ELEUTHERIO, E.C; SOUZA, R.M; DA SILVA, J.F; PEREIRA, M.D. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. *Brazilian journal of microbiology : [publication of Brazilian Society for Microbiology]*, 2013;44(3): 993–1000.
- DEPONTE, M; Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2013; 1830 (5): 3217–3266.
- DHILLON, S.S; MASTROPAOLO, L.A; MURCHIE, R; GRIFFITHS, C; THÖNI, C; ELKADRI, *et al*..Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. *Clinical and translational gastroenterology* 2014. 5 (11) :e46-56.
- DÍAZ PEÑA, R; VALDÉS, E; COFRÉ, C; CASTRO -SANTO,S P;Th17 response and autophagy - main pathways implicated in the development of inflammatory bowel disease by genome-wide association studies. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* 2015; v. 107, n. 9, p. 560–566.
- DIETERICH, S; BIELIGK, U;BEULICH, K;HANSEFUSS, G; PRESTLE, J.Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 2000; 101(1): 33–39.
- DIJKSTRA, G;ZANDVOORT, A .J. H; KOBOLD, A. C; MULLERDE JAGER-KRIKKEN, A;HEERINGA, P;VAN GOOR, H;*et al*. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with active inflammatory bowel disease.*Scadinavian journal of gatroenterology* 2002;37:546-557.
- ELSON, C. O; SARTOR, R.B; TENNYSON, G.S; RIDDELL LI, R.H; HERNANDEZ,L;GONÇALVES, C.C;OLIVEIRA, N.L.B; *et al* ;Hgths from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 1995a.; 13(42): 5581–5593,

ELSON, C. O; SARTOR, R.B; TENNYSON, G.S; RIDDELL LI, R.H; HERNANDEZ,L;GONÇALVES, C.C;OLIVEIRA, N.L.B; *et al* . SPECIAL REPORTS AND REVIEWS Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease Acetic Acid-Induced Colitis. *Wourld journal of gastroenterology* 1995 b;109: 1344–1367.

ESBERARD, B; Etiopatogenia das Doenças Inflamatórias Intestinais. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto* 2012;n.D(2): 7-18.

FAROMBI, E.O; ADEDARA, I; AJAYI, B.O; AYEPOLA, O; EGBEME, E.E;.Kolaviron.A natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2013; 113(1):49–55.

FERNÁNDEZ-SALAZAR,L; BARRIO, J;MUÑOZ, F;MUÑOZ, C;PAJARES, R; RIVERO, M; PRIETO, V ;LEGIDO, J;BOUHMIDI, A;HERRANZ, M;GONZÁLEZ-REDONDO, G;FERNÁNDEZ, N;SANTOS, F; SÁNCHEZ-OCAÑA; Frequency, predictors, and consequences of maintenance infliximab therapy intensification in ulcerative colitis. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* 2015; 107(9); 527–533.

FEUERSTEIN, J. D.; CHEIFETZ, A. S. Ulcerative colitis: Epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clinic Proceedings* 2014, 89(11): 1553–1563.

FILIPPIN, L.I; VERCELINO, R; MARRONI, N.P. MACHADO XAVIER,R ;2008. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2008; 48(1): 17–24.

FILMANN, H.O EFEITO PROTETOR DA GLUTAMINA EM COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.Rio de Janeiro, BRASIL (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro:- Universidade Federal do Rio de Janeiro,2007.

FONSECA, M. J. V; MARQUELE-OLIVEIRA, F; VICENTINI, F.T.M.C; FURTADO, N.A.J.C; SOUSA, J.P.B *et al*;. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 2011: 1-8.

GERLACH, K; McKENZIE, A.N; NEURATH, M.F; WEIGMANN, B;. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue barriers* 2015; 3, (1-2): 40-61

GHATULE, R. R; GAUTAM, M.K. GOEL ; SINGH, A; JOSHI, V.K; GOEL R.K; Effect of Azadirachta indica leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012; 2 n(2): 147-152.

GONÇALVES,C.C,HERNANDES, L; BERSANI-AMADO, C.A, FRANCO,S.L, SILVA J.F. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. *Ciência, Cuidado e Saúde* 2008; 7(0): 107–111;

GIODA, C.R; BARRETO,T.O; PRÍMOLA-GOMES, T.N; CARVALHO LIMA, D; CAMPOS, P.P; CAPETTINI, L.S.A; LAUTON-SANTOS, S; VASCONCELOS, A.C ;CÂNDIDO C. COIMBRA, V.S.L;PESQUERO, J.L.; CRUZ, J.S Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298 (19):H2039–H2045.

GONÇALVES C.C;HERNANDES L; BERSANI-AMADO C.A; FRANCO,S.L; SILVA, J.F; NATALI, M.R; 2013. Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic Acid. *Evid Based Complement Alternat Med*.2013; 2013(1): p1-13.

ISHIHARA, T; TANAKA, K.I; NAMBA, T; SUZUKI, J. OKAMOTO, S; HIBI,T; T; *et al*.Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009;28(1) 152–164.

- JAKOBSSON, H. E. Rodríguez-Piñeiro, A.M; Schütte, A;Ermund, A;Boysen, P;SOMMER,et al.The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports* 2015;16(2):164–177.
- JAMONTT, J ; PETIT, S; CLARK, A; PARKINSON, S.J;SMITH, P. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 signaling promotes hyperresponsive macrophages and colitis in IL-10-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 190 (6): 2948–58.
- JOO, M; KIM, H.S; KWON, T.H; PALIKHE, A;ZAW,T.S; JEONG, J.H; Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on TNBS-induced Colitis of Rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 2015;19: 43–50.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 2013; 1(1) : 244–57.
- KAYAMA, H.; TAKEDA, K;. Review Article Regulation of intestinal inflammation through interaction of intestinal environmental factors and innate immune cells .*Rev inflammation and Regeneration* 2015; 35(1):28-41
- KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J.Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474 (7351): 307–317.
- KIESLER, P.; FUSS, I. J.; STROBER, W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2015;1(2): 154–170.
- KIM, D. B; LEE, K.M; LEE,J.M; CHUNG,Y.Y;SUNG,H,J; PAIK,C.N; et al.Correlation between Histological Activity and Endoscopic, Clinical, and Serologic Activities in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Research and Practice* 2016; 2016: 1–7.
- KIM, D. B; LEE, K.M; LEE,J.M; CHUNG,Y.Y;SUNG,H,J; PAIK,C.N; CHUNG, W.C;JUNG, J.H; CHOI, H.D. Attenuation of Experimental Colitis in Glutathione Peroxidase 1 and Catalase Double Knockout Mice through Enhancing Regulatory T Cell Function. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95332 :e953343.
- KNIGHTS, D.; LASSEN, K. G.; XAVIER, R. J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* 2013, 62(10): 1505–10.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: A universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004. 113, (4): 427–437.
- KONDAMUDI, P.K. KOVELAMUDI, H; MATHEW, G;NAYAK, P.G;RAO, M.C.SHENOY, R.R.Investigation of sesamol on myeloperoxidase and colon morphology in acetic acid-Induced inflammatory bowel disorder in albino rats. *The Scientific World Journal* 2014; 2014:.1-7.
- KUSHIMA,H .Efeito dos extratos metanólicos das folhas de Davilla elliptica e Davilla nitida na vigência de colite experimental induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos. SÃO PAULO ,BRASIL (Tese de Doutorado) BOTUCATU:2011
- LATIFI G, GHANNADI A, MINAIYAN M..Anti-inflammatory effect of volatile oil and hydroalcoholic extract of Rosa damascena Mill. on acetic acid-induced colitis in rats. *Res Pharm Sci* 2015; 10(6).Nov-Dec :514-22.
- LENOIR,L.R;ADRIEN,J.K;VERGNAUD-GAUDUCHON,J;FARGES,M.C;FRAISSE, D;TEXIERA,O; et al. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Digestive Diseases and Sciences* 2011; 56(12): 3534–3545.

- LEONEL, A.J; TEIXEIRA, L.G; OLIVEIRA, R.P; SANTIAGO, A.F; BATISTA, N.V; *et al.* Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *British Journal of Nutrition* 2013; 5(3):1-12.
- LIMA CAVENDISH R, DE SOUZA SANTOS J, BELO NETO R, OLIVEIRA PAIXÃO A, VALÉRIA OLIVEIRA J, DIVINO DE ARAÚJO E, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol* 2015; 15(33):173-177
- LISZKA, Ł.; WOSZCZYK, D.; PAJĄK, J. Histopathological diagnosis of microscopic colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 2006; 21(5): 792-797.
- LIU, P; PIEPER, R; VHJEN, W; DAVIN, R; PLENDL, J; MEYER, W; ZENTEK, J. Effect of dietary zinc oxide on morphological characteristics, mucin composition and gene expression in the colon of weaned piglets. *PLoS ONE* 2014, v. 9, n. 3, p. 5009–5018.
- LOPEZ, B. G.C; BEGOÑA GIMÉNEZ-C.L; ALVES, C.C.; MACHADO, D; LANCELLOTTI, M; SAWAYA, A.C.H.F; 2015. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert as to its safe use. *Journal of Applied Microbiology*, v.5 p.2070-2080.
- LOWRY, O.H; ROSENBRADT, N.J; FARR, L; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. chemistry* 1951; 1: 265-275
- MADESH, M; BALASUBRAMANIAN, K.A. Microtiter plate assay for SOD using MTT reduction superoxide. *Indian, J. Biochem Biophys* 1988; 35 : 1884-1888.
- MAGIEROWSKI M, MAGIEROWSKA K, KWIECIEN S, BRZOZOWSKI T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. *Molecules* 2015. 19 (20) s5:9099-123.
- MANNASAHEB B.A, KULKARNI PV, SANGRESKOPP MA, SAVANT C, MOHAN A; Protective effect of Agave americana Linn. leaf extract in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats 2015; 36 (1):101-6.
- MANZO, L.P; DE-FARIA, F.M. DUNDER, R.J. RABELO-SOCCA, E.A. CONSONNI, S.R; DE ALMEIDA, A.C.A; SOUZA-BRITO, A.R.M. LUIZ-FERREIRA. Royal Jelly and Its Dual Role in TNBS Colitis in Mice. *The scient word journal* 2015; 2015:1-7
- MENDONÇA L.S, MENDONÇA F.M, ARAÚJO Y.L, ARAÚJO E.D, RAMALHO S.A, NARAIN NARENDRA J, *et al.* Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. *Food Science and Technology* 2015; 35(2):291-298.
- MESQUITA JÚNIOR, D; ARAÚJO, T.T.T; SOUZA, A.W.S; CRUVINEL, W.M; ANDRADE, L.E.C; SILVA, N. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010; 50(5): 552–580.
- MINAIYAN M, ASGHARI G, SADRAEI H, FEILI E.. Anti-inflammatory effect of *Pycnocycla spinosa* extract and its component isoacetovanillone on acetic acid induced colitis in rats. *Res Pharm Sci* 2015; 10(4): 345-55
- MIN, J. K. ;. Amelioration of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by liquiritigenin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2015, v. 30, n. 5, p. 858–865.
- MORRIS, G. P; BECK, P.L; DEPEW, W.T; SZEWZUK, M.R, WALLACE, J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; (96): 795–803.
- MOSSALAYI, M. D; RAMBERT, J; RENOUEF, E; MICOULEAU, M; MÉRILLON, J. M. Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. *Phytomedicine* 2014; 21, (3): 290–297.

- MOURA, F.A.A; DOS SANTOS, J.C.F; ARAÚJO, O.R.P; GOULART, M.O.F . Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work?..*Redox Biology* 2015; (6):617-639.
- MOUSAVIZADEH, K ; RAHIMIAN, R; FAKHFOURI, G;ASLAINI, F.S; GHAFOURIFAR, P; Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. *European journal of clinical investigation* 2009; 39 (5): 375–83.
- M'KOMA; Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology* 2013; (2013): 33-45.
- NIELSEN, O. H.; VAINER, B.; RASK-MADSEN; 2008. J. Non-IBD and noninfectious colitis. *Nature clinical practice - Gastroenterology & hepatology*, v. 5, n. 1, p. 28–39.
- NITZAN, O; Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2016; 22(3): 1068- 1078.
- O'NEILL, S; BRAULT, J; STASIA, M-J; KNAUS, U.G .Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biology* 2015; (6) :135–156.
- OKAMOTO,Y; TAKAZUMI, H; TATSUYA, E; TAKASHI, F; TOSHIYUKI, M. Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation. *International immunopharmacology* 2013; 16 (2): 178–83.
- OLDONI,T.L.C; CABRAL, I.S.R; DARCE, M.A.B.R; ROSALEN, P.L; IKEGAKI, M.N; ALENCAR A.M. OLDONI, S.M. CABRAL, T.L.C. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology* 2011; 77(2): 208–213.
- OLIVEIRA, L. G.; DUARTE, L.A;NOGUEIRA, M.C; MARQUES, M; CHEBLI, J; FONSECA, A; KOPKE, A.. Positive Correlation Between Disease Activity Index and Matrix Metalloproteinases Activity in a Rat Model of Colitis. *Arq. Gastroenterol.* [online]. 2014;51 (2): 107-112. ISSN 0004-2803.
- OLIVEIRA, F. M.; EMERICK, A. P. D. C.; SOARES, E. G.Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais State. *Epidemiology* 2010; 15(1): 1031–1037
- ORDÁS, I; ECKMANN, L; TALAMINI, M; BAUMGART, D.C; SANDBORN, W.J; 2012.Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 38 (9853): 1606–19.
- OZ, H. S; CHEN, T.S; McCLAIN, C.J. VILLIERS, W.J.S . Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *The Journal of nutritional biochemistry* 2005; 16(5): 297–304.
- OZTURK C.C, OKTAY S, YUKSEL M, AKAKIN D, YARAT A, KASIMAY CAKIR, O. Anti-inflammatory effects of nesfatin-1 in rats with acetic acid - induced colitis and underlying mechanisms. *J Physiol Pharmacol* 2015;.66(5):741-50
- PARENTE, J. M. L.Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. *World Journal of Gastroenterology* 2015. 21(4) 1177-1197.
- PÁSZTI-GERE,E; MCMANUS,S; MEGGYESHÁZI, N;BALLA, P;GÁLFI, P; STEINMETZER, T.Inhibition of Matriptase Activity Results in Decreased Intestinal Epithelial Monolayer Integrity In Vitro. *Plos One* 2015; 10(10):0141-177.
- PERDERSEN, N; ANDERSEN, N.N. VEGH, Z. LISBETH, J. ANLDERSEN, D.V. FELDING, M. SIMONSEN, M.H; BURISCH, J. Ehealth: Low FODMAP diet vs *Lactobacillus rhamnosus* GG in irritable bowel syndrome W.J.G 2014; .21(20): p 16215-16226.
- PEREIRA, D.S; IBERÊ, C; FREITAS, A; FREITAS, M.A; BERG, J; AGRA, R. Histórico e principais usos da própolis apícola. *Agropecuária Científica no Semi-árido* 2015;11(2): 1–21.

PINHEIRO, K. S; RIBEIRO,D.R; ALVES, A.V.F; PEREIRA-FILHO, R.N; OLIVEIRA, C.R; LIMA, S.O; REIS,F.P; CARDOSO, J.C; ALBURQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermaal carcinogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2014; 29(2) : 111–117.

PINHO, M. A. Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2008; 28(1): 100-110..

POEHLMANN, A; REISSIG, K;SCHÖNFELD, P;WALLUSCHECK, D;SCHINLAUER, A;HARTIG, R; et al. Repeated H₂O₂ exposure drives cell cycle progression in an in vitro model of ulcerative colitis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2013;17(12): 1619–31.

PONDER, A.; LONG, M. D.A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical epidemiology* 2013; 5(1): 237–47.

PRAVDA, J.; GUAGNOZZI, D.; LUCENDO, A. J. Radical induction theory of ulcerative colitis; 2005. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11(16): 2371–2384.

PUNTEL, R.L; ROOS, D.H; PAIXÃO,M.W; BRAGA, A.L; ZENI, G; NOGUEIRA, C.W; ROCHA, J.B.T.Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: Effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Chemico-Biological Interactions* 2007; 165(2): 87–98.

RABELO C. MOSCATO, C.H; TOMÉ, G.J; PEDRAZZOLI, J.P.R; GAMBERO,A; 2014. Artigo Original / Original Article Nitric Oxide Interferes With Inflammation. *Arq Gastroenterol* 2014; 51(4): 302:308.

RAMOS, G. P. APEL, M.A; MORAIS, C.B; CEOLATO, P.C; SCHAPOVAL,E.E.S; DALL AGNOL, M; ZUANASSI, J.A.S.In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2012; 22(1): 176–180.

RANA, S. V ; SHARMA, S; PRASADA, K.K. SINHA, S.K; SINGH, K 2014.Role of oxidative stress & antioxidant defence in ulcerative colitis patients from north India . *Indian J Med Res* 2014; 139 (4): 568-571 .

RANDHAWA, P. K; SINGH, K; SING,N; SINGH,J.A. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 279–288.

RASHIDIAN,A; MEHRZADI, S; GHANNADI, A.R; MHZOONI, P; SADR, S.Protective Effect of Ginger Volatile Oil against Acetic Acid-Induced Colitis in Rats: A Light Microscopic Evaluation. *Journal of Integrative Medicine* 2014; 12(2): 115–120

REINECKER, H. C., STEFFEN, M; WITTHOEFT, T; PLUEGER, I; SHREIBER, S; MACDERMOTT, R.P; Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and experimental immunology* 1993; 94(1):.174–181.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 2013 (2013): 1-14 .

RODRIGUES, M. S.; DE, J. NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NA COLITE UL; CEROSA SÃO PAULO, BRASIL (Tese de Mestrado Integrado em Medicina – ICBAS-USP); SÃO PAULO, 2011.

SAKAI, T; FUROKI, S; NAKAMOTO, M; SHUTO, E; HOSAKA, T; NISHIOK,A Y; SABURO, S .Soy Isoflavone Equol Perpetuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Colitis in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2011; 75(3): 593–595.

SALATINO, A; FERNANDES-SILVA, C.C; RIGHI, A.A. SALATINO, M.L.F. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports* 2011; 28(5): 925–936.

- SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; CÁRDENO, A; SÁNCHEZ-HIDALGO, M. APARICIO-SOTO, M; DE LA LASTRA, C.A. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013., 24(7): 1401–1413.
- SARTOR, R. B; Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 2006;3(7):390–407.
- SARTOR, R. B.; MAZMANIAN, S. K. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *The American Journal of Gastroenterology Supplements* 2012; 1(1): 15–21.
- SCHOFFEN, P. Artigos de Revisão. *Revista saúde pesquisa* 2011 ;4 (1):. 73–80.
- SEGUÍ, J.; GIRONELA, M; SANS, M; GRANELL, S; GIL, F; CORONEL, P; PIQUÉ, J.M; PANÉS, J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *Journal of leukocyte biology* 2004; 76(3) 537–544.
- SELLON, R. K. ;TONKONOGY, S;SCHULTZ, M;DIELEMAN, L. A ;GRENTHER, W; *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity* 1998; 66 (11): 5224–5231.
- SENOL,R.C;TONKONOGY,S; SCHULTZ, M; DIELEMAN, L.A; GRENTHER, W; BALISH, ED; RENNICK, D.M. SARTOR, R.B. Kefir treatment ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(46): 13020–13029.
- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2015; 35(1): 206-219.
- SKLENICKOVA, O; FLESAR, J; KOKOSKA, L; VLKOVA,E;HALAMOVA,K; MALIKE, J. Selective growth inhibitory effect of biochanin A against intestinal tract colonizing bacteria. *Molecules Basel, Switzerland* 2010; 15(3) p. 1270–9.
- SZALAI, Z; SZÁSZ, A;NAGY, I;PUSKÁS, L.G; KUPAI, K;KIRÁLY, A; BERKÓ, A; PÓSA, A; STRIFLER,G; BARÁTH, Z; NAGY, L. I; SZABÓ, R; PÁVÓ,I ;MURLASITS, Z; GYÖNGYÖSI, M. Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in TNBS-Induced Colitis in Rats : Role of NOS / HO / MPO .*System* 2014;2014(5): 324-339.
- TANIDEH, N; JAMSHIDZADEH, A; SEPEHRIMANESH, M, HOSSEINZADEH M, KOOHI-HOSSEINABADI .O; NAJIBI,A; *et al.* Healing acceleration of acetic acid-induced colitis by marigold (*Calendula officinalis*) in male rats. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22 (1): 50-56.
- THIPPESWAMY, B.S; BIRADAR, M.I; RAJ, P; SRIVASTAVA, K. BADAMI, S; VEERAPUR, V.P. Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *European Journal of Pharmacology* 2011; 654(1): 100–105.
- TIAN, H; SUN, H-W; ZHANG, J.J; ZHANG, X-W; ZHAO, L; GUO, S.D; LI, Y.Y, JIAO, P; WANG, H; QUIN, S.C; YAO, S.T. Ethanol extract of propolis protects macrophages from oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting CD36 expression and endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway. *BMC- Complementary and Alternative Medicine* 2015;15(1):230-250.
- TOMASELLO,G; SINAGRA, E; RAIMONDO, D; PALUMBO, V.D; PULEIO, R; COTTONE, M. DAMIANI, P. Validation of a modified model of TNBS-induced colitis in rats. How to induce a chemical colitis in rats. *Acta Biomedica* 2015; 86(1): 92–96.
- TOPCU-TARLADACALISIR, Y; AKPOLAT, M; UZ. Y.H; KIZILAY, G; SAPMAZ-METIN, M; CERKEZKAYABEKIR, A; OMURLU, I.K. Effects of curcumin on apoptosis and oxidative inflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: the roles of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of medicinal food* 2013.16(4) 296–305.

- TORRES, J.A. P; SANTANA, R.M; TORRES, F.A.P. MOURA, A.R; TORRES NETO, J.R. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2011, 31(2)115–119.
- TUN, X.; YASUKAWA, K.; YAMADA, K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free radical biology & medicine* 2014; 74(1): 108–17.
- UPADHYAY S, DIXIT M; Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Long* 2015; 253(1):2326-2349.
- URONIS, J. M; MÜHLBAUER, M.H; HANS.H; RUBINAS. T.C; JONES, G.S.; JOBIN, C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE* 2009; 4(6) : 6026-6040.
- VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. D. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arquivos de Gastroenterologia* 2009;46 (1) 20–25.
- WALKER, C. R; HAUTEFORT, I; DALTON, J.E. OVERWEG, K; EGAN, C.E; BONGAERTS, R.J. NEWTON, D.J. Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by paneth cells upon microbial challenge. *PLoS ONE* 2013; 8(12):. 1–16.
- WANG, X; YAO, Z; GAO, L; YIN, H; XIE, Z; WANG, D; ZHU, Z; HAN, X . Protective effects of 2,3,5,4-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-d-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb, on experimental colitis in mice. *European Journal of Pharmacology* 2008; 578(2-3): 339–348.
- WANG, Y; ZHAO, L; HAN, T; CHEN, S; W.J. Formononetin attenuates IL-1b-induced apoptosis and NF-??B activation in INS-1 cells. *Molecules* 2012;17(9): 10052–10064.
- WATTERLOT, L; ROCHAT, T; SOKOL,H; CHERBUY, C; BOULOUFA, I; LEFÉVRE, F; *et al.* Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology* 2010;144 (1): 35–41.
- XU, X. R; LIU, C.Q; FENG, B,S; LIU, Z.J.. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014; 20(12): 3255–3264.
- YAO, J; Wang, Y;Zhu, Y;Gao, L;Yin, H;Xie, Z;Wang, D;Zhu, Z; Han, X . Anti-oxidant Effects of Resveratrol on Mice with DSS-induced Ulcerative Colitis. *Archives of Medical Research* 2010; 41(4): 288–294.
- ZHANG,L.; GAO, LU; YIN, H; XIE, Z; WANG, D;ZHU, Z; HAN, X.Heme Oxygenase-1 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-induced Acute Murine Colitis by Regulating Th17/Treg Cell Balance. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 26; 289(39):26847-58. doi: 10.1074/jbc.M114.590554. Epub 2014 Aug 11.
- ZHAO, L; ZHANG, Y;ZHONG,W; DI, C;LIN,X; XIA, Z; 2014.The in vivo and in vitro study of polysaccharides from a two-herb formula on ulcerative colitis and potential mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, n. 1, p. 151–159.
- ZHANQUIANG, M; WEIWEI, J; QUIANG, F; SHIPING, M. Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression.*Inflammation* 2013;36(6):1560-1566.

10 ANEXO

10. 1 ANEXO A- Aprovação CEUA

Unit
UNIVERSIDADE TIRADENTES

UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto de pesquisa, "Avaliação dos extratos da própolis vermelha, na sintomatologia de inflamação intestinal em ratos", processo nº 031014, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pela pesquisadora: **Juliana Cordeiro Cardoso**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 16 de outubro de 2014.

Marina Lima Vercelli
Coordenadora(a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UN
Prof. Dr. Maria Alice Araújo
Coordenadora do Núcleo de Apoio
Administrativo

UNIVERSIDADE TIRADENTES
R. M. AURELIANO GUERINHO Nº 300 - FÁBIO - JUAZEIRO DO NORTE - BA
TELEFONE: (71) 3218-4734
FAX: (71) 3218-2180

