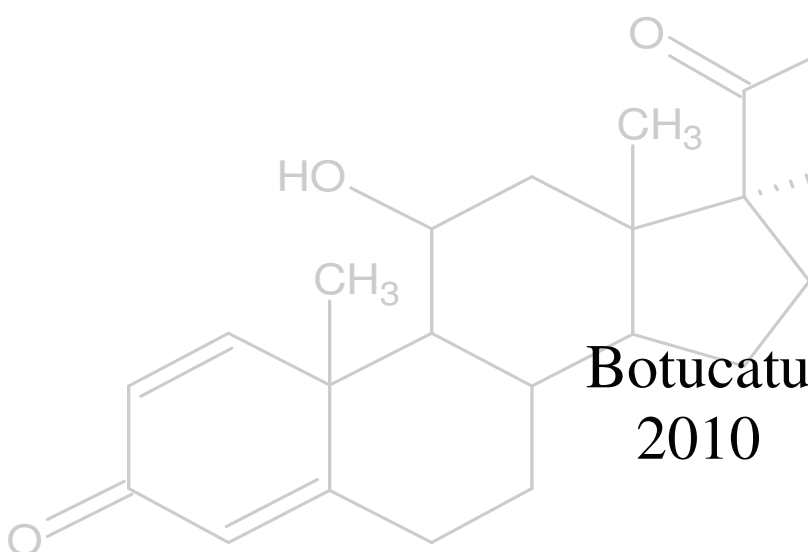
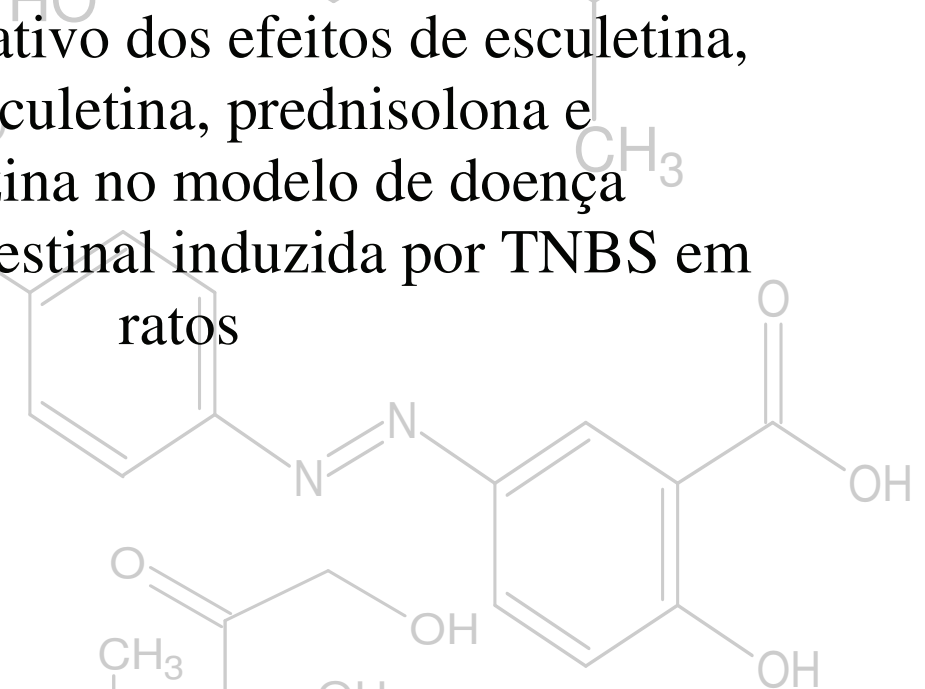
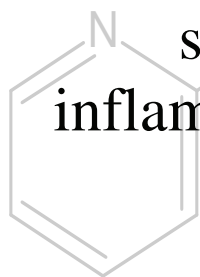


Estudo comparativo dos efeitos de esculetina,  
4-metilesculetina, prednisolona e  
sulfassalazina no modelo de doença  
inflamatória intestinal induzida por TNBS em  
ratos



**Aline Witaicenis**

**Estudo comparativo dos efeitos de esculetina,  
4-metilesculetina, prednisolona e  
sulfassalazina no modelo de doença  
inflamatória intestinal induzida por TNBS em  
ratos**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração:  
Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi**

**Botucatu  
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Witaicenis, Aline.

**1 Estudo comparativo dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos / Aline Witaicenis – Botucatu, 2010**

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21006008

1. Intestino – Doenças inflamatórias. 2. Produtos naturais. 3. Colite.

Palavras-chave: Esculetina, 4-metilesculetina; Inflamação intestinal; Metaloproteinases; Prednisolona; Sulfassalazina.

**Aline Witaicenis**

Estudo comparativo dos efeitos de esculetina,  
4-metilesculetina, prednisolona e  
sulfassalazina no modelo de doença  
inflamatória intestinal induzida por TNBS em  
ratos

Tese para obtenção do grau de doutora

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi  
2º Examinador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Clélia Akiko Hiruma Lima  
3º Examinador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
4º Examinador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>: Elfriede Marianne Bacchi  
5º Examinador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Auxílio Financeiro:



(Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo)

(Processo: 07/54516-7)



C A P E S

(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

## Dados Curriculares

**Nome:** Aline Witacenis

**Data Nascimento:** 27/03/1980

### **Formação**

Graduação em licenciatura plena em Ciências Biológicas – UNESP – Bauru (1999/2003).

Mestrado em Ciências Biológicas, AC: Farmacologia – UNESP – Botucatu (2004/2006).

## Atividades realizadas durante o doutorado (2006/2010):

### **A) Participação em congressos e eventos:**

- 1.** I Encontro nacional sobre ética na experimentação animal, Instituto de Biociências-UNESP – Botucatu - SP, 2006.
- 2.** VI Workshop de pós-graduação em Ciências Biológicas, UNESP - Botucatu - SP, 2007.
- 3.** Workshop "Pesquisa Clínica na Faculdade de Medicina de Botucatu - Perspectivas, paradigmas e propostas", Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu - SP, 2007.
- 4.** Oficina de trabalho do Workshop de Pesquisa Clínica na Faculdade de Medicina de Botucatu - Perspectivas, paradigmas e propostas, Faculdade de Medicina – UNESP- Botucatu-SP, 2007.
- 5.** 9º Seminário sobre Ciências Básicas em Homeopatia, UNESP- Lageado – Botucatu-SP, 2007.
- 6.** VII Workshop da pós-graduação, realizado na cidade de Botucatu-SP, no período de 24 a 26 de abril de 2008.
- 7.** Participação no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 8.** Participação no X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.
- 9.** 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia – Lisboa – Portugal, Hotel Altis Park, 8 a 10 de outubro 2009.

## **B) Estágio de docência**

### **1º Semestre/2008**

Curso: Biomedicina

Disciplina: Toxicologia

Duração: 46h

Aula Ministrada: Intoxicação por medicamentos

### **2º Semestre/2008**

Curso: Biomedicina

Disciplina: Farmacodinâmica

Duração: 46h

Aula Ministrada: Farmacologia do trato gastrintestinal

## **C) Aulas ministradas:**

A) Aula de "Métodos de Estudo de Plantas Medicinais", ministrada aos alunos do curso de graduação em Ciências Biológicas, Modalidade Bacharelado/licenciatura do período diurno, com duração de 2 horas, no dia 19 de abril de 2007.

B) Aula de "Farmacoquímica de Produtos Naturais" ministrada na disciplina optativa de Metodologia Científica Experimental, para os cursos de graduação em Ciências Biológicas e em Biomedicina, no dia 21 de maio de 2010, com duração de 4 horas.

## **D) Cursos assistidos**

1) Curso de Extensão Universitária em "Toxicologia Aplicada", realizado pelo CEATOX, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, no período de 11 a 16 de fevereiro de 2008, no total de 30 horas.

2) Participação no Mini-curso de "Produtos Naturais e doenças do trato gastrointestinal", realizado no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

3) "Curso Teórico e Prático de PCR, RT-PCR e PCR em tempo real", realizado no Instituto de Biociências - Unesp- Botucatu-SP, com duração de 45 horas.

4) Desmitificando o microarray, ministrado no Instituto de Biociências, no dia 26 de abril de 2010, com duração de 4 horas.

## **E) Cursos Ministrados**

1) "Métodos de estudo fitoquímico e farmacológico de plantas medicinais", ministrado no VI Workshop da pós-graduação, em Ciências Biológicas, UNESP - Botucatu - SP, com duração de 8 horas, 2007.

2) "A importância do estudo de plantas medicinais", ministrado no VII Workshop da pós-graduação, com duração de 6 horas, nos dias 25 e 26 de abril de 2008, com duração de 8 horas.

3) "Farmacoquímica de produtos naturais", ministrado no IX Workshop da Pós-Graduação & X Workshop de genética do Instituto de Biociências de Botucatu, SP, com duração de 6 horas, realizado de 13 a 15 de maio de 2010.

## **F) Trabalhos apresentados em Congressos**

**1)** Atividade antiinflamatória intestinal da cumarina (1,2-benzopirona) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos. **Witaicenis, Aline**; Cestari, Silvia Helena; Rodrigues, Patrícia; Seito, Leonardo Noboru; Fadel, Gustavo; Pelizzon, Claudia Helena; Vasconcelos, Paulo Cp; DI STASI, Luiz Claudio. No XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2006, Salvador- Bahia.

**2)** Atividade antiinflamatória intestinal da dafnetina (7-8-dihydroxicumarina) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos. Rodrigues, Patrícia; **Witaicenis, Aline**; Cestari, Silvia Helena; Seito, Leonardo Noboru; Fadel, Gustavo; Pelizzon, Claudia Helena; Di Stasi, Luiz Claudio. No XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2006, Salvador-Bahia.

**3)** Atividade antiinflamatória intestinal da escoparona (6-7-dimetoxicumarina) no modelo de colite ulcerativa induzida por TNBS em ratos. Cestari, Silvia Helena; **Witaicenis, Aline**; Rodrigues, Patrícia; Seito, Leonardo Noboru; Fadel, Gustavo; Pelizzon, Claudia Helena; Di Stasi, Luiz Claudio. No XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2006, Salvador-Bahia.

**4)** Evaluation of esculetin and 4-methyl-esculetin in acute and chronic models of rat colitis. **Witaicenis, A.**; Cestari, S.H.; Orsi, P.R.; Luchini, A.C.; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. No XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**5)** Protective effects of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) in acute and chronic experimental models of rat colitis. **Witaicenis, A.**; Cestari, S.H.; Orsi, P.R.; Luchini, A.C.; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. No XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**6)** Preventative effects of natural coumarins fraxetin, scopoletin, esculin and 4-methyl-umbelliferone on trinitrobenzenesulphonic (TNBS) rat colitis model. Seito, L.N.; **Witaicenis, A.**; Luchini, A.C.; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Di Stasi, L.C. No XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**7)** Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin on acute and chronic experimental rat colitis model. Luchini, A.C.; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Seito, L.N.; **Witaicenis, A.**; Di Stasi, L.C. No XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**8)** Paepalantine synergistic effect on sulfasalazine intestinal anti-inflammatory activity in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; **Witaicenis, A.**; Luchini, A.C.; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. No X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**9)** Intestinal anti-inflammatory activity of Daphnetin (7,8- dihydroxycoumarin) on acute and chronic experimental modelo f rat colitis. Orsi, P.R.; Luchini, A.C.; Cestari, S.H.; **Witaicenis, A.**; Seito, L.N.; Di Stasi, L.C. No XX Simpósio de Plantas Mediciniais do



Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008.

**10)** Synergic effects of the coumarin and 4-hydroxycoumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine in the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) rat colitis model. Luchini, A.C.; Orsi, P.R.; Cestari, S.H.; Seito, L.N.; **Witaicenis, A.**; Di Stasi, L.C. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo, SP de 16 a 19 de setembro de 2008

**11)** Synergic effects of the coumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. Luchini, A.C.; Cestari, S.H.; Orsi, P.R.; Seito, L.N.; **Witaicenis, A.**; Di Stasi, L.C. No 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado em Águas de Lindóia, SP, Brasil, de 16 a 19 de outubro de 2008.

**12)** A comparative study of esculetin, 4-methylesculetin, prednisolone and sulfasalazine in acute model of rat colitis. **A.Witaicenis**, L.N. Seito, P. Rodrigues-Orsi, A.C. Luchini, , L.A. Justulin, S. Felisbino , L.C. Di Stasi. No 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia. Lisboa – Portugal, Hotel Altis Park, 8 a 10 de outubro 2009.

**13)** *In vitro* effects of esculetin and 4-methylesculetin on inflammatory cytokine secretion. **A. Witaicenis**, L.N.Seito, AC. Luchini, ME. Rodriguez-Cabezas, M. Comalada, LC. Di Stasi, J. Gálvez. 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia. Lisboa – Portugal, Hotel Altis Park, 8 a 10 de outubro 2009.

#### **G) Artigos publicados**

1) WITAICENIS, Aline, ROLDÃO, Erika de Freitas, SEITO, Leonardo Noboru, ROCHA, Noeli Pereira da, DI STASI, Luiz Claudio. Pharmacological, toxicological and phytochemical studies of *Drimys angustifolia* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.541 - 546, 2007.

2) ERIKA DE FREITAS ROLDÃO, ALINE WITAICENIS, LEONARDO NOBORU SEITO, CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA, LUIZ CLAUDIO DI STASI. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.94–98, 2008.

3) ANA CAROLINA LUCHINI, PATRÍCIA RODRIGUES – ORSI, SILVIA HELENA CESTARI, LEONARDO NOBORU SEITO, ALINE WITAICENIS, CLÁUDIA HELENA PELLIZZON, LUIZ CLAUDIO DI STASI. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v.31, n.7, p.1343–1350, 2008.

4) WITAICENIS, A., SEITO, L.N., DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v.186, p.211–218, 2010.

5) WITAICENIS, A., FRUET, A.C., SALEM, L., DI STASI, L.C. Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in TNBS experimental model of rat colitis. **Journal of Medicinal Food**, no prelo. Aceito em maio/2010.

## **H) Outras atividades**

### **1) Co-orientação**

- A) Co-orientação da aluna de iniciação científica Letícia Salém.
- B) Co-orientação do aluno de iniciação científica Luiz Domingues de Almeida Júnior.

### **2) Assessora Científica**

- A) Participação como assessora científica do IX Workshop da Pós-Graduação & X Workshop de genética do Instituto de Biociências de Botucatu, SP, realizado de 13 a 15 de maio de 2010.

### **3) Colaboração em outros projetos de pesquisa.**

- A) Avaliação da atividade antiinflamatória intestinal da escoparona no modelo agudo e crônico de colite ulcerativa;
- B) Avaliação da atividade antiinflamatória intestinal de cumarina e 4-hidroxi-cumarina no modelo agudo e crônico de colite ulcerativa;
- C) Avaliação da atividade antiinflamatória intestinal da dafnetina no modelo agudo e crônico de colite ulcerativa;
- D) Efeitos sinérgicos da paepalantina, uma isocumarina isolada dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*, sobre a atividade da sulfassalazina no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos;
- E) Avaliação dos efeitos de *Baccharis dracunculifolia* DC na prevenção e tratamento de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.
- F) Avaliação dos efeitos preventivos da polidextrose no modelo experimental agudo de colite ulcerativa.
- G) Avaliação da atividade preventiva da fibra alimentar de *Musa* spp e de seus efeitos sinérgicos com a prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.
- H) Avaliação da atividade preventiva da fibra alimentar de *Typha angustifolia* L. e de seus efeitos sinérgicos com a prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos.
- I) Avaliação dos sintomas e sobrevivência de camundongos infectados com vírus da raiva e submetidos ao tratamento com *Allamanda schottii*.
- J) Avaliação da participação de HSP70 e heparanase como mediadores e novos alvos terapêuticos na inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.
- K) Avaliação dos efeitos de esculina no modelo experimental crônico de colite induzida por TNBS em ratos.

“Não existe realização sem sonho, sonhar é rascunhar a realidade, conquistar é acreditar, não conquistamos aquilo o que não acreditamos.”

## *Dedicatória*

*Dedico a conclusão desta etapa de minha vida à pessoa que está  
sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando e torcendo  
por mim:  
Meu marido Luciano*

*A Deus, por estar sempre ao meu lado me dando forças e me protegendo, obrigada pelo dom da vida e por tudo a ela acrescentado.*

"O que nós somos é o presente de Deus a nós. O que nós nos tornamos é o nosso presente a Deus."

(Eleanor Powell)

*Ao meu marido Luciano por tudo que representa em minha vida, por estar sempre ao meu lado, me ouvindo e me orientando. Obrigada por fazer parte da minha vida, por me apoiar e me compreender em todos os momentos.*

"Amar profundamente em uma direção nos torna mais amáveis em todas as outras"

(Madame Swetchine)

*Aos meus pais Líliliana e Sebastião pelo que são e por tudo que contribuíram para que eu me tornasse o que sou.*

*Ao meu irmão Danilo, pelo carinho, apoio e amizade.*

"O essencial é invisível aos olhos; só se vê bem com o coração!"

(Saint Exupéry)

*Aos meus amigos Nátali, Anderson, Fernanda, Luciano e Eduardo (Tucurada) por fazerem parte da minha vida, vocês são amigos especiais.*

"Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro."

(Eclesiástico 6:14)

## *Agradecimentos*

*Aos meus companheiros de trabalho do Lafit-Botu, a todas as pessoas que passaram por aqui durante estes anos e me auxiliaram de alguma forma, seja pela “mão de obra”, seja pela amizade e companherismo. Em especial gostaria de agradecer à Silvia Helena, Carol, Patrícia, Ana, Tarina, Andréa, Viviane (as meninas do Laboratório do Di Stasi), por toda a ajuda em diversos momentos.*

*E ao Leonardo, por todos os ensinamentos, auxílio e amizade.*

*Galerinha do bem, valeu mesmo!!!*

*“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”*

*Martin Luther King. Jr*

*À professora Clélia Akiko Hiruma-Lima, não só pela ajuda neste trabalho, mas por toda colaboração e ensinamentos durante toda a minha pós-graduação.*

*À professora Cláudia Helena Pellizzon, pelo auxílio no preparo das amostras de histologia.*

*Ao professor Sérgio Luis Felisbino, pela parceria, ajuda e ensinamentos na determinação das metaloproteinases.*

*Ao professor Luis Fernando Barbizan pelo auxílio na determinação da apoptose.*

*À professora Maria Terezinha Serrão Peraçoli por permitir que eu aprendesse a fazer as dosagens das citocinas.*

*À professora Irani Quagio-Grassiotto por permitir que eu usasse o seu laboratório para realizar a técnica de Feulgen.*

*Ao Professor Dr. Julio Gálvez da Universidade de Granada-Espanha, e as alunas de seu laboratório pela parceria nos experimentos in vitro.*

*Ao hoje Professor Luiz Antônio Justolin Júnior, por ter me ensinado a técnica de zimografia.*

*A Érika, aluna da professora Terezinha por me ensinar a dosar citocinas.*

*Aos alunos e técnicos do departamento de morfologia por me socorrerem na hora do sufoco.*

*Ao técnico Vicente do departamento de morfologia, por me ensinar a técnica de Feulgen.*

*A Marta e ao Victor do laboratório de pesquisa experimental pelo auxílio no preparo do material histológico.*

*A Cilene, técnica do departamento de biofísica, pelo auxílio na análise dos géis de zimografia.*

*Ao Hélio (Pompom) do departamento de Fisiologia pela parceria nas dosagens das citocinas.*

*Aos funcionários da seção de pós-graduação da UNESP por toda ajuda e orientação com a parte burocrática.*

*Aos professores do Departamento de Farmacologia, da UNESP de Botucatu e aos funcionários Luiz, Paulão, Cris, Flávia e Janete.*

*Enfim a todas as pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram em algum momento na realização deste trabalho e nesta etapa da minha vida, a vocês meu agradecimento!*

"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."  
(Luiz Fernando Veríssimo)

*Ao meu orientador Luiz Claudio Di Stasi*

*Agradeço por todos esses anos de convivência, pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança, pelo carinho, pela amizade, enfim por tudo que contribuiu para o meu crescimento profissional e também pessoal.*

*A você meu eterno e sincero agradecimento.*

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(Cora Coralina)



# Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Doença Inflamatória Intestinal .....	1
2. Epidemiologia .....	2
3. Etiologia.....	3
3.1. FATORES AMBIENTAIS.....	4
3.1.1. Dieta .....	4
3.1.2. Fármacos .....	4
3.1.3. Tabagismo .....	5
3.1.4. Fatores Geográficos e Sociais.....	6
3.1.5. Fatores Psicológicos.....	7
3.1.6. Alterações na Microbiota Intestinal .....	8
3.1.7. Alterações na Permeabilidade da Mucosa.....	9
3.2. SISTEMA IMUNE INTESTINAL .....	10
3.3. FATORES GENÉTICOS .....	12
3.4. RADICAIS LIVRES.....	14
3.4.1. Antioxidantes.....	16
4. Principais Tratamentos Farmacológicos Disponíveis .....	17
5. A Busca de Novos Compostos para o Tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais .....	21
6. O Modelo Experimental De Doença Inflamatória Intestinal Induzida Pelo Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS) .....	25
<b>OBJETIVO</b> .....	27
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
1. Animais.....	28
2. Substâncias Testes E Desenho Experimental.....	28
2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESCULETINA, 4-METILESCULETINA, PREDNISOLONA E SULFASSALAZINA NA FASE AGUDA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INTESTINAL. ....	29
2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE ESCULETINA, 4-METILESCULETINA, PREDNISOLONA E SULFASSALAZINA NA FASE CRÔNICA COM RECÍDIVA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INTESTINAL. ....	31
3. Avaliação Do Processo Inflamatório Intestinal .....	32
3.1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA .....	32
3.2. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE AMOSTRAS DE CÓLON.....	33
3.2.1. Determinação Do Número De Células Apoptóticas Das Criptas .....	34
3.3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	36
4. Avaliação Da Atividade De Esculetina E 4-Metilesculetina Sobre A Secreção De Citocinas Pró-Inflamatórias <i>In Vitro</i> .....	39

5. Análise Estatística .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	43
1. Resultados Modelo Experimental De Fase Aguda .....	43
1.1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA .....	43
1.2. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	46
1.2.1. Determinação Das Células Apoptóticas.....	48
1.3. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	49
2. Resultados Do Modelo Experimental De Doença Inflamatória Intestinal De Fase Crônica Com Recidiva.....	53
2.1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA .....	53
2.2. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	58
2.2.1. Determinação Das Células Apoptóticas.....	64
2.3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	65
3. Avaliação Da Atividade De Esculetina E 4-Metilesculetina Sobre A Secreção De Citocinas Pró-Inflamatórias <i>In Vitro</i> .....	73
<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>CONCLUSÃO</b> .....	98
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99
<b>ANEXO</b> .....	117
9: Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis.....	125

# *Lista de Figuras*

<b>Figura 1:</b> Interação entre os fatores ambientais, alterações genéticas e desregulação do sistema imune que refletem no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais.....	03
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de indução da doença inflamatória intestinal pelo TNBS.....	26
<b>Figura 3:</b> Estrutura química das substâncias testes.....	29
<b>Figura 4:</b> Desenho experimental.....	31
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia da mucosa de cólon de rato do grupo controle do modelo experimental de colite de fase aguda, corado de acordo com a técnica de Feulgen para determinação da apoptose.....	35
<b>Figura 6:</b> Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	45
<b>Figura 7:</b> Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	45
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais dois dias após a administração de TNBS.....	47
<b>Figura 9:</b> Avaliação do número de células apoptóticas por cripta de animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	48
<b>Figura 10:</b> Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	50
<b>Figura 11:</b> Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	50
<b>Figura 12:</b> Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	50
<b>Figura 13:</b> Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	51

<b>Figura 14:</b> Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	51
<b>Figura 15:</b> Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS.....	51
<b>Figura 16:</b> Atividade gelatinolítica da MMP-9 e da MMP-2 determinada por zimografia.....	52
<b>Figura 17:</b> Análise densitométrica da atividade gelatinolítica da MMP-9 e da MMP-2 por zimografia, em animais submetidos ao modelo experimental de retocolite aguda induzida por TNBS.....	52
<b>Figura 18:</b> Avaliação do consumo médio de ração dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica, na primeira, segunda e terceira semanas após a administração do TNBS.....	56
<b>Figura 19:</b> Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica com recidiva induzida por TNBS.....	57
<b>Figura 20:</b> Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a administração de TNBS.....	60
<b>Figura 21:</b> Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais duas semana após a administração de TNBS.....	61
<b>Figura 22:</b> Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a recidiva.....	62
<b>Figura 23:</b> Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a recidiva.....	63
<b>Figura 24:</b> Avaliação do número de células epiteliais em apoptose por cripta, de animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	64
<b>Figura 25:</b> Avaliação dos níveis de glutathiona colônica em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	66
<b>Figura 26:</b> Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica induzida por TNBS.....	67
<b>Figura 27:</b> Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	68

<b>Figura 28:</b> Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	69
<b>Figura 29:</b> Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	70
<b>Figura 30:</b> Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	71
<b>Figura 31:</b> Análise densitométrica da atividade gelatinolítica da MMP-9 e da MMP-2 por zimografia, em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva.....	72
<b>Figura 32:</b> Efeito da esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-1 $\beta$ .....	73
<b>Figura 33:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-2 .....	74
<b>Figura 34:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IFN- $\gamma$ .....	74
<b>Figura 35:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-8 .....	75
<b>Figura 36:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade de esplenócitos.....	75
<b>Figura 37:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade das células de Raw.....	76
<b>Figura 38:</b> Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade das células Caco-2.....	76

## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 1.</b> Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.....	32
<b>Tabela 2.</b> Critério de avaliação microscópico da lesão colônica.....	34
<b>Tabela 3.</b> Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal .....	44
<b>Tabela 4.</b> Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal.....	54
<b>Tabela 5.</b> Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental agudo de colite .....	117
<b>Tabela 6.</b> Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental agudo de colite .....	117
<b>Tabela 7.</b> Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental crônico com recidiva.....	118
<b>Tabela 8.</b> Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal .....	119
<b>Tabela 9.</b> Efeito de diferentes concentrações de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de citocinas em cultura de células.....	120
<b>Tabela 10.</b> Resultados dos parâmetros macroscópicos e microscópicos apresentados em porcentagem da diferença dos valores em relação ao grupo controle, em todas as fases experimentais estudadas.....	121
<b>Tabela 11.</b> Resultados dos parâmetros bioquímicos apresentados em porcentagem da diferença dos valores em relação ao grupo controle, em todas as fases experimentais estudadas.....	122
<b>Tabela 12.</b> Resumo dos resultados obtidos com a administração de esculetina , 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina em todos os parâmetros avaliados, durante todas as fases do modelo experimental.....	123
<b>Tabela 13.</b> Atividade antioxidante de cumarinas no modelo de peroxidação lipídica induzida por ferro-ácido ascórbico em membranas de cérebro de ratos.....	124

Sob a denominação de Doença Inflamatória Intestinal (DII) estão englobadas: a Doença de Crohn e a retocolite ulcerativa, que se caracterizam por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos de remissão dos sintomas. A terapêutica atualmente disponível não representa a cura destas doenças; apresenta-se como tratamento sintomático e paliativo, além de possuir sérios efeitos colaterais e alto custo – aspectos que limitam sua utilização. Apesar da etiologia das doenças inflamatórias intestinais ser pouco conhecida, sabe-se que os radicais livres desempenham um papel chave em sua gênese e manutenção. Portanto, substâncias antioxidantes apresentam-se como uma nova estratégia terapêutica. As cumarinas representam uma ampla classe de compostos fenólicos com inúmeras propriedades farmacológicas importantes para que um produto seja potencialmente ativo no tratamento das DII. Dados preliminares obtidos em nosso laboratório demonstraram que esculetina e 4-metilesculetina atuam como potentes agentes antioxidantes e apresentam efeitos na fase aguda e crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) em ratos. Considerando-se a relevância dos resultados observados, os objetivos do presente estudo foram comparar os efeitos de esculetina e 4-metilesculetina com dois fármacos de escolha no tratamento das DII em humanos, a sulfassalazina e a prednisolona, enfocando o perfil de respostas farmacológicas destes compostos nas fases aguda e crônica com recidiva do modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos; além de avaliar o perfil de efeitos destes compostos sobre as metaloproteinases, como um marcador do processo inflamatório e padronizar o perfil de respostas da prednisolona neste modelo experimental. Para tanto, foram avaliados os parâmetros clínicos gerais (consumo de alimento, peso corporal, diarreia), parâmetros macroscópicos da lesão (índice de lesão, relação peso-comprimento colônico, aderências do cólon e obstrução intestinal), microscópicos (estudos histológicos, análise de lesão e determinação do número de células epiteliais em apoptose) e bioquímicos (avaliação da mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina (FA), metaloproteinases (MMP), glutatona total (GSH), malonildialdeído (MDA), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). Este estudo demonstrou que esculetina e 4-metilesculetina, na dose de 5mg/Kg, apresentaram relevante atividade antiinflamatória no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos. Essa atividade está relacionada com a redução dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , inibição da atividade das enzimas MPO, FA e MMP-9 e atividade antioxidante dos compostos, observada pela diminuição nos níveis de MDA, por evitar a depleção de GSH e pela diminuição na apoptose das células epiteliais. É possível concluir que os mecanismos de ação de esculetina e 4-metilesculetina são semelhantes, porém esculetina age reduzindo os níveis de TNF- $\alpha$  e 4-metilesculetina não altera os níveis desta citocina. Prednisolona pode ser usada preferencialmente como fármaco de referência neste modelo experimental e a metaloproteinase 9 mostrou-se como um importante marcador desse processo inflamatório. O presente estudo demonstrou que esculetina e 4-metilesculetina apresentam resultados superiores à sulfassalazina e semelhantes à prednisolona no modelo experimental de DII, indicando que essas substâncias são promissoras para o tratamento desta grave e incurável doença.

**Palavras-chaves:** Esculetina, 4-metilesculetina, inflamação intestinal, metaloproteinases, prednisolona, sulfassalazina.

The idiopathic inflammatory bowel diseases comprise two types of chronic intestinal disorders: Crohn's disease and ulcerative colitis that are characterized by a chronic inflammation of the intestine, with periods of remission and reactivation of the inflammatory process. The currently used therapy does not represent the cure of these diseases, as it is only a symptomatic and palliative treatment, with the additional problem of being expensive and not devoid of serious side effects – aspects that limit their use. The etiology of inflammatory bowel disease has not yet been defined, but it is known that reactive oxygen species can contribute to or even initiate an inflammatory response. Thus, antioxidant compounds may be a new strategy for the treatment of the inflammatory bowel disease. Coumarins comprise a broad class of phenolic compounds that influences the formation and scavenging of reactive oxygen species and the processes involving free radical-mediated injury. A study carried out in our laboratory showed that esculetin and 4-methylesculetin may be effective for the treatment of the inflammatory bowel disease. In light of this, the aim of present study was to compare the effects of esculetin and 4-methylesculetin with two main drugs used for the treatment of DII in humans, i.e. sulphasalazine and prednisolone. This comparison was performed by evaluation of the pharmacological responses of these compounds in experimental models of rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) in the acute and chronic with relapse phases. Additionally, we evaluated the effects of the coumarins, sulphasalazine and prednisolone on the metalloproteinase activity, as it is a marker in this experimental inflammatory process and the profile of pharmacological responses of prednisolone in these experimental model. For this purpose, clinic parameters (food intake, body weight, diarrhoea), macroscopic (extension of lesion, adherence, colonic weight/length ratio, damage score), microscopic (histological studies, lesion analyses, the number of apoptosis of crypt epithelial cells) and biochemical parameters (myeloperoxidase (MPO), alkaline phosphatase (AP), matrix metalloproteinases (MMP) activities and glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels) were evaluated. Our results revealed that esculetin and 4-methylesculetin at the dose of 5 mg/Kg showed significant anti-inflammatory activities in the experimental model of rat colitis induced by TNBS. This activity was related with the reduction in the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , as well as reduction in the MPO, AP and MMP-9 enzyme activities. Indeed, the anti-inflammatory properties were related with the antioxidant activity of these compounds as evidenced by the reduction in the levels of malondialdehyde, counteraction of the glutathione depletion and reduction in the number of apoptotic intestine epithelial cells. It is possible to conclude that esculetin and 4-methylesculetin have similar mechanisms of action, differing only in the fact that esculetin reduces the TNF- $\alpha$  level, whereas 4-methylesculetin do not alter the levels of this cytokine. Prednisolone could be used as a preferential reference drug in these experimental models and metalloproteinase 9 is an important marker of this inflammatory process. The present study demonstrated that esculetin and 4-methylesculetin present better effects than sulphasalazine and similar effects to prednisolone in experimental models of inflammatory bowel disease, indicating that these are promising compounds for the treatment of these serious and incurable diseases.

**Keywords:** Esculetin, 4-metilesculetin, inflammatory bowel disease, metalloproteinase, prednisolone, sulphasalazine, TNBS.



# *Introdução*

## **1. Doença Inflamatória Intestinal**

Sob a denominação de Doença Inflamatória Intestinal (DII) estão englobadas, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcadas pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação (Singh *et al.*, 2003).

As características e distribuição do processo inflamatório intestinal são distintas. Histologicamente, a inflamação na retocolite ulcerativa se restringe a camada mucosa colônica, sendo caracterizada pela infiltração de linfócitos e granulócitos e presença de abscessos das criptas com infiltração de neutrófilos. Já a doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação transmural, descontínua, que pode ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal, caracterizada pela infiltração de linfócitos, formação de granuloma e fibrose (Collins & Croitoru, 1994).

Clinicamente, a RCU é caracterizada pela ocorrência de diarreia severa com sangue, muco e pus, perda do peristaltismo e da rigidez da parede intestinal e perfuração. Já a doença de Crohn é caracterizada por dor abdominal intensa, ocorrência de estreitamento do lúmen intestinal (estenoses) e desenvolvimento de fístulas (Bouma & Strober, 2003).

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

## **2. Epidemiologia**

Estima-se que 1.4 milhões de americanos apresentam a doença (Abraham & Cho, 2009). Dados mundiais indicam que a prevalência está em um range de 37-246 casos de retocolite ulcerativa e 26-199 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes, variando de acordo com a região demográfica, sexo ou etnia (Loftus, 2004).

No Brasil são escassos os estudos relatando a incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais, devido à existência de problemas nos sistemas de informação de saúde como, por exemplo, qualidade dos prontuários, registros constituídos apenas pelas redes públicas hospitalares e conveniadas, além da característica crônica da doença seguida de períodos de exacerbação, fatores estes que dificultam o registro dos casos. Porém, um estudo epidemiológico realizado em um hospital universitário do interior de São Paulo revelou que ocorreu um aumento nas doenças inflamatórias intestinais de 40 para 61 casos para cada 10.000 atendimentos realizados, em um período de 5 anos (Souza *et al.*, 2002). Victoria *et al.*, (2009) em estudo realizado no hospital da Universidade Estadual Paulista da cidade de Botucatu-SP, o qual atende predominantemente pacientes da região centro-oeste paulista, demonstrou que a ocorrência das doenças inflamatórias intestinais foi de 14,81 casos para a retocolite ulcerativa e 5,65 casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes. Apesar destes números estarem abaixo da prevalência mundial, é relatado um aumento considerável no número de casos.

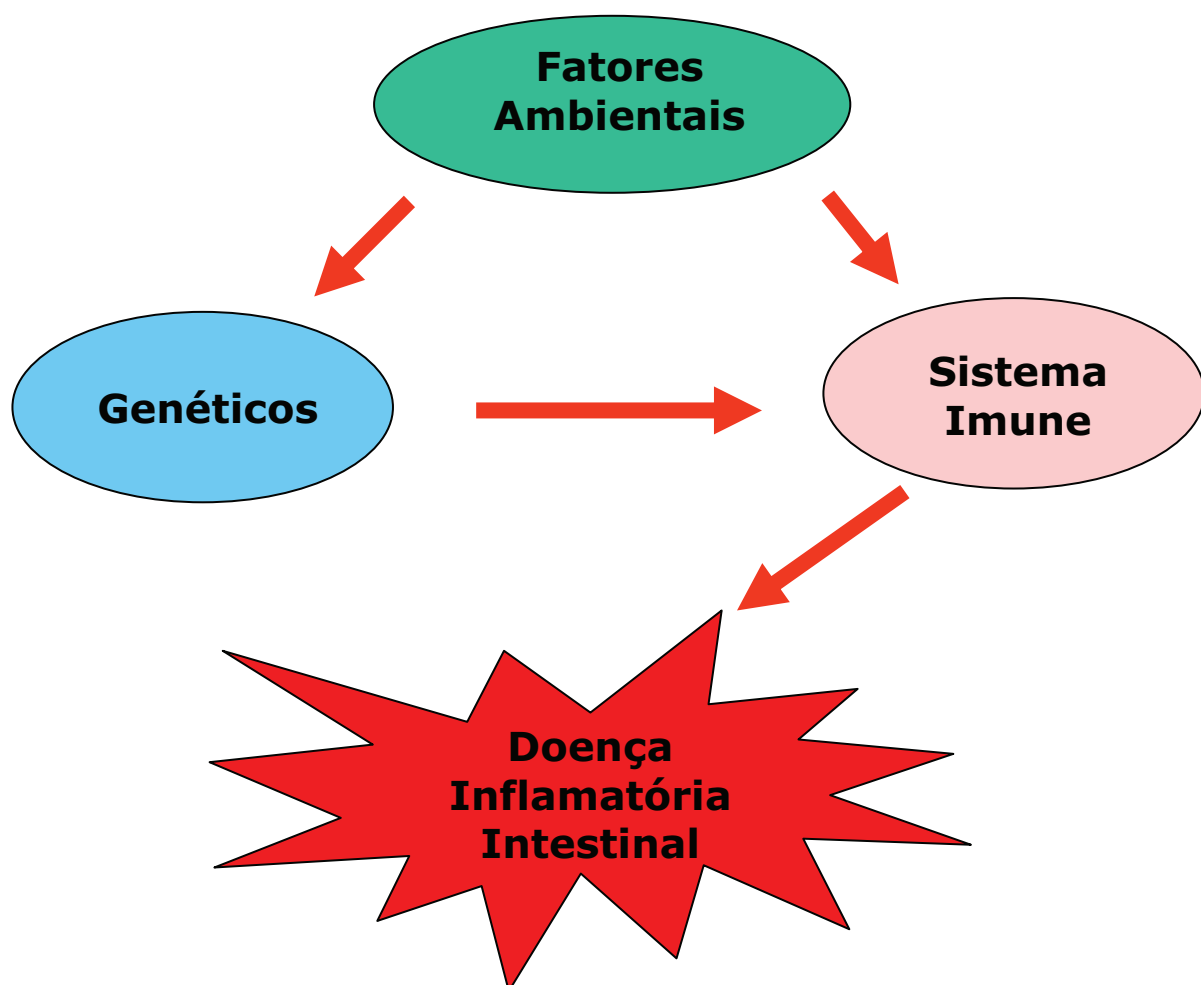
No Brasil e no mundo, em ambas as doenças, é observado um predomínio de casos em pessoas do sexo feminino, de cor branca, de estado civil casado, na faixa etária entre 20 e 50 anos, não-tabagistas e residentes na zona urbana (Souza *et al.*, 2002; Victoria *et al.*, 2009; Loftus, 2004).

As doenças inflamatórias intestinais não ocorrem em igual proporção, sendo maior a incidência de RCU do que de DC, sendo as mulheres mais predisposta a DC e não havendo distinção entre os sexos para a RCU. Porém estudos pediátricos revelam um aumento na incidência da DC em jovens nas últimas três décadas (Declercq *et al.*, 2009).

### 3. Etiologia

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, sabe-se que interações entre os fatores genéticos, ambientais e uma desregulação do sistema imune refletem em seu desenvolvimento (Mayer, 2010). Trata-se, portanto, de uma doença multifatorial e vários fatores podem ser ressaltados como, por exemplo, a alteração na função epitelial e na microbiota intestinal (Su *et al.*, 2009).

Dentre os fatores ambientais podemos citar a dieta, alguns fármacos, o tabagismo, fatores geográficos e sociais, fatores psicológicos, entre outros (Danese *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Interação entre os fatores ambientais, alterações genéticas e desregulação do sistema imune que refletem no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais.

### **3.1. Fatores Ambientais**

#### **3.1.1. Dieta**

O meio que circunda a mucosa intestinal é uma mistura complexa de antígenos de três origens: da dieta, da flora bacteriana normal e de seus produtos, sendo que estes últimos podem representar patógenos potenciais. Por este motivo, é essencial que o sistema imune da mucosa tenha a capacidade de discriminar os estímulos prejudiciais dos inofensivos, prevenindo assim a entrada maciça de patógenos e não produzindo uma resposta imune frente aos agentes inofensivos.

Sendo a DII uma condição entérica, é lógico considerar a dieta como um possível fator etiológico (Shanahan & Targan, 1994). Alguns alimentos específicos podem estar relacionados com o desenvolvimento da inflamação intestinal, atuando como um antígeno. Dentre estes podemos citar o açúcar refinado (Vind *et al.*, 2008), o álcool, o café (Boyko *et al.*, 1989), o leite de vaca (Yamamoto *et al.*, 2009) e um aumento no consumo de carboidratos (Martini & Brandes, 1976).

Por outro lado, existem alguns alimentos que são relatados como preventivos do processo inflamatório intestinal, como por exemplo, produtos ricos em ômega-3, que tem demonstrado atividade antiinflamatória (O'Morain *et al.*, 1989), bem como uma dieta rica em frutas, vegetais e fibras (Shanahan & Targan, 1994).

Os fatores da dieta são parâmetros difíceis de ser estudados, pois não atuam sozinhos, mas juntamente com alterações genéticas e no sistema imune.

#### **3.1.2. Fármacos**

Os contraceptivos orais e os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são duas classes de fármacos que têm sido bastante estudados como fatores etiológicos ou de relação causa-efeito das doenças inflamatórias intestinais.

Diferentes estudos analisados por Cornish *et al.*, (2008) evidenciaram a associação dos contraceptivos orais e o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais. O mecanismo pelo qual essa classe de medicamentos atua ainda não está claro, mas atribui-se esta propriedade principalmente a sua atividade trombogênica. Estudos morfológicos demonstram que o infarto multifocal microvascular do trato gastrointestinal (TGI) pode estar envolvido com a doença de Crohn (Wakefield *et al.*, 1989), além disso, essa propriedade trombogênica pode causar isquemia, o que pode acarretar em alteração na integridade da mucosa e conseqüentemente permitir a entrada de antígenos no lúmen (Shanahan & Targan, 1994).

Já os AINES possuem como efeito colateral a injúria da mucosa do trato gastrointestinal, principalmente no estômago e no duodeno, porém seu efeito tóxico se estende ao cólon e ao intestino grosso. Esse efeito colateral está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular e lesão local causada por essa classe de fármacos, além de seu efeito sistêmico sobre a síntese de prostaglandinas, o que diminui os fatores de proteção da mucosa do TGI (Shanahan & Targan, 1994), acarretando em alterações na permeabilidade colônica e conseqüentemente no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais.

### **3.1.3. Tabagismo**

O tabagismo é outro fator ambiental relacionado com a DII, sendo este um dos mais fáceis de ser estudado, pois é possível distinguir o fumante do não fumante, além de ser possível estimar quanto tempo à pessoa esteve exposta a este agente etiológico (Shanahan & Targan, 1994).

O cigarro apresenta ações antagônicas nos dois diferentes tipos de DII. Na retocolite ulcerativa o cigarro está relacionado com menor risco de ocorrência da doença, sendo esta incidência de apenas 40% em relação às pessoas não fumantes (Shanahan & Targan, 1994). O mecanismo pelo qual o cigarro atua na retocolite ulcerativa ainda não está esclarecido, porém pode estar relacionado com alterações do muco colônico

(Shanahan & Targan, 1994). Cope *et al.*, (1986) demonstraram que a produção de muco em pacientes fumantes com retocolite ulcerativa é semelhante ao de pessoas saudáveis. Além disso, o cigarro promove uma redução na permeabilidade do epitélio intestinal, o que ocasiona uma diminuição na entrada de patógenos e conseqüentemente uma menor alteração da resposta imune.

Diferentemente, o cigarro está relacionado com o aumento do risco de ocorrência da doença de Crohn, sendo os fumantes do sexo masculino duas e as do sexo feminino quatro vezes mais susceptíveis a doença, sendo a propriedade trombogênica do cigarro associada a tal fato (Shanahan & Targan, 1994). Além disso, Logan & Kay, (1989) propuseram que o cigarro pode converter a retocolite ulcerativa em doença de Crohn, por isso é observado uma maior incidência para a DC em pacientes fumantes, porém, nada pode ser afirmado, pois as duas doenças afetam os mesmos grupos demográficos e possuem sintomas semelhantes, e o cigarro é apenas um entre todos os outros fatores etiológicos das doenças inflamatórias intestinais.

#### **3.1.4. Fatores geográficos e sociais**

A DII é mais comumente observada em países ocidentais do que orientais, e em países desenvolvidos do que em desenvolvimento (Bernstein *et al.*, 2010), porém há um notável aumento no número de casos no Japão e em outros países orientais, fato este que pode estar associado ao aumento no consumo de gorduras e proteínas de origem animal, ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos, entre outros (Yamamoto *et al.*, 2009).

Além disso, a ocorrência das doenças inflamatórias intestinais é maior em grandes áreas urbanas do que na área rural e em pessoas de classes econômicas mais altas. Para este fato é levantada a "hipótese da higiene" que sugere que crianças menos expostas a infecções ou condições não-sanitárias ("sujeira") desenvolvem menos o sistema regulatório das células-T e o sistema imune, fato este que pode estar associado a um

aumento na incidência de doenças imunes crônicas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais (Bernstein *et al.*, 2010).

Essas doenças podem apresentar variações em suas manifestações extraintestinais de acordo com a localização geográfica em que ocorre, por exemplo é comum observar a ocorrência de artralgia em pacientes do Paquistão, porém a ocorrência de fístulas perianais é menor, sendo esta última bastante comum em pacientes da América do Norte, América do Sul, Europa, Austrália e Nova Zelândia. Já na Índia, o pico de ocorrência das doenças inflamatórias intestinais se dá por volta dos quarenta anos, ou seja, dez anos mais tarde do na maioria dos países citados acima (Bernstein *et al.*, 2010).

Essas variações geográficas na ocorrência destas doenças podem ser reflexos da variação na exposição aos diferentes fatores etiológicos e/ou das variações sócio-demográficas da população (Declercq *et al.*, 2009).

### **3.1.5. Fatores Psicológicos**

É descrito na literatura que fatores emocionais podem afetar o sistema imune e alterar a susceptibilidade as doenças (Shanahan & Targan, 1994). Existem evidências crescentes de que o estresse psicológico pode aumentar a inflamação da mucosa e piorar o curso das doenças inflamatórias intestinais (Wahed *et al.*, 2009). Estudos revelam uma forte relação entre fatores psicológicos como depressão, ansiedade, perda da agressividade e imaturidade com a DC (Shanahan & Targan, 1994). Apesar de poucos estudos comprovarem tal fato, o estresse psicológico pode estar relacionado com a exacerbação dos sintomas das doenças inflamatórias intestinais, talvez pela ativação do sistema nervoso entérico e da expressão das citocinas pró-inflamatórias (Brandi *et al.*, 2009).

Wahed *et al.*, (2009) relatam que os pacientes com DII que foram acompanhados por psicoterapia, apresentaram uma melhora na doença, bem como uma redução na



ocorrência de recidiva, no uso de medicamentos e em atendimentos ambulatoriais, em relação aos pacientes do grupo controle.

A resposta ao estresse envolve uma série de respostas cerebrais, principalmente no hipotálamo, amígdala e hipocampo. Essa resposta pode estar relacionada com a estimulação do eixo-HPA (hipotalâmico-pituitária-adrenal) e conseqüente agravamento da doença ativa e aumento dos casos de recidiva (Mawdsley & Rampton, 2005).

### **3.1.6. Alterações na microbiota intestinal**

A microbiota bacteriana intestinal é um importante fator na etiologia das doenças inflamatórias intestinais (Ott *et al.*, 2004). Existe uma ampla evidência de que as bactérias comensais entéricas e seus produtos estão envolvidos com a iniciação e perpetuação destas doenças (Papadakis & Targan, 1999). Um fato que reforça esta hipótese reside no fato de animais "germ-free" não desenvolvem a doença, já que a ausência de microorganismos na mucosa intestinal faria com que o sistema imune não fosse estimulado devido a ausência de antígenos. Dados que corroboram a importância da microbiota intestinal consiste no fato de que em humanos com DII há um aumento nos níveis de anticorpos contra as bactérias intestinais (Hyun & Mayer, 2006).

O mecanismo pelo qual as bactérias podem levar a iniciação e ou perpetuação do processo inflamatório intestinal está relacionado principalmente com o aumento da permeabilidade deste local (Chichlowski & Hale, 2008) e desencadeamento da resposta imune.

Vários microorganismos estão relacionados como potenciais agentes etiológicos para as doenças inflamatórias intestinais, como por exemplo, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus*, *Saccharomyces cerevisiae* (Lakatos *et al.*, 2006).

Por outro lado, existem as bactérias benéficas, como por exemplo, a *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii spp. bulgaricus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus salivarius spp.* e *Thermophilus*.

Um estudo realizado utilizando um produto contendo todas essas bactérias benéficas como probióticos, demonstrou que elas podem normalizar a função fisiológica e a integridade da barreira, reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a integridade das *tight junctions* entre as células epiteliais (Madsen *et al.*, 2001).

Em adição, algumas bactérias são produtoras de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta, considerados como uma importante fonte de energia para as células epiteliais colônicas, além de ter efeito imunomodulador e antiinflamatório (Chichlowski & Hale, 2008).

O balanço entre as bactérias benéficas e as espécies patogênicas determina a homeostase intestinal e esse balanço pode ser manipulado por antibióticos, probióticos e prebióticos usados para o tratamento e para a prevenção das recidivas das doenças inflamatórias intestinais (Sartor, 2008).

### **3.1.7. Alterações na permeabilidade da mucosa**

O epitélio intestinal consiste na maior e mais importante barreira do organismo com o ambiente externo. A principal função deste epitélio é oferecer ao organismo uma barreira eficaz contra toxinas, antígenos e bactérias, bem como macromoléculas nocivas e outros microorganismos, ao mesmo tempo em que deve ser permeável aos nutrientes, eletrólitos e água (Groschwitz & Hogan, 2009). A função de barreira seletiva é mantida pela formação de complexos que ligam uma célula a outra através de desmossomos, junções de aderência e *tight junctions*. A integridade do epitélio intestinal é essencial para o perfeito funcionamento do trato gastrintestinal (Chichlowski & Hale, 2008). Alterações patológicas no intestino podem permitir a abertura destes complexos, especialmente das *tight junctions* e permitir a passagem de grandes antígenos (Snoeck *et al.*, 2005).

É amplamente descrito na literatura que pacientes com DII possuem um aumento na permeabilidade intestinal, que é consequência da ulceração da mucosa e de apoptose, o que acarreta em uma diminuição na função de barreira deste epitélio (Edelblum &

Turner, 2009). A disfunção da barreira epitelial e a inflamação são fatores que contribuem com a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, permitindo maior exposição aos antígenos com conseqüente ativação do sistema imune (Hyun & Mayer, 2006) e das citocinas pró-inflamatórias, sendo que estas por sua vez, são conhecidas por induzir a disfunção da barreira epitelial, especialmente por desregularem as *tight junctions*, como é o caso do fator de necrose tumoral (Turner, 2006). Esse aumento na permeabilidade do epitélio intestinal pode ser o fator etiológico mais importante no desenvolvimento, progressão e recidiva destas doenças (Secundulfo *et al.*, 2001).

### **3.2. Sistema Imune Intestinal**

O sistema imune intestinal é considerado o maior e mais complexo do organismo, por estar constantemente exposto ao maior número de antígenos e por ser capaz de distinguir claramente entre agentes não-nocivos e nocivos. A resposta imune intestinal protege o organismo da entrada de agentes patogênicos, sendo essencial para a manutenção da fisiologia e prevenção de infecções. Por outro lado, quando a imunidade reage contra o material não-patogênico, como antígenos da dieta ou bactérias não-patogênicas, podem ocorrer distúrbios inflamatórios como o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais (Mowat, 2003).

Devido essa exposição constante e a capacidade de determinar o que é ou não nocivo, a mucosa intestinal dispõem de um sistema de defesa especializado, que é dividido em imune e não imune (Plevy, 2002).

No sistema de defesa não-imune, a especialização do próprio epitélio intestinal funciona como uma barreira e sua formação, os tipos de transporte que por ele ocorre, seja por endocitose (via transcelular) ou intercelulares (via paracelular), além dos complexos que ligam uma célula a outra, reforçam o sistema de defesa, barrando a entrada de toxinas, antígenos e bactérias. Outros componentes também auxiliam na manutenção da integridade da barreira intestinal, como o glicocálix e as defensinas. O glicocálix consiste de uma barreira formada de ácido mucopolissacarídeo e glicoproteínas

que recobre toda a superfície intestinal. Já as defensinas são moléculas com capacidade de defesa, produzidas pelas células de Paneth, que se dirigem contra diferentes tipos de microorganismos (Pardo, 2006).

O denominado sistema imune intestinal é um importante mecanismo de defesa imunológico constituído por distintas células e moléculas, cuja função é evitar a entrada de agentes estranhos, sendo que a resposta desencadeada pelo sistema imune intestinal pode ser do tipo inata ou adquirida (Plevy, 2002).

Os componentes celulares da imunidade inata compreendem as células fagocíticas, como os neutrófilos, macrófagos e células natural killer. Já os componentes celulares da resposta imune adquirida ou específica são os linfócitos T, que são estimulados por exposição a um antígeno específico (Pardo, 2006). As citocinas produzidas pelos linfócitos T, em resposta a uma infecção, organizam e direcionam a resposta imune, que além de erradicar o agente infeccioso, controlam as células de memória prevenindo doenças em caso de re-exposição ao mesmo agente infeccioso (Mayer, 2010).

Disfunções do sistema imune intestinal têm sido relatadas como o principal mecanismo no desenvolvimento da inflamação intestinal. Durante a fase aguda da doença, é observada a presença de infiltrado de células inflamatórias contendo mastócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Além disso, o dano da mucosa epitelial tem sido relacionado com altas concentrações de CD4+ e CD8+ citotóxico de células T (Neuman, 2007).

Pacientes que apresentam alteração na imunidade inata tem maior incidência de DII. Porém, o sistema imune adquirido, especialmente linfócitos T, tem sido mais fortemente relacionado à patogênese dessas doenças (Mayer, 2010).

Sabe-se, que os mecanismos imunes envolvidos na iniciação e perpetuação da RCU e da DC são distintos. Na DC os níveis de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), de interéferon (INF- $\gamma$ ), interleucinas (IL) IL-12 e IL-1 estão aumentados, enquanto na RCU é observado um aumento na secreção de IL-5, IL-14, IL-10 e IL-13, sendo maior o

desequilíbrio da homeostasia no sistema imune na DC do que na RCU (Šventoraitytė *et al.*, 2008).

Bouma e Strober (2003) demonstram através de diferentes modelos experimentais e estudos em humanos, que a doença de Crohn está mais fortemente relacionada com linfócito Th1 e a retocolite ulcerativa com Th2, isso levando em consideração as diferentes citocinas que predominam em cada doença.

Outro mecanismo da resposta imune envolvido na patogênese da doença inflamatória intestinal é a atividade das metaloproteinases, que estão relacionadas com a ativação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras proteínas que regulam vários processos inflamatórios e da imunidade (Parks *et al.*, 2004). Atualmente se reconhece que as metaloproteinases apresentam papel crítico na resposta inflamatória, visto que influenciam a função e a migração de células inflamatórias, ulceração da mucosa, assim como a deposição e degradação da matrix extracelular (Medina & Radomski, 2006).

O sistema imune mucoso intestinal é muito bem coordenado para evitar a entrada de patógenos e agentes nocivos e não reagir frente às bactérias comensais e antígenos provenientes da dieta, fenômeno denominado de tolerância oral (Mowat, 2003). Sabe-se que a perda da tolerância oral e o desenvolvimento de resposta imune contra as bactérias não patogênicas são os pontos chave para o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, porém o motivo pelo qual isso ocorre ainda permanece desconhecido.

### **3.3. Fatores Genéticos**

Existem evidências que indicam que o fator genético está intimamente relacionado com o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais, especialmente com a DC. Dentre estas podemos citar a ocorrência da doença em alguns grupos étnicos e em pessoas com grau de parentesco (Cavanaugh & Pavli, 1997). Especialmente para a DC, foi observado que em gêmeos idênticos, em mais de 58% de casos, ambos

desenvolveram a doença, sendo que nos casos de retocolite ulcerativa esta relação está em um range de 6-17% (Bouma & Strober, 2003).

Atualmente, o gene NOD2 (domínio de oligomerização de nucleotídeo) também denominado CARD15 (domínio 15 de recrutamento de ativação de caspase) é descrito como o gene relacionado com o desenvolvimento da DII, especialmente DC (Heliö *et al.*, 2003).

Existe mais de 60 variações do gene NOD2/CARD15 com três variantes principais R702W, G908R e 1007fs. A função exata desse gene ainda não é totalmente conhecida, porém sabe-se que ele está relacionado com o reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de membrana de bactérias Gram negativas e subsequente ativação do NF-κB (Ogura *et al.*, 2001). Heliö *et al.*, (2003) descrevem que a variação 1007fs é a mais observada em pacientes com DC e está relacionada com a deficiência em induzir a ativação do NF-κB mediada pelo LPS, o que aumenta o risco de DC na região do íleo. Esse risco é 17.1 vezes maior em pessoas que apresentam essa mutação e isto tem sido relacionado ao fato de que o NOD2, assim como os receptores do tipo "toll-like" (TLRs) são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, com consequente ativação da imunidade inata, induzindo portanto a expressão da resposta imune de vários genes e a ativação de citocinas inflamatórias (Ishirara *et al.*, 2009).

É possível que o gene NOD2 e os TLRs atuem sinergicamente participando do reconhecimento de bactérias intestinais e na ativação da resposta da imunidade inata. Assim sendo, uma diminuição na ativação do NF-κB, devido a mutação do NOD2 pode resultar em um desbalanço da homeostase, com o descontrole das bactérias patogênicas intestinais, sendo necessária outra via de ativação do sistema imune, ocasionando um aumento na produção de outras citocinas pró-inflamatórias, o que pode culminar com o desenvolvimento da DC (Ishirara *et al.*, 2009).

Além disso, o polimorfismo de outro gene, o OCTN1/2 (transportador de cátion orgânico) também conhecido como SLC22A4/5, localizado no *locus* IBD5, também tem sido associado com a ocorrência de DC (Peltekova *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2006; Vind *et al.*, 2008; Ishihara *et al.*, 2009). Tem sido sugerido que sua mutação afeta a

capacidade de transporte de xenobióticos e aminoácidos através das membranas celulares (Peltekova *et al.*, 2004).

Outro recente gene também associado principalmente a DC é o NLRP3 da família de receptores do tipo Nod (Ishihara *et al.*, 2009), visto que sua expressão está significativamente maior em animais submetidos ao modelo de colite induzida por TNBS, tanto no modelo agudo como no crônico, e também em biopsias de pacientes com DC (Villani *et al.*, 2009). Sua função também parece estar relacionada com o reconhecimento de microorganismos patogênicos e ao desencadeamento da resposta imune (Ishihara *et al.*, 2009).

O estudo do fator genético na DII é um importante passo para o entendimento dessa complexa doença e a associação deste com a compreensão das alterações do sistema imune intestinal são os pontos críticos para o entendimento de sua cronicidade e patofisiologia, bem como uma das estratégias para o desenvolvimento de novos medicamentos.

### **3.4. Radicais Livres**

Outro fator etiológico que tem sido alvo para a busca de novos tratamentos para as doenças inflamatórias intestinais são os radicais livres. O estresse oxidativo é um potencial fator etiológico de ambas as doenças, pois os efeitos nocivos das moléculas reativas de oxigênio (EROS) ou nitrogênio (ERN) têm sido amplamente observados em processos inflamatórios.

Espécies reativas de oxigênio, formadas naturalmente por produto do metabolismo do oxigênio, são moléculas altamente reativas, devido à presença de um elétron desemparelhado, porém essas moléculas são eliminadas por sistemas de defesa antioxidantes. O desbalanço entre a produção de radicais livres e sua remoção por agentes antioxidantes é denominado de estresse oxidativo (Rezaie *et al.*, 2007).

Os principais radicais livres observados nas doenças inflamatórias intestinais são: o óxido nítrico (NO), o superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de nitrito ( $ONOO_2$ ), o peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o hipoclorito ( $OCl_2$ ) (McKenzie *et al.*, 1996), sendo os neutrófilos na RCU e os monócitos na DC, a principal fonte para a produção destes radicais livres (Karp & Koch *et al.*, 2006), principalmente depois que a doença já está instalada. Estudos indicam que os radicais livres podem apresentar atividade imunomoduladora, como por exemplo o  $O_2^-$  tem sido relatado como mediador da infiltração e acúmulo de neutrófilos no local da inflamação, além de estar envolvido na mobilização do ácido araquidônico. O  $H_2O_2$  parece estar relacionado com a quimioatração de neutrófilos, rolamento de leucócitos, ativação de linfócitos T, indução da angiogênese e na mobilização do ácido araquidônico (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana e a conseqüente morte celular. Também os radicais livres podem reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da célula. Finalmente, quando os ácidos nucléicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese proteica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento de processos do tipo tumoral (Roessner *et al.*, 2008). Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com retocolite ulcerativa (Gitnick 1996).

As doenças inflamatórias intestinais são caracterizadas pela presença de neutrófilos e macrófagos, que quando ativados liberam radicais livres, estes causam destruição de mucina o que permite a entrada de bactérias na lamina própria intestinal. Esse fato promove a migração de mais células fagocíticas e conseqüentemente a liberação de mais moléculas reativas de oxigênio, além da liberação de toxinas, que juntos causam a degradação da colagenase e do ácido hialurônico. A degradação destas enzimas somada com a peroxidação lipídica, causada pelos radicais livres, atuam como os principais responsáveis pelo desenvolvimento da ulceração da mucosa intestinal (Dagli *et al.*, 1997).



De fato, é incontestável a forte relação existente entre o aumento nos níveis de radicais livres na DII, seja esta experimental ou em humanos (Kruidenier & Verspaget, 2002). Em adição, estudos sugerem que o dano intestinal nestas doenças está relacionado com o aumento da produção de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes endógenas (Koutroubakis *et al.*, 2004). Wendland *et al.*, (2001) observaram uma correlação entre a severidade das doenças inflamatórias intestinais e o estresse oxidativo, enquanto Lih-Brody *et al.*, (1996) comprovaram a existência de alterações nos níveis oxidativos de biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com esta enfermidade.

### **3.4.1. Antioxidantes**

Com base no exposto acima, fica fácil observar que a produção excessiva ou o descontrole na regulação dos radicais livres está relacionado com doenças inflamatórias. Portanto, é essencial que as células e os tecidos possuam um sistema de defesa para controlar os níveis de radicais livres e evitar esses processos inflamatórios. Para isso as células dispõem de um sistema de defesa antioxidante que pode ser classificado como enzimático ou não-enzimático (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos estão incluídos os compostos da dieta que são encontrados em frutas, vegetais e extratos de plantas, alguns minerais como zinco, vitamina E, C e os flavonóides. Adicionalmente, o organismo humano em especial o intestino, produz ou já contém uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos dentre os quais podemos citar a glutatona, a metalotioneína, o ácido úrico e algumas proteínas do plasma como o  $\alpha$ -tocoferol, a bilirrubina e o ubiquinol (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O sistema de defesa enzimático está presente nas células de mamíferos e consiste no mais importante componente de defesa contra radicais livres. Entre as principais enzimas deste sistema estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPO) (Kruidenier & Verspaget, 2002).

Em condições fisiológicas a atividade destas enzimas antioxidantes é precisamente balanceada para manter um baixo e controlado nível de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Qualquer desbalanço ou uma resposta ineficiente de antioxidantes endógenos na mucosa de pacientes com DII, podem contribuir para a patogênese e a perpetuação do processo inflamatório (Kruidenier *et al.*, 2003). De fato, esse mesmo estudo demonstra que quantificações em mucosa de pacientes com DC e RCU apresentaram um aumento na atividade de CAT e GPO e uma redução na concentração de metalotioneína. Buffintom & Doe (1995) também demonstraram uma redução nos níveis de urato, glutatona reduzida e total e ubiquinol-10 em pacientes com DII.

Com base no exposto, a inibição ou neutralização dos radicais livres, juntamente com a ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não enzimáticos, pode ser benéfico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (Nielsen & Rask-Madsen, 1996), sendo esta uma importante abordagem para a pesquisa de novos fármacos.

#### **4. Principais tratamentos farmacológicos disponíveis**

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais, inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, os glicocorticóides, os imunossupressores, imunomoduladores (Yamamoto-Furusho, 2007) e a terapia biológica (Morrison *et al.*, 2009). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura da DII, sendo que os fármacos disponíveis ou possuem sérios efeitos colaterais, como os corticosteróides, e/ou são de alto custo, como por exemplo, o infliximabe, aspectos que limitam imensamente sua utilização, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes.

No Brasil, os medicamentos mais utilizados no tratamento destas doenças são os aminossalicilatos e os glicocorticóides, e menos frequentemente, os imunomoduladores ou a terapia biológica (Dewulf 2005; Biondo-Simões *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2002).

Os aminossalicilatos compreendem a classe dos derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), que possuem como representantes principais a sulfassalazina, balsalazina, olsalazina e mesalazina. Esses fármacos consistem na associação de sulfapiridina com o ácido 5-aminosalicílico unidos por uma ligação do tipo azo.

A sulfassalazina é o fármaco de primeira escolha nos casos leves ou moderados de retocolite ulcerativa, na prevenção da ocorrência de recidiva (Morrison *et al.*, 2009) e nos casos leves de DC (Navarro & Hanauer, 2003). O seu mecanismo de ação está relacionado à atividade antiinflamatória, promovida pela inibição da síntese de prostaglandinas, bem como à sua propriedade antioxidante (Peppercorn, 1994).

Apesar da sulfassalazina ser amplamente utilizada para o tratamento da retocolite ulcerativa, seu uso é limitado devido ao grande número de efeitos colaterais que apresenta. Estes efeitos compreendem desde dores de cabeça, náuseas e anorexia, os quais estão relacionados aos níveis séricos de sulfapiridina, até dispepsia, reações alérgicas, febre, hemólise, neutropenia e anemia (Ransford & Langman, 2002), sendo que grande parte destes efeitos podem ser revertidos com a diminuição da dose de sulfassalazina, o que também diminui sua eficácia. Existe também uma variedade de reações de hipersensibilidade, que incluem hepatite, pancreatite, pneumonia, pericardites e neuropatia periférica que acarretam na descontinuação do uso deste fármaco (Peppercorn, 1994). Em adição, efeitos hepato- e nefrotóxico (Linares *et al.*, 2009) e de promoção de infertilidade masculina (Alonso *et al.*, 2009) estão associados ao uso deste fármaco.

Os glicocorticóides ou corticosteróides são fármacos com efeito antiinflamatório utilizados no tratamento dos casos severos de retocolite ulcerativa e nos casos moderados e severos de doença de Crohn (Navarro & Hanauer, 2003), sendo a prednisolona e a prednisona os fármacos mais utilizados desta classe. O mecanismo geral de ação destes fármacos consiste na ligação da molécula do esteróides com os receptores intracelulares que controlam a transcrição gênica. O complexo receptor-esteróide promove a formação de dímeros que migram para o núcleo da célula e ligam-se ao DNA, modificando a transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas,

como por exemplo, a lipocortina-1, e inibindo a síntese de outras, como da AP-1 e do NFkB (Marx, 1995). Devido a esse mecanismo, os glicocorticóides afetam a função de várias células envolvidas no processo inflamatório, como a expressão de várias citocinas, quimiocinas, cininas e seus respectivos receptores, diminuição das moléculas de adesão, do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e da ciclooxigenase (COX-2) (Rogler, 2010). Sua atividade antiinflamatória se caracteriza pela inibição dos primeiros eventos da inflamação, como a migração de mediadores inflamatórios, vasodilatação, permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos (Andus & Targan, 1994). Estes fármacos ainda agem diminuindo o recrutamento de macrófagos para a área inflamada, inibindo a produção de IL-1 por monócitos, de IL-2 e TNF- $\alpha$  por linfócitos, a fosfolipase A2 e as prostaglandinas e leucotrienos (Schimmer & Parker, 1996).

Devido ao fato dos receptores para os glicocorticóides estarem presentes em praticamente todos os tecidos, o seu uso prolongado e em altas doses, posologia necessária no tratamento da DII, acarreta no desenvolvimento de graves efeitos colaterais, que são decorrentes principalmente da supressão do eixo HPA (Rogler, 2010). Dentre os principais efeitos colaterais descritos podemos observar o desbalanço eletrolítico e de fluidos corpóreos, distúrbios ácido-base, anormalidades metabólicas, alterações nos sistemas hepático, cardiovascular, mental e músculo-esquelético, hiperglicemia, aumento do risco de diabetes, desenvolvimento de hipertensão arterial e edema, que são conseqüências da retenção de sódio promovida por esses fármacos. Foram relatados também risco de sangramento na parte superior do TGI e desenvolvimento de úlceras pépticas, além de alterações na distribuição da gordura corpórea, susceptibilidade a infecções e estenose hepática (Navarro & Hanauer, 2003). Além dos efeitos colaterais observados, esta classe de medicamentos tem sido insuficiente para um grande número de pacientes, o que reforça a necessidade da busca de uma nova terapêutica mais específica e eficaz (Shanahan, 2002).

A budesonida outro glicocorticóide tem demonstrado atividade na DII, com menos efeitos colaterais, porém tem sido usada sob a forma de enemas, com bons resultados apenas para o tratamento de retocolite distal (Biondo-Simões *et al.*, 2003).

Os imunossupressores como azatioprina e 6-mercaptopurina também têm sido utilizados no tratamento da DII, apresentando efeitos na doença ativa, bem como na manutenção da remissão tanto da DC como da RCU (Rogler, 2010). A mercaptopurina, que é o metabólito ativo, possui ação citotóxica, pois atua como análogo da purina e promove inibição da síntese de DNA. Portanto, as reações imunes mediadas por células e por anticorpos são deprimidas por esses fármacos (Rang *et al.*, 2001). Apesar do importante efeito imunossupressor, essa classe de medicamentos possui como principal efeito colateral a toxicidade da medula óssea, desenvolvimento de leucopenia e trombocitopenia, além de estarem amplamente associados com o desenvolvimento de linfomas (Navarro & Hanauer, 2003).

O metotrexato, outro imunossupressor usado para tratamento da artrite reumatóide, também tem sido introduzido no tratamento da DII. O metotrexato age inibindo a diidrofolato redutase, impedindo a produção de tetraidrofolato, que é necessário para a síntese de DNA, promovendo assim a formação de um DNA defeituoso, o que resulta em apoptose, principalmente das células T. Dentre os efeitos colaterais podemos destacar a ocorrência de mielossupressão, hepato e nefrotoxicidade e fibrose pulmonar (Rogler, 2010).

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

intolerância a essa terapia biológica (Yun & Hanauer, 2009), sem contar o alto custo desses medicamentos, o que inviabiliza o seu uso pela maioria dos pacientes da população brasileira.

Apesar dos derivados do 5-ASA, corticóides, imunomoduladores e da terapia biológica apresentarem benefícios no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, tais fármacos apresentam riscos para os pacientes (Navarro & Hanauer, 2003), não representam a cura definitiva da doença e consistem apenas em tratamentos sintomáticos e paliativos, e são incapazes ainda de manter a remissão do processo inflamatório colônico por longos períodos de tempo (Yamamoto-Furusho, 2007), o que faz necessário a busca por novos produtos com atividade antiinflamatória intestinal e potencialmente úteis para o tratamento, cura e/ou prevenção dessas graves doenças.

## **5. A busca de novos compostos para o tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais**

De acordo com as informações apresentadas, novos compostos com atividade antioxidante representam uma importante estratégia de obtenção de novos fármacos ativos para a DII. De fato, inúmeros estudos demonstram os efeitos benéficos de diferentes compostos com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de colite, incluindo flavonóides como a quercetrina (Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Sánchez de Medina *et al.*, 2002), rutosídeo (Gálvez *et al.*, 1997), silimarina (Cruz *et al.*, 2001), morina (Ocete *et al.*, 1998; Gálvez *et al.*, 2001), diosmina (Crespo *et al.*, 1999) e hesperidina (Crespo *et al.*, 1999), além da vitamina E (Gonzalez *et al.*, 2001) e do tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000).

Os flavonóides constituem um importante grupo de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, amplamente distribuídos na natureza e que manifestam uma importante atividade antioxidante (Cook & Saman, 1995; Formica & Regelson, 1994), além de terem a capacidade de inibir algumas enzimas cuja atividade se encontra aumentada em processos inflamatórios, assim como modular a atividade de células do

sistema imune (Middleton & Kandaswami, 1993). Em definitivo, os flavonóides são capazes de afetar três dos fatores chaves do processo de inflamação intestinal: geração de radicais livres, metabolismo de eicosanóides e o sistema imune intestinal.

Considerando-se a atividade antioxidante e as similaridades químicas com os flavonóides, especialmente quanto ao padrão de substituição de hidroxilas em seus distintos anéis e as atividades farmacológicas relatadas, as cumarinas foram selecionadas para estudo por nosso laboratório como potenciais compostos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

As cumarinas compreendem uma grande classe de compostos fenólicos encontrados principalmente em plantas, mas com ocorrência em fungos e bactérias. Também denominadas de benzopironas, as cumarinas são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo o principal representante a 1,2-benzopirona, denominada simplesmente de cumarina. Estes constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e *p*-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados por diferentes vias (Hoult & Payá, 1996).

Assim como os flavonóides, as cumarinas são extremamente variáveis em sua estrutura, e os diferentes substituintes na molécula básica, podem influenciar a sua atividade biológica. Algumas cumarinas já foram estudadas e demonstraram importantes atividades farmacológicas, como por exemplo, a escoparona que possui descrita atividade imunossupressora, hipolipidêmica, hipotensora e relaxante vascular (Hoult & Payá, 1996). Além disso, é descrito que cumarinas contendo grupos di-hidroxilados em posição orto como a fraxetina (7,8-di-hidróxi-6-metoxi-cumarina), esculetina (6,7-di-hidróxi-cumarina) e 4-metilesculetina (6,7-di-hidróxi-4-metilcumarina) são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro (Kuster & Rocha, 2000). Vários derivados cumarinícos são descritos por sua atividade anticoagulante, antitumoral, antiviral, antiinflamatória e antioxidante, bem como por sua atividade antimicrobiana e de inibição enzimática (Riviero *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Di Stasi *et al.*, (2002, 2004) caracterizou a atividade antiulcerogênica e antiinflamatória da paepalantina, uma isocumarina isolada da espécie *Paepalanthus bromelioides* (Família Euriocaulaceae). Nestes estudos, observou-se uma potente atividade antiulcerogênica, especialmente contra úlceras induzidas por etanol e etanol-ácido clorídrico (Di Stasi *et al.*, 2002), assim como um importante efeito preventivo da colite experimental aguda e crônica induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos (Di Stasi *et al.*, 2004).

Com base no exposto, iniciou-se em nosso laboratório um estudo para avaliar a atividade antioxidante de 14 cumarinas no modelo de peroxidação lipídica induzida por ferro-ácido ascórbico em membranas de cérebro de ratos (tabela 13 do anexo). Esse estudo demonstrou que esculetina e 4-metilesculetina possuem um dos menores valores de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) da peroxidação lipídica, com valores de 36,85 e 16,07µM respectivamente (Witaicenis *et al.*, 2010).

De fato, esculetina e 4-metilesculetina são dois derivados cumarínicos descritos como os compostos com melhor atividade antioxidante (Payá *et al.*, 1992, Sharma *et al.*, 2005), além de possuírem descrita atividade antiinflamatória por inibirem a via da lipooxigenase e ciclooxigenase por um mecanismo não-competitivo (Sekiva *et al.*, 1982). Essas substâncias, especialmente esculetina, possuem várias propriedades farmacológicas descritas, ressaltando a atividade antioxidante por diferentes mecanismos e envolvendo vários radicais livres, conforme demonstrado por diversos estudos.

Esculetina possui a propriedade de diminuir a formação de MDA (malonildialdeído) induzida por *t*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP), eliminar o radical livre DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil) (Lin *et al.*, 2000), proteger o DNA contra o estresse oxidativo (Kaneko *et al.*, 2003), inibir o radical hidroxila e os radicais livres intracelulares promovendo a proteção do DNA contra a ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 2008), inibir a xantina oxidase e os radicais livres (Lin *et al.*, 2008). Além destas atividades, esculetina protege os animais de hepatotoxicidade causada por *t*-BHP, por diminuir a infiltração de neutrófilos e manter os níveis de glutathiona (Lin *et al.*, 2000); inibe a síntese de tromboxano B<sub>2</sub>, de ânion superóxido dependente de neutrófilos (Egan *et al.*, 1990), a agregação plaquetária



(Okada *et al.*, 1995), a atividade das metaloproteinases (Watanabe *et al.*, 1999). Possui ainda efeitos como: imunomodulador em macrófagos e linfócitos murinos *in vitro* e *in vivo* (Leung *et al.*, 2005), inibidor de crescimento (Wang *et al.*, 2002) e indutor de apoptose (Park *et al.*, 2009) de células leucêmicas humanas e de células adiposas (Yang *et al.*, 2006), inibidor da morte de neurônios motores *in vitro* (Barber *et al.*, 2009) e do crescimento de células SAS de câncer oral (Kok *et al.*, 2009), redutor da fibrose subepitelial e dos níveis de TGF- $\beta$ 1 no pulmão (Mabalirajan *et al.*, 2009) e de inibir a expressão de NF- $\kappa$ B e a ativação de proteína-1 (AP-1) (Pan *et al.*, 2003).

4-metilesculetina possui a atividade de inibir a proliferação de tumores subcutâneos e a síntese de ácido hialurônico em camundongos com câncer pancreático (Hajime *et al.*, 2007), promover o relaxamento de músculo liso, efeito este tanto mediado por prostaciclina (Bettini *et al.*, 1985) como por prostaglandina (Bettini *et al.*, 1983).

Com base nas atividades antioxidante e outras descritas, esculetina e 4-metilesculetina foram selecionadas para avaliação da atividade antiinflamatória no modelo de colite experimental. Nosso estudo preliminar avaliou a atividade destes dois derivados cumarínicos em diferentes doses no modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos, nas fases aguda e crônica. Esse estudo demonstrou que essas substâncias, nas doses de 10 e 5mg/Kg, apresentaram atividade antiinflamatória neste modelo experimental e tal atividade está relacionada com a propriedade antioxidante e antiinflamatória destas substâncias (Witaicenis *et al.*, 2010/ anexo).

Esses importantes resultados nos impulsionaram na continuação deste estudo, para comprovar a atividade antiinflamatória destes compostos, para tentar elucidar o mecanismo pelo qual elas estão agindo, além de comparar a eficácia e a potência destes dois derivados cumarínicos, com os dois fármacos de referência mais utilizados na DII em humanos, a sulfassalazina e a prednisolona, enfocando o perfil de respostas farmacológicas destes fármacos no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

## **6. O modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS)**

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

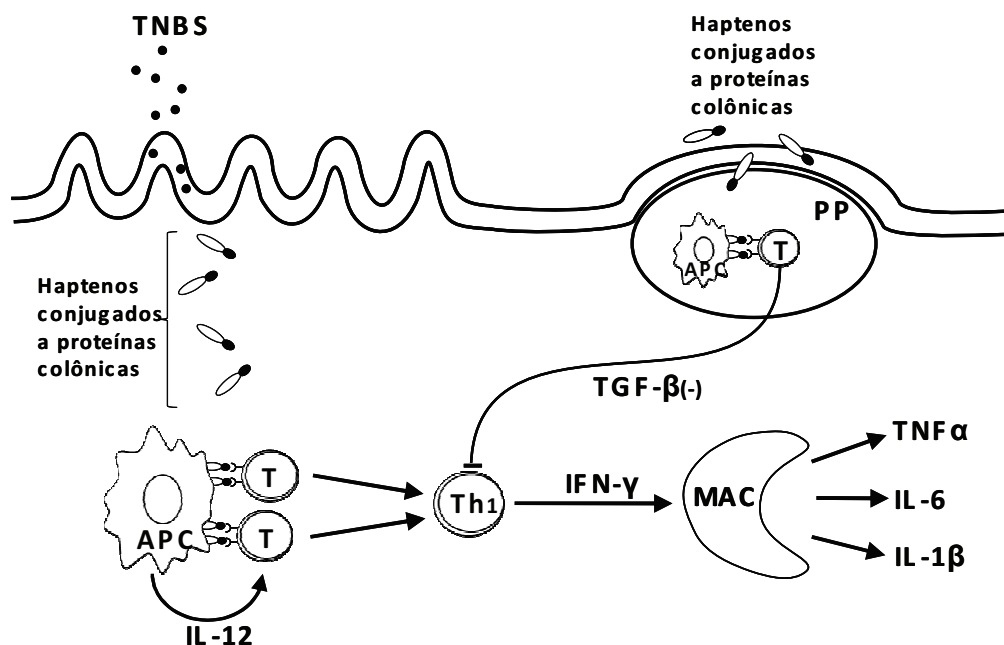
O método se baseia no uso de uma solução de TNBS em etanol 50%, na qual o etanol agiria como um "rompedor de barreira", enquanto que o ácido TNBS, atuaria com um hapteno, que ao associar-se com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais, seria capaz de desencadear uma resposta imunológica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

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

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

Segundo Strober *et al.*, (1998), após ser administrada, a solução de TNBS/etanol é apresentada para as células T pelas células apresentadoras de antígeno da lâmina própria. A presença e o reconhecimento do TNBS promove a secreção de IL-12 e indução da resposta das células Th1, que produz principalmente INF- $\gamma$ , este por sua vez age nos macrófagos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que desencadeiam imediatamente o processo inflamatório (Figura 2). Além destes, vários mediadores inflamatórios estão envolvidos nesta resposta como prostaglandinas E2, tromboxano B2, leucotrieno B4 e C4 e outras interleucinas (Zheng *et al.*, 2000).

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



**Figura 2. Mecanismo de indução da doença inflamatória intestinal pelo TNBS.**

APC = célula apresentadora de antígeno; PP = Placa de Peyser; T = células T; MAC= macrófago. (adaptada de Strober *et al.*, 1998)

Objetivos

Com base no exposto os objetivos do presente trabalho foram:

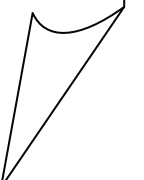
1. Avaliar os efeitos antiinflamatórios intestinais de dois derivados cumarínicos (esculetina e 4-metilesculetina), tendo em vista determinar a potencialidade de uso dos mesmos na prevenção e tratamento das doenças inflamatórias intestinais;

2. Comparar os resultados destes derivados cumarínicos (eficácia e potência) com os efeitos de dois fármacos de referência mais utilizados na DII em humanos, a sulfassalazina e a prednisolona, enfocando o perfil de respostas farmacológicas destes compostos nas fases aguda, crônica e na recidiva da colite induzida por TNBS, visto que para o segundo fármaco estes dados ainda não foram padronizados;

3. Avaliar comparativamente os efeitos destes 4 compostos sobre os parâmetros clínicos, macroscópicos, microscópicos e bioquímicos envolvidos no processo inflamatório colônico, com ênfase nos efeitos de importantes mediadores deste processo;

4. Avaliar o perfil de efeitos destes compostos sobre as metaloproteinases, como um marcador do processo inflamatório, ainda pouco estudado neste modelo experimental.

# *Material e Métodos*



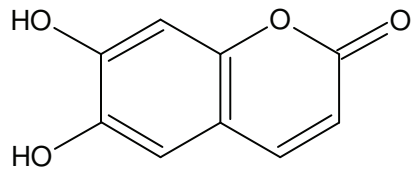
## **1. Animais**

Ratos machos albinos da Cepa Wistar de 180 a 220g de peso, oriundos do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo foram utilizados para os testes de atividade antiinflamatória intestinal. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Unesp, durante pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos ficaram alojados em caixas, separados por grupo, com no máximo 6 animais por caixa e foram alimentados com ração de manutenção PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n. 42/04 – CEEA).

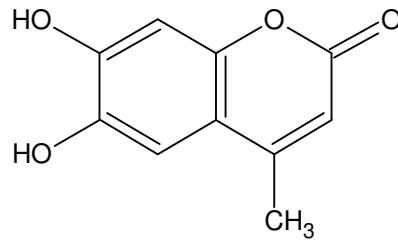
## **2. Substâncias testes e desenho experimental**

Esculetina (6,7-dihidroxi-cumarina), 4-metilesculetina (6,7-dihidroxi-4-metil-cumarina), prednisolona e sulfassalazina, ilustradas na Figura 3, foram obtidas da Sigma, solubilizadas em metilcelulose 1%, preparadas diariamente e usadas neste estudo conforme protocolo experimental descrito abaixo.

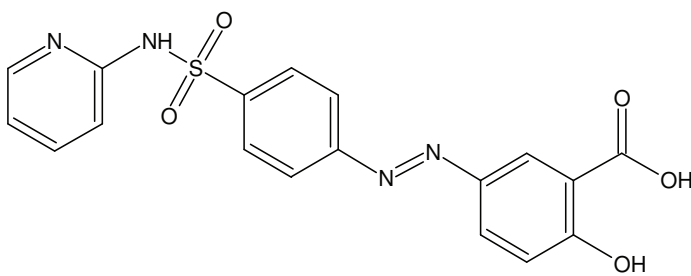
**Figura 3. Estrutura química das substâncias testes.**



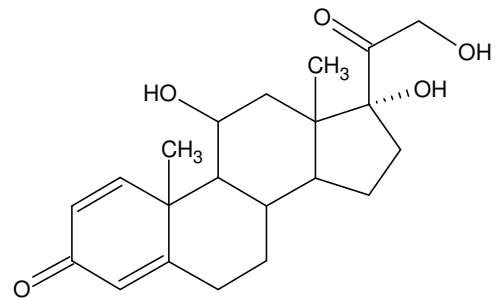
Esculetina



4-Metilesculetina



Sulfassalazina



Prednisolona

**2.1. Avaliação da atividade de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina na fase aguda do processo inflamatório intestinal.**

Na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais:

- A. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento
- B. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento
- C. Grupos com os compostos-testes:
  - C1. Animais tratados com esculetina 5mg/Kg
  - C2. Animais tratados com 4-metilesculetina 5mg/Kg
- D. Grupo com os fármacos:
  - D1. Animais tratados com prednisolona 2mg/Kg
  - D2. Animais tratados com sulfassalazina 50mg/Kg



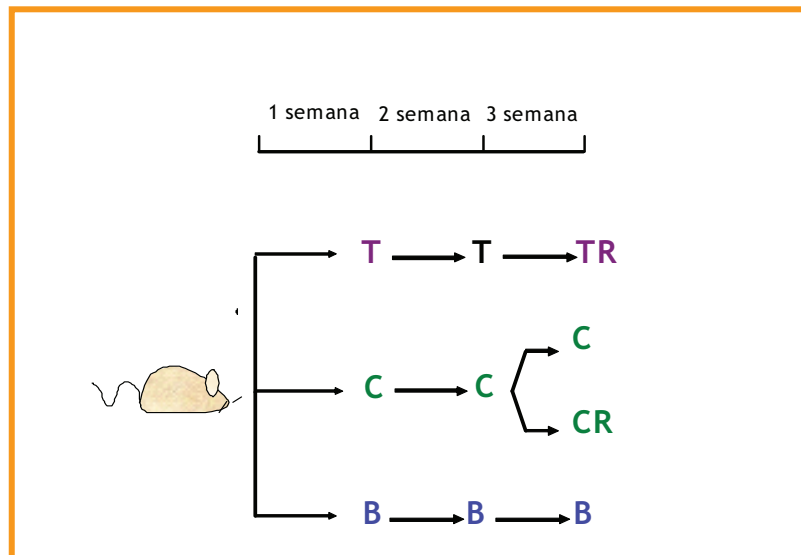
A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.*, (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados em câmara de gás CO<sub>2</sub> para sacrifício de roedores.

Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25ml de uma solução de 10mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foram realizados às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite. Os animais dos grupos controle e branco receberam metilcelulose 1% por via oral. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório.

## 2.2. Avaliação da atividade antiinflamatória de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina na fase crônica com recidiva do processo inflamatório intestinal.

Os compostos foram testados de acordo com o protocolo experimental crônico de colite com recidiva conforme esquema abaixo (Figura 4).



**Figura 4.** Desenho experimental. **B** (grupo branco; ratos não colíticos); **C** (grupo controle; ratos colíticos); **CR** (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que receberão uma segunda administração de TNBS); **T** (grupo tratado; ratos colíticos tratados com esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona ou sulfassalazina); **TR** (grupo tratado e com recidiva; ratos colíticos que receberão uma segunda administração de TNBS).

Na fase crônica com recidiva, os tratamentos (todos por via oral) foram iniciados 2 horas após a primeira administração de TNBS e continuaram até o dia da morte dos animais. Foram avaliados no experimento crônico, um grupo branco (não-colítico), um grupo controle (colítico), 4 grupos colíticos tratados com esculetina (5mg/kg), 4-metilesculetina (5mg/kg), prednisolona (2mg/Kg) ou sulfassalazina (50mg/Kg). Seis animais de cada grupo colítico e seis do grupo branco foram mortos após 7, 14 e 21 dias a partir da primeira indução da colite, enquanto todos os animais do grupo colítico sem recidiva foram mortos apenas após 21 dias. A segunda administração de TNBS (recidiva) foi realizada no 14º dia após a primeira administração, nos animais que foram sacrificados no 21º dia, excetuando-se o grupo branco e o grupo controle sem recidiva.

### 3. Avaliação do processo inflamatório intestinal

Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons extraídos e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos.

#### 3.1. Avaliação macroscópica

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. Na análise macroscópica foram avaliados o peso e o comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, 1995.

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

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

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em 7 fragmentos longitudinais, seis deles foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para determinação de proteínas e a atividade da

fosfatase alcalina, metaloproteinase, mieloperoxidase, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e conteúdo de malonildialdeído colônico, enquanto um fragmento foi processado para determinação dos níveis de glutathiona total.

### **3.2. Avaliação microscópica de amostras de cólon**

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, amostras de tecido (0,5mm) adjacentes à área de lesão foram coletadas para processamento histológico. Essas amostras foram fixadas em formalina 4% por 24 horas, lavadas em água corrente por igual período, desidratadas em série alcoólica etílica crescente, diafanizadas em xilol, e posteriormente incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609) e preparadas para a microtomia. Os cortes, com 6 micrômetros de espessura, foram desparafinizados e reidratados utilizando série alcoólica etílica decrescente.

A seguir, as amostras foram submetidas à coloração em eosina-hematoxilina para a análise morfológica das lesões e determinação do índice de lesão microscópica de acordo com método descrito por Stucchi *et al.*, (2000). As lâminas histológicas foram observadas no microscópio óptico e microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.3 e 3.40, no aumento 20X.

**Tabela 2.** Critério de avaliação microscópico da lesão colônica.

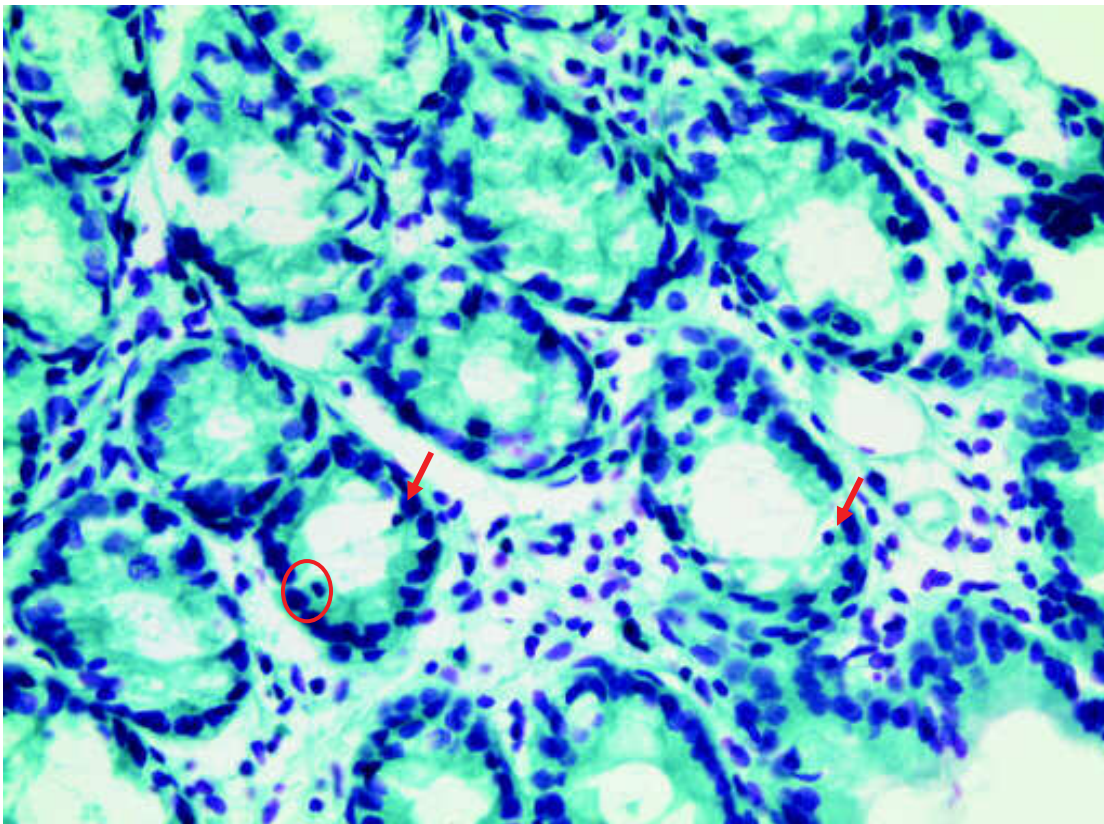
<b>Local do Dano</b>	<b>Critérios para Avaliação</b>
<b>Mucosa</b>	1. Ulceração: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
<b>Criptas</b>	2. Atividade Mitótica: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 3. Depleção de Muco: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
<b>Lâmina Própria</b>	4. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 5. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 6. Vascularidade: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 7. Infiltrado Mononuclear: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)
<b>Submucosa</b>	8. Infiltrado Granulocítico: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3) 9. Edema: (0) Nenhum; Suave (1); Moderado (2); Severo (3)

Escore Máximo: 27, modificado de Stucchi *et al.*, 2000.

### **3.2.1. Determinação do número de células apoptóticas das criptas**

O número de células epiteliais em apoptose foi determinado de acordo com o método de Feulgen (Feulgen & Rossenbeck, 1924). Amostras de tecido preparadas para o processamento histológico, conforme descrito anteriormente, foram cortadas com 6 micrômetros de espessura, desparafinizadas e reidratadas utilizando série alcoólica etílica decrescente. A seguir, as amostras foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa à 60°C e imersas em solução de HCl 1N também à 60°C, por 15 minutos. Após isto as amostras foram novamente lavadas e deixadas em água corrente por 10 minutos. Após este procedimento as amostras foram cobertas com reativo de Schiff, e foram mantidas em geladeira por 45 minutos. Decorrido este período, as amostras foram lavadas com água corrente durante 10 minutos. Para auxiliar na análise, as amostras foram contracoradas com reativo verde luz 1%, durante 5 minutos. O material histológico foi novamente lavado e desidratado utilizando série alcoólica etílica crescente. A análise do número de células epiteliais em apoptose foi realizada em microscópio óptico no aumento de 40X, onde foram contados 10 campos de cada corte histológico de

todos os animais experimentais, com auxílio de objetiva com gradícula. Foram contados em cada campo o número total de criptas e o número de células epiteliais em apoptose. Foram consideradas células apoptóticas aquelas que apresentavam cromatina condensada, ou seja, com núcleos picnóticos e localizavam-se próximas a base da cripta, conforme destacado na figura 5. Os resultados foram expressos em média por grupo do número total de células apoptóticas dividido pelo número total de criptas.



**Figura 5:** Fotomicrografia da mucosa de cólon de rato do grupo controle do modelo experimental de colite de fase aguda. Corte corado de acordo com a técnica de Feulgen para determinação da apoptose. As células apoptóticas estão indicadas em destaque. Corte microfotografado com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 40X.

### **3.3. Determinações bioquímicas**

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

#### **A. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz *et al.*, (1984) e os resultados expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C. A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

#### **B. Determinação do conteúdo de glutatona total**

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

### **C. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina**

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por Smith *et al.*, (1985) e Bessey *et al.*, (1946), respectivamente.

### **D. Determinação do conteúdo de malonildialdeído (MDA) colônico**

A determinação do conteúdo de malonildialdeído colônico foi realizada de acordo com o método descrito por Zingarelli *et al.*, (1999), seguindo algumas modificações.

As amostras de tecido foram homogenizadas em solução de KCl 1.15% na proporção de 1:5. O homogenato foi centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Foram utilizados 400µl do sobrenadante, que foi adicionado em tubo de vidro com tampa de rosca, onde também foram adicionados 200 µl de lauril sulfato de sódio 8.1%, 1500 µl de ácido acético 20%, pH 3.5, 1500 µl de ácido tiobarbitúrico 0.8% diluído em ácido acético e 400 µl de água destilada. Para curva padrão, foram utilizados 100 µl de diferentes concentrações de malonildialdeído, 700µl de água destilada e os demais reagentes.

Os frascos contendo essa mistura foram colocados em banho-maria a 95°C durante uma hora. Após isso as amostras foram transferidas para ependorfs e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. 200 µl do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532nm. O valor da concentração de MDA foi multiplicado por 50 e os resultados foram expressos em nanomoles/grama de tecido.



### **E. Determinação das metaloproteinases**

A atividade gelatinolítica das metaloproteinases (MMPs) -2 e -9 presentes no cólon de rato dos diferentes grupos experimentais foi analisada por zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina. Para a extração das enzimas, uma proporção de 30mg de tecido para cada 0,1ml de uma solução de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7.5, contendo 0,25% de Triton X-100 e 10mM CaCl<sub>2</sub> foi triturada em um homogeneizador do tipo Poltron por três ciclos de 5 segundos cada um. O homogeneizado foi incubado com agitação por 2 horas a 4° C para aumentar a eficiência da extração. Após este período, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 RPM por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método descrito por Bradford (1976). Amostras da extração (20µg de proteínas) foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0.1% de gelatina. Depois da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2.5% de Triton X-100 para remover o dodecil sulfato de sódio (SDS), seguido por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo 5 mM CaCl<sub>2</sub> e 1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Posteriormente, os géis foram incubados por 20-24 horas na mesma solução a 37° C, sob agitação. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular das enzimas comerciais utilizadas na eletroforese. Análises semiquantitativas por densitometria (densidade ótica integrada - IOD) das bandas obtidas na zimografia foram realizadas utilizando-se Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech). Os resultados foram expressos em IOD.

### **F. Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram determinados a partir de amostras de cólon coletadas, pesadas e homogeneizadas em solução de PBS (tampão fosfato sódico), pH

7.2, na proporção de (1:5) peso/volume a 4°C. Após homogeneização as amostras foram agitadas em banho-maria à 37°C durante 20 minutos e após isso foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer -80°C até a realização da dosagem. Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram determinados por kit de imunoenensaio (ELISA), e os valores obtidos foram expressos em pg/mg de proteína (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002).

#### **4. Avaliação da atividade de Esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro***

Para avaliação dos efeitos de esculetina e 4-metilesculetina, sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, foram utilizados três tipos de linhagens celulares: célula tumoral de intestino humano (Caco-2), macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e células de cultivo primário, obtidas de linfócitos de baço de camundongo Balb  $\prime$  c.

A célula tumoral (Caco-2), que é uma linhagem de células de adenocarcinoma humano, e a linhagem celular RAW 264.7 foram obtidas no Serviço de Cultivos Celulares da Universidade de Granada-Espanha. Estas células foram mantidas a 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub> atmosférico e cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado, com L-glutamina (2Mm), penicilina/estreptomicina (50000 U/L), anfotericina B (2,5 mg/L) e 10% de soro fetal bovino inativado (40 minutos, 56°C), essa solução foi denominada DMEN completo.

As células de cultivo primário foram obtidas de linfócitos de camundongos Balb  $\prime$  c segundo protocolo a seguir. Após a morte dos animais, o baço foi removido cuidadosamente para evitar remoção da membrana externa. Em condições estéreis, o órgão foi colocado em uma placa de cultivo de 10 cm com 5 ml de meio DMEM suplementado com 1% da mistura de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Com ajuda de pinças, o baço foi pressionado na placa até ficar transparente e todas as células estarem dissolvidas no meio. Em seguida, esta solução (meio+células) foi homogeneizada com a ajuda de uma seringa com agulha e colocada em um tubo de 15

ml, o qual foi centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm. O precipitado resultante foi ressuspendido em 5 ml de tampão ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,7 mol/L,  $\text{KHCO}_3$  0,12mol/L, etilenediamina-tetracético 9mmol/L) por 30 minutos à 4° C, com o objetivo de lisar os eritrócitos. Após isso, a suspensão, que contém principalmente linfócitos e macrófagos (esplenócitos), foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e em seguida foi adicionado a esse precipitado 5 ml de DMEM completo.

#### **A. Determinação da Secreção de Citocinas Pró-Inflamatórias**

As citocinas analisadas neste teste foram IL-8, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-2, para tanto, esculetina e 4-metilesculetina foram testadas nas concentrações de 1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$ .

Para determinação da secreção de IL-8 foram utilizadas as células do tipo Caco-2. Estas células foram incubadas, por um período de 24 horas, com esculetina ou 4-metilesculetina nas concentrações descritas acima. Após este período as células foram estimuladas com IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) por um período de 20 horas. Decorrido isto, o sobrenadante foi coletado e centrifugado à 7000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em freezer -80° C para determinação dos níveis de IL-8 por Elisa (Biosource International, Nivilles, Belgium). Os resultados foram expressos em concentração de IL-8 (pg/ml).

Para determinação da secreção de IL-1 $\beta$  foram utilizadas células de RAW (1 x 10<sup>5</sup> células). Estas células foram cultivadas em placas de 24 poços e colocadas na presença ou ausência das diferentes concentrações dos derivados cumarinícos, 30 minutos antes de serem estimuladas com LPS (50 ng/ml). Após 36 horas, o sobrenadante foi coletado e mantido a -80°C até o momento da realização do teste. Para determinação dos níveis de IL-1 $\beta$  foi utilizado Kit de Elisa murino (Biosource). Os resultados foram expressos em concentração de IL-1 $\beta$  (pg/ml).

Para determinação da secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 foram utilizados esplenócitos (1,5 milhões de células por ml) cultivados em placas de 24 poços. Uma hora antes de serem

estimuladas com concanavalina A (5µg/ml), as células foram colocadas na presença ou ausência das diferentes concentrações das substâncias em teste. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e mantido a -80° C até o momento da determinação dos níveis de IFN-γ e IL-2 por Kit de Elisa murino (Biosource). Os resultados foram expressos em concentração de IFN-γ e IL-2 (pg/ml).

## **B. Viabilidade Celular**

Para avaliar o potencial tóxico das substâncias em teste, foi realizado o teste de viabilidade sobre os diferentes tipos de células utilizadas no estudo *in vitro*.

A viabilidade das células Caco-2 e RAW 264.7 foi testada pela técnica de coloração com cristal violeta, segundo metodologia descrita por Xaus *et al.*, (2001), com algumas modificações. As células foram coradas e fixadas com cristal violeta (0.2%) em etanol (2%) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após 4 lavagens com PBS, as células foram desprendidas com dodecil sulfato de sódio (SDS 1%) durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, a intensidade da cor foi quantificada por ELISA a 540 nm. As células não viáveis não são capazes de incorporar o corante em suas membranas (Ishiyama *et al.*, 1996). Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

A viabilidade dos esplenócitos foi determinada utilizando o Reagente WST-1 (Roche Diagnostics). Esta técnica consiste em uma determinação colorimétrica da atividade metabólica e da proliferação celular. O sal solúvel (WST-1) em contato com as células, forma a partir da desidrogenase mitocondrial viável, uma coloração. Quanto maior a proliferação, maior a atividade mitocondrial, o que implica em uma maior hidrólise do reativo WST-1, resultando em uma maior coloração, que é detectada a 450nm.

As células derivadas de baço (esplenócitos) foram cultivadas em placas de 24 poços (1,5 x 10<sup>6</sup> célula/poço) em 0,5 ml de células, e foram estimuladas com concanavalina A (Con A) (5µg/ml) durante 48 horas. Transcorrido este tempo foi

adicionado 5µl/poço do reativo WST-1 (Roche) durante 2 horas a 37° C. Em seguida a placa foi agitada por 1 minuto e a intensidade da cor foi quantificada por ELISA a 540 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular dos esplenócitos.

## **5. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Dados descontínuos foram analisados pelo teste  $\chi^2$ . A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

*Resultados*

## 1. Resultados modelo experimental de fase aguda

### 1.1. Avaliação Macroscópica

A administração intracolônica de TNBS resulta em inflamação no epitélio colônico, que pode ser evidenciada após 48 horas com uma necrose na camada mucosa, essa lesão estende-se por 3.8 – 5.8 cm ao longo do cólon, e promove a ocorrência de espessamento e hiperemia na parede intestinal. Esses parâmetros foram analisados e expressos em forma de escore, e os resultados podem ser observados na tabela 3.

Os animais tratados com prednisolona apresentaram o menor escore macroscópico quando comparados com os animais do grupo controle (6 vs. 8 respectivamente, com  $p < 0,05$ ). Os animais tratados com sulfassalazina, 4-metilesculetina e esculetina também apresentaram um escore inferior ao grupo controle (tabela 3), porém nenhuma diferença estatística foi observada.

Analisando a extensão da lesão, o grupo controle apresentou uma extensão média de  $4,63 \pm 0,46$  cm, apesar dos animais tratados com as substâncias testes apresentarem uma extensão de lesão inferior, nenhuma diferença estatística foi observada.

Avaliando-se a relação peso/comprimento colônico (mg/cm), os animais do grupo controle apresentaram uma relação de  $144,65 \pm 14,04$  grupo controle vs.  $80,23 \pm 12,17$  grupo branco (não colítico), com diferença estatística de  $p < 0,01$ , porém nenhum tratamento promoveu alteração neste parâmetro.

Os animais do grupo controle apresentaram 100% de diarreia, enquanto que os animais tratados com esculetina e prednisolona apresentaram uma ocorrência de diarreia de 33,3%. Quanto à incidência de aderência, esta foi observada em 83,3% dos animais do grupo controle, em somente 33,3% dos animais tratados com esculetina, 4-metilesculetina e sulfassalazina, e em nenhum animal tratado com prednisolona (tabela 3).

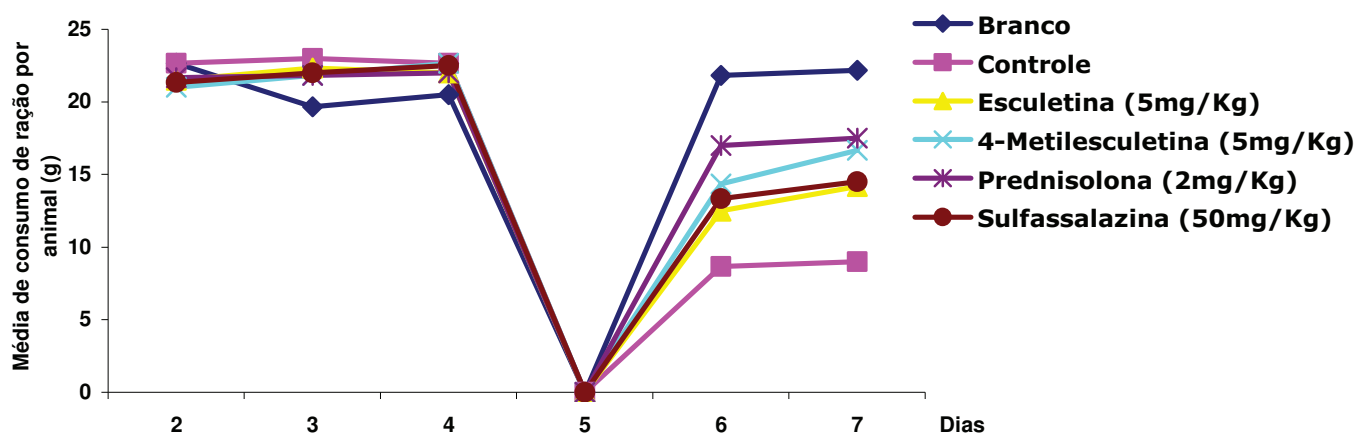
**Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental agudo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

<b>Grupo</b>	<b>Escore microscópico (0-27)<sup>a</sup></b>	<b>Escore macroscópico (0-10)<sup>a</sup></b>	<b>Extensão da lesão (cm)<sup>b</sup></b>	<b>Relação Peso/comprimento (mg/cm)<sup>b</sup></b>	<b>Diarréia (%)<sup>c</sup></b>	<b>Aderência (%)<sup>c</sup></b>
<b>Branco</b>	3,5 (2-7)***	0***	0**	80,23±12,17**	0*	0*
<b>Controle</b>	16,5 (13-22)	8,0(7-10)	4,63±0,46	144,65±14,04	100,00	83,33
<b>Esculetina</b>	13,0 (8-20)	7,5(5-8)	4,02±0,50	130,21±15,58	33,33*	33,33
<b>4-metilesculetina</b>	10,0 (7-14)*	7,0(3-7)	3,80±0,75	138,05±22,17	83,33	33,33
<b>Prednisolona</b>	9,5 (8-16)*	6,0(1-8)*	3,05±0,51	138,98±23,98	33,33*	0*
<b>Sulfassalazina</b>	13,0 (11-14)	6,5(3-8)	3,85±0,53	132,85±23,52	66,66	33,33

<sup>a</sup> Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), <sup>b</sup> extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M., <sup>c</sup> diarréia e aderência foram analisados pelo teste X<sup>2</sup>, onde \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco com p < 0,01 (significância não demonstrada na tabela).

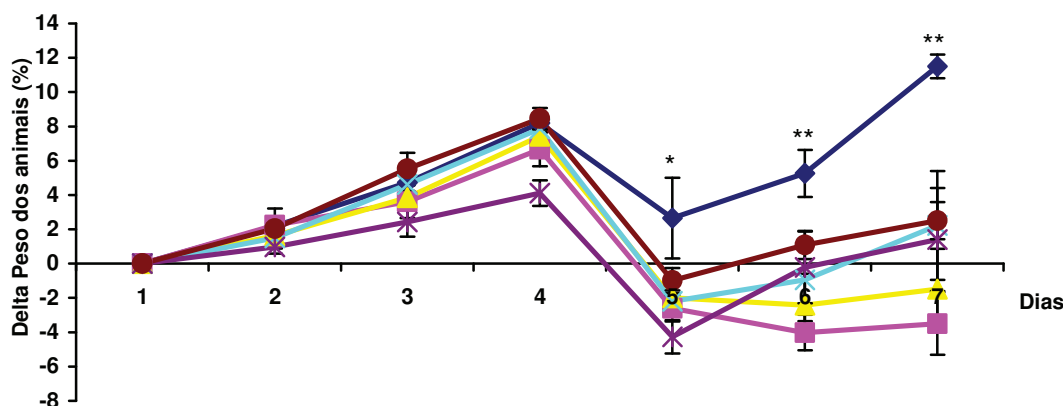


Após a administração do TNBS, o consumo de alimento fica reduzido, sendo que os animais do grupo branco (não colítico) restabelecem normalmente o consumo após o jejum e diferem estatisticamente na quantidade de alimento ingerida quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais tratados com 4-metilesculetina e prednisolona restabeleceram o consumo de alimento mesmo após a indução do processo inflamatório colônico ( $p < 0.05$ , diferença estatística não demonstrada na tabela) (Figura 6).



**Figura 6:** Avaliação do consumo de ração por grupo, dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais.

A redução no consumo de alimento reflete na redução do peso corpóreo, os animais do grupo branco restabelecem o ganho de peso de antes do jejum. Os animais tratados com 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina restabeleceram o ganho de peso corpóreo mesmo após a administração do TNBS (Figura 7).

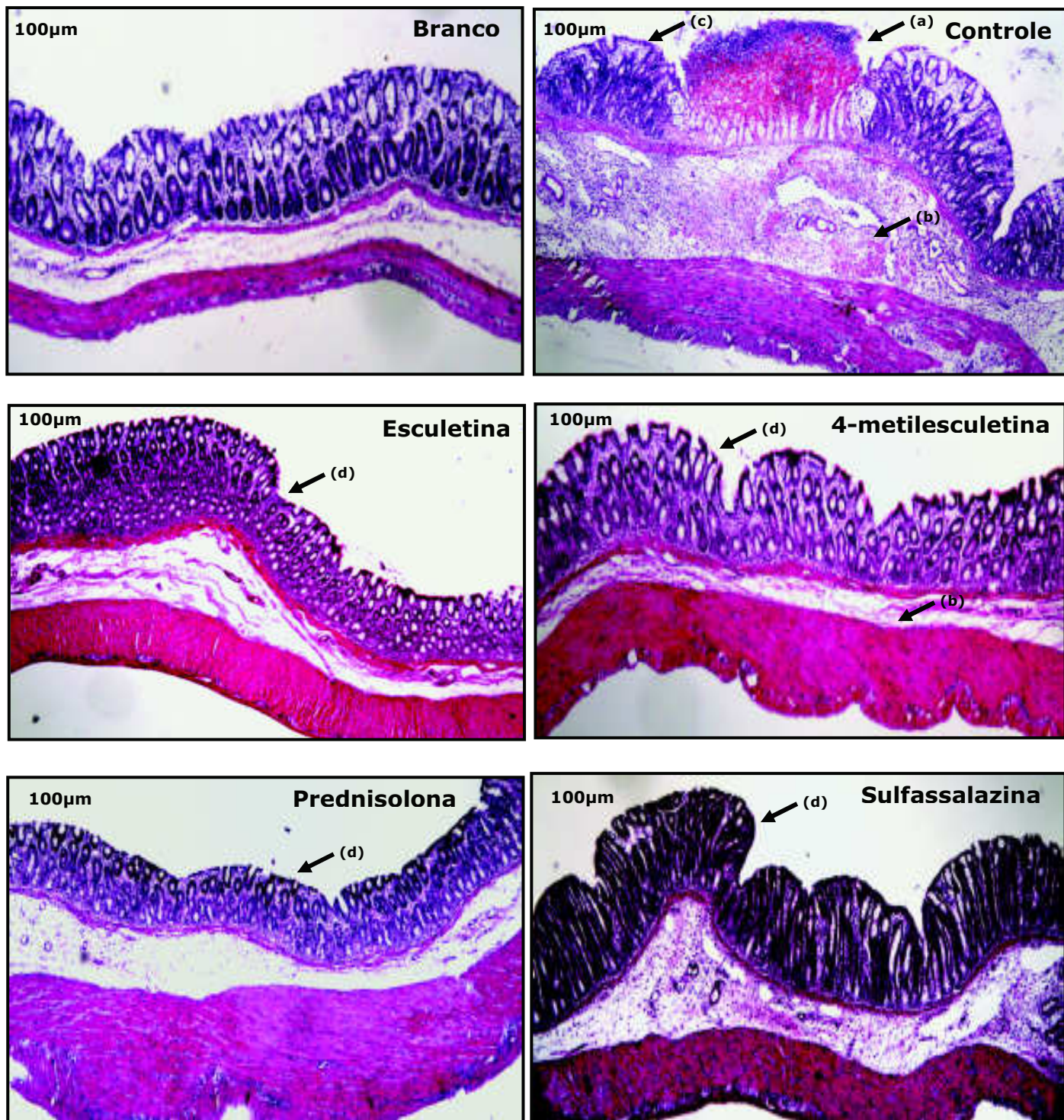


**Figura 7:** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final - peso inicial) X 100/peso inicial)  $\pm$  E.P.M. com \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados com o grupo controle TNBS.

## 1.2. Avaliação microscópica

A análise histológica demonstrou que os animais do grupo controle apresentaram uma ulceração severa ou moderada na camada mucosa, presença de vascularização, depleção moderada de muco, presença de edema (severo a moderado) e presença de infiltrado inflamatório bastante acentuado na lâmina própria (severo) e um pouco menos acentuado na camada submucosa (moderado), sendo este infiltrado tanto do tipo mononuclear como granulocítico, que são características deste tipo de processo inflamatório.

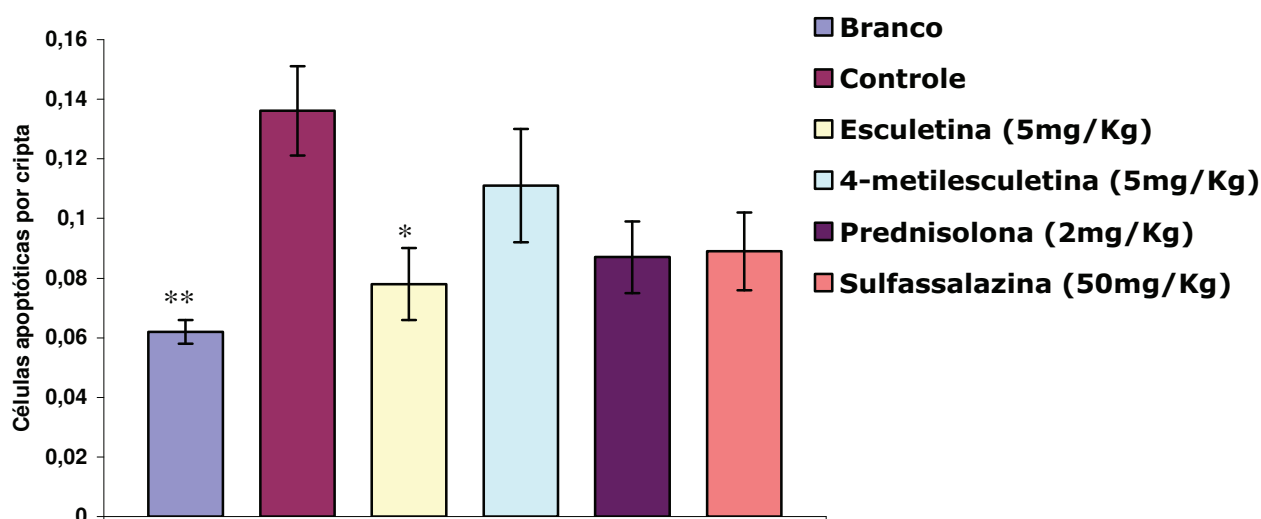
Os animais tratados com esculetina apresentaram um edema moderado e uma menor vascularização na lâmina própria, quando comparados ao grupo controle. Os animais tratados com 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina apresentaram uma ulceração variando de nenhuma à suave, edema suave ou moderado, menor depleção de muco e infiltrado mononuclear e granulocítico na camada submucosa, sendo que 4-metilesculetina também promoveu menor presença de infiltrado na lâmina própria (figura 8). Estes resultados foram avaliados segundo metodologia descrita por Stucchi *et al.*, (2000) e expressos na forma de escore microscópico, sendo que 4-metilesculetina e prednisolona diminuíram significativamente o escore microscópico em relação ao grupo controle e esculetina apresentou resultados semelhantes à sulfassalazina (tabela 3).



**Figura 8:** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais dois dias após a administração de TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 5X. Grupo controle com ulceração severa, presença de edema severo; Grupos tratados esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina com menos edema, menor ulceração e infiltrado na camada submucosa. As setas indicam: (a) ulceração severa, (b) edema e infiltrado de células inflamatórias na camada submucosa, (c) desorganização da citoarquitetura epitelial, (d) restauração da citoarquitetura epitelial.

### 1.2.1. Determinação das células apoptóticas

A determinação do número de células epiteliais em apoptose em relação ao número de criptas demonstrou que os animais do grupo controle apresentaram um maior número de células apoptóticas em relação aos animais do grupo branco. Dos quatro tratamentos avaliados somente esculetina diminuiu o número de células epiteliais em apoptose em relação ao grupo controle (Figura 9).



**Figura 9:** Avaliação do número de células epiteliais em apoptose por cripta de animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média ± E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle.

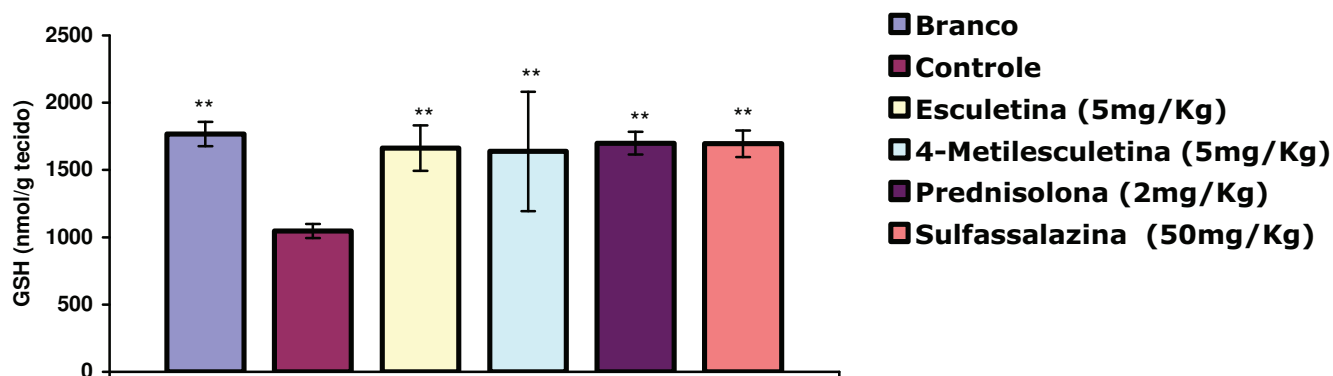
### 1.3. Avaliações Bioquímicas

Bioquimicamente, os mediadores inflamatórios estão em intensa atividade após a administração de TNBS, dados que podem ser observados pela atividade da MPO (Figura 11), fostatase alcalina (Figura 12) e metaloproteinase 9 (Figura 17), além do aumento nos níveis de citocinas como o TNF- $\alpha$  (Figura 14) e a IL-1 $\beta$  (Figura 15), quando comparados os animais do grupo controle e os animais não colíticos (branco). Estes resultados são acompanhados por uma significativa redução no conteúdo de glutathiona colônica (Figura 10) e no aumento do conteúdo de malonildialdeído (MDA) (Figura 13), como consequência do estresse oxidativo ao qual o cólon lesado está submetido.

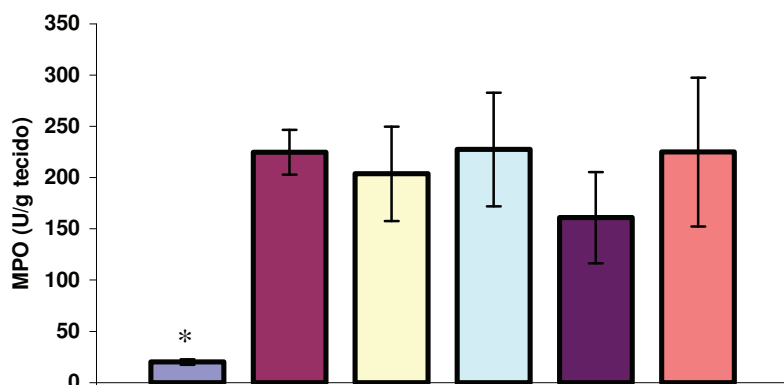
O pré-tratamento dos animais com esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina evitou a depleção nos níveis de glutathiona colônica, quando comparados ao grupo controle (Figura 10). Apesar dos tratamentos promoverem uma manutenção no conteúdo de GSH, nenhuma diferença estatística foi observada nos animais tratados com as substâncias testes ou com os fármacos de referência, em relação ao conteúdo de MDA (Figura 13).

Os animais pré-tratados com 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina promoveram uma redução na atividade da fosfatase alcalina quando comparados ao grupo controle (Figura 12), no entanto, nenhum tratamento foi capaz de diminuir a atividade da enzima mieloperoxidase (Figura 11). Quanto aos níveis de TNF- $\alpha$ , os tratamentos com esculetina e prednisolona reduziram os níveis desta citocina em 45% (Figura 14), no entanto, nenhum tratamento promoveu diminuição significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 15).

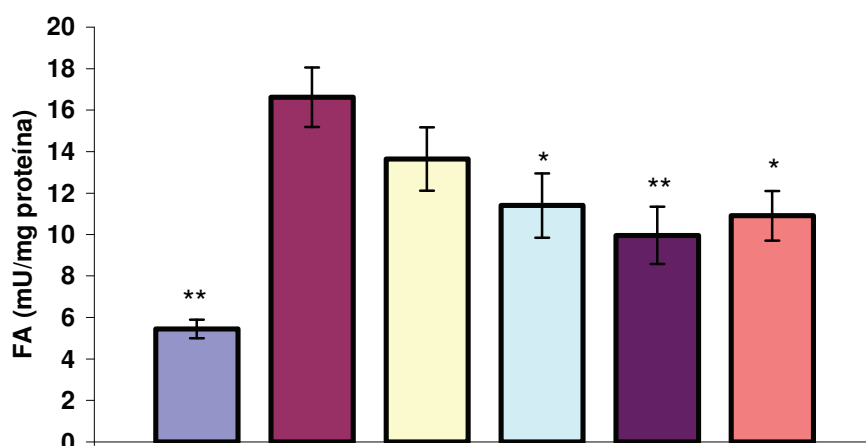
A determinação da atividade da enzima metaloproteinase (MMP) demonstrou que a atividade da MMP-9 fica aumentada durante o processo inflamatório colônico de fase aguda e a atividade da MMP-2 permanece inalterada, quando comparados os animais do grupo branco e controle. Os tratamentos não foram capazes de inibir a atividade da MMP-9 e também não alteraram a atividade da MMP-2 neste protocolo experimental (Figura 17).



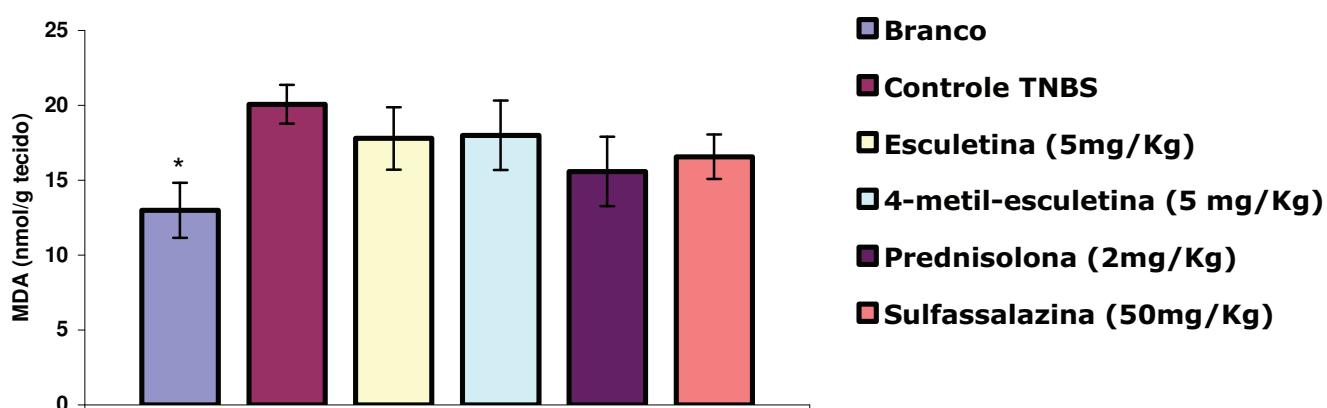
**Figura 10:** Avaliação dos níveis de glutatona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle.



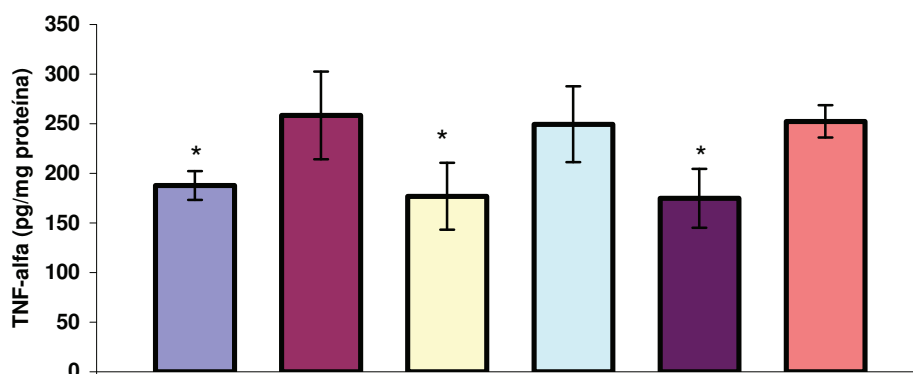
**Figura 11:** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  comparados ao grupo controle.



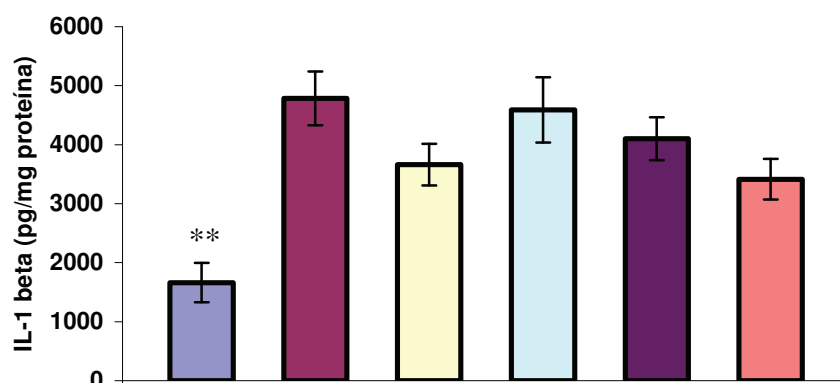
**Figura 12:** Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.



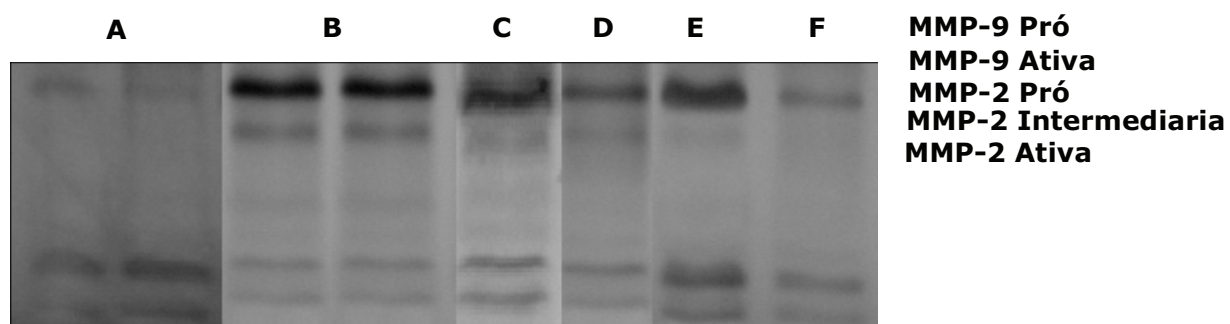
**Figura 13:** Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$ , comparados ao grupo controle.



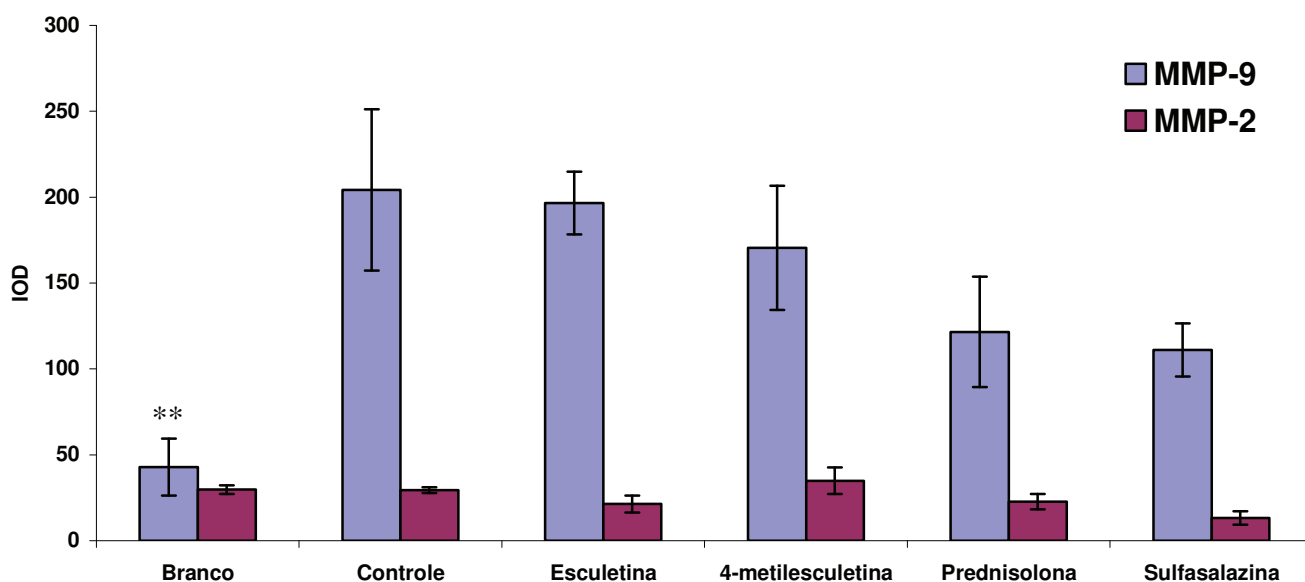
**Figura 14:** Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.



**Figura 15:** Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$  em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.



**Figura 16:** Atividade gelatinolítica da MMP-9 e da MMP-2 determinada por zimografia. Gel fotografado em Image Master VDS (Pharmacia Biotech). A=Branco; B=controle; C=Esculetina; D=4-metilesculetina, E=Prednisolona e F=Sulfasalazina.



**Figura 17:** Análise densitométrica da atividade gelatinolítica da metaloproteinase (MMP) -9 e da MMP-2 por zimografia, em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. da intensidade de densidade óptica (IOD), onde \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle.



## **2. Resultados do modelo experimental de doença inflamatória intestinal de fase crônica com recidiva**

### **2.1. Avaliação Macroscópica**

Assim como no modelo experimental de fase aguda, o modelo crônico se caracteriza pela inflamação no epitélio colônico com a presença de necrose na camada mucosa. A ulceração e a inflamação no cólon do rato são caracterizadas pela doença na parede colônica, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, (observados histologicamente e pela atividade da mieloperoxidase) e formação de granulomas. Esta lesão é máxima 48 horas após a administração do TNBS como observado no modelo agudo, e reduz com o tempo, ocorrendo uma restauração do epitélio intestinal. Após uma semana, a lesão apresenta um escore menor do que o observado no experimento de fase aguda, e diminuiu ao longo da segunda semana após a primeira administração do TNBS (Tabela 4).

No modelo experimental de doença inflamatória intestinal de fase crônica, quanto aos parâmetros macroscópicos, foi possível observar que os animais tratados com 4-metilesculetina apresentaram uma diminuição no escore macroscópico, na incidência de aderência, na primeira semana após a indução da colite. Os animais tratados com prednisolona apresentaram resultados semelhantes, além de uma diminuição significativa da extensão da lesão e na incidência de diarreia (Tabela 4). Na segunda semana após a administração do TNBS, foi possível observar nos animais tratados com prednisolona uma diminuição na extensão da lesão e o tratamento com 4-metilesculetina promoveu uma diminuição na relação peso/comprimento colônico quando comparados aos animais do grupo controle. Na terceira semana após a recidiva, os animais tratados com esculetina, 4-metilesculetina, assim como o controle sem recidiva apresentaram uma redução na extensão da lesão quando comparados aos animais do grupo controle, diferentemente dos fármacos de referência que não promoveram nenhuma melhora significativa nos parâmetros macroscópicos avaliados, após a recidiva do processo inflamatório (Tabela 4).

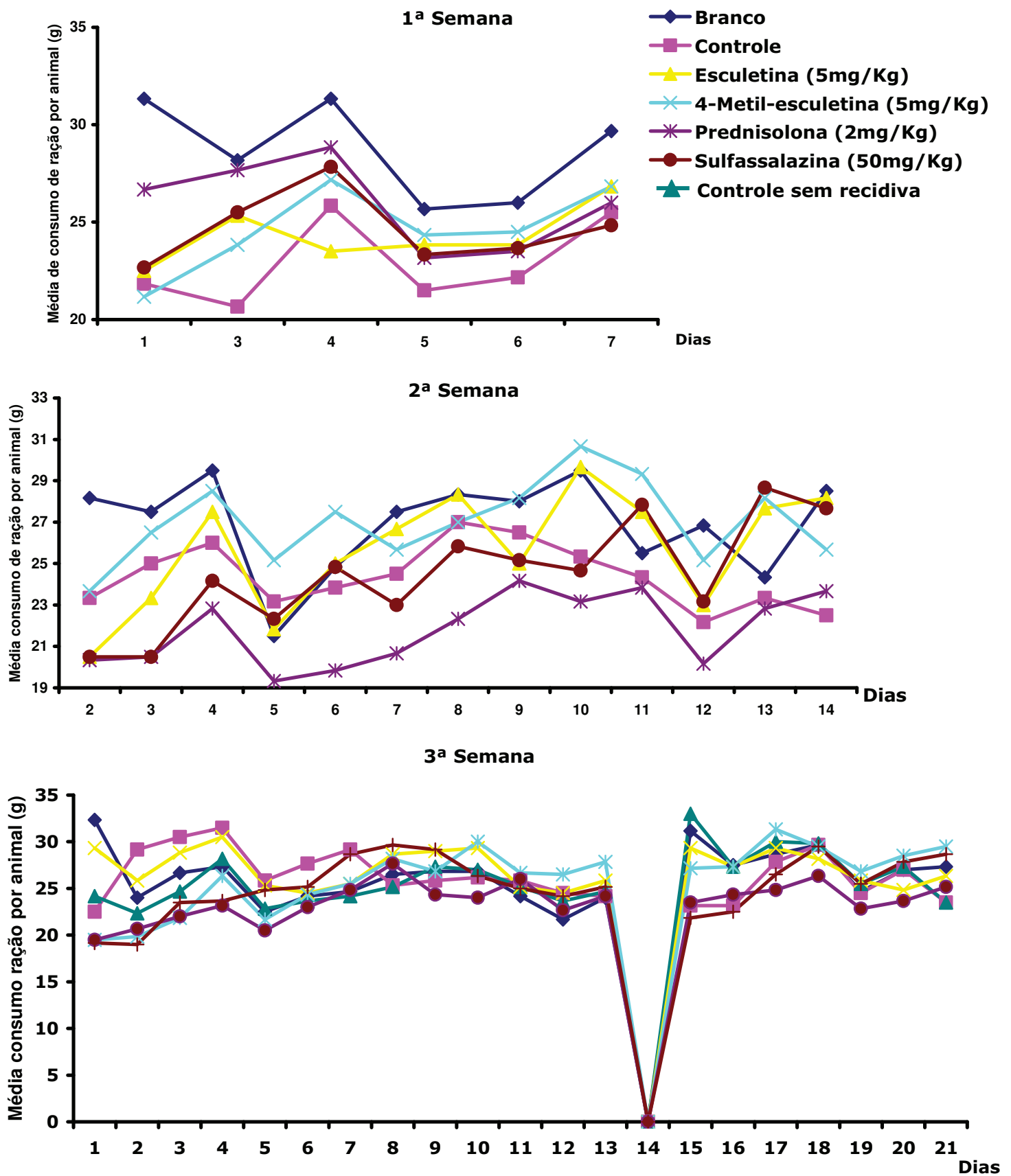
**Tabela 4.** Avaliação dos parâmetros microscópicos e macroscópicos dos efeitos de esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore microscópico (0-27) <sup>a</sup>	Escore macroscópico (0-10) <sup>a</sup>	Extensão da lesão (cm) <sup>b</sup>	Relação Peso/comprim. (mg/cm) <sup>b</sup>	Diarréia (%) <sup>c</sup>	Aderência (%) <sup>c</sup>
<b>1ª Semana</b>						
<b>Branco</b>	4,83 (4-5)**	0***	0**	89,03±7,42**	16,66	0,0*
<b>Controle TNBS</b>	14,5 (10-23)	5,5(5-7)	2,30±0,25	147,52±8,02	100,00	66,66
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	13,16 (9-18)	4,0(3-6)	1,92±0,25	141,44±8,75	33,33	33,33
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	7,75 (2-15)	3,5(3-5)*	1,93±0,37	138,27±4,15	100,00	0,0*
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	10,33(7-14)	2,0(0-5)**	1,08±0,34*	137,74±8,39	16,6*	0,0*
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	13,2 (9-19)	4,0(2-6)	1,83±0,27	139,14±10,75	83,33	16,66*
<b>2ª Semana</b>						
<b>Branco</b>	4,4 (4-5)***	0*	0**	102,00±3,89**	33,33	0,0
<b>Controle TNBS</b>	13,83 (10-17)	3,0(2-4)	1,53±0,25	146,33±9,59	66,66	0,0
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	9,33 (5,17)	4,0(3-5)	1,37±0,11	147,35±7,86	83,33	16,6
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	11,00 (6-18)	2,0(2-3)	0,82±0,26	120,06±5,56*	50,00	0,0
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	10,83 (9-12)	2,5(0-3)	0,68±0,26*	134,88±6,14	50,00	0,0
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	8,16 (4-13)*	3,0(2-6)	1,07±0,32	135,11±2,72	83,33	16,6
<b>3ª Semana</b>						
<b>Branco</b>	4,66(3-7)***	0***	0**	97,90±4,13**	0	0,0
<b>Controle TNBS</b>	14,80 (12-18)	4,0(2-4)	2,28±0,25	138,13±13,83	50,0	16,6
<b>Controle sem recidiva</b>	12,16 (9-17)	2,0(1-3)	0,98±0,27*	144,51±3,30	0	0,0
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	12,33 (8-16)	1,0(0-4)	0,68±0,47*	140,50±5,94	33,3	0,0
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	7,00 (4-9)*	2,5(1-4)	1,15±0,24*	151,79±11,30	83,3	0,0
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	12,5 (8-18)	2,5(2-4)	1,45±0,24	171,54±10,21	33,3	0,0
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	11,00 (6-13)	3,0(2-7)	1,25±0,60	171,00±24,71	33,3	33,3

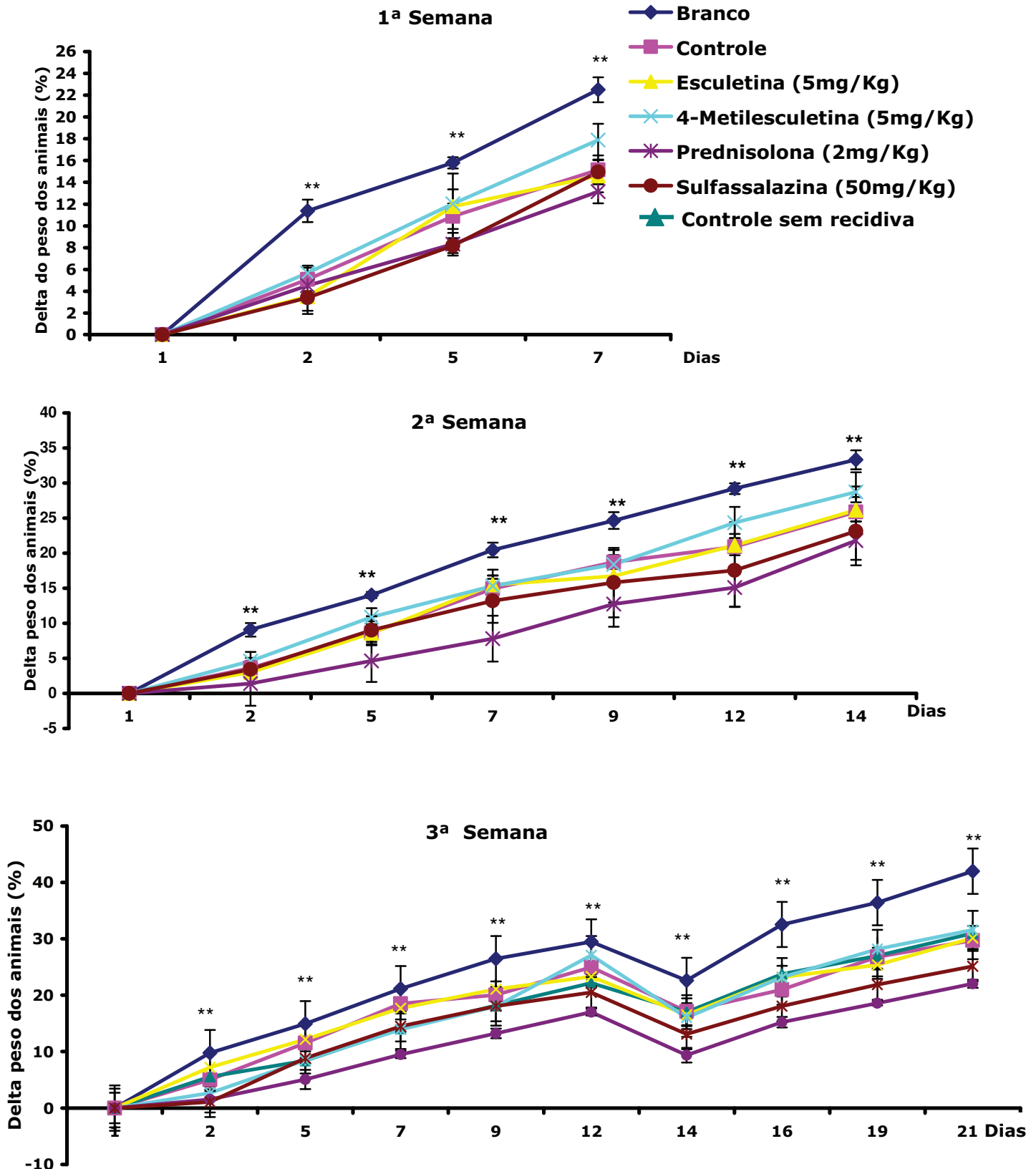
<sup>a</sup> escore são expressos em mediana (intervalo), <sup>b</sup> extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M. e <sup>c</sup> diarréia e aderência foram analisados pelo teste X<sup>2</sup>, onde \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle. Todos os grupos diferem de forma significativa do grupo branco p < 0,01 (significância não demonstrada na tabela).

Na avaliação do consumo de ração, foi observada uma redução no consumo pelos animais do grupo controle quando comparado aos animais do grupo branco (não-colítico), principalmente após a primeira semana da administração do TNBS, sendo que essa diferença diminuiu ao longo da segunda e terceira semanas (Figura 18). Todos os tratamentos promoveram um maior consumo em relação ao grupo controle, na primeira semana após a indução do processo inflamatório. Os derivados cumarínicos e a sulfassalazina tiveram um maior consumo na segunda semana, e na terceira semana o consumo foi restabelecido, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados.

Os animais do grupo controle tiveram um ganho de peso menor do que os animais do grupo branco (não-colítico) na primeira, segunda e terceira semana de tratamento. Os animais tratados com esculetina e 4-metilesculetina tiveram um ganho de peso superior aos animais tratados com os fármacos de referência, o que pode ser observado na figura 19. Os animais tratados com prednisolona e sulfassalazina, em alguns dias de experimentação, especialmente após a recidiva, apresentaram um ganho de peso estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) aos animais do grupo controle. O grupo tratado com prednisolona diferiu do grupo controle nos dias 5, 7, 9, 12, 14 e 19. E os animais que receberam sulfassalazina diferiram do grupo controle nos dias 12, 14 e 16 (diferença estatística não demonstrada na figura 19).



**Figura 18:** Avaliação do consumo médio de ração dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica, na primeira, segunda e terceira semanas após a administração do TNBS. Dados expressos em média de consumo por animal, em gramas. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva (jejum), nos animais mortos na terceira semana.



**Figura 19:** Avaliação da evolução do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de inflamação intestinal crônica com recidiva induzida por TNBS. Dia 1 primeira administração de TNBS e 14º dia indução da recidiva, nos animais mortos na terceira semana. Dados expressos em média (Peso final - Peso inicial) X 100/ Peso inicial) ± E.P.M. com \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle TNBS.

## **2.2. Avaliação Microscópica**

Na primeira semana após a indução da colite, os animais do grupo controle apresentaram ulceração moderada em diversos pontos e na camada mucosa foi possível observar uma acentuada migração de células inflamatórias, mononuclear e granulocítica, sendo as primeiras presentes em maior quantidade, além de uma acentuada depleção de muco e pouca vascularidade. Na camada submucosa também foi possível observar a presença de um grande infiltrado de células inflamatórias sendo também a maioria do tipo mononuclear e a presença de um edema acentuado (Figura 20).

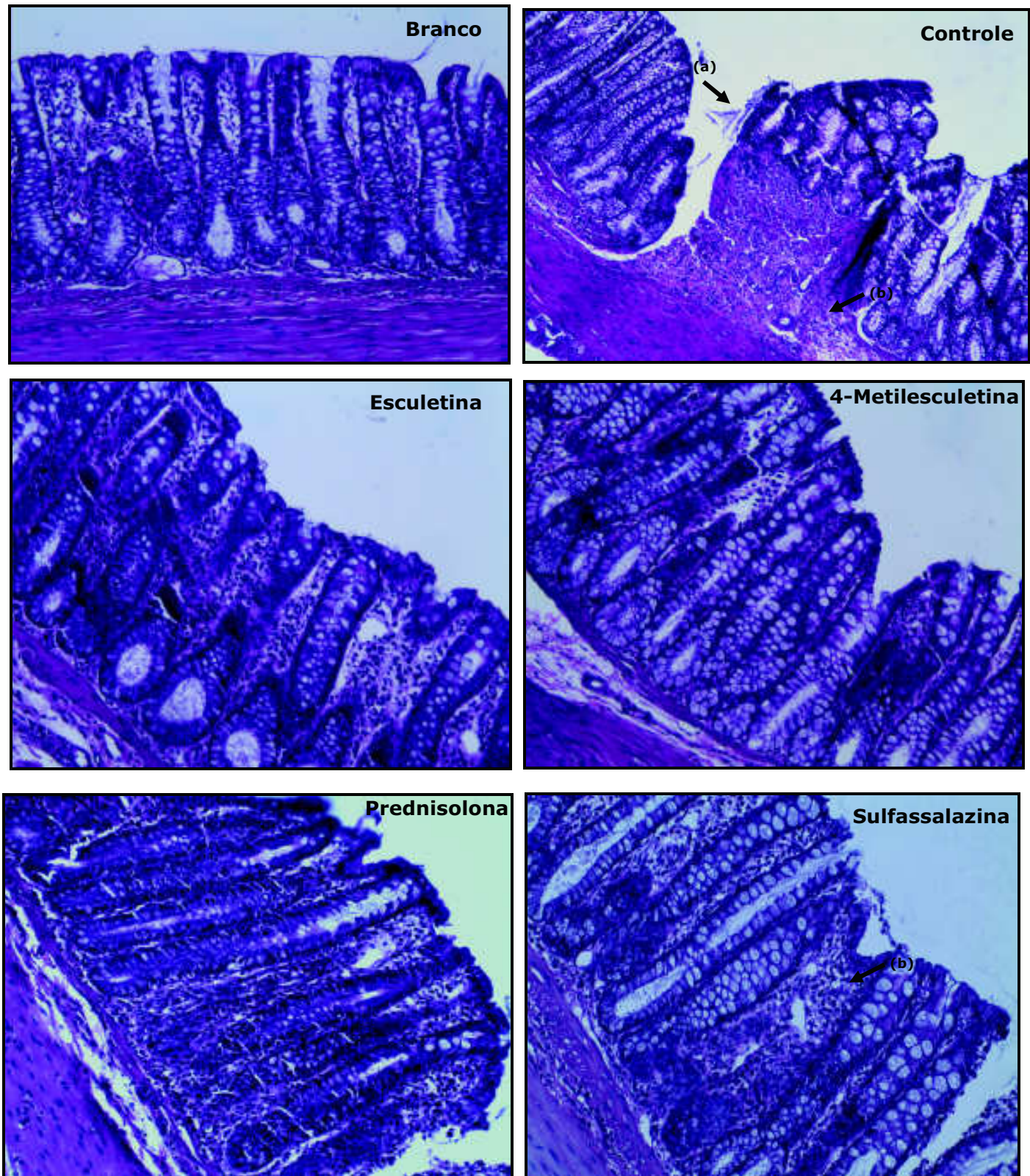
Os animais tratados com esculetina apresentaram menor infiltrado de células inflamatórias na camada mucosa e lâmina própria, em relação ao grupo controle. Nos animais tratados com 4-metilesculetina, foi possível observar uma melhora em diversos parâmetros analisados, como menor ulceração, depleção de muco, edema e presença de infiltrado inflamatório, resultados estes demonstrados por uma diminuição de 46,5% no escore microscópico quando comparados aos animais do grupo controle, porém nenhuma diferença estatística foi observada. Os animais tratados com prednisolona apresentaram menor ulceração e presença de infiltrado inflamatório, principalmente na camada submucosa e menor edema. Nos cortes histológicos dos animais tratados com sulfassalazina foi possível observar uma menor ulceração em relação aos animais do grupo controle (Figura 20/Tabela 4).

Na segunda semana após a administração do TNBS, os animais do grupo controle apresentaram ulceração menos severa e menor depleção de muco quando comparados aos animais do grupo controle da primeira semana após a administração do TNBS; porém apresentaram infiltrado inflamatório granulocítico e mononuclear, sendo mais acentuado na camada mucosa e presença de vascularidade variando de suave a moderada. Os animais tratados com esculetina demonstraram ausência de edema, ulceração bem menos intensa do que os

animais do grupo controle, bem como menor infiltrado na camada mucosa. 4-metilesculetina promoveu menor depleção de muco, infiltrado inflamatório e edema. Prednisolona promoveu uma menor depleção de muco, pouco infiltrado inflamatório na camada mucosa e quase ausente na camada submucosa, além de uma menor ulceração. Sulfassalazina apresentou pouca presença de infiltrado inflamatório e depleção de muco e menor ulceração, cujos resultados refletiram na diminuição significativa do escore microscópico em relação ao grupo controle (Figura 21/Tabela 4).

Na terceira semana, após a recidiva, o grupo controle apresentou vascularidade severa, ulceração, depleção de muco e edema moderados, presença de infiltrado mononuclear e granulocítico severo na lâmina própria e moderado na camada submucosa. Os animais do grupo controle sem recidiva, ou seja, que não receberam a segunda administração de TNBS, apresentaram menor ulceração do que o controle com recidiva, presença de infiltrado inflamatório principalmente na lâmina própria, pouca vascularidade e edema moderado. Os animais que receberam esculetina apresentaram menor ulceração, depleção de muco, vascularidade e edema, bem como menor infiltrado mononuclear e granulocítico, tanto na camada mucosa quanto na submucosa. Histologicamente, os animais que receberam 4-metilesculetina apresentaram resultados melhores do que esculetina, prednisolona e sulfassalazina, diferindo estatisticamente do grupo controle, melhorando todos os parâmetros avaliados. Os tratamentos com prednisolona e sulfassalazina promoveram diminuição da ulceração, da presença de infiltrado inflamatório na camada mucosa e submucosa, na presença de vascularidade e no edema em relação ao grupo controle (Figura 22 e 23/Tabela 4).

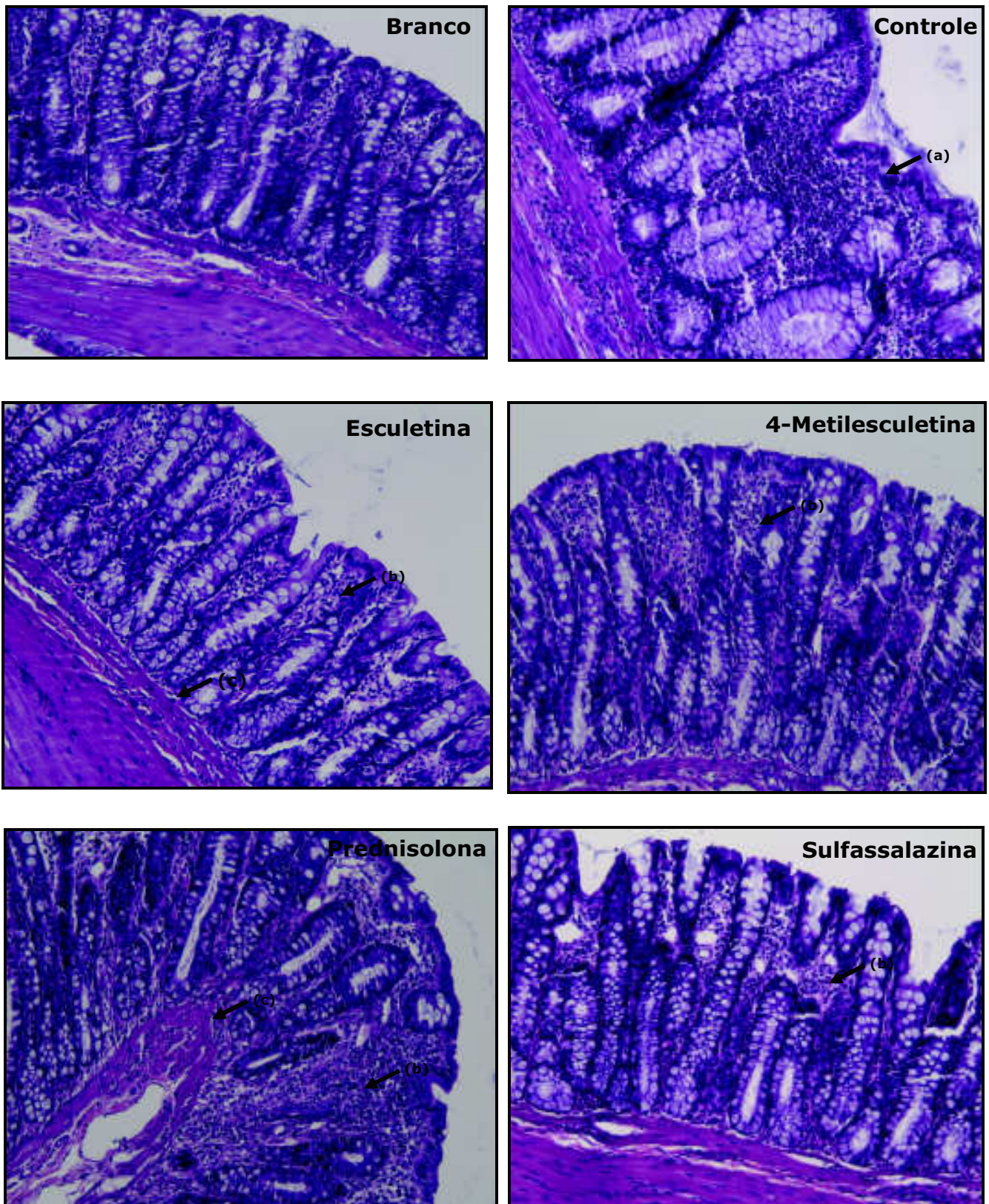
## 1ª Semana



**Figura 20:** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a administração do TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Microfotografadas com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 20X. Grupo controle com ulceração severa ou moderada e presença de infiltrado inflamatório na camada mucosa e submucosa. Grupos tratados com esculetina, prednisolona e sulfassalazina com menor ulceração e infiltrado na camada mucosa e submucosa. Animais tratados com 4-metilesculetina apresentaram características semelhantes ao grupo branco. (a) Ulceração e (b) infiltrado de células inflamatórias.

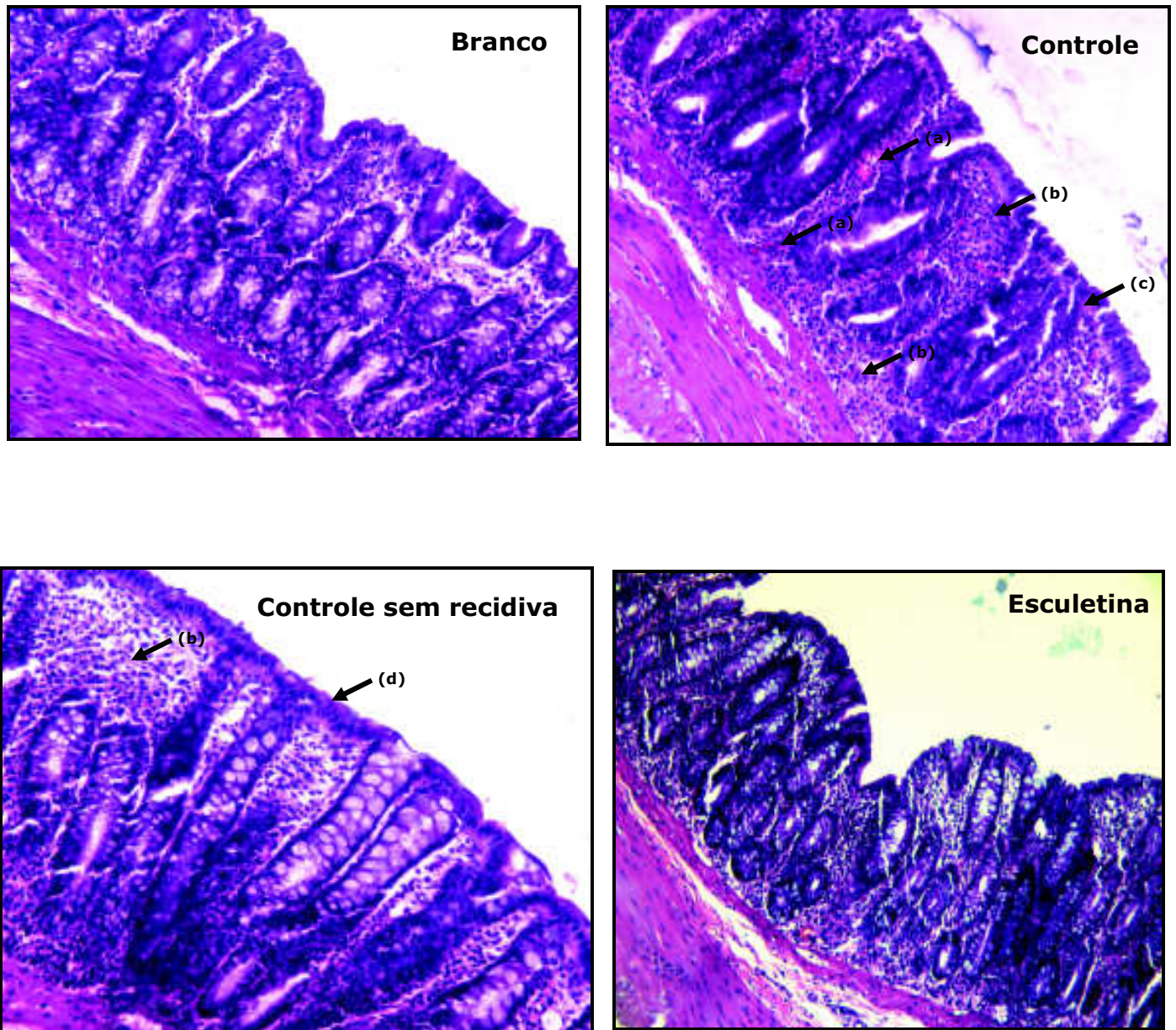


## 2ª Semana



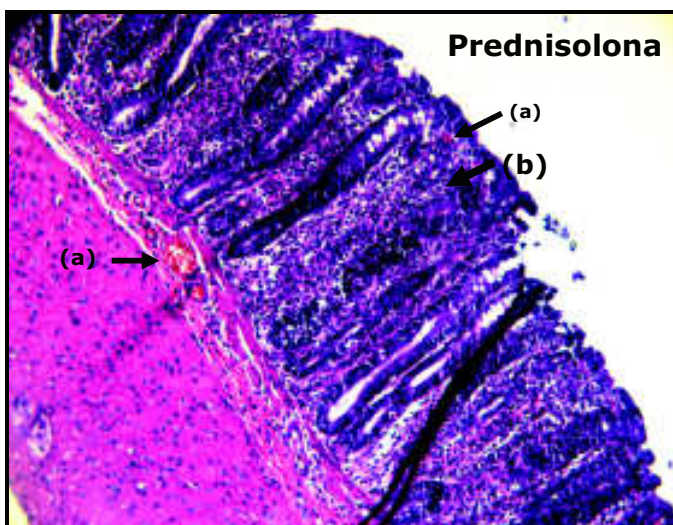
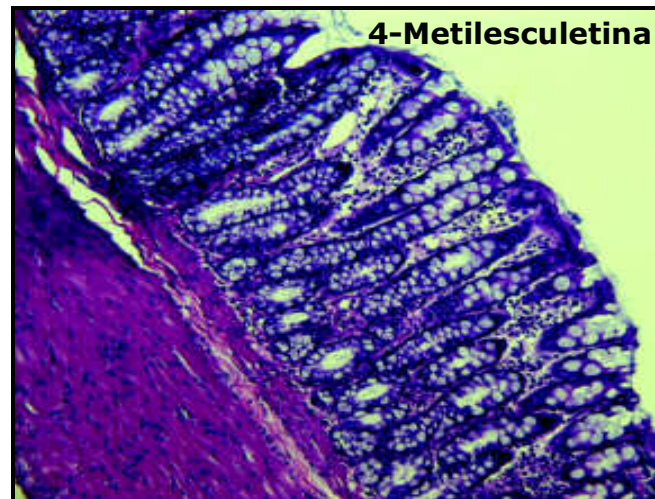
**Figura 21:** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais duas semanas após a administração de TNBS. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e microfotografados com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 20X. Grupo controle com pouca ulceração e presença de infiltrado inflamatório na camada mucosa e submucosa (a). Grupos tratados com menor ulceração e infiltrado de células inflamatórias na camada mucosa (b) e submucosa (c), controle com restauração da mucosa colônica, 14 dias após a instilação do TNBS.

## 3ª Semana



**Figura 22:** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a recidiva. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE), microfotografados com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 20X. Grupo tratado com esculetina com menor ulceração e infiltrado na camada mucosa e submucosa. Animais do grupo controle com **(a)** presença de vascularização, **(b)** infiltrado de células inflamatórias, **(c)** perda de citoarquitetura intestinal. Controle sem recidiva com restauração da citoarquitetura intestinal**(d)**.

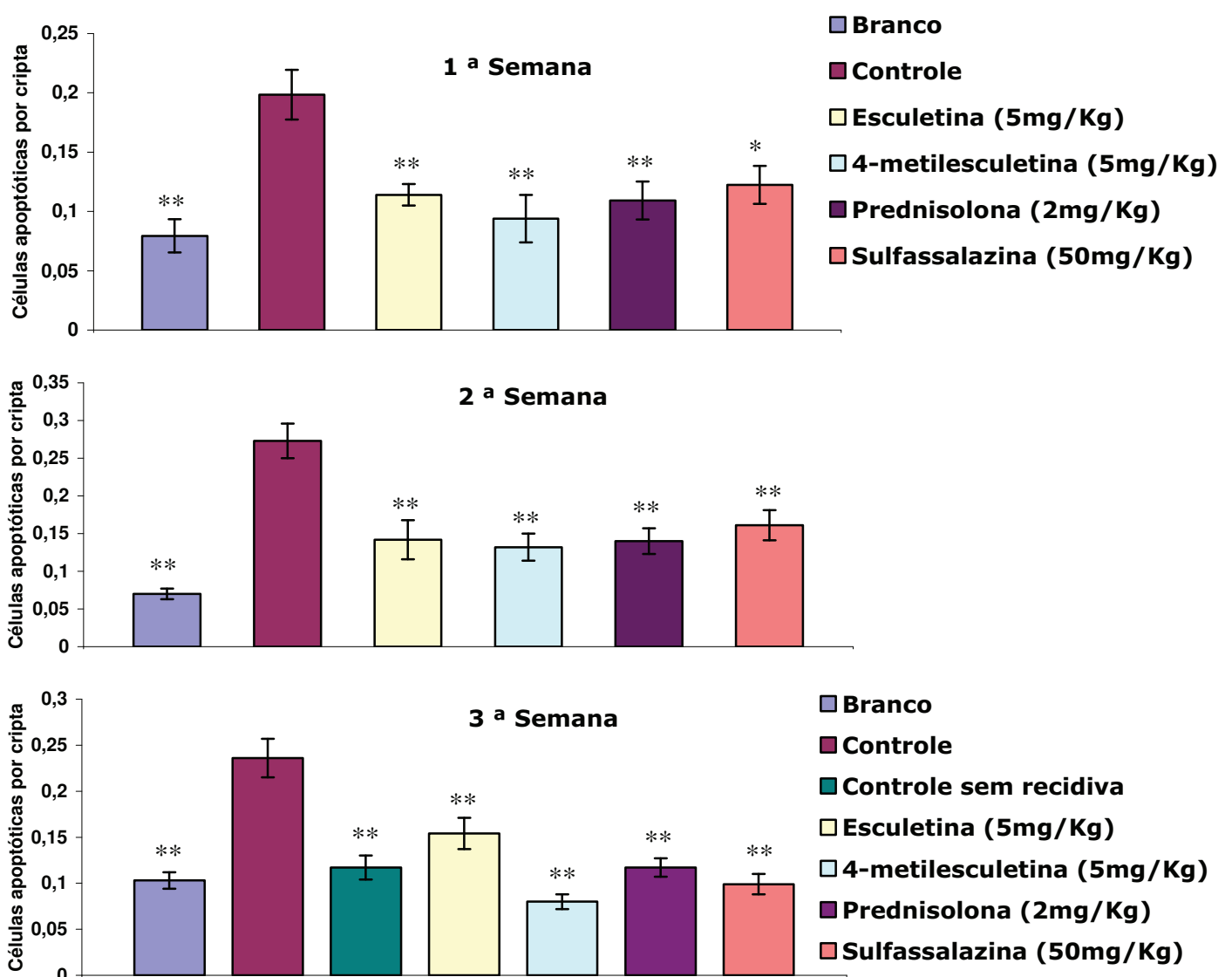
## 3ª Semana



**Figura 23:** Fotomicrografias da mucosa de cólon de ratos dos diferentes grupos experimentais uma semana após a recidiva. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e microfotografados com microscópio óptico Leica Qwin Plus versão 3.40, no aumento 20X. Grupo tratado com 4-metilesculetina semelhante ao grupo branco. Grupo tratado com prednisolona com **(a)** presença de vascularização e **(b)** infiltrado de células inflamatórias. Grupo tratado com sulfassalazina com menor ulceração e infiltrado na camada mucosa e submucosa quando comparados ao grupo controle.

### 2.2.1. Determinação das células apoptóticas

A avaliação histológica demonstrou que o grupo controle apresenta um maior número de células apoptóticas na primeira, segunda e terceira semanas do processo inflamatório de fase crônica, sendo esse número um pouco maior do que o observado no experimento de fase aguda. Todos os tratamentos promoveram uma diminuição significativa no número de células epiteliais em apoptose em todas as semanas avaliadas (Figura 24).



**Figura 24:** Avaliação do número de células epiteliais em apoptose por cripta, de animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS em ratos. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \* p,0,05 e \*\* p<0,01 comparados ao grupo controle.

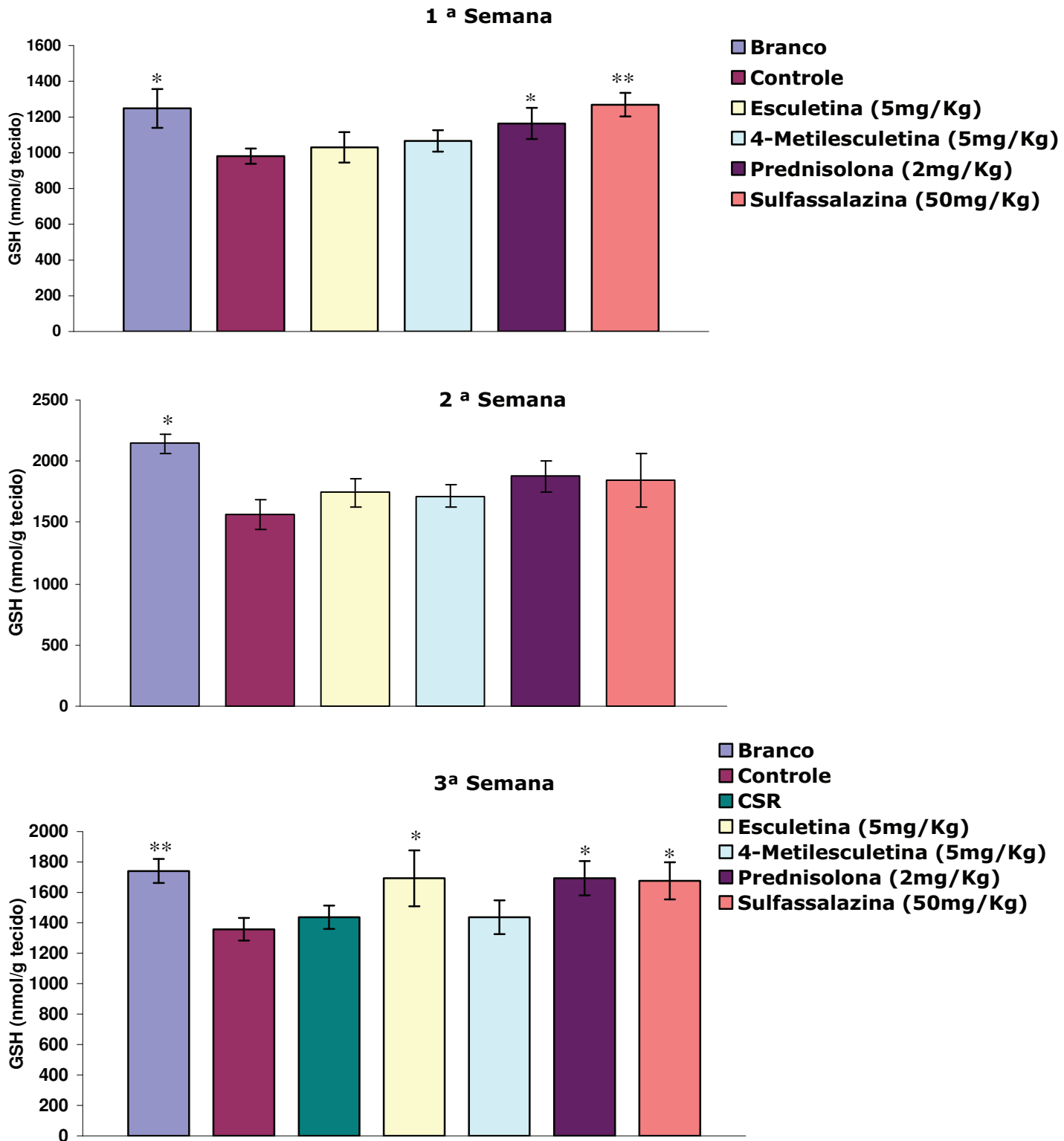
### **2.3. Determinações Bioquímicas**

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, na primeira semana após a administração do TNBS, os tratamentos com esculetina e 4-metilesculetina promoveram inibição na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) (Figura 26) e fosfatase alcalina (FA) (Figura 27) e reduziram os níveis de malonildialdeído (MDA) (Figura 28), assim como o tratamento com prednisolona que além de melhorar esses parâmetros, também evitou a depleção dos níveis de glutathione (GSH) (Figura 25). O tratamento com sulfassalazina evitou a depleção dos níveis de GSH (Figura 25) e inibiu a atividade das enzimas MPO e FA (figuras 26 e 27), porém não reduziu os níveis de MDA (Figura 28).

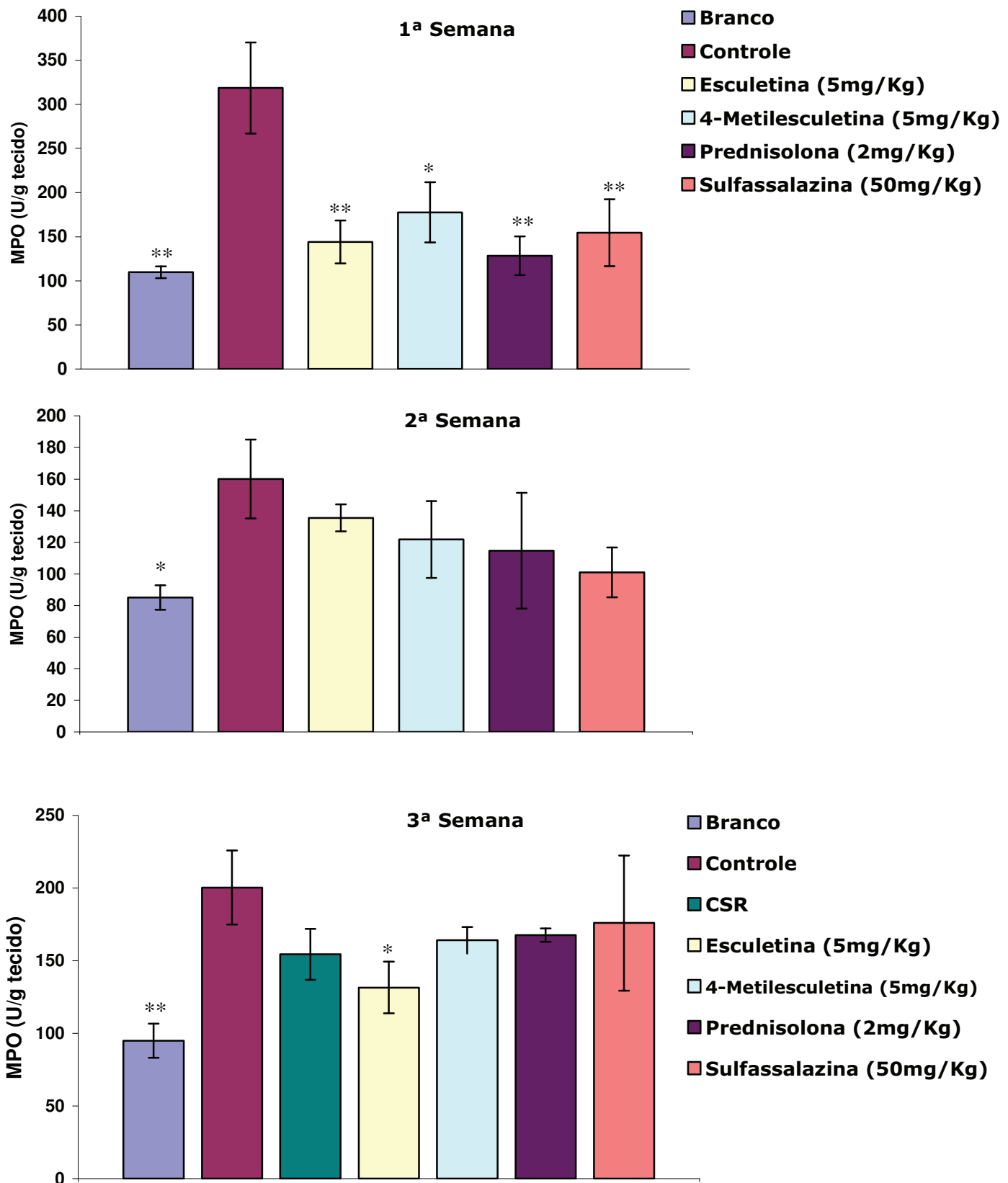
Quanto à avaliação das citocinas pró-inflamatórias colônicas, os tratamentos com esculetina, assim como com prednisolona reduziram os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figuras 29 e 30), enquanto que o tratamento com 4-metilesculetina diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$ . O tratamento com sulfassalazina não promoveu nenhuma alteração significativa nestes parâmetros. Na determinação da atividade das metaloproteinases, os animais tratados com 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina apresentaram uma diminuição na atividade da MMP-9, e nenhum tratamento promoveu alteração na MMP-2 (Figura 31).

Na segunda semana após a administração do TNBS, os derivados cumarínicos e os fármacos de referência promoveram apenas inibição na atividade da enzima FA (Figura 27).

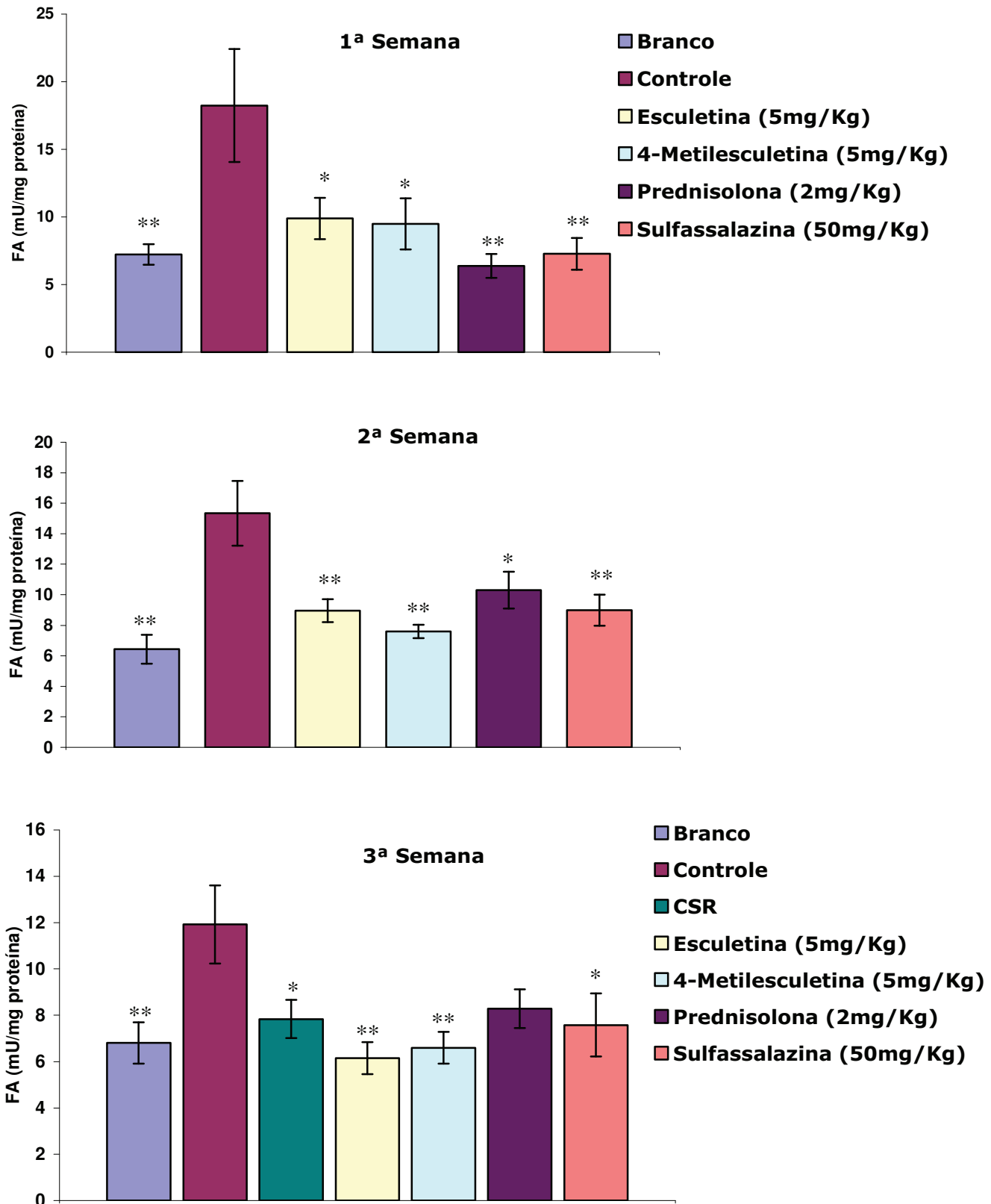
Após a recidiva, o tratamento com esculetina evitou a depleção de GSH e inibiu a atividade das enzimas MPO e FA (Figura 26 e 27), enquanto que o tratamento com 4-metilesculetina inibiu a atividade da FA (Figura 27). O tratamento com prednisolona evitou a depleção dos níveis de GSH (Figura 25), assim como o tratamento com sulfassalazina, que além disso, também inibiu a atividade da FA (Figura 27).



**Figura 25:** Avaliação dos níveis de glutatona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo controle.

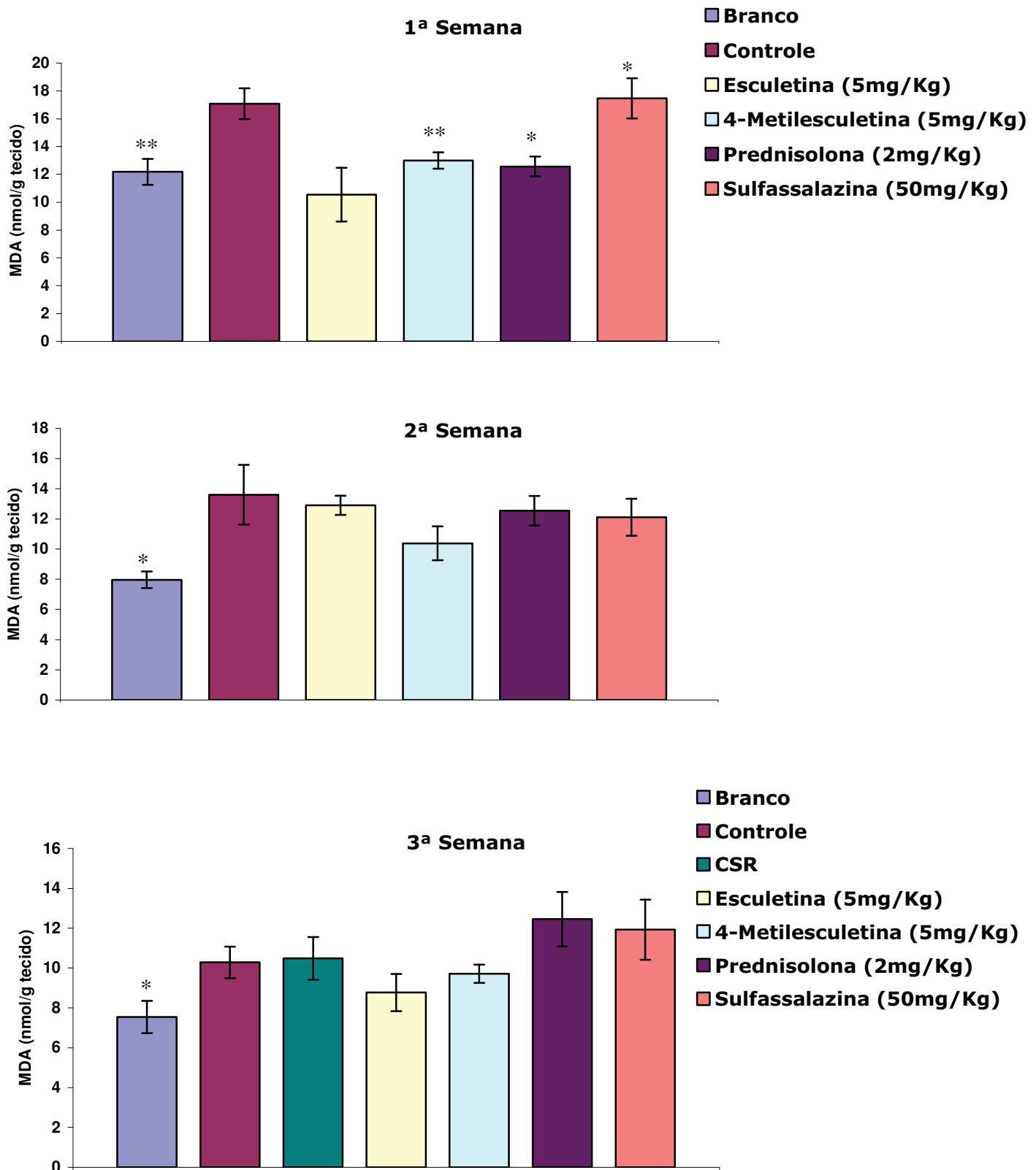


**Figura 26:** Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo controle.

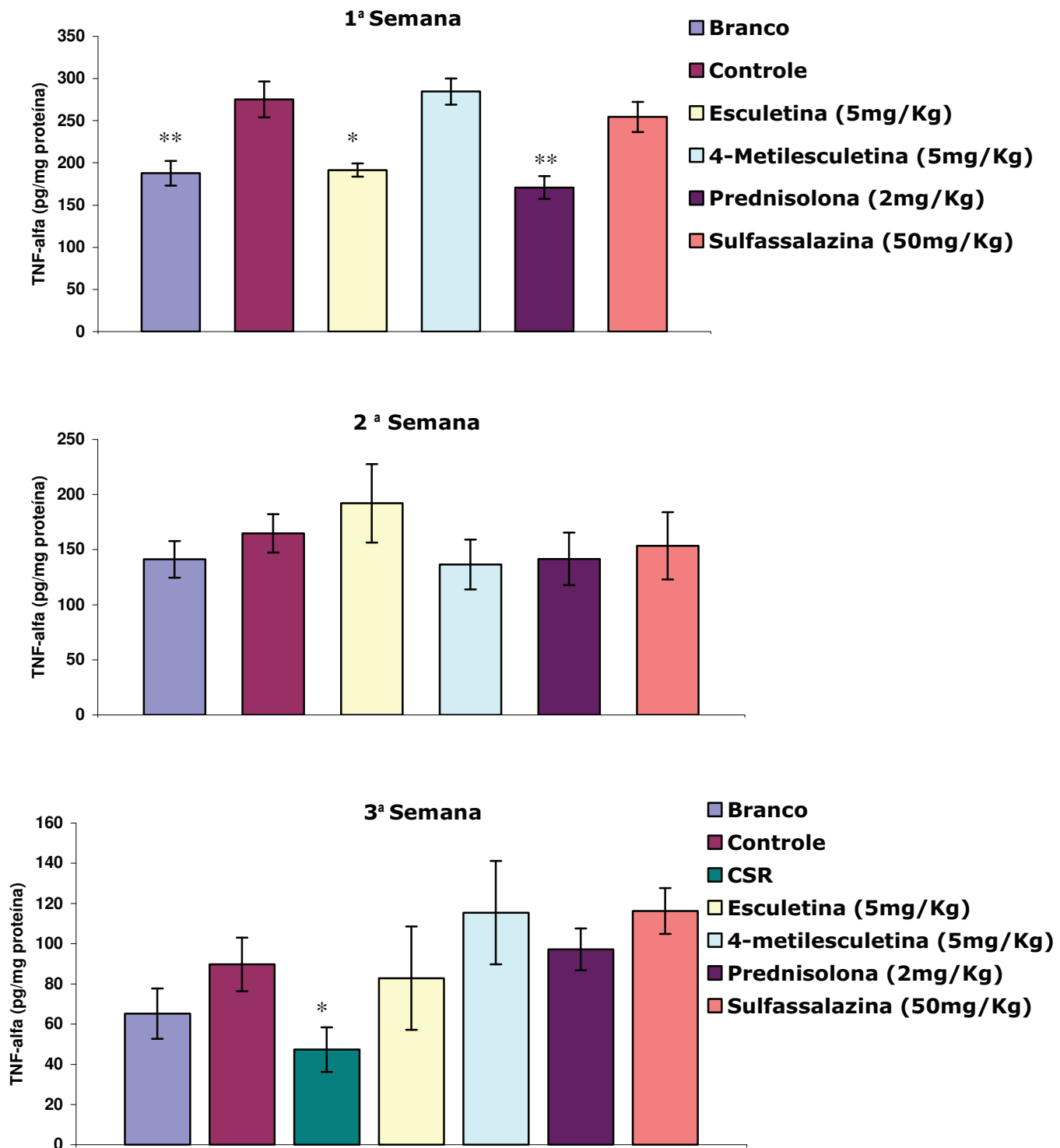


**Figura 27:** Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , comparados ao grupo controle.

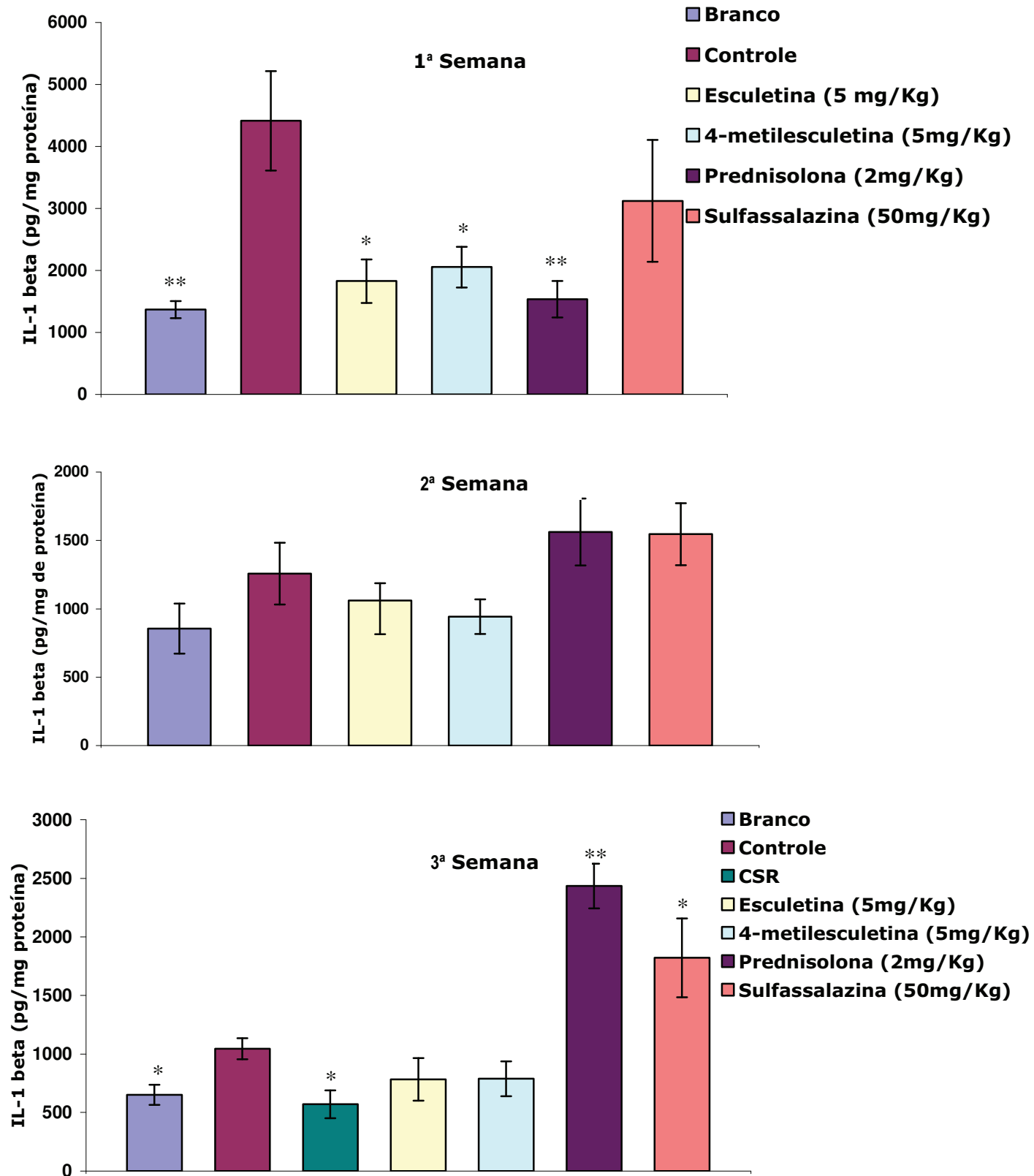




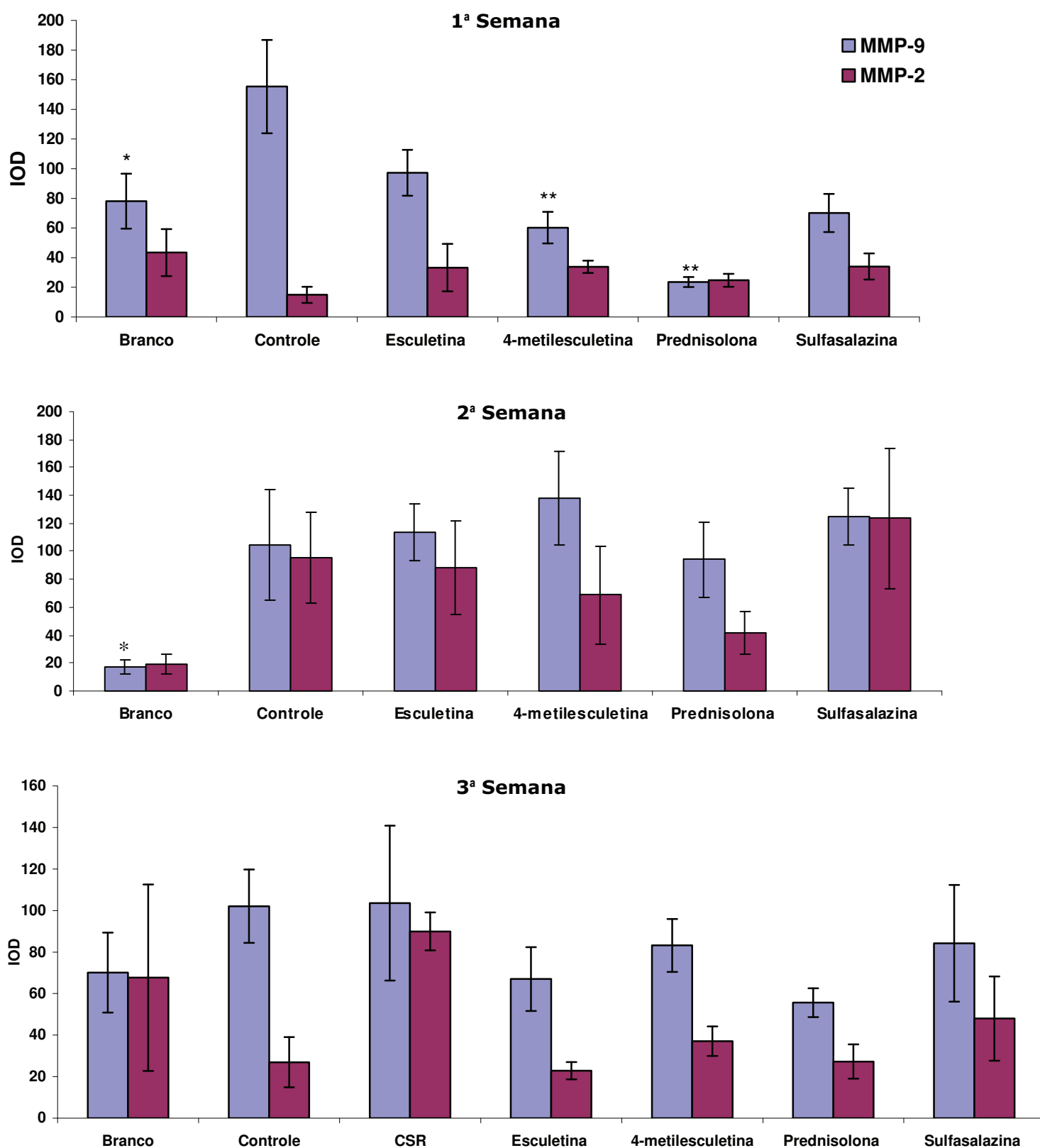
**Figura 28:** Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ , comparados com o grupo controle.



**Figura 29:** Avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.



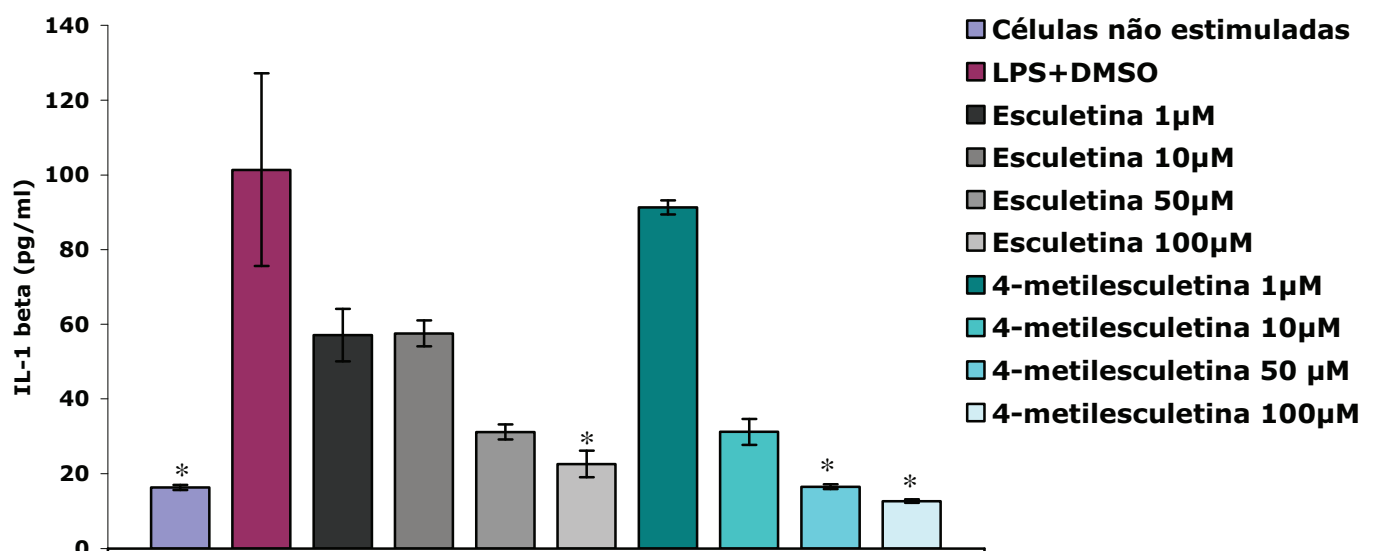
**Figura 30:** Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$  em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica induzida por TNBS, na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*  $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ , comparados ao grupo controle.



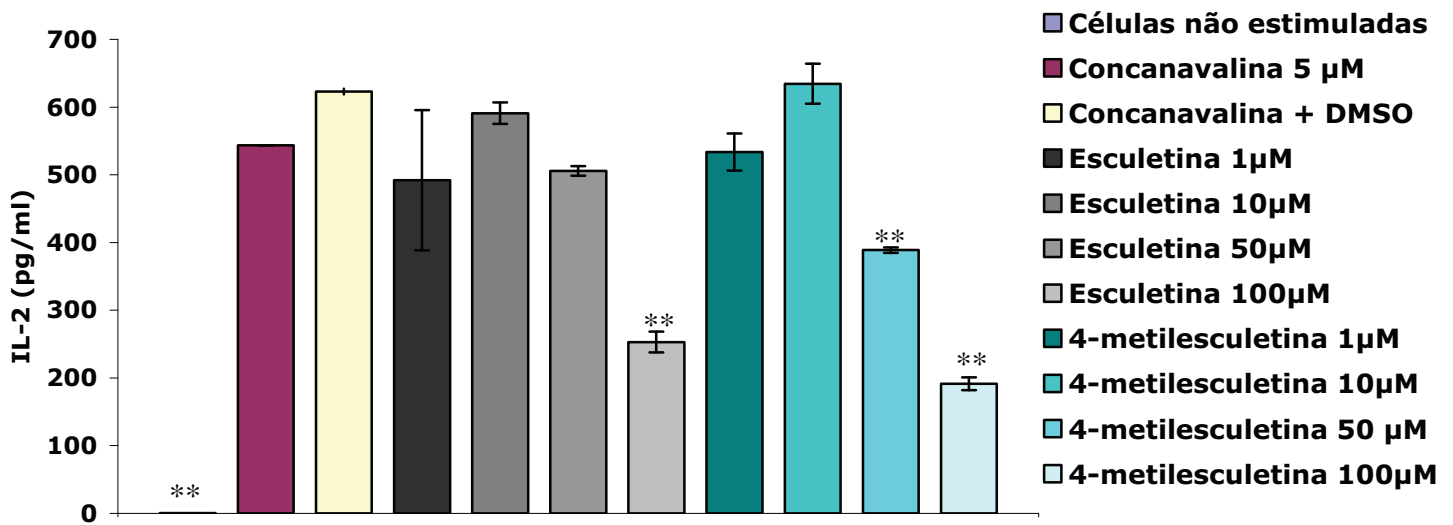
**Figura 31:** Análise densitométrica da atividade gelatinolítica da metaloproteinase (MMP) -9 e da MMP-2 por zimografia, em animais submetidos ao modelo experimental de colite crônica com recidiva induzida por TNBS. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. da intensidade de densidade ótica (IOD) com \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$  comparados ao grupo controle.

### 3. Avaliação da atividade de Esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*

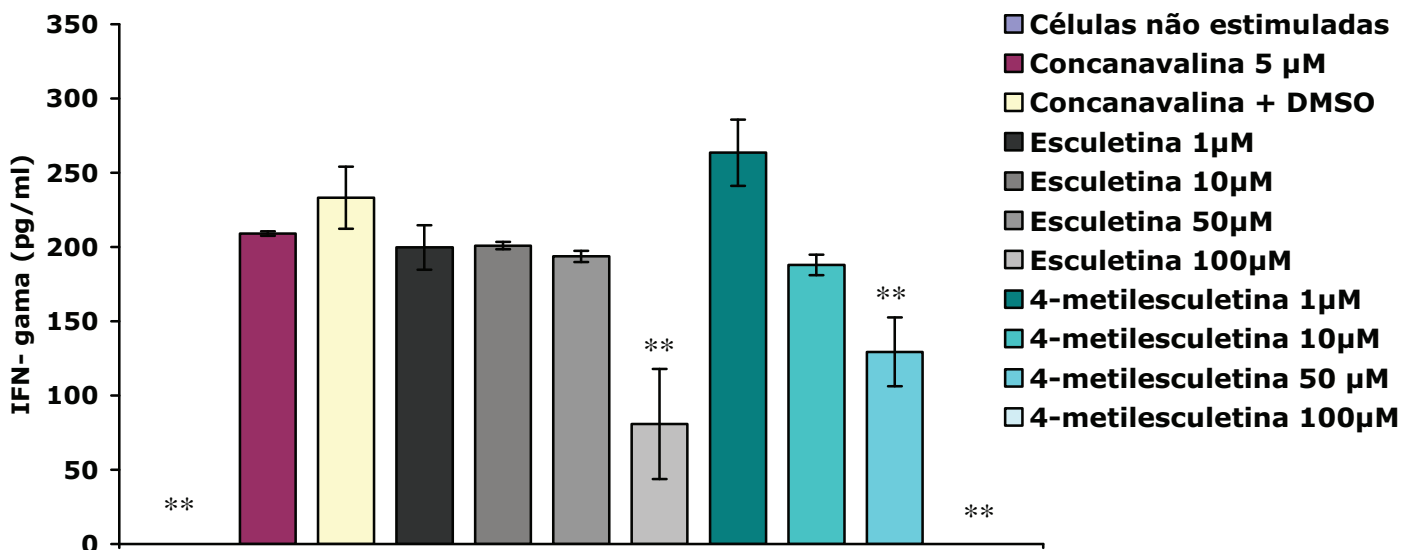
Nos testes para avaliar a inibição da secreção das citocinas pró-inflamatórias, foi possível observar que esculetina na concentração de 100 $\mu$ M inibiu a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Figuras 33 e 34) e inibiu também a secreção de IL-1 $\beta$  (Figura 32), porém esta concentração também promoveu a morte de 75,34% das células de RAW (Figura 37). 4-metilesculetina na concentração de 50 $\mu$ M inibiu a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-8 (Figuras 32, 33, 34 e 35). No teste de viabilidade esta concentração promoveu a morte de 25% das células de RAW (Figura 37). Na concentração de 100 $\mu$ M 4-metilesculetina inibiu a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-2 (Figuras 32 e 33) e em 100% a secreção de IFN- $\gamma$  (Figura 34), no teste de viabilidade esta concentração promoveu a morte de 35% das células de RAW (Figura 37). Esculetina e 4-metilesculetina não promoveram alteração na viabilidade dos esplenócitos e das células Caco-2 (Figuras 36 e 38).



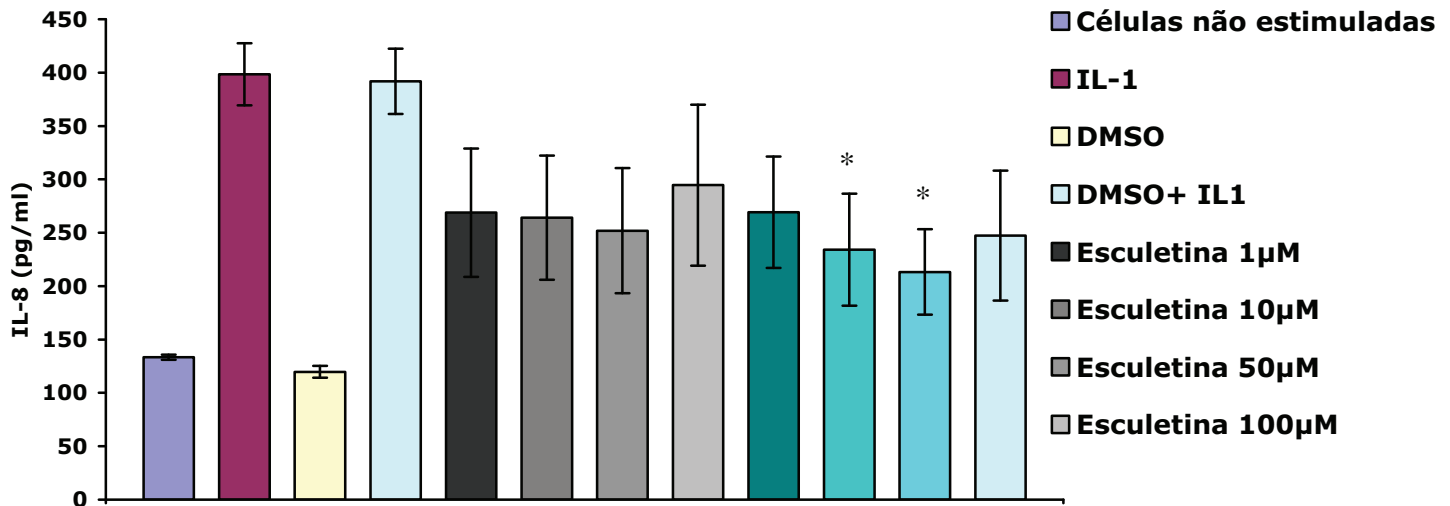
**Figura 32:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-1 $\beta$  pelas células RAW 264.7 estimuladas com LPS (50 ng/ml) durante 36 horas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle LPS+DMSO.



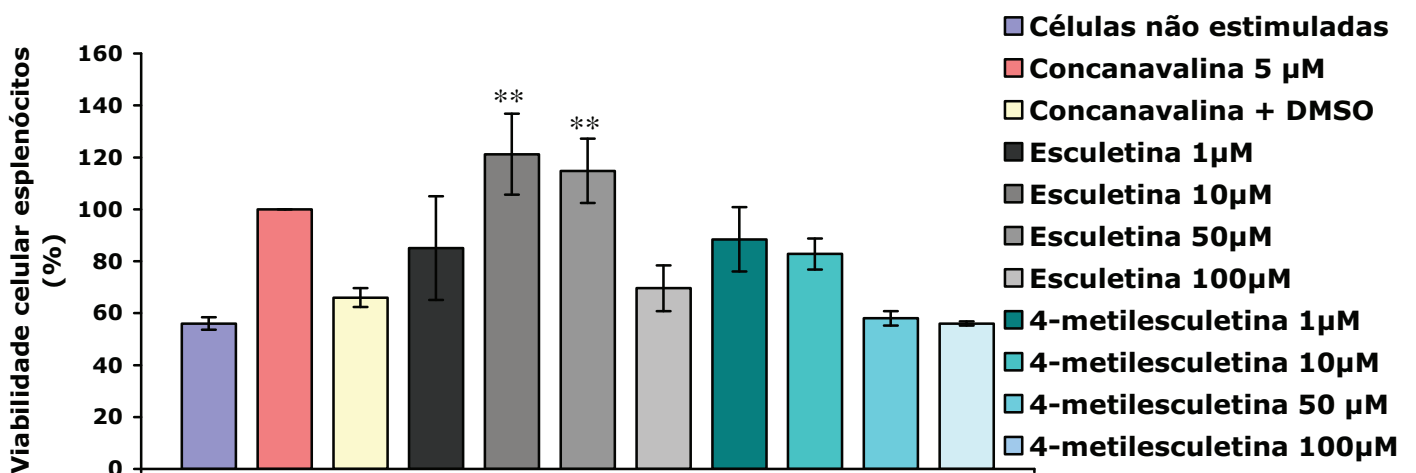
**Figura 33:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-2 pelos esplenócitos estimulados com concanavalina A (5µg/ml) durante 48 horas. Os dados estão expressos em média ± E.P.M. com \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle Concanavalina+DMSO.



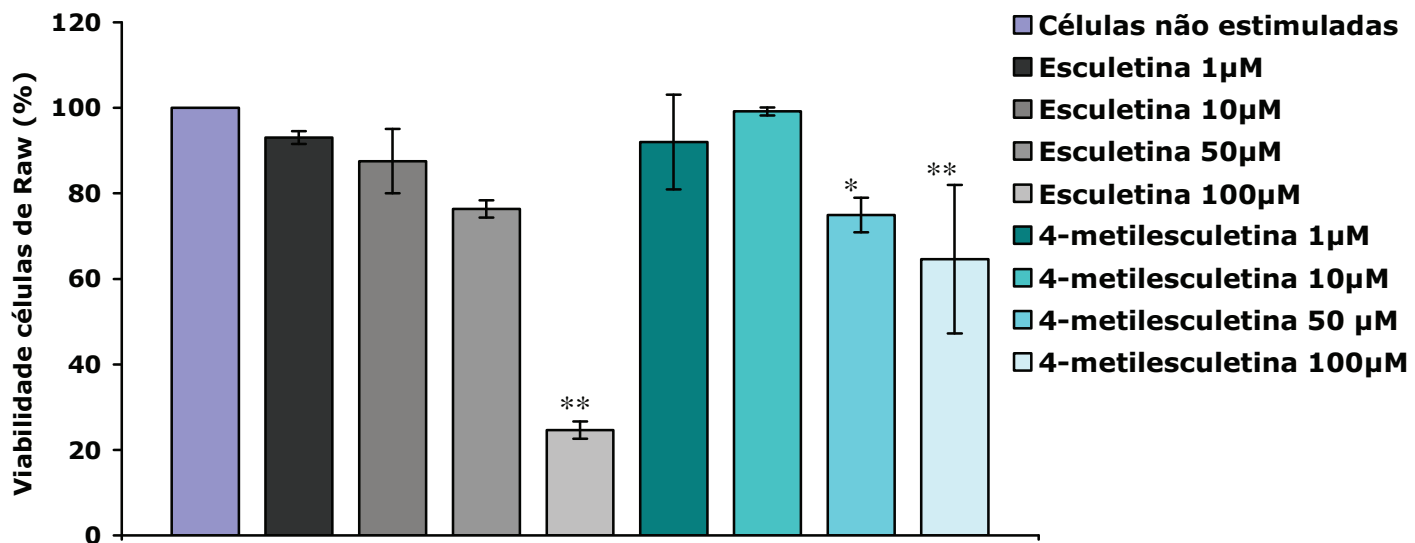
**Figura 34:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos estimulados com concanavalina A (5µg/ml) durante 48 horas. Os dados estão expressos em média ± E.P.M. com \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle concanavalina+DMSO.



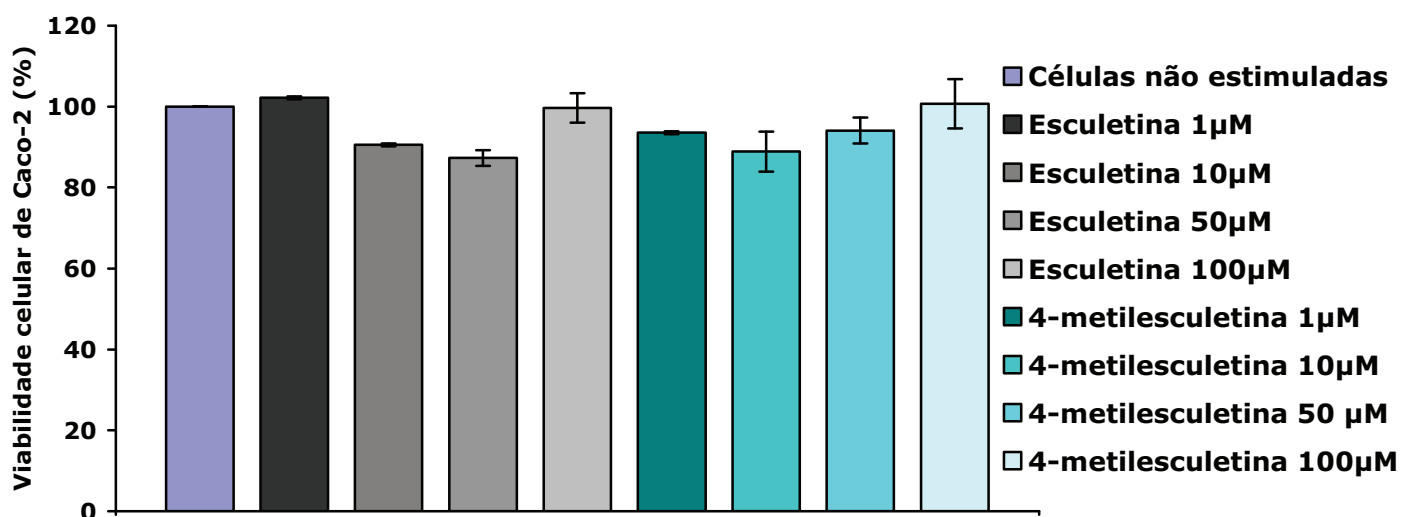
**Figura 35:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de IL-8 pelas células Caco-2 estimulada com IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) durante 20 horas. Os dados estão expressos em média  $\pm$  E.P.M., onde \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle DMSO+IL-1 $\beta$ .



**Figura 36:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade de esplenócitos. Resultados expressos em % de viabilidade celular.



**Figura 37:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade das células de Raw. Resultados expressos em % de viabilidade celular.



**Figura 38:** Efeito de esculetina e 4-metilesculetina sobre a viabilidade das células Caco-2. Resultados expressos em % de viabilidade celular.



*Discussão*



O processo inflamatório intestinal envolve uma série de eventos celulares e moleculares que resultam no aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade capilar. Esse fato promove o extravasamento de granulócitos, especialmente leucócitos polimorfonucleares. A migração e ativação de mediadores químicos inflamatórios, como metabólitos do ácido araquidônico, bradicinina e as citocinas presentes em macrófagos, linfócitos, e outros tipo de células, servem para iniciar, coordenar e amplificar o processo inflamatório. Esses agentes pró-inflamatórios promovem a aderência dos fagócitos no endotélio vascular e o extravasamento destas células para a mucosa intestinal e, posteriormente, a ativação destes fagócitos origina a liberação de radicais livres.

Os radicais livres oriundos do processo inflamatório apresentam um papel chave na regulação da inflamação intestinal e na ausência de mecanismos de defesa antioxidantes, promovem um aumento da lesão, depleção dos níveis de glutathione, das enzimas de detoxificação, bem como a ativação do NF- $\kappa$ B, além de estarem relacionados com a ocorrência de diarreia (Dryden *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo é um potencial mecanismo de lesão tecidual que contribui para a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, o que reforça a pesquisa de novos compostos com atividade antioxidante como novas terapias para o tratamento destas doenças (McKenzie *et al.*, 1996), portanto estratégia para inibir os radicais livres, seja na produção de enzimas que agem diretamente na produção destes, ou seqüestrando os que já foram produzidos, ou ainda aumentando a produção de compostos antioxidantes pelas células intestinais (Dryden *et al.*, 2005), são um importante ponto de partida na busca de novos medicamentos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

No tecido colônico de pacientes com essas doenças, o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento nos níveis de malonildialdeído (MDA) e do 4-hidroxinonal (Kruidenier *et al.*, 2003; Dagli *et al.*, 1997; Lih-Brody *et al.*, 1996). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexaenóico. O 4-hidroxinonal é o produto majoritário da oxidação de ácidos

graxos polinsaturados e consiste em um aldeído insaturado, sendo um produto quantitativamente mais importante da degradação peroxidativa de ácidos graxos omega-6 (Lima & Abdalla, 2001). O MDA é freqüentemente avaliado como indicador da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo *in vivo*, pois seu potencial deletério consiste em sua habilidade de reagir com grupos amino de proteínas, o que causa modificação estrutural, cross-linking e geração de epítomos, que podem desencadear a resposta imunológica (Requena *et al.*, 1997).

Assim como observado na DII em humanos, o modelo experimental de colite induzida pelo TNBS promove um aumento da peroxidação lipídica, como observado neste estudo e em outros (Loguercio *et al.*, 2003) e confirmado pelo aumento dos níveis de MDA colônico tanto no modelo experimental de fase aguda, como crônica com recidiva. O tratamento com esculetina e 4-metilesculetina, assim como com prednisolona, o fármaco de referência, foi capaz de diminuir o estresse oxidativo colônico, no modelo experimental de fase crônica na primeira semana após a administração do TNBS, demonstrado pela diminuição no conteúdo de malonildialdeído (Figura 28).

Outro fator que confirma a presença de estresse oxidativo na mucosa colônica no processo inflamatório intestinal é a depleção dos níveis de glutathiona, como observado em humanos (Sido *et al.*, 1998; Lauterburg *et al.*, 1988) e em modelos experimentais (Pavlick *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 1997; Sánchez de Medina *et al.*, 1996; Loguercio *et al.*, 1996; Buffinton & Doe, 1995). A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina sendo um dos mais abundantes agentes antioxidantes biológicos e que serve de substrato para a glutathiona peroxidase (GP<sub>x</sub>) e a glutathiona S-transferase. A GSH em sua forma reduzida possui um grupo sulfidríla, que pode atuar seqüestrando radicais livres como o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peroxinitrito e hidroperóxidos lipídicos, além disso, está relacionada diretamente com o processo de reparação da lesão oxidativa no DNA e proteção contra moléculas reativas de oxigênio e citocinas que induzem a apoptose (Kruidenier & Verspaget, 2002). A GSH é predominantemente a primeira defesa antioxidante intracelular contra os produtos tóxicos de oxigênio, particularmente na mitocôndria, local onde ocorre a maior síntese desses radicais (Deleve & Kaplowitz,

1991). Após a exposição da GSH em sua forma reduzida ao agente oxidante, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ocorre sua oxidação à sua forma oxidada (GSSG), cuja reação é catalisada pela glutathione peroxidase (GPx). A recuperação da GSSG é feita pela enzima glutathione reductase (GSHred), na presença de NADPH, constituindo um ciclo redox essencial para manutenção da integridade do sistema protetor celular (Wang & Ballatori, 1998). O nível intracelular de GSH é regulado pelo equilíbrio entre sua utilização e síntese (Halliwell & Gutteridge, 1984). Sob condições fisiológicas, a GSHred mantém mais de 98% da GSH intracelular na forma reduzida (Wang & Ballatori, 1998). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, há recuperação da GSH, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, ocorre desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que acarreta em estresse oxidativo (Shan *et al.*, 1990; Gilbert, 1990; Halliwell, 1993). Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode ser monitorada pela glutathione total (GSH+GSSG).

Estudos demonstram que os níveis de GSH colônica são significativamente depletados na retocolite ulcerativa e na doença de Crohn, quando comparados com o grupo controle de pacientes normais ou com essas doenças em fase inativa (Karp & Koch, 2006). Outros estudos também confirmam a diminuição nos níveis de GSH em sua forma reduzida na DII (Holmes *et al.*, 1998) e o aumento da GSH em sua forma oxidada em pacientes com retocolite ulcerativa ativa (Sido *et al.*, 1998). É relatado que o nível de GSH reduzida na mucosa de pacientes com DII é 27% menor do que de pessoas saudáveis (Buffinton & Doe, 1995). A potencial importância da glutathione na doença inflamatória intestinal tem sido demonstrada em modelos animais, que sugerem que a depleção de GSH altera a função das células T e dos macrófagos (Karp & Koch, 2006). Além disso, existem outras evidências de que a GSH e enzimas associadas atuam na imunidade celular. Por exemplo, níveis de GSH e células apresentadoras de antígeno determinam se a resposta imune predominante é do tipo Th1 ou Th2, porém as bases moleculares desta diferenciação ainda não são conhecidas (Townsend *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina, assim como com prednisolona e sulfassalazina, evitaram a depleção dos níveis de glutatona total, no modelo experimental de DII induzida pelo TNBS em ratos, na fase aguda. No protocolo experimental de fase crônica com recidiva, os tratamentos com prednisolona e sulfassalazina promoveram tal atividade na primeira semana após a administração do TNBS, e a administração de esculetina, prednisolona e sulfassalazina foi capaz de manter os níveis de GSH mesmo após a recidiva.

Estudos demonstram que a suplementação com glutatona diminui o dano colônico, promovendo restauração nos níveis de GSH e cisteína e diminuindo a peroxidação lipídica em ratos, no modelo experimental de colite induzida por TNBS (Loguercio *et al.*, 2003). Outros estudos experimentais também associam a atividade antiinflamatória de seus compostos com a propriedade destes em evitarem a depleção nos níveis de GSH colônica (Gálvez *et al.*, 2006; Di Stasi *et al.*, 2004; González *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 1998; Ocete *et al.*, 1998; Sánchez de Medina *et al.*, 1996). A administração de N-acetilcisteína, no modelo experimental de colite induzida por TNBS, promove melhora nos parâmetros avaliados, sugerindo que o precursor da GSH pode ser benéfico para evitar o estresse oxidativo do processo inflamatório intestinal (Ardite *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que esculetina, 4-metilesculetina, assim como sulfassalazina e prednisolona diminuem o estresse oxidativo no modelo experimental de colite induzida por TNBS, evidenciados pela redução nos níveis de MDA e por evitarem a depleção nos níveis de GSH.

Além das características descritas acima, a glutatona é descrita como o principal antioxidante para o ácido hipocloroso, produzido pelos neutrófilos por ação da enzima mieloperoxidase (Winterbourn & Brennan, 1997), a qual é encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração desse tipo celular e a inflamação tecidual. A MPO catalisa a conversão do anion cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso (HClO) que é secretado durante condições inflamatórias (Loria *et al.*,

2008). Esse ácido é uma poderosa molécula reativa de oxigênio, conhecida por suas propriedades de inativar inibidores das proteases, promovendo um distúrbio do balanço protease-antiprotease com conseqüente degradação da matrix extracelular e dano da mucosa tecidual (Kruidenier & Vespaget, 1998), portanto a MPO está associada a uma atividade pró-oxidativa e pró-inflamatória (Loria *et al.*, 2008). A redução na atividade da enzima mieloperoxidase pode ser interpretada como uma propriedade antiinflamatória dos compostos em teste (Krawisz *et al.*, 1984), indicando uma diminuição na migração de neutrófilos para a área inflamada.

Os neutrófilos são considerados os maiores responsáveis pela lesão tecidual que ocorre nas doenças inflamatórias, pelo fato de que quando ativados produzem radicais livres e o ácido hipocloroso, que estão relacionados com os danos em importantes estruturas biológicas como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos, além de estarem associados com o aumento da resposta inflamatória (Dhiman *et al.*, 2009).

Nossos resultados demonstram que no modelo experimental de colite de fase aguda, os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina, não foram capazes de inibir a atividade da enzima MPO (Figura 11), o que pode ser devido ao processo inflamatório estar em plena atividade 48 horas após a administração do TNBS. Na fase crônica com recidiva deste modelo experimental, os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina promoveram inibição na atividade da enzima MPO na primeira semana após a administração do TNBS, sendo que após a recidiva somente esculetina promoveu tal atividade (Figura 26). Esses resultados corroboram com a análise histológica que demonstrou menor infiltrado de células inflamatórias nos grupos tratados na primeira semana após a indução do processo inflamatório. O fato dos animais tratados com esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina terem inibido a atividade da enzima mieloperoxidase, indica que os compostos em teste apresentam importante atividade antiinflamatória.

Além deste, outro resultado reforça a atividade antiinflamatória das substâncias testes, a inibição da atividade da fosfatase alcalina. A Fosfatase alcalina é uma glicoproteína de membrana ligada ao fosfatidilinositol e compreende uma família de

enzimas que quelam radicais fosfato em pH alcalino. Essa enzima pode ser encontrada em diferentes tipos celulares, incluindo os neutrófilos (Karlsson *et al.*, 1995). No intestino está localizada na membrana com borda em escova e participa do processo de absorção de nutrientes (Sánchez de Medina *et al.*, 2004). A atividade da fosfatase alcalina intestinal não é exclusiva dos enterócitos, mas está presente também nas células da lâmina própria, incluindo neutrófilos e outros leucócitos (Smith *et al.*, 1984). Sua função fisiológica é ainda desconhecida, mas sabe-se que esta enzima fica aumentada no processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 2002). Dentre as funções conhecidas, há evidências de participar do processo de calcificação óssea, transporte de imunoglobulinas através da placenta, transporte de fosfato nas células do epitélio intestinal (Karlsson *et al.*, 1995), podendo ainda estar relacionada com a detoxificação de lipopolissacarídeos (Tuin *et al.*, 2009). Desta forma, a redução na atividade da fosfatase alcalina pode ser interpretada como uma manifestação da atividade antiinflamatória das substâncias em estudo (Sanchez de Medina *et al.*, 2004).

Na fase aguda do modelo experimental estudado, os tratamentos com 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina inibiram a atividade da fosfatase alcalina. Na fase crônica com recidiva, os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina e sulfassalazina inibiram a atividade desta enzima na primeira, segunda e terceira semanas, e a administração de prednisolona também promoveu tal atividade, exceto na terceira semana. Esses resultados corroboram com o observado na análise histológica, pela diminuição do infiltrado de células inflamatórias e reforçam a atividade antiinflamatória de esculetina e 4-metilesculetina.

Sendo as doenças inflamatórias intestinais relacionadas com a destruição tecidual, outro parâmetro avaliado no presente estudo, foi à atividade das metaloproteinases no cólon inflamado. As metaloproteinases (MMPs), compreendem uma família de proteases zinco-dependentes, que participam da degradação e remodelagem da matriz extracelular. Estas enzimas são secretadas como zimógenos inativos por vários tipos de células, como por exemplo, as mesenquimais, células T, monócitos, macrófagos,

neutrófilos, queratinócitos e células tumorais (Pender & MacDonald, 2004). As MMPs estão envolvidas no processo de infiltração celular, ativação de citocinas, migração celular, lesão, remodelagem e reparação tecidual (Pallavi et al., 2009). Estão divididas estruturalmente em subclasses de acordo com o tipo de especificidade com o substrato primário, dentre essas podemos citar as collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -7, -10 e -11), elastases (MMP-12), tipos de membrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) entre outras (MMP-19, -20, -23, -26, -27 e -28) (Pender & MacDonald, 2004).

Em condições normais, as MMPs estão presentes em baixos níveis, geralmente sob a forma latente e a sua regulação pode ocorrer ao nível da transcrição, no ponto de ativação do precursor dos zimógenos, pela interação com componentes específicos da matriz extracelular ou serem inibidas pelas TIMPs (metaloproteinases inibidoras de tecido) (Pender & MacDonald, 2004).

A atividade proteolítica das MMPs é precisamente regulada pelo balanço entre a sua ativação e inibição (Gao et al., 2005). Durante os processos patológicos, ocorre um aumento na atividade das MMPs que não consegue ser regulada pelas TIMPs, resultando em degradação da matriz extracelular e lesão tecidual (Medina & Radomski, 2006). Além disso, algumas MMPs estão relacionadas com a ativação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras proteínas que regulam vários processos inflamatórios e da imunidade (Parks et al., 2004) e estão relacionadas com a patofisiologia das doenças inflamatórias intestinais. De fato, tem sido observado um aumento das MMPs -1, -3 e -9, em homogenatos de tecidos de pacientes com DII e em modelos experimentais, sugerindo que o aumento destas enzimas proteolíticas está associado com desenvolvimento de ulceração, inflamação e formação de fístulas. Em adição, as MMPs podem estar envolvidas no recrutamento de células inflamatórias e na transmigração de linfócitos através das vênulas endoteliais (Medina & Radomski, 2006).

As metaloproteinases do tipo gelatinases, MMP-2 e MMP-9, são descritas por suas funções antagônicas no processo inflamatório intestinal (Pallavi et al., 2009). A MMP-2 é mais comumente expressa em tecido normal adulto e principalmente por células do



estroma, enquanto que a MMP-9 é principalmente sintetizada pelas células inflamatórias, especialmente por leucócitos polimorfonucleares (Gao *et al.*, 2005). Essa protease está ainda associada à migração de neutrófilos, sendo sugerido que esteja ativa durante todo o processo de transmigração (Medina & Radomski, 2006). A MMP-9 é um importante mediador da lesão tecidual na retocolite, ao passo que a MMP-2 exerce atividade protetora contra o dano tecidual, assim como de manter a função de barreira do intestino (Pallavi *et al.*, 2009).

Em geral, estudos demonstram que a MMP-9 participa ativamente do processo que ocorre nas doenças inflamatórias intestinas, especialmente na fase aguda (Gao *et al.*, 2005). De fato, essa MMP tem sido amplamente associada a DII, sendo que a ausência na produção desta protease tem sido significativamente relacionada à menor severidade da doença (Baxter *et al.*, 2008), portanto, compostos que promovam o bloqueio da atividade da MMP-9 intestinal pode ser uma estratégia benéfica para o tratamento destas enfermidades (Pallavi *et al.*, 2009).

Nossos resultados demonstram que as substâncias em teste e os fármacos de referência não foram capazes de promover inibição na atividade da MMP-9 na fase aguda. Porém, na primeira semana no modelo experimental de fase crônica alguns destes tratamentos promoveram diminuição na atividade desta metaloproteinase, particularmente a 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina que promoveram inibição na atividade desta enzima em 61,22%, 84,86% e 54,84%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Apesar dos animais tratados com esculetina não ter diferido estatisticamente do grupo controle, essa substância promoveu uma inibição na atividade desta enzima de 37,41%. Vale ressaltar que o tratamento com 4-metilesculetina promoveu uma inibição superior ao tratamento com sulfassalazina em uma dose dez vezes menor (Figura 31).

A análise zimográfica deste estudo demonstrou que não houve diferença estatística na atividade da MMP-2 entre os animais do grupo branco e os animais do grupo controle, bem como nos animais tratados com as substâncias testes ou os fármacos de referência. Medina *et al.*, (2003) também relatam que não houve diferença

estatística na atividade da MMP-2 entre os grupos branco e colítico, no modelo experimental de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS).

A inibição da MMP-9 pode ser benéfica no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, mesmo que as substâncias testadas promovam diminuição na MMP-2, já que são estruturalmente muito parecidas (Pallavi *et al.*, 2009). No entanto, nossos resultados demonstram que os tratamentos com 4-metilesculetina, assim como com prednisolona e sulfassalazina promoveram inibição da MMP-9 sem interferir com a atividade da MMP-2, indicando que além de inibirem a MMP-9 que é responsável pela injúria, não inibiram a atividade protetora da MMP-2.

A atividade promovida por esculetina e 4-metilesculetina, assim como por sulfassalazina e prednisolona pode ser devida à atividade antioxidante destes compostos, pois é descrito que os radicais livres induzem a MMP-9 e substâncias antioxidantes podem limitar a ação desta protease (Bogani *et al.*, 2007). Em adição, é amplamente descrito que a expressão das MMPs bem como das TIMPs é controlada pelas citocinas pró-inflamatórias, principalmente pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Sternlicht & Werb, 2001; Louis *et al.*, 2000; Sarén *et al.*, 1996), sendo o TNF- $\alpha$  um dos mais importantes indutores da produção de MMPs (Gan *et al.*, 2001; Nee *et al.*, 2004), principalmente da MMP-9 dos neutrófilos (Chakrabarti *et al.*, 2006).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória, multifuncional produzida por monócitos e macrófagos ativados, sendo crucial para a iniciação e continuação do processo inflamatório (Rojas-Cartagena *et al.*, 2005). A liberação do TNF- $\alpha$  por monócitos e linfócitos T é mediada por uma metaloproteinase específica, a TNF- $\alpha$  convertase (TACE). Se a TACE for inativada, o TNF- $\alpha$  não pode ser secretado e permanece inativo (Baert & Rutgeerts, 1999). Quando ativado o TNF- $\alpha$  possui como principais funções a ativação de outros macrófagos, aumento da resposta das células T, da expressão das moléculas de adesão do endotélio vascular, do recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação, estimulação de edema, inativação da coagulação e indução na formação de granulomas. O TNF- $\alpha$  também regula a atividade de outras citocinas pró-inflamatórias como por exemplo, a IL-6 e a IL-1 $\beta$

(Sands & Kaplan, 2007), assim como está relacionado com a liberação da MMP-9 dos neutrófilos, como descrito anteriormente.

O TNF- $\alpha$  é uma das mais importantes citocinas envolvidas na patogênese da doença inflamatória intestinal. O fato de anticorpos monoclonais anti-TNF-alfa produzirem respostas benéficas em pacientes com doença de Crohn e em vários modelos experimentais reforçam esta hipótese (Rojas-Cartagena *et al.*, 2005). Alguns fármacos têm demonstrado atividade na DII por inibirem o TNF- $\alpha$ , como por exemplo a talidomida, que age aumentando a degradação do mRNA para TNF (Baert & Rutgeerts, 1999), além do infliximab, um anti-TNF-alfa quimérico que tem promovido a indução da remissão em mais de 50% dos pacientes com DC (Rojas-Cartagena *et al.*, 2005). Portanto, substâncias que promovam inibição nos níveis de TNF- $\alpha$ , apresentam-se como uma importante estratégia no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Os tratamentos com esculetina e prednisolona, reduziram os níveis de TNF- $\alpha$  tanto no modelo experimental de fase aguda, como na primeira semana de tratamento do experimento crônico. O tratamento com esculetina também promoveu tal atividade após a recidiva do processo inflamatório. Esse resultado promovido por esculetina pode constituir um mecanismo importante em seu efeito antiinflamatório intestinal, dada a relevância desta citocina pró-inflamatória na DII, caracterizando uma diferença marcante no mecanismo de ação de esculetina e 4-metilesculetina.

Apesar de

O tratamento com esculetina ter promovido uma importante redução nos níveis de TNF- $\alpha$ , não inibiu a atividade da MMP-9 em relação ao grupo controle. De fato, somente o tratamento com prednisolona promoveu redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e na atividade da MMP-9. Por outro lado, 4-metilesculetina inibiu a atividade da MMP-9 sem reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  e tal efeito pode estar relacionado à sua atividade antioxidante, pois é relatado que os radicais livres induzem a MMP-9 e substâncias antioxidantes podem limitar a ação destas proteases (Bogani *et al.*, 2007). Em adição, o tratamento com 4-metilesculetina reduziu os níveis de IL-1 $\beta$ , uma citocina também envolvida na liberação das MMPs (Louis *et al.*, 2000).

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células do músculo liso (Ohama *et al.*, 2003). A IL-1 é dividida em dois tipos a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , diferindo em alguns aspectos como por exemplo, a IL-1 $\alpha$  esta associada às membranas de algumas células e possui ação local, enquanto que a IL-1 $\beta$  é secretada e circula sistemicamente. O controle dos níveis de ambas as IL-1 é fortemente regulado pelo seu antagonista o IL-1Ra (Sims & Smith, 2010).

Quanto às funções, a IL-1 $\beta$  está relacionada com a ativação de várias células do processo inflamatório, com o aumento na expressão das moléculas de aderência (Panja *et al.*, 1998), com a liberação do óxido nítrico, da prostaciclina e do fator de agregação plaquetária, além do recrutamento de outras células inflamatórias e de fibroblasto intestinal para a síntese de matriz metaloproteinase (Fina & Pallone, 2008). Outra função da IL-1 $\beta$  quando associada ao TNF- $\alpha$  é desencadear a febre e induzir a síntese hepática de proteínas plasmáticas da inflamação aguda (Camuesco, 2006). Ambas citocinas também promovem alterações nas *tight junctions* e na permeabilidade intestinal (Bauer *et al.*, 2010).

Na DII, o aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  é observado em biopsias humanas e em modelos experimentais (Ligumsky *et al.*, 1990), sendo que tanto a expressão da IL-1 $\alpha$  como da IL-1 $\beta$  está aumentada em pacientes com essas doenças, e a inibição principalmente da IL-1 $\beta$  pode ser benéfica para o tratamento desta grave doença (Sims & Smith, 2010).

Nossos resultados demonstram que os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina e prednisolona reduziram os níveis de IL-1 $\beta$  na primeira semana do modelo experimental de fase crônica, em 58,6%, 53,43% e 65,18%, respectivamente. Vale ressaltar que a redução promovida pelos derivados cumarínicos foi semelhante a promovida por prednisolona e muito superior a sulfassalazina (Figura 30). Após a recidiva esculetina e 4-metilesculetina não promoveram redução nos níveis de IL-1 $\beta$ , porém os fármacos de referência promoveram um aumento nos níveis desta citocina.

O fato do tratamento com prednisolona ter promovido um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , pode estar associado ao desenvolvimento da sensibilidade ao corticóide. É descrito que a resposta aos glicocorticóides pode diminuir em alguns pacientes, sugerindo diferenças na sensibilidade dos indivíduos. Esse fato é observado principalmente no tratamento das recidivas de várias doenças autoimunes como na artrite reumatóide, na asma, bem como na retocolite ulcerativa e na doença de Crohn (van Winsen *et al.*, 2005). Essa diminuição na resposta aos glicocorticóides, está diretamente relacionada com favorecimento no desenvolvimento das recidivas (Franchimont *et al.*, 1999). Além disso, a prednisolona apresenta maior atividade em inibir a liberação de IL-1 do que em promover redução desta citocina no tecido inflamado, demonstrando que os esteróides possuem uma característica dual sobre a atividade desta citocina (Ligumsky *et al.*, 1990).

Quanto ao fato do tratamento com sulfassalazina também promover aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e não apresentar atividade após a recidiva, é descrito por diversos estudos que os aminosalicilatos induzem e mantêm a remissão da retocolite ulcerativa (Sutherland & MacDonald, 2003), porém não exerce tal atividade na DC. Talvez esse fato seja devido à intensidade e as características do processo inflamatório desenvolvido neste modelo experimental, que se assemelham mais a DC do que a RCU.

Assim como observado nos experimentos realizados *in vivo*, esculetina e 4-metilesculetina também promoveram a inibição dos níveis de IL-1 $\beta$  *in vitro*. Esculetina promoveu inibição de 77,7% na concentração de 100 $\mu$ M e 4-metilesculetina promoveu inibição de 83,6% e 87,48%, nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M, respectivamente. A inibição da IL-1 $\beta$  por esculetina *in vitro* poderia estar associada ao efeito citotóxico, pois este composto promoveu a morte de 75% das células de Raw, de modo que estudos de toxicidade precisam ser realizados com este composto.

Além da inibição da IL-1 $\beta$ , 4-metilesculetina também inibiu a secreção de outras citocinas como IL-2, IL-8 e IFN- $\gamma$ , promovendo a inibição de 100% na secreção de IFN- $\gamma$ , na concentração de 100  $\mu$ M. 4-metilesculetina alterou a viabilidade das células de Raw, porém não alterou as demais células, como relatado por Galkin *et al.*, (2009) que

também não observaram redução na viabilidade das células tipo Caco2, por essa substância.

Quanto às funções destas citocinas no processo inflamatório, há evidências de que o IFN- $\gamma$  está relacionado com a alteração da permeabilidade das 'tight junctions' facilitando a transmigração de neutrófilos (Panja *et al.*, 1998). A IL-2 induz a proliferação das células T, sendo este um efeito autócrino, ou seja, sobre as mesmas células que as produzem, mas também exercem efeitos sobre outras células (Rogler & Andus, 1998). A IL-8 é secretada por macrófagos e células endoteliais, sendo um poderoso quimioatratador e ativador de neutrófilos e seus níveis estão correlacionados com a intensidade da lesão, especialmente em pacientes com RCU (Rogler & Andus, 1998).

Assim como o observado em nossos estudos, algumas moléculas com atividade antioxidante, têm demonstrado inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias em linhagens celulares humanas e animais (Reimund *et al.*, 1998). Recentes estratégias para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais têm priorizado a inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e o estímulo da IL-10 que é uma citocina antiinflamatória, porém outras citocinas também devem ser consideradas (Rogler & Andus, 1998).

Estes resultados sugerem que além do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , sendo esta última reduzida *in vivo* e *in vitro*, que a atividade de esculetina e 4-metilesculetina possa estar relacionada com a inibição de outras citocinas pró-inflamatórias, conforme sugerido pelos resultados *in vitro*. De fato, a redução destas duas importantes citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , reforçam ainda mais a atenção para esses dois compostos, para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Quanto aos parâmetros macroscópicos, o processo inflamatório colônico está associado a um aumento da relação peso/comprimento deste tecido, além da ocorrência de diarreia, aderência, redução no consumo de alimento e conseqüente redução no peso corpóreo.

O modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS, promove a perda de 8 a 10% do peso corpóreo observado principalmente após uma semana da administração do TNBS (Morris *et al.*, 1989), isso está relacionado com a redução no

consumo alimentar que é uma consequência da dor abdominal e da diarreia durante a fase ativa da doença (Campos *et al.*, 2002), sendo necessário um período de recuperação para que os animais restabeleçam o consumo de alimento e o peso corporal (Morris *et al.*, 1989).

Em nossos estudos, a diferença estatística no ganho de peso entre os grupos branco e controle foi observada nos dois protocolos experimentais, durante todos os dias. Quanto aos tratamentos, no modelo agudo, os animais que receberam 4-metilesculetina e prednisolona restabeleceram o consumo de alimento e o ganho de peso corpóreo mesmo após a administração do TNBS. No modelo experimental de fase crônica, os animais tratados com esculetina e 4-metilesculetina tiveram um ganho de peso superior aos animais tratados com os fármacos de referência na primeira, segunda e terceira semanas de tratamento (figura 19). Todos os tratamentos promoveram um maior consumo de ração em relação ao grupo controle, na primeira semana após a indução do processo inflamatório. Os derivados cumarínicos e a sulfassalazina promoveram um maior consumo na segunda semana, e na terceira semana o consumo foi restabelecido, não havendo diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 18).

A diarreia é um importante sintoma da doença tanto nos animais como em humanos, e indica uma perda da capacidade absorptiva do cólon, que fica bastante prejudicada durante o processo inflamatório colônico (Sánchez de Medina *et al.*, 2002). Além disso, ocorre a aderência do cólon a órgãos adjacentes que é o resultado da inflamação transmural, característica comum à doença de Crohn (Levine, 1994). Nossos resultados demonstram que no modelo experimental de fase aguda, somente o tratamento com prednisolona foi capaz de diminuir a incidência de aderência. No entanto, no modelo experimental de fase crônica com recidiva, na primeira semana, tanto os tratamentos com prednisolona e como com esculetina promoveram diminuição na ocorrência de diarreia e os animais que receberam 4-metilesculetina e prednisolona apresentaram diminuição na incidência de aderência.

De fato, os glicocorticóides são descritos por sua habilidade em reduzir a diarreia na retocolite ulcerativa em humanos, devido aos efeitos diretos no cólon distal

promovendo o aumento na absorção de sódio e de água, conseqüência das propriedades antiinflamatórias desta classe de medicamentos (Sandle *et al.*, 1986). Esse resultado demonstra que esculetina também apresenta esta habilidade e confirma sua importante atividade antiinflamatória.

O aumento do peso do tecido inflamado indica a severidade e extensão da lesão inflamatória (Rachmilewitz *et al.*, 1989), portanto a relação peso/comprimento colônico fica aumentada nos animais que recebem TNBS. Somente o tratamento com 4-metilesculetina, na segunda semana do experimento de fase crônica, foi capaz de diminuir a relação peso /comprimento colônico (tabela 3). De fato este parâmetro é difícil de ser revertido por tratamento farmacológico, pois a lesão deste modelo experimental é severa e extensa (Veljaca *et al.*, 1995), conseqüentemente, isto também ocorre com os parâmetros de escore macroscópico e extensão da lesão.

De fato, poucas diferenças estatísticas foram observadas nestes parâmetros, porém é possível observar que as substâncias em estudo foram capazes de promover uma melhora considerável, apesar de somente o tratamento com prednisolona diferir estatisticamente do grupo controle quanto ao escore macroscópico, na fase experimental aguda. No experimento de fase crônica, na primeira semana, apesar de não haver diferença estatística, os tratamentos com esculetina e 4-metilesculetina promoveram uma inibição no escore macroscópico superior ao promovido por sulfassalazina. Após a recidiva do processo inflamatório, o tratamento com 4-metilesculetina promoveu uma inibição de 37,5% no escore macroscópico e de 49% na extensão da lesão, enquanto que os animais que receberam esculetina apresentaram uma inibição de 75% no escore macroscópico e de 70% na extensão da lesão, sendo esses valores superiores à inibição promovida por prednisolona e sulfassalazina (Tabela 10 anexo).

Interessantes estratégias terapêuticas para a DII são aquelas que restauram a integridade e a função do epitélio intestinal ou atenuam a inflamação da mucosa (Kruidenier & Vespaget, 1998). Nossos resultados confirmam novamente que os derivados cumarínicos testados podem ser potencialmente úteis para esta finalidade.



Histologicamente, a doença inflamatória intestinal é caracterizada pela infiltração de um grande número de células como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos na camada mucosa e lâmina própria. O infiltrado inflamatório é acompanhado de lesão na mucosa, aumento da permeabilidade vascular, rompimento da matriz extracelular, edema, dano nas células epiteliais e ulceração (Yamada & Grisham, 1994). De modo geral, os animais tratados com 4-metilesculetina e prednisolona apresentaram um menor dano tecidual com menor presença de infiltrado inflamatório na fase aguda, o que pode ser observado pela diminuição do escore microscópico de 39 e 42%, respectivamente (tabela 10 anexo). Na fase crônica na primeira semana, 4-metilesculetina promoveu uma diminuição no escore microscópico de 46%, sendo esta superior à diminuição promovida pela prednisolona que foi de 28%. Os tratamentos com esculetina e sulfassalazina promoveram menor ulceração e infiltrado inflamatório em relação ao grupo controle, sendo essa inibição semelhante às duas substâncias. Na terceira semana após a recidiva, o tratamento com 4-metilesculetina promoveu melhora em quase todos os parâmetros avaliados, sendo superior aos resultados promovidos pela administração de esculetina, prednisolona e sulfassalazina, o que pode ser observado pela redução de 52,7% no escore microscópico em relação ao grupo controle.

A melhora nos parâmetros microscópicos, como menor infiltrado inflamatório e ulceração nos grupos tratados com os derivados cumarínicos, reforça a atividade antiinflamatória observada também bioquimicamente, pela diminuição da FA, MPO e redução nos níveis das citocinas avaliadas.

Outro parâmetro avaliado microscopicamente, foi a ocorrência de apoptose das células epiteliais das criptas colônica. A apoptose é a execução programada da morte celular, processo essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase. É caracterizado por diversas alterações morfológicas, fenotípicas e bioquímicas, que incluem diminuição no tamanho da célula, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, ativação da caspase e formação de corpos apoptóticos (Sturm, 2008).

A apoptose pode ser controlada por diferentes vias, como por exemplo, pela cascata da caspase, pelas proteínas da família do gene bcl-2, onde bcl-2 e bcl-xl são

potentes inibidoras da apoptose, e bax e bcl-xs são importantes moléculas pró-apoptóticas (Ruemmele *et al.*, 2002). Existem também os genes que codificam as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), cujo principal mecanismo está na inibição das caspases (Levine, 2000). Outro fator associado à indução da apoptose das células epiteliais intestinais são as citocinas TNF- $\alpha$  e o INF- $\gamma$ . Estudos demonstram que estas citocinas especialmente em associação, possuem atividade de induzir a apoptose em células epiteliais humanas e de ratos, sendo a cascata da caspase diretamente ativada em resposta ao TNF- $\alpha$  (Ruemmele *et al.*, 2002). Além disso, o TNF possui a atividade de aumentar a produção de INF- $\gamma$  e de recrutar as células inflamatórias para o local da inflamação intestinal. Esse fato induz ao estresse oxidativo, ao dano no DNA e conseqüentemente à apoptose das células epiteliais (Cliffe *et al.*, 2007).

Na retocolite ulcerativa a apoptose das células epiteliais é mediada principalmente pelo sistema imune. É observado nesta doença um grande número de células apoptóticas na parte superior das vilosidades e das criptas. A ocorrência de apoptose nas células prematuras, causa a proliferação de células imaturas na cripta, o que acarreta em perda da funcionalidade do epitélio intestinal, sendo esse fato responsável pela má absorção, ocorrência de diarreia, dor e distensão abdominal (Ruemmele *et al.*, 2002), portanto, a apoptose das células epiteliais das criptas esta diretamente relacionada com a perda do epitélio colônico na RCU ativa (Iwamoto *et al.*, 1996).

Na DC, a freqüência da apoptose das células epiteliais está fortemente associada com a expressão da xantina oxidase, que pode estar relacionada com o excesso de produção de superóxido (Kruidenier *et al.*, 2003). Além disso, nos pacientes com DC é observada uma regulação defeituosa da apoptose das células T. Os linfócitos da lâmina própria dos pacientes com essa doença apresentam bcl-2 e bcl-xl, que protegem essas células da apoptose. Essa resistência à apoptose dos linfócitos T na DC tem sido relacionada com a via de sinalização da interlucina-6 e estudos relatam que o bloqueio desta via em modelos experimentais de DII, tem demonstrado uma redução no processo inflamatório (Ruemmele *et al.*, 2002).

Existe ampla evidência da associação da apoptose com diversos processos de estresse oxidativo. A exposição da célula a baixas doses de espécies reativas de oxigênio ou a depleção dos antioxidantes celulares tem sido associada à ocorrência de apoptose. Outro fator que reforça essa hipótese é o fato da apoptose poder ser bloqueada por compostos antioxidantes (Kruiderier *et al.*, 2003).

A inibição da apoptose patológica das células epiteliais intestinais, pode ser uma importante estratégia no tratamento sintomático da severa diarreia que ocorre nos pacientes com RCU (Ruemmele *et al.*, 2002), além de evitar a destruição tecidual e a atrofia das vilosidades que estão relacionadas com a patologia das doenças inflamatórias intestinais (Edelblum *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstram que os animais do grupo controle, em todos os protocolos experimentais, apresentaram um número maior de células apoptóticas quando comparados aos animais do grupo branco (não-colítico), demonstrando que neste modelo experimental de DII induzida pelo TNBS, ocorre um aumento da apoptose das células epiteliais da cripta intestinal.

Quanto aos tratamentos, no modelo experimental de fase aguda, somente esculetina foi capaz de diminuir o número de células apoptóticas em relação ao grupo controle. Porém, no experimento de fase crônica com recidiva, os tratamentos com esculetina, 4-metilesculetina, assim como com prednisolona e sulfassalazina promoveram diminuição significativa no número de células epiteliais apoptóticas em relação ao grupo controle, nas três semanas avaliadas.

Estudos demonstram que o tratamento com anti-TNF também reduz a apoptose de células epiteliais (Edelblum *et al.*, 2006). De fato, como descrito anteriormente, o TNF- $\alpha$  está relacionado com a indução da apoptose destas células, porém nossos resultados indicam que somente esculetina inibiu os níveis de TNF- $\alpha$  e a apoptose, no experimento de fase aguda. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a atividade inibitória da apoptose das células epiteliais deve estar associada principalmente à propriedade antioxidante dos compostos testados, principalmente para esculetina, 4-metilesculetina e sulfassalazina. Porém, no caso da prednisolona essa atividade pode

estar relacionada com a atividade antioxidante e com a inibição do NF- $\kappa$ B, conforme demonstrado por Goke *et al.*, (2002).

Com base em um resumo geral de todos os resultados obtidos (tabela 12 do anexo), é possível fazer algumas considerações importantes.

As novas substâncias em teste assim como os fármacos de referência mais utilizados na clínica, prednisolona e sulfassalazina não foram capazes de alterar todos os parâmetros avaliados neste estudo. De fato, não existe até o momento nenhuma droga capaz de alterar todas as etapas do processo inflamatório nos modelos experimentais de DII (Ballester *et al.*, 2005).

Dos diversos parâmetros avaliados pelas substâncias testes e pelos fármacos de referência, foi possível observar que poucos diferiram estatisticamente do grupo controle na segunda semana após a primeira administração do TNBS, no modelo experimental de fase crônica. Isso se deve ao fato de que esse modelo experimental é caracterizado por uma recuperação natural da inflamação e da injúria com o passar das semanas, conforme também observado por outros estudos (Appleyard & Wallace, 1995; Di Stasi *et al.*, 2004; Videla *et al.*, 1998).

No presente estudo, foi possível observar que o tratamento com prednisolona promoveu resultados muito superiores à sulfassalazina, nos dois protocolos experimentais, demonstrando que este fármaco pode ser preferencialmente usado como droga de referência para este modelo experimental.

A importante atividade promovida por esculetina e 4-metilesculetina foi muito superior à promovida por sulfassalazina e semelhante de prednisolona. Vale ressaltar a importância destes resultados, já que esses derivados cumarínicos foram utilizados na dose de 5mg/Kg e sulfassalazina na dose de 50mg/Kg, ou seja uma dose 10 vezes menor. Após a recidiva, esculetina promoveu resultados superiores a 4-metilesculetina, prednisolona e sulfassalazina, pois foi a única substância que reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ , além de manter superiores os níveis GSH e a maior redução nos níveis de MPO e FA.

Diferentemente do observado em nosso estudo anterior (Witaicenis *et al.*, 2010/anexo), no presente estudo não foi possível observar a superioridade de atividade de 4-metilesculetina em relação à esculetina. Vale ressaltar que neste estudo, foram incluídos vários outros parâmetros para avaliação do processo inflamatório intestinal, e com base em todos estes, não foi possível observar diferença na atividade antiinflamatória promovida por esses derivados cumarínicos, exceto após a recidiva, onde esculetina apresentou atividade superior. Isso indica que essas substâncias podem ter um mecanismo de ação semelhante, demonstrando que ambas são promissoras para continuação dos estudos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

O processo inflamatório intestinal é uma cascata complexa que acarreta no desenvolvimento das lesões (Louis *et al.*, 2000), portanto não é possível descrever a ordem dos eventos, e o mecanismo de ação pelo qual esculetina e 4-metilesculetina estão agindo, mas é possível fazer algumas considerações.

É possível inferir que esculetina e 4-metilesculetina agem de modo semelhante, porém a diferença marcante observada foi que esculetina reduz os níveis de TNF- $\alpha$  e 4-metilesculetina não altera este parâmetro. A importante atividade antiinflamatória pode estar relacionada com a modulação do sistema imune, principalmente com a inibição das citocinas pró-inflamatórias, demonstradas no estudo *in vivo* e sugerida nos estudos *in vitro*. Essa inibição pode ser responsável pela diminuição do infiltrado inflamatório, observada histologicamente e confirmada pela diminuição na atividade das enzimas MPO, FA e MMP-9, o que acarreta consequentemente em menor estresse oxidativo, demonstrado pela diminuição nos níveis de MDA e na ocorrência de apoptose das células epiteliais.

Além disso, a atividade antiinflamatória demonstrada por esculetina e 4-metilesculetina pode estar relacionada com a atividade antioxidante destes compostos. De fato, esses derivados cumarínicos estão descritos como uma das mais potentes cumarinas antioxidantes (Payá *et al.*, 1992), assim também como confirmado em nosso estudo anterior (Witaicenis *et al.*, 2010).

Provavelmente os efeitos produzidos por esculetina e 4-metilesculetina decorrem de vários processos simultâneos que culminam com a atividade antiinflamatória em uma dose tão baixa, o que nos impulsiona a continuação do estudo com essas duas promissoras substâncias para o tratamento desta grave e incurável doença.

*Conclusão*

Com base nos objetivos propostos, nos resultados e discussões apresentadas, foi possível concluir que:

- 1) Esculetina e 4-metilesculetina, na dose de 5mg/Kg, apresentam importante atividade antiinflamatória no modelo de doença inflamatória induzida por TNBS em ratos.
- 2) A atividade antiinflamatória observada se deve principalmente, a inibição de IL-1 $\beta$  por ambas as substâncias e de TNF- $\alpha$  por esculetina, confirmada histologicamente e pela redução na atividade das enzimas MPO, FA e MMP-9.
- 3) A atividade antiinflamatória também deve estar relacionada à atividade antioxidante dos compostos, observada pela diminuição nos níveis de MDA, por evitar a depleção de GSH e pela diminuição na apoptose das células epiteliais.
- 4) O mecanismo de ação de esculetina e 4-metilesculetina são semelhantes, porém esculetina age inibindo o TNF- $\alpha$  e 4-metilesculetina não altera os níveis desta citocina.
- 5) Prednisolona pode ser usada preferencialmente como melhor fármaco de referência neste modelo experimental.
- 6) A metaloproteinase 9 é um importante marcador do processo inflamatório no modelo de doença inflamatória induzida por TNBS em ratos
- 7) Os resultados observados por esse estudo demonstram que esculetina e 4-metilesculetina apresentaram resultados superiores à sulfassalazina e semelhantes à prednisolona no modelo experimental de DII.



## Referências



ABRAHAM, C. & CHO, J.H. Inflammatory Bowel Disease. **N Engl. J. Med.**, v.361, p.2066-78, 2009.

ALONSO, V.; LINARES, V.; BELLÉS, M.; ALBINA, M.L.; SIRVENT, J.J.; DOMINGO, J.L.; SÁNCHEZ, D.J. Sulfasalazine induced oxidative stress: A possible mechanism of male infertility. **Reproductive Toxicology.**, v.27, p.35-40, 2009.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Meth. Enzymol.**, v.113, p.548-555, 1985.

ANDUS, T. & TARGAN, S.R. "Glucocorticoids". In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside.**, S.R. Targan and F. Shanahan eds., pp 487-502, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

APPLEYARD, C.B. & WALLACE, J.L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by antiinflammatory drugs. **Am. J. Physiol.**, v.269, p. 119-125, 1995.

ARDITE, E.; SANS, M.; PANÉS, J.; ROMERO, F.J.; PIQUÉ, J.M.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. **Lab Invest.**, v. 80, n.5, p.735-744, 2000.

BAERT, F.J. & RUTGEERTS, P.R. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. **Int. J. Colorect. Dis.**, v.14, p.47-51, 1999.

BALLESTER, I.; GONZÁLEZ, R.; NIETO, A.; ZARZUELO, A.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Monochloramine induces acute and protracted colitis in the rat: Response to pharmacological treatment. **Life Sciences.**, v.76, p.2965-2980, 2005.

BARBER, S.C.; HIGGINBOTTOM, A.; MEAD, R.J.; BARBER, S.; SHAW, P.J. An in vitro screening cascade to identify neuroprotective antioxidants in ALS. **Free Radical Biology & Medicine.**, v.46, p. 1127-1138, 2009.

BAUER, C.; DUEWELL, P.; MAYER, C.; LEHR, H.A.; FITZGERALD, K.A.; DAUER, M.; TSCHOPP, J.; ENDRES, S.; LATZ, E.; SCHNURR, M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. **Gut.**, p.1-8, 2010.

BAXTER, R.; HOFFMAN, A.; KIM, I.Y.; NASAR, A.; SHANTHA, K.H.; FOSTER, M.; HOFFMAN, K.; WHELAN, R.L. Murine colitis is inhibited in mmp-9 knockout mice: the addition of IGFBP-3 overexpression does not further decrease disease severity. **Gastroenterology.**, v.134, n.4, S.1,p.910, 2008.

BELL, C.J.; GALL, D.G.; WALLACE J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am. J. Physiol.**, 268, G622-G630, 1995.

BERNSTEIN, C.N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J.H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S.; GEARRY, R.; GOH, K.L.; HAMID, S.; KHAN, A.G.; LEMAIR, A.W.; MALFERTHEINER, OUYANG, Q.; REY, J.F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; THOMSEN, O.O.; THOMSON, A.; WATERMEYER, G. World Gastroenterology Organization

Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. **Inflamm Bowel Dis.**, v.16, n.1, 2010.

BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of seru. **J. Biol. Chem.**, v.164, p-321-329, 1946.

BETTINI, V.; CALÒ, L.; CANTARO, S.; MARTINO, R.; MUNARI, L.; SALVATICO, E.; TON, P. Liberation of prostaglandin-like substances from the isolated coronary artery in presence of angiotensin and of 4-methylesculetin. **Acta Vitaminol Enzymol.**, v.7, p.257-267, 1985.

BETTINI, V.; CALÒ, L.; CANTARO, S.; MARTINO, R.; MUNARI, L.; SALVATICO, E.; TON, P. Liberation of prostaglandin-like substances from the isolated coronary artery in presence of angiotensin and of 4-methylesculetin. **Acta Vitaminol Enzymol.**, v.7, n.3-4, p.257-67, 1985.

BETTINI, V.; GAMBA, G.; GUIDO, A.; LEGRENZI, E.; MAYELLARO, F. Effect of a bioflavinoid (4-methylesculetin) on the response of calf hepatic arteries to serotonin in the presence of indomethacin. **Boll Soc Ital Biol Sper.**, v.30, n.59, p.1231-1235, 1983.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev bras Coloproct.**,v.23, n.3, p.172-182, 2003.

BOGANI, P.; CANAVESI, M.; HAGEN, T.M.; VISIOLI, F.; BELLOSTA, S. Thiol supplementation inhibits metalloproteinase activity independent of glutathione status. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v.363, p.651-655, 2007.

BOUMA, G. & STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology.**, v.3, p.521-533, 2003.

BOYKO, E.J.; PERERA, D.R.; KOESELL, T.D.; KEANE, E.M.; INUI, T.S. Coffee and alcohol use and the risk of ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology.**, v.84, n.5, p.530-534, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **J. Biol. Chem.**,v.164, p.321-329, 1976.

BRANDI, M.T.; RIBEIRO, M.S.; CHEBLI, L.A.; FRANCO, M.B.; PINTO, A.L.; GABURRI, P.D.; ZANINI, A.; CHEBLI, J.M. Psychological distress in Brazilian Crohn's disease patients: Screening, prevalence, and risk factors. **Med Sci Monit.**, v.15, n.8, 2009.

BUNFFINTON, G.D. & DOE, W.F. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine.**, v.19, n.6, p.911- 918, 1995.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; TEIXEIRA, M.G.; MUSCERINO, D.R.; HABRAGAMA, A.; KISS, D.R. Inflammatory bowel diseases, principles of nutritional therapy. **Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.**, v.57, n.4, p-187-198, 2002.

CAMUESCO, D. Efecto de la quercetrina asociada a ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ 3 en el modelo de colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico em ratas. Granada: **Tese de doutorado**, 2006.

CARTER, M.J.; LOBO, A.J.; TRAVIS, S.P.L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut.**, v.53, p.v1-v16, 2004. doi: 10.1136/gut.2004.043372.

CAVANAUGH, J.A. & PAVLI, P. Ulcerative colitis: a genetic disease? **Baillière's Clinical Gastroenterology.**, v.11, n 1, 1997.

CHAKRABARTI, S.; ZEE, J.M.; PATEL, K.D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. **J. Leukoc. Biol.**, v.79, p.214-222, 2006.

CHICHLAWSKI, M. & HALE, L.P. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease—an alliance gone bad. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.295, p.G1139-G1149, 2008.

CLIFFE, L.J.; POTTEN, C.S.; BOOTH, C.E.; GRENCIS, R.K. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. **Infection and Immunity.**, v.75, n.4, p.1556-1564, 2007.

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

COOK, N.C. & SAMMAN, C. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutr. Biochem.**, v.7, p.66-76, 1995.

COPE, G.F.; HEATLEY, R.V.; KELLEHER, J. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. **Br. Med. J.**, v.293, p.481, 1986.

CORNISH, J.A.; TAN, E.; SIMILLIS, C.; CLARK, S.K.; TEARE, J.; TEKKIS, P.P. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.103, p.2394-2400, 2008.

CRESPO, M. E.; GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; OCETE, M. A; ZARZUELO.,A. Anti inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rats colitis induced by TNBS. **Planta med.**, v.65, p.651-653,1999.

CRUZ, T.; GÁLVEZ, J.; CRESPO, E.; OCETE, M.A.; ZARZUELO.A. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta med.**, v.67, p.94-96,2001.

CUZZOCREA, S.; MC DONALD, M.C; MASÓN, E.; DUGO, L.; LEPORE, V.; FONTI, M.T.; CICCULO, A.; TERRANOVA, M.L.; CAPUTI, A.P.; THIEMERMANN,C. Tempol. a

membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.406, p.27-37, 2000.

DAGLI, U.; BALK, M.; YUCEL, D.; ULKER, A.; OVER, H.; SAYDAM, G.; SAHIN, B. The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis. **Inflammatory bowel disease.**, v.3, n.3, p.260-264, 1997.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity Reviews.**, v.3, p.394- 400, 2004.

DECLERCQ, C.; GOWER-ROUSSEAU, C.; VERNIER-MASSOUILLE, G.; SALLERON, J.; BALDE, M.; POIRIER, G.; LEREBOURS, E.; DUPAS, J.L.; MERLE, V.; MARTI, R.; DUHAMEL, A.; CORTOT, A.; SALOMEZ, J.L.; COLOMBEL, J.F. Mapping of inflammatory bowel disease in northern france: spatial variations and relation to affluence. **Inflamm. Bowel Dis.**, 2009. DOI 10.1002/ibd.21111.

DELEVE, L.D. & KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol. Ther.**, v.52, p.287-305, 1991.

DEWULF, N.L.S. **Investigação sobre a adesão ao tratamento medicamentoso em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais.** Ribeirão Preto, 2005.

DHIMAN, M.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; PANDO, J.M.; RAMIREZ-AGUILAR, F.J.; SPRATT, H.; VAZQUEZ-CORZO, S.; PEREZ-MOLINA, G.; GALLEGOS-SANDOVAL, R.; MORENO, R.; GARG, N.J. Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. **Clinical and Vaccine Immunology.**, p.660-666, 2009.

DI STASI, L.C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v.70, p.315-320, 2004.

DI STASI, L.C.; SEITO, L.N.; GONZALEZ, F.G.; VILEGAS, W. Antiulcerogenic activity of paepalantine from *Paepalanthus bromelioides* in mice models. **50<sup>th</sup> Annual Congress of Society of Medicinal Plant Research.**, no período de 4-8 de setembro de 2002, Barcelona-España, 84, 2002.

DRYDEN, G.W.; DEACIUC, I.; ARTEEL, G.; MCCLAIN, C.J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Current Gastroenterology Reports.**, v.7, p.308-316, 2005.

EDELBLUM, K.L. & TURNER, J.R. The tight junction in inflammatory disease: communication. breakdown. **Current Opinion in Pharmacology.**, v.9, p.715-720, 2009.

EDELBLUM, K.L.; YAN, F.; YAMAOKA, T.; POLK, D.B. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.12, p.413-424, 2006.

EGAN, D.; O'KENNEDY, R.; MORAN, E.; COX, D.; PROSSER, E.; THORNES, R.D. The pharmacology, metabolism analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug Metab. Rev.**, v 22, p 503-529, 1990.

FEULGEN, R. & ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seylers' Zeitschrift für Physiologische Chemie.**, v.135, p.203-248, 1924.

FINA, D. & PALLONE, F. What is the role of cytokines and chemokines in IBD? **Inflamm. Bowel Dis.**, v.14, n.S2, 2008.

FOLIGNÉ, B.; NUTTEN, S.; STEIDLER, L.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; MERCENIER, A.; POT, B. Recommendations for Improved Use of the Murine TNBS-Induced Colitis Model in Evaluating Anti-inflammatory Properties of Lactic Acid Bacteria: Technical and Microbiological Aspects. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.51, n.2, p. 390-400, 2006.

FORMICA, J.V. & REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food-Chem. Toxic.**, v.33, p.1061-1080, 1995.

FRANCHIMONT, D.; LOUIS, E.; DUPONT, P.; VRINDTS-GEVAERT, Y.; DEWE, W.; CHROUSOS, G.; GEENEN, V.; BELAICHE, J. Decreased corticoid sensitivity in quiescent Crohn's disease: an ex vivo study using whole blood cell cultures. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.44, n.6, p.1208-1215, 1999.

GALKIN, A.; FALLARERO, A.; VUORELA, P.M. Coumarins permeability in Caco-2 cell model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.**, v. 61, p. 177-184, 2009.

GÁLVEZ, J.; CRUZ, T.; CRESPO, M.E.; OCETE, M.A.; LORENTE, M.D.; SANCHEZ DE MEDINA, F.; ZARZUELO, A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. **Planta Medica.**, v.63, p.409-414, 1997.

GÁLVEZ, J.; GRACIOSO, J.S.; CAMUESCO, D.; GÁLVEZ, J.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; ZARZUELO, A. Intestinal anti-inflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. **Fitoterapia.**, v.77, p.515-520, 2006.

GÁLVEZ, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA F.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Studies in natural products chemistry, v. 25. Bioactive natural products (Part f). **Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders.** In: Atta-ur-Rahman, editor. Amsterdam: Elsevier, p.607-49, 2001.

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

GAN, X.; WONG, B.; WRIGHT, S.D.; CAI, T.Q. Production of matrix metalloproteinase-9 in Caco-2 cells in response to inflammatory stimuli. **Journal of Interferon and Cytokine Research.**, v.21, p.93-98, 2001.

GAO, Q.; MEIJER, M.J.W.; KUBBEN, F.J.G.M.; SIER, C.F.M.; KRUIDENIER, L.; DUIJN, W.; BERG, M.; HOGEZAND, R.A.; LAMERS, C.B.H.W.; VERSPAGET, H.W.

Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Dig Liver Dis.**, v.37, p.584-592, 2005.

GARCIA-ARGAEZ, A.N.; APAN, T.O.R.; DELGADO, H.P.; VELASQUEZ, G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. **Planta Med.**, v.66, p.279-281, 2000.

GARG, P.; VIJAY-KUMAR, M.; WANG, L.; GEWIRTZ, A.T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S.V.; Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.296, p.G175-G184, 2009. doi:10.1152/ajpgi.90454.2008

GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.**, v.63, p.169-172, 1990.

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

GÖKE, M.N.; SCHNEIDER, M.; BEIL, W.; MANNS, M.P. Differential glucocorticoid effects on repair mechanisms and NF- $\kappa$ B activity in the intestinal epithelium. **Regulatory Peptides.**, v.105, p.203-214, 2002.

GONÇALVES, C.C.M.; HERNANDES, L.; OLIVEIRA, N.L.B.; NATALI, M.R.M. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. **Cienc Cuid Saúde.**, v.7, n. 1, p.107-111, 2008.

GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **International Journal Of Vitamin And Nutrition Research.**, v.71, n.4, p.243-250, 2001.

GROSCWITZ, K.R. & HOGAN, S.P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, v.124, n.1, p.3-20, 2009.

HAJIME, M.; SHUICHI, Y.; MAKOTO, N.; MASANORI, Y.; IKUKO, K.; ATSUSHI, K.; MUTSUO, S.; KEIICHI, T. Inhibitory effect of 4-methylesculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. **Int. J. Cancer.**, v.120, p.2704-2709, 2007.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J.**, v.219, p.1-14, 1984

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis.**, v.23, s.1, p.118-126, 1993.

HELIÖ, T.; HALME, L.; LAPPALAINEN, M.; FODSTAD, H.; PAAVOLA-SAKKI, P.; TURUNEN, U.; FÄRKKILÄ, M.; KRUSIUS, T.; KONTULA, K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. **Gut.**, v.52, p.558-562, 2003.

- HOLMES, E.W.; YONG, S.L.; EIZNHAMER, D.; KESHAVARZIAN, A. Glutathione content of colonic mucosa evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.43, n.5, p.1088-1095, 1998.
- HOULT, J.R.S. & PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. **Gen. Pharmacol.**, v.27, n.4, p.713-722, 1996.
- HU, Y.; CHEN, X.; DUAN, H.; HU, Y.; MU, X. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB2 in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v.31, n.4, p.550-555, 2009.
- HYUN, J.G. & MAYER, L. Mechanisms underlying inflammatory bowel disease. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.**, v.3, n.4, 2006.
- INOHARA, N.; OGURA, Y.; CHEN, F.F.; MUTO, A.; NUNEZ, G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. **J Biol Chem.**, v.276, p.2551-2554, 2001.
- ISHIHARA, S.; AZIZ, M.M.; YUKI, T.; KAZUMORI, H.; KINOSHITA, Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. **J Gastroenterol.**, v.44, p.1097-1108, 2009.
- ISHIYAMA, M.; TOMINAGA, H.; SHIGA, M.; SASAMOTO, K.; OHKURA, Y.; UENO, K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. **Biol.Pharm. Bull.**, v.19, p.1518-1520, 1996.
- IWAMOTO, M.; KOJI, T.; MAKIYAMA, K.; KOBAYASHI, N.; NAKANE, P.K. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. **Journal of Pathology.**, v.180, p.152-159, 1996.
- JURJUS, A.R.; KHOURY, N.N.; REIMUND, J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. **J.Pharmacol Toxicol Methods.**, v.50, p.81-92, 2004.
- KANEKO, T.; TAHARA, S.; TAKABAYASHI, F. Supresión of lipid hydroperoxide-induced oxidative damage to cellular DNA by esculetin. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, p.840-844, 2003.
- KARLSSON, A.; KHALFAN, L.; DAHLGREN, C.; STIGBRAND, T.; FOLLIN, P. Neutrophil alkaline phosphatase activity increase in bacterial infections is not associated with a general increase in secretory vesicle membrane components. **Infection and Immunity.**, v.63, n.3, p.911-916, 1995.
- KARP, S.M. & KOCH, T.R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Dis. Mon.**, v.52, p.199-207, 2006.
- KIM, S.H.; KANG, K.A.; ZHANG, R.; PIAO, M.J.; KO, D.O.; WANG, Z.H.; CHAE, S.W.; KANG, S.S.; LEE, K.H.; KANG, H.K.; KANG, H.W.; HYUN, J.W. Protective



effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta pharmacol sin.**, v.29, n.11, p.1319-26, 2008.

KOK, S.H.; YEH, C.C.; CHEN, M.L.; KUO, M.Y.P. Esculetin enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral cancer SAS cells. **Oral Oncol.**, (2009) doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.018

KOUTROUBAKIS, I.E.; MALLIARAKI, N.; DIMOULIOS, P.D.; KARMIRIS, K.; CASTANAS, E.; KOUROUMALIS, E.A. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences.**, v.49, n.9, p.1433-1437, 2004.

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

KRUIDENIER, L. & VERSPAGET, H.W. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? **Mediators of Inflammation.**, v.7, n.157-162, 1998.

KRUIDENIER, L. & VERSPAGET, H.W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? **Aliment Pharmacol. Ther.**, v.16, p.1997-2015, 2002.

KRUIDENIER, L.; KUIPER, I.; LAMERS, C.B.H.W.; VERSPAGET, H.W.; Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. **Journal of Pathology.**, v.201, p.28-36, 2003.

KUSTER, R.M. & ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.**, 2.ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.451-469, 2000.

LAKATOS, P.L.; FISCHER, S.; LAKATOS, L.; GAL, I.; PAPP J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? **World J Gastroenterol.**, v.12, n.12, p.1829-1841, 2006.

LAUTERBURG, B.H.; BILZER, M.; ROWEDDER, E.; INAUEN, W. Decreased glutathione in inflamed colonic mucosa in man. A possible role of hypochlorous acid and prevention by 5-aminosalicylic acid. In MacDERMOTT (Ed.). **Inflammatory bowel disease: current status and future approach.** Amsterdam: Elsevier Science, p.273-277, 1988.

LEUNG, K.N.; LEUNG, P.Y.; KONG, L.P.; LEUNG P.K. Immunomodulatory effects of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) on murine lymphocytes and peritoneal macrophages. **Mol. Immunol.**, v.2, p.181-188, 2005.

LEVINE, A.D. Apoptosis: implications for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases.**, v.6, n.3, p.191-205, 2000.

- LEVINE, D.S. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**. TARGAN, S.R., SHANAHAN, F. eds., p 478-486, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- LIGUMSKY, M.; SIMON, P.L.; KARMELI, F.; RACHMILEWITZ, D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease - enhanced production during active disease. **Gut.**, v.31, p.686-689, 1990.
- LIH-BRODY, L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P.; REDDY, G.M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G.; KATZ S.; FLOYD, R.A.; MCKINLEY, M.J.; FISHER, S.E.; MULLIN, G.E. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p.2078-2086, 1996.
- LIMA, E.S. & ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v.37, n.3, 2001.
- LIN, H.C.; TSAI, S.H.; CHEN, C.S.; CHANG, Y.C.; LEE, C.M.; LAI, Z.Y.; LIN, C.M. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Biochemical pharmacology.**, v.75, p.1416-1425, 2008.
- LIN, W.L.; WANG, C.J.; TSAI, Y.Y.; LIU, C.L.; HWANG, J.M.; TSENG, T.H. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. **Arch. Toxicol.**, v.74, p.467-472, 2000.
- LINARES, V.; ALONSO, V.; ALBINA, M.L.; BELLÉS, M.; SÁNCHEZ, D.J. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. **Toxicology.**, v.256, p.152-156, 2009.
- LOFTUS, E.V.Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, p.1504-1517, 2004.
- LOGAN, R.F.A. & KAY, C.R. Oral contraception, smoking and inflammatory bowel disease — findings in the royal college of general practitioners oral contraception study. **Int. J. Epidemiol.**, v.18, p.105-107, 1989.
- LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Digestive and Liver Disease.**, v.35, p.635-641, 2003.
- LOGUERCIO, C.; D'ARGENIO, G.; DELLE CAVE, M.; COSENZA, V.; DELLA VALLE, N.; MAZZACCA, G.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41: 1204-1211, 1996.
- LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L.M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation.**, doi:10.1155/2008/135625, 2008.

LOUIS, E.; RIBBENS, C.; GODON, A.; FRANCHIMONT, D.; GROOTE, D.; HARDY, N.; BONIVER, J.; BELAICHE, J.; MALAISE, M. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Immunol.**, v.120, p.241-246, 2000.

LUCHINI, A.C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S.H.; SEITO, L.N.; WITAICENIS, A.; PELLIZZON, C.H.; DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenosulphonic acid model of rat colitis. **Biol. Pharm.Bull.**, v.37, n.1, p.1343-1350, 2008.

MABALIRAJAN, U.; DINDA, A.K.; SHARMA, S.K.; GHOSH, B. Esculetin Restores Mitochondrial Dysfunction and Reduces Allergic Asthma Features in Experimental Murine Model. **J. Immunol.**, v.183, p.2059-2067, 2009.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; MCKAIGNEY, C.; JIJON, H.; YACHIMEC, C.; DOYLE, J.; JEWELL, L.; DE SIMONE, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v.121, p.580-591, 2001.

MARTINI, G.A. & BRANDES, J.W. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. **Klin. Wschr.**, v.54, p.367-371, 1976.

MARX, J. How the glucocorticoids suppress immunity. **Science.**, v.270, p.232-233, 1995.

MAWDSLEY, J.E. & RAMPTON, D.S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut.**, v.54, p.1481-1491, 2005.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **J Gastroenterol.**, v.45, p.9-16, 2010.

McKENZIE, S.J.; BAKER, M.S.; BUFINTON, G.D.; DOE, W.F. Evidence of Oxidant-induced Injury to Epithelial Cells during Inflammatory Bowel Disease. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.136-141, 1996.

MEDINA, C. & RADOMSKI, M.W. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.**, v.318, p.933-938, 2006.

MEDINA, C.; VIDELA, S.; RADOMSKI, A.; RADOMSKI, M.W.; ANTOLI, N.M.; GUARNER, F.; VILASECA, J.; SALAS, A.; MALAGELADA, J.R. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. **Am.J. Physiol.Gastrointest. Liver Physiol.**, v.284, p.G116-G122, 2003.

MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. "Plant flavonoid modulation of immune and inflammatory cell functions" In: **Human Nutrition - A Comprehensive Treatise.**, v.8, Nutrition and Immunology, D.M. Klurfeld eds., p.239-266, Plenum Press, New York, 1993.

MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; HERRIDGE W.; DEPEW, W.; SZCEWCZUK, M.R.; WALLACE, J.L. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, p.795-803, 1989.

MORRISON, G.; HEADON, B.; GIBSON, P. Update in inflammatory bowel disease. **Australian Family Physician**, v.38, n.12, 2009.

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews, Immunology**; v.3, p.330-341, 2003.

NAVARRO, F. & HANAUER, S.B. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. **The American Journal of Gastroenterology**, v.98, n.12, 2003.

NEE, L.E.; MCMORROW, T.; CAMPBELL, E.; SLATTERY, C.; RYAN, M.P. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. **Kidney International**, v.66, p.1376-1386, 2004.

NEUMAN, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. **Translational Research**, v.149, p.173-186, 2007.

NIELSEN, O.H. & RASK-MADSEN, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.31, n.216, p.149-159, 1996.

OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; GONZALEZ, M.; TORRES, M.I.; ZARZUELO, A. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v.57, p.261-170, 1998.

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSCHNER, B.S.; HANAUER, S.B.; NUNEZ, G.; CHO, J.H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, p.603-606, 2001.

OHAMA, T.; HORI, M.; SATO, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Chronic treatment with interleukin-1 $\beta$  attenuates contractions by decreasing the activities of cpi-17 and mypt-1 in intestinal smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.49, p.48794-48804, 2003.

OKADA, Y.; MIYAUCHI, N.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, T.; TSUTSUI, C.; MAYUZUMI, K.; NISHIBE, S.; OKUYAMA, T. Inhibitory effect of coumarin and flavonoids derivatives on bovine reductase and rabbit platelet aggregation. **Chem. Pharm. Bull.**, v.43, p.1385-1387, 1995.

O'MORAIN C.; TOBIN A.; SUZUKI Y.; O'RIORDAN T. Risk factors in inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v.70, p.58-60, 1989.

OTT, S.J.; MUSFELDT, M.; WENDEROTH, D.F.; HAMPE, J.; BRANT, O.; FÖLSCH, U.R.; TIMMIS, K.N.; SCHREIBER, S. Reduction in diversity of the colonic mucosa

associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut.**, v.53, p.685–693, 2004.

PALLAVI, G.; VIJAY-KUMAR, M.; WANG, L.; GEWIRTZ, A.T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S.W. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.296, p.G175–G184, 2009.

PAN, S.L.; HUANG, Y.W.; GUH, J.H.; CHANG, Y.L.; PENG, C.Y.; TENG, C.M. Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. **Biochemical Pharmacology.**, v.65, p.1897–1905, 2003.

PANJA, A.; GOLDBERG, S.; ECKMANN, L.; KRISHEN, P.; MAYER, L. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. **The Journal of Immunology.**, v.161, p.3675–3684, 1998.

PAPADAKIS, K.A. & TARGAN, S.R. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology clinics of North America.**, v.28, n.2, p.283–296, 1999

PARDO, M.P. Inflamación intestinal y dismotilidad en um modelo de enfermedad inflamatoria intestinal em la ratas: mecanismos de accion implicados in la ciclicidad y cronicidad. **Tese de Doutorado.**, Universitat Autònoma de Barcelona, 2006.

PARK, C.; JIN, C.Y.; KWON, H. J.; HWANG, H.J.; KIM, G.Y.; CHOI, W.; KWON, T.K.; KIM, B.W.; KIM, W.J.; CHOI, Y.H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells: Roles of Bcl-2 and extracellular-regulated kinase signaling. **Toxicol. In Vitro.**, doi:10.1016/j.tiv.2009.09.017, 2009.

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LÓPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews, Immunology.**, v.4, n.6, p.617–629, 2004.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine.**, v.33, n.3, p.311–22, 2002.

PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochem. Pharmacol.**, v.44, n.2, p.205–214, 1992.

PELTEKOVA, V.D.; WINTLE, R.F.; RUBIN, L.A.; AMOS, C.I.; HUANG, O.; GU, X.; NEWMAN, B.; OENE, M.V.; CESCONE, D.; GREENBERG, G.; GRIFFITHS, A.M.; GEORGE-HYSLOP, H.S.; SIMINOVITCH, K.A. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease. **Nature Genetics.**, v.36, p.471–475, 2004.

PENDER, S.L.F. & MACDONALD, T.T. Matrix metalloproteinases and the gut—new roles for old enzymes. **Current opinion in pharmacology.**, v.4, p.546–550, 2004.

- PEPPERCORN, M.A. "Antiinflammatory Agents" In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**, S.R. Targan and F. Shanahan eds., pp 478-486, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- PLEVY, S. The immunology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin N Am.**, v.31, p.77-92, 2002.
- PROBERT, C.S.J.; HEARING, S.D.; SCHREIBER, S.; KÜHBACHER, T.; GHOSH, S.; ARNOTT, I.D.R.; FORBES, A. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. **Gut.**, v.52, p.998-1002, 2003.
- RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P.L.; SCHWARTZ, L.W.; DON GRISWOLD, E.; FONDACARO, J.D.; WASSERMANN, M.A. Inflammatory mediators of experimental colitis rats. **Gastroenterology**, v.312, p.326-337, 1989.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 Ed., p.339-354, 2001.
- RANSFORD, R.A.J. & LANGMAN, M.J.S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the committee on safety of medicines. **Gut.**, v.51, p.536-539, 2002.
- REIMUND, J.M.; ALLISON, A.C.; MULLER, C. D.; DUMONT, S.; KENNEY, J.S.; BAUMANN, R.; DUCLOS, B.; POINDRON, P. Antioxidants inhibit the *in vitro* production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. **European Journal of Clinical Investigation.**, v.28, S2, p.145-150, 1998.
- REQUENA, J.R.; FU, M.X.; AHMED, M.U.; JENKINS, A.J.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, v.322, p.317-325, 1997.
- REZAIIE, A.; PARKER, R.D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? **Dig Dis Sci.**, v.52, p.2015-2021, 2007.
- RIVEIRO, M.E.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VÁZQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO C.; DAVIO, C. Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. **Current Medicinal Chemistry.**, v.17, n.13, p.1325-1338, 2010.
- RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; GALVEZ, J.; LORENTE, M.D.; CONCHA, A.; CAMUESCO, D.; AZZOUZ, S.; OSUNA, A.; REDONDO, L.; ZARZUELO, A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J Nutr.**, v.132, p.3263-3271, 2002.
- ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER-STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology – Research and Practice.**, v.204, p.511-524, 2008.

ROGLER, G. & ANDUS, T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. **World J. Surg.**, v.22, p.382-389, 1998.

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

ROJAS-CARTAGENA, C.; FLORES, I.; APPLEYARD, C.B. Role of tumor necrosis factor receptors in an animal model of acute colitis. **Cytokine.**, v.32, p.85-93, 2005.

RUEMMELE, F.M.; SEIDMAN, E.G.; LENTZE, M.J. Regulation of intestinal epithelial cell apoptosis and the pathogenesis of inflammatory bowel disorders. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.**, v.34, p.254-260, 2002.

SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GÁLVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.278, p.771-779, 1996.

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

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

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

SANDLE, G.I.; HAYSLETT, J.P.; BINDER, H.J. Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. **Gut.**, v.27, n.3, p.309-316, 1986.

SANDS, B.E. & KAPLAN, G.G. The role of TNF- $\alpha$  in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Pharmacology.**, v.47, p.930-941, 2007.

SARÉN, P.; WELGUS, H.G.; KOVANEN, P.T. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  selectively induce expression of 92-kda gelatinase by human macrophages. **The Journal of Immunology.**, v.157, p.41-59, 1996.

SARTOR, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology.**, v.134, p.577-594, 2008.

SCHIMMER, B.P. & PARKER, K.L. Adrenocorticotrophic hormone: adrenocortical steroids and their synthesis analogues; inhibitors of the synthesis and action of adrenocortical hormones. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G. (Eds.), **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.**, 9th edition. McGraw-Hill, New York, pp. 1459-85, 1996.

SECONDULFO, M.; MAGISTRIS, L.; FIANDRA, R.; CASERTA, L.; BELLETTA, M.; TARTAGLIONE, T.; RIEGLER, G.; BIAGIL, F.; CORAZZAL, G.F.; CARRATTI, R. Intestinal permeability in Crohn's disease patients and their first degree relative. **Digest Liver Dis.**, v.33, p.680-685, 2001.

SEKIVA, K.; OKUDA, H.; ARICHI, S. Selective inhibition of platelet lipoxigenase by esculetin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.14, p.68-72, 1982.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, v.47, p.61-71, 1990.

SHANAHAN, F. & TARGAN, S.R. "Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside" In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**. TARGAN, S.R., SHANAHAN, F. (eds.), p. 02-30, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

SHANAHAN, F. & TARGAN, S.R. "Mechanisms of tissue injury in inflammatory bowel disease" In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**. TARGAN, S.R., SHANAHAN, F. (eds.), p.78-88, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

SHANAHAN, F. Crohn's disease. **Lancet.**, v.359, p.62-69, 2002.

SHARMA S.D.; RAJOR, H.K.; CHOPRA, S.; SHARMA, R.K. Studies on structure activity relationship of some dihydroxy-4-methylcoumarin antioxidants based on their interaction with Fe (III) and ADP. **Bio. Metals.**, v.18, p.143-154, 2005.

SIDO, B.; HACK, V.; HOCHLEHNERT, A.; LIPPS, H.; HERFARTH, C.; DRÖGE, W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. **Gut.**, v.42, p.485-492, 1998.

SIMS, J.E. & SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews, Immunology**, v.10, p.89-102, 2010.

SINGH, V. P.; PATIL, C.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. **Prostaglandins & others Lipid Mediators.**, v.71, p.163-175, 2003.

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

SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen Uptake. **Microbes and Infection.**, v.7, p.997-1004, 2005.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, E.U.G. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, n.2, 2002.



STERNLICHT, M.D. & WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p.463–516, 2001.

STROBER, W.; FUSS, I.J.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.20, p.495–549, 2002.

STROBER, W.; LUDVIKSSON, B.R.; FUSS, I.J. The Pathogenesis of Mucosal Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease and Crohn Disease. **Annals of Internal Medicine.**, v.128, n.10, 1998.

STUCCHI, A.F.; SHOFER, S.; LEEMAN, S.; MATERNE, O.; BEER, E.; MCCLUNG, J.; SHEBANI, K.; MOORE, F.; O'BRIEN, M.; BECKER, J.M. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 279, 298-306, 2000.

STURM, A. What is the role of apoptosis in the normal and inflamed intestine? **Inflamm Bowel Dis**, v.14, n.S2, 2008.

SU, L.; SHEN, L.; CLAYBURGH, D.R.; NALLE, S.C.; SULLIVAN, E.A.; MEDDINGS, J.B.; ABRAHAM, C.; TURNER, J.R. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. **Gastroenterology.**, v.136, p.551–563, 2009.

SUTHERLAND, L. & MACDONALD, J.K. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.2, 2003.

ŠVENTORAITYTĖ, J.; ŽVIRBLIENĖ, A.; KIUDELIS, G.; ŽALINKEVIČIUS, R.; ŽVIRBLIENĖ, A.; PRAŠKEVIČIUS, A.; KUPČINSKAS, L.; TAMOŠIŪNAS, V. Immune system alterations in patients with inflammatory bowel disease during remission. **Medicina (Kaunas).**, v.44, n.1, p.27-33, 2008.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v.57, p.145–155, 2003.

TUIN, A.; POELSTRA, K.; JAGER-KRIKKEN, A.; BOK, L.; RAABEN, W.; VELDERS, M.P.; DIJKSTRA, G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. **Gut.**, v.58, p.379-387, 2009.

TURNER, J.R. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation From Basic Mechanisms to Clinical Application. **The American Journal of Pathology.**, v.169, n.6, p.1901-1909, 2006.

VAN WINSEN, L.M.L.; MURIS, D.F.R.; POLMAN, C.H.; DIJKSTRA, C.D.; VAN DEN BERG, T.K.; UITDEHAAG, B.M.J. Sensitivity to glucocorticoids is decreased in relapsing remitting multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v.90, n.2, p.734–740, 2004.

VAN WINSEN, L.M.L.; MURIS, D.F.R.; POLMAN, C.H.; DIJKSTRA, C.D.; VAN DEN BERG, T.K.; UITDEHAAG, B.M.J. Sensitivity to Glucocorticoids Is Decreased in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v.90, n.2, p.734–740, 2005.

- VELJACA, M.; LESCH, C.A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v.102, p.1524-1534, 1995.
- VICTORIA, C.R.; SASSAKI, L.Y.; NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. **Arq Gastroenterol.**, v.46, p.20-25, 2009.
- VIDELA, S.; GARCIA-LAFUENTE, A.; ANTOLIN, M.; VILASECA, J.; GUARNER, F.; CRESPO, E.; GONZALEZ, G.; SALAS, A.; MALAGELADA, J.R. Antitumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.287, p.854-859, 1998.
- VILLANI, A.C.; LEMIRE, M.; FORTIN, G.; LOUIS, E.; SILVERBERG, M.S.; COLLETTE, C.; BABA, N.; LIBIOULLE, C.; BELAICHE, J.; BITTON, A.; GAUDET, D.; COHEN, A.; LANGELIER, D.; FORTIN, P.R.; WITHER, J.E.; SARFATI, M.; RUTGEERTS, P.; RIOUX, J.D.; VERMEIRE, S.; HUDSON, T.J.; FRANCHIMONT, D. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nature Genetics.**, v.41, p.71-76, 2009.
- VIND, I.; LENE RIIS, L.; JESPERGAARD, C.; JESS, T.; KNUDSEN, K.; PEDERSEN, N.; ELKJAERE, M.; HANSEN, T.S.; ANDERSEN, I.B.; PAERREGAARD, A.; BONDESENH, S.; LOCHT, H.; LARSEN, S.O.; MOESGAARD, F.; BENDTSEN, F.; ANDERSEN, P.S.; MUNKHOLM, P. Genetic and environmental factors as predictors of disease severity and extent at time of diagnosis in an inception cohort of inflammatory bowel disease. Copenhagen County and City 2003-2005. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.2, p.162-169, 2008.
- WAHED, M.; CORSER, M.; GOODHAND, J.R.; RAMPTON, D.S. Does Psychological Counseling Alter the Natural History of Inflammatory Bowel Disease? **Inflamm. Bowel Dis.**, v.16, n.4, p.664-669, 2009.
- WAKEFIELD, A.J.; DHILLON, A.P.; ROWLES, P.M.; SAWVERR, A.M.; PITTILO, R.M.; LEWIS, A.A.M.; POUNDER, R.E. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. **The Lancet.**, v.334, n.8671, p.1057-1062, 1989.
- WALLER, S.; TREMELLING, M.; BREDIN, F.; GODFREY, L.; HOWSON, J.; PARKES, M. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. **Gut.**, v.55, p.809-814, 2006.
- WANG, C.J.; HSIEH, Y.J.; CHU, C.Y.; LIN, Y.L.; TSENG, T.H. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters.**, v.183, p.163-168, 2002.
- WANG, W. & BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol. Rev.**, v.50, n.3, p.335-356, 1998.
- WATANABE, K.; ITO, A.; SATO, T.; SAITO, T.; HAYASHI, H.; NIITANI, Y. Esculetin suppresses proteoglycan metabolism by inhibiting the production of matrix metalloproteinases in rabbit chondrocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v.16, p.297-305, 1999. Erratum in: *Eur. J. Pharmacol.*, v.379, n.2, p.243, 1999.

WENDLAND, B.E.; AGHDASSI, E.; TAM, C.; CARRIER, J.; HILLARY-STEINHART, A.; WOLMAN, S.L.; BARON, D.; ALLARD, J.P. Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn's disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.74, n.2, p.259–264, 2001.

WINTERBOURN, C. & BRENNAN, S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. **Biochem. J.**, v.326, p.87-92, 1997.

WINTERBOURN, C.C. & KETTLE, A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.5, p.403–409, 2000.

WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions.**, v.186, p.211–218, 2010.

XAUS, J.; COMALADA, M.; VALLEDOR, A.F.; CARDÓ, M.; HERRERO, C.; SOLER, C.; LLOBERRAS, J.; CELADA, A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. **Immunobiology.**, v.204, p.543–550, 2001.

YAMADA, T. & GRISHAM, M.B. "Pathogenesis of tissue injury: Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen". In: **Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside**. TARGAN, S.R., SHANAHAN, F. (eds.), p.133-150, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A.R. Review article: diet and inflammatory bowel disease – epidemiology and treatment. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 30, p.99–112, 2009.

YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.**, v.13, p.1893-1896, 2007.

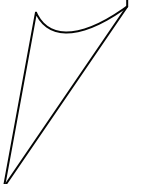
YANG, J.E.; DELLA-FERA, M.A.; HARTZEL, D.L.; NELSON-DOOLEY, C.; HAUSMAN, D.B.; BAILE, C.A. Esculetin induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Obesity**, v.14, 2006.

YUN, L. & HANAUER, S. Selecting appropriate anti-TNF agents in inflammatory bowel disease. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.**, v.3, n.3, p.235-48, 2009.  
ZHENG, L.; GAO, Z.Q.; WANG, S.X. A chronic ulcerative colitis model in rats. **World Journal of Gastroenterology.**, v.6, n.1, p.150-152, 2000.

ZINGARELLI, B.; SZABO, C.; SALZMAN, A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut.**, v.45, p.199-209, 1999.

*Anexo*

---



**Tabela 5.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de Esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), Prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental agudo de colite induzida por TNBS ratos

<b>Grupo</b>	<b>GSH(nmol/g tecido)</b>	<b>MPO(U/g tecido)</b>	<b>FA (mU/mg proteína)</b>	<b>MDA (nmol/g tecido)</b>
<b>Branco</b>	1768,3±90,63**	201,23±26,20*	5,44±0,45**	12,99±1,83*
<b>Controle TNBS</b>	1046,6±51,92	2246,1±216,97	16,62±1,43	20,07±1,29
<b>Esculetina</b>	1663,6±168,77**	2035,6±459,25	13,65±1,53	17,79±2,09
<b>4-metilesculetina</b>	1638,0±443,41**	2274,1±555,21	11,41±1,55*	18,00±2,29
<b>Prednisolona</b>	1698,9±84,31**	1608,3±443,48	9,96±1,39**	15,58±2,32
<b>Sulfassalazina</b>	1695,6±98,90**	2250,3±726,62	10,91±1,20*	16,57±1,48

Dados de glutationa (GSH), mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina (FA) e malonildialdeído (MDA) expressos em média ± E.P.M. com \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; e \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle.

**Tabela 6.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de Esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), Prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental agudo de colite induzida por TNBS ratos

<b>Grupo</b>	<b>MMP-9 (IOD)</b>	<b>MMP-2 (IOD)</b>	<b>TNF-α (pg/mg proteína)</b>	<b>IL-1β (pg/mg proteína)</b>	<b>Células apoptóticas/ por cripta</b>
<b>Branco</b>	42,89±16,57**	29,76±2,51	187,65±14,54*	1662,33±332,34**	0,062±0,004**
<b>Controle TNBS</b>	204,16±29,46	29,46±1,66	258,32±44,24	4784,14±454,86	0,136±0,015
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	196,61±18,31	21,40±4,94	176,93±33,86*	3659,67±353,10	0,078±0,012*
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	170,54±36,19	34,91±7,76	220,33±30,03	4587,91±552,60	0,111±0,019
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	121,53±32,12	22,74±4,55	174,76±29,68*	4099,85±363,63	0,087±0,012
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	111,00±15,5	13,19±3,87	252,38±16,38	3413,27±344,68	0,089±0,013

Dados da avaliação das metaloproteinases (MMP- 9 e 2), (fator de necrose tumoral) TNF-α, interleucina (IL-1β) e apoptose das células epiteliais. Dados expressos em média ± E.P.M. com \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; e \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle.

**Tabela 7.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de Esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), Prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

<b>Grupo</b>	<b>GSH</b> (nmol/g tecido)	<b>MPO</b> (U/mg tecido)	<b>FA</b> (mU/mg proteína)	<b>MDA</b> (nmol/ g tecido)
<b>1ª Semana</b>				
<b>Branco</b>	1300,02±116,53*	109,76±6,77**	7,23±0,76**	12,18±0,93*
<b>Controle TNBS</b>	981,11±42,69	318,62±51,67	18,23±4,18	17,08±1,11
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	1030,41±85,02	144,09±24,29**	9,90±1,53*	10,54±1,93**
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	1066,29±5982	177,52±34,00*	9,96±1,53*	12,99±0,59*
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	1223,64±77,01*	128,45±22,05**	6,38±0,89**	12,56±0,71*
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	1268,93±65,64**	154,62±37,92**	7,28±1,18**	17,47±1,44
<b>2ª Semana</b>				
<b>Branco</b>	2146,43±78,71*	85,03±7,70*	6,44±0,95**	7,96±0,55*
<b>Controle TNBS</b>	1568,08±123,04	160,07±24,96	15,34±2,12	13,61±1,97
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	1743,76±115,24	135,44±8,60	8,96±0,75**	12,91±0,64
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	1715,18±91,67	121,74±24,33	7,60±0,44**	10,39±1,13
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	1875,61±128,04	114,70±36,64	10,30±1,2*	12,55±0,98
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	1841,43±216,08	100,98±15,71	8,99±1,01**	12,12±1,22
<b>3ª Semana</b>				
<b>Branco</b>	1741,02±79,29**	95,04±11,74**	6,81±0,89*	7,53±0,81*
<b>Controle TNBS</b>	1252,96±74,08	200,34±25,54	11,92±1,69	10,28±0,79
<b>Controle Sem Recidiva</b>	1436,5±76,84	154,36±17,53	7,84±0,82*	10,48±1,07
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	1780,59±197,96*	131,57±17,66*	6,15±0,69**	8,77±0,93
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	1471,30±111,83	164,04±9,16	6,60±0,69**	9,51±0,46
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	1693,79±111,9*	167,57±4,62	8,28±0,83	12,45±1,37
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	1676,41±122,03*	175,93±46,47	7,58±1,36*	11,92±1,51

Dados de glutatona (GSH), mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina (FA) e malondialdeído (MDA) expressos em média ± E.P.M. com \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; e \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle.

**Tabela 8.** Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos efeitos de Esculetina (5mg/Kg), 4-metilesculetina (5mg/Kg), Prednisolona (2mg/Kg) e sulfassalazina (50mg/Kg) no modelo experimental crônico com recidiva de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos.

Grupo	MMP-9 (IOD)	MMP-2 (IOD)	TNF- $\alpha$ (pg/mg proteína)	IL-1 $\beta$ (pg/mg proteína)	Células apoptóticas/ por cripta
<b>1ª Semana</b>					
<b>Branco</b>	78,08 $\pm$ 18,54*	43,43 $\pm$ 15,82	187,81 $\pm$ 14,53**	1370,65 $\pm$ 138,55**	0,079 $\pm$ 0,014**
<b>Controle TNBS</b>	155,37 $\pm$ 431,41	14,94 $\pm$ 5,40	275,17 $\pm$ 21,18	4412,87 $\pm$ 800,83	0,198 $\pm$ 0,021
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	97,24 $\pm$ 15,46	33,30 $\pm$ 4,95	191,39 $\pm$ 7,84*	1826,87 $\pm$ 348,14*	0,114 $\pm$ 0,009**
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	60,25 $\pm$ 10,67**	33,82 $\pm$ 4,16	284,57 $\pm$ 15,54	2055,20 $\pm$ 326,80*	0,094 $\pm$ 0,02**
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	23,53 $\pm$ 3,37**	24,79 $\pm$ 4,38	170,82 $\pm$ 13,38**	1536,48 $\pm$ 291,58**	0,109 $\pm$ 0,016**
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	70,17 $\pm$ 12,89**	34,03 $\pm$ 8,81	254,42 $\pm$ 17,80	3122,49 $\pm$ 985,79	0,122 $\pm$ 0,016*
<b>2ª Semana</b>					
<b>Branco</b>	17,09 $\pm$ 5,31*	19,49 $\pm$ 7,29	141,19 $\pm$ 16,60	593,95 $\pm$ 117,60*	0,07 $\pm$ 0,007**
<b>Controle TNBS</b>	104,29 $\pm$ 39,44	95,29 $\pm$ 32,78	174,81 $\pm$ 17,43	1257,45 $\pm$ 225,45	0,273 $\pm$ 0,023
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	114,08 $\pm$ 20,40	88,16 $\pm$ 33,83	192,06 $\pm$ 35,67	1061,02 $\pm$ 246,83	0,141 $\pm$ 0,026**
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	138,08 $\pm$ 33,13	68,86 $\pm$ 35,01	136,55 $\pm$ 22,59	942,01 $\pm$ 126,73	0,132 $\pm$ 0,018**
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	94,02 $\pm$ 26,99	41,58 $\pm$ 15,40	141,55 $\pm$ 23,85	1562,20 $\pm$ 244,74	0,140 $\pm$ 0,017**
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	124,96 $\pm$ 20,12	123,39 $\pm$ 49,80	153,45 $\pm$ 30,48	1546,04 $\pm$ 226,46	0,161 $\pm$ 0,02**
<b>3ª Semana</b>					
<b>Branco</b>	70,06 $\pm$ 19,26	67,65 $\pm$ 44,87	65,28 $\pm$ 12,53	650,18 $\pm$ 85,93*	0,103 $\pm$ 0,009**
<b>Controle TNBS</b>	102,09 $\pm$ 17,69	26,95 $\pm$ 12,07	89,73 $\pm$ 13,27	1044,89 $\pm$ 89,60	0,236 $\pm$ 0,021
<b>Controle Sem Recidiva</b>	103,58 $\pm$ 37,32	89,91 $\pm$ 9,14	47,33 $\pm$ 11,09*	569,95 $\pm$ 118,36*	0,117 $\pm$ 0,013**
<b>Esculetina 5mg/Kg</b>	67,03 $\pm$ 15,37	22,86 $\pm$ 4,17	82,86 $\pm$ 23,37	782,21 $\pm$ 182,80	0,154 $\pm$ 0,017**
<b>4-metilesculetina 5mg/Kg</b>	83,18 $\pm$ 12,76	37,08 $\pm$ 7,12	115,41 $\pm$ 25,70	788,22 $\pm$ 149,21	0,08 $\pm$ 0,008**
<b>Prednisolona 2mg/Kg</b>	55,62 $\pm$ 6,98	27,26 $\pm$ 8,24	97,14 $\pm$ 10,41	2434,66 $\pm$ 190,40**	0,117 $\pm$ 0,01**
<b>Sulfassalazina 50mg/Kg</b>	84,21 $\pm$ 28,08	47,99 $\pm$ 20,29	116,24 $\pm$ 11,38	1821,60 $\pm$ 337,18*	0,099 $\pm$ 0,011**

Dados de metaloproteinase (MMP- 9 e 2), (fator de necrose tumoral) TNF- $\alpha$ , interleucina (IL-1 $\beta$ ) e apoptose das células epiteliais por criptas. Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; e \*\*\* p < 0,001 comparados ao grupo controle.

**Tabela 9.** Efeito de diferentes concentrações de esculetina e 4-metilesculetina sobre a secreção de citocinas em cultura de células.

<b>Grupos</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b> <b>(pg/ml)</b>	<b>IL-2 (pg/ml)</b>	<b>IL-8 (pg/ml)</b>	<b>IFN (pg/ml)</b>	<b>Viab.CaCO</b> <b>2</b>	<b>Viabilidade</b> <b>Esplenócito</b>	<b>Viab. Raw</b>
<b>Células não estimuladas</b>	16,35 $\pm$ 0,68	0,55 $\pm$ 0,01	133,41 $\pm$ 2,39	0 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0,03	56 $\pm$ 2,3	100 $\pm$ 0
<b>Concanavalina</b>	-----	543,49 $\pm$ 4,16	-----	208,96 $\pm$ 1,4	-----	100 $\pm$ 0	-----
<b>Concanavalina + DMSO</b>	-----	622,89 $\pm$ 103,42	-----	233,10 $\pm$ 20,8	-----	66 $\pm$ 3,5	-----
<b>LPS+DMSO</b>	101,37 $\pm$ 25,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>IL-1</b>	-----	-----	398,37 $\pm$ 29,1	-----	-----	-----	-----
<b>DMSO</b>	-----	-----	119,73 $\pm$ 5,5	-----	-----	-----	-----
<b>IL-1+DMSO</b>	-----	-----	391,93 $\pm$ 30,5	-----	-----	---	-----
<b>Esculetina 1 <math>\mu</math>M</b>	57,10 $\pm$ 7,0	491,93 $\pm$ 15,6	268,8 $\pm$ 60,1	199,6 $\pm$ 15,0	102,16 $\pm$ 0,3	85,07 $\pm$ 19,9	93,03 $\pm$ 1,5
<b>Esculetina 10 <math>\mu</math>M</b>	57,58 $\pm$ 3,4	591 $\pm$ 7,0	264,19 $\pm$ 58,2	200,86 $\pm$ 2,4	90,53 $\pm$ 0,3	121,2 $\pm$ 15,5**	87,51 $\pm$ 7,5
<b>Esculetina 50 <math>\mu</math>M</b>	31,16 $\pm$ 2,0	505,57 $\pm$ 15,4	251,93 $\pm$ 58,5	193,6 $\pm$ 3,8	87,29 $\pm$ 1,9	114,8 $\pm$ 12,3**	76,31 $\pm$ 3,8
<b>Esculetina 100 <math>\mu</math>M</b>	22,58 $\pm$ 3,5*	253,03 $\pm$ 27,4**	294,61 $\pm$ 75,4	80,88 $\pm$ 37,1**	99,66 $\pm$ 3,6	69,6 $\pm$ 8,7	24,66 $\pm$ 2,0**
<b>4-Metilesculetina 1 <math>\mu</math>M</b>	91,26 $\pm$ 1,9	533,56 $\pm$ 29,5	269,25 $\pm$ 52,2	263,45 $\pm$ 22,3	93,53 $\pm$ 0,3	88 $\pm$ 12,3	91,98 $\pm$ 11,0
<b>4-Metilesculetina 10 <math>\mu</math>M</b>	31,19 $\pm$ 3,4	634,42 $\pm$ 4,1	234,21 $\pm$ 52,4*	187,91 $\pm$ 6,9	88,86 $\pm$ 4,9	82,8 $\pm$ 5,9	99,15 $\pm$ 0,9
<b>4-Metilesculetina 50 <math>\mu</math>M</b>	16,53 $\pm$ 0,6*	388,83 $\pm$ 48,9**	213,26 $\pm$ 40,1*	129,45 $\pm$ 23,1**	94,07 $\pm$ 3,1	58 $\pm$ 2,7	74,91 $\pm$ 4,0*
<b>4-Metilesculetina 100 <math>\mu</math>M</b>	12,69 $\pm$ 0,4*	191,5 $\pm$ 9,3**	247,32 $\pm$ 60,9	0 $\pm$ 0**	100,70 $\pm$ 6,1	56 $\pm$ 0,7	64,6 $\pm$ 17,3**

Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. com \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparados com o respectivo grupo controle. Testes de Viabilidade expressos em % de viabilidade celular.



**Tabela 10.** Resultados dos parâmetros macroscópicos e microscópicos apresentados em porcentagem da diferença dos valores em relação ao grupo controle, em todas as fases experimentais estudadas.

Grupo	Agudo			
	escore microscópico	escore macroscópico	extensão da lesão	relação peso/comprimento
<b>Branco</b>	-78,79	-100,00	-100,00	-44,54
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	-21,21	-6,25	-13,17	-9,98
<b>4-metilesculetina</b>	-39,39	-12,50	-17,93	-4,56
<b>prednisolona</b>	-42,42	-25,00	-34,13	-3,92
<b>Sulfasalazina</b>	-21,21	-18,75	-16,85	-8,16
<b>1 Semana</b>				
<b>Branco</b>	-66,69	-100,00	-100,00	-39,65
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	-9,24	-27,27	-16,52	-4,12
<b>4-metilesculetina</b>	-46,55	-36,36	-16,09	-6,27
<b>prednisolona</b>	-28,76	-63,64	-53,04	-6,63
<b>Sulfasalazina</b>	-8,97	-27,27	-20,43	-5,68
<b>2 Semana</b>				
<b>Branco</b>	-68,19	-100,00	-100,00	-30,29
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	-32,54	33,33	-10,46	0,70
<b>4-metilesculetina</b>	-20,46	-33,33	-46,41	-17,95
<b>prednisolona</b>	-21,69	-16,67	-55,56	-7,82
<b>Sulfasalazina</b>	-41,00	0,00	-30,07	-7,67
<b>3 Semana</b>				
<b>Branco</b>	-68,51	-100,00	-100,00	-29,12
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Controle sem reincidiva</b>	-17,84	-50,00	-57,02	4,62
<b>Esculetina</b>	-16,69	-75,00	-70,18	1,72
<b>4-metilesculetina</b>	-52,70	-37,50	-49,56	9,89
<b>prednisolona</b>	-15,54	-37,50	-36,40	24,19
<b>Sulfasalazina</b>	-25,68	-25,00	-45,18	23,80

Resultados apresentados em porcentagem de inibição, demonstrado pelo sinal (-), os valores são a diferença do parâmetro avaliado em relação ao grupo controle, cujo valor foi considerado de 100%.

**Tabela 11.** Resultados dos parâmetros bioquímicos apresentados em porcentagem da diferença dos valores em relação ao grupo controle, em todas as fases experimentais estudadas.

Grupo	Agudo								
	GSH	MPO	FA	MDA	MMP-9	MMP-2	TNF-alfa	IL-1beta	apoptose
<b>Branco</b>	68,96	-91,04	-67,27	-35,28	-78,99	1,02	-27,36	-65,25	-54,41
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	58,95	-9,37	-17,87	-11,36	-3,70	-27,36	-31,51	-23,50	-42,65
<b>4-metilesculetina</b>	56,51	1,25	-31,35	-10,31	-16,47	18,50	-14,71	-4,10	-18,38
<b>prednisolona</b>	62,33	-28,40	-40,07	-22,37	-40,47	-22,81	-32,35	-14,30	-36,03
<b>Sulfasalazina</b>	62,01	0,19	-34,36	-17,44	-45,63	-55,23	-2,30	-28,65	-34,56
<b>1 Semana</b>									
<b>Branco</b>	32,51	-65,55	-60,34	-28,69	-49,75	190,70	-31,75	-68,94	-60,10
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	5,02	-54,78	-45,69	-38,29	-37,41	122,89	-30,45	-58,60	-42,42
<b>4-metilesculetina</b>	8,68	-44,28	-45,36	-23,95	-61,22	126,37	3,42	-53,43	-52,53
<b>prednisolona</b>	24,72	-59,69	-65,00	-26,46	-84,86	65,93	-37,92	-65,18	-44,95
<b>Sulfasalazina</b>	29,34	-51,47	-60,07	2,28	-54,84	127,78	-7,54	-29,24	-38,38
<b>2 Semana</b>									
<b>Branco</b>	36,88	-46,88	-58,02	-41,51	-83,61	-79,55	-19,23	-52,77	-74,36
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Esculetina</b>	11,20	-15,39	-41,59	-5,14	9,39	-7,48	9,87	-15,62	-48,35
<b>4-metilesculetina</b>	9,38	-23,95	-50,46	-23,66	32,40	-27,74	-21,89	-25,09	-51,65
<b>prednisolona</b>	19,61	-28,34	-32,86	-7,79	-9,85	-56,36	-19,03	24,24	-48,72
<b>Sulfasalazina</b>	17,43	-36,92	-41,40	-10,95	19,82	29,49	-12,22	22,95	-41,03
<b>3 Semana</b>									
<b>Branco</b>	38,95	-52,56	-42,87	-26,75	-31,37	151,02	-27,25	-37,78	-56,36
<b>Controle</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Controle sem recidiva</b>	14,65	-22,95	-34,23	1,95	1,46	233,62	-47,25	-45,45	-50,42
<b>Esculetina</b>	42,11	-34,33	-48,41	-14,69	-34,34	-15,18	-7,66	-25,14	-34,75
<b>4-metilesculetina</b>	17,43	-18,12	-44,63	-7,49	-18,52	37,59	28,62	-24,56	-66,10
<b>prednisolona</b>	35,18	-16,36	-30,54	21,11	-45,52	1,15	8,26	133,01	-50,42
<b>Sulfasalazina</b>	33,80	-12,18	-36,41	15,95	-17,51	78,07	29,54	74,33	-58,05

Resultados apresentados em porcentagem de inibição, demonstrado pelo sinal (-), número sem sinais indicam aumento em relação ao grupo controle, em especial no parâmetro da GSH (glutaciona). Os valores correspondem a diferença do parâmetro avaliado em relação ao grupo controle, cujo valor foi considerado 100%.

**Tabela 12.** Resumo dos resultados obtidos com a administração de esculetina, 4-metilesculetina, prednisolona e sulfasalazina em todos os parâmetros avaliados, nas fases aguda e crônica do modelo experimental de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS em ratos.

<b>Agudo</b>													
<b>Grupo</b>	<b>escore micro</b>	<b>escore macro</b>	<b>exten. lesão</b>	<b>relação p/comp.</b>	<b>GSH</b>	<b>MPO</b>	<b>FA</b>	<b>MDA</b>	<b>MMP-9</b>	<b>MMP-2</b>	<b>TNF-alfa</b>	<b>IL-1beta</b>	<b>apoptose</b>
<b>Branco</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Controle</b>													
<b>Esculetina</b>					X						X		X
<b>4-metilesculetina</b>	X				X		X						
<b>prednisolona</b>	X	X			X		X				X		
<b>Sulfasalazina</b>					X		X						
<b>1 Semana</b>													
<b>Branco</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Controle</b>													
<b>Esculetina</b>						X	X	X			X	X	X
<b>4-metilesculetina</b>		X				X	X	X	X			X	X
<b>prednisolona</b>		X	X		X	X	X	X	X		X	X	X
<b>Sulfasalazina</b>					X	X	X		X				X
<b>2 Semana</b>													
<b>Branco</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<b>Controle</b>													
<b>Esculetina</b>							X						X
<b>4-metilesculetina</b>				X			X						X
<b>prednisolona</b>			X				X						X
<b>Sulfasalazina</b>	X						X						X
<b>3 Semana</b>													
<b>Branco</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Controle</b>													
<b>CSR</b>			X				X				X	X	X
<b>Esculetina</b>			X		X	X	X						X
<b>4-metilesculetina</b>			X				X						X
<b>prednisolona</b>					X								X
<b>Sulfasalazina</b>					X		X						X

X representa a ocorrência de diferença estatística em relação ao grupo controle. CSR= controle sem recidiva, GSH=glutathiona, FA= fosfatase alcalina, MPO= mieloperoxidase, MMP=metaloproteínase.

**Tabela 13.** Atividade antioxidante de cumarinas no modelo de peroxidação lipídica induzida por ferro-ácido ascórbico em membranas de cérebro de ratos.

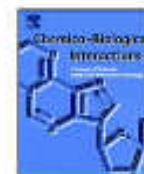
1 Substância Testada	IC <sub>50</sub> Anti-oxidante $\mu$ M
ESCOPOLETINA	-
ESGOPARONA	-
4-HIDROXICUMARINA	-
ESCULETINA	36,85
FRAXETINA	21,08
7-METOXI-4-METILCUMARINA	-
METILCUMARINA	-
CUMARINA	-
ESFULINA	-
7-METOXICUMARINA	-
7-HIDROXICUMARINA	520,39
4-METILESCULETINA	16,07
4-METILUMBELIFERONA	635,73
DAFNETINA	24,12

Dados expressos em (IC<sub>50</sub>) concentração inibitória de 50% da peroxidação lipídica.



Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chembioint](http://www.elsevier.com/locate/chembioint)

## Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis

Aline Witaicenis, Leonardo N. Seito, Luiz C. Di Stasi\*

Univ Estadual Paulista – UNESP, Institute of Biosciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Phytochemistry, Botucatu, 13618-000 SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 February 2010

Received in revised form 23 March 2010

Accepted 25 March 2010

Available online 7 April 2010

## Keywords:

Inflammatory bowel disease

Esculetin

4-Methylesculetin

Coumarin

TNBS

## ABSTRACT

Coumarins comprise a broad class of phenolic compounds that influences the formation and scavenging of reactive oxygen species and the processes involving free radical-mediated injury. In light of the antioxidant and anti-inflammatory properties of esculetin and 4-methylesculetin, the aim of this study was to investigate the effects of these compounds in an experimental model of rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS). For this purpose, macroscopic (diarrhoea, extension of lesion, colonic weight/length ratio and damage score) and biochemical parameters (myeloperoxidase, alkaline phosphatase and glutathione) were evaluated. Our results reveal that these compounds, particularly 4-methylesculetin, may be effective for the treatment of intestinal inflammatory bowel disease. In the acute colitis model, esculetin promoted a reduction in the extension of the lesion accompanied by a reduction in the incidence of diarrhoea and restoration of the glutathione content. Similar effects were produced by the administration of 4-methylesculetin, which also inhibited the myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities in the acute intestinal inflammatory process and in the model of colitis relapse. The effect of the esculetin and 4-methylesculetin on the inflammatory process may be related to their antioxidant and anti-inflammatory properties, as observed in this study. The evidence for better effects of 4-methylesculetin in comparison to those demonstrated by esculetin in both experimental settings could be attributed to the presence of the methyl group at C-4 of 4-methylesculetin.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) 4-methylesculetin is a chronic inflammatory process including two main distinct types: ulcerative colitis and Crohn's disease. The aetiology of inflammatory bowel disease has not yet been defined, but it is known that interactions between immune and genetic factors could be responsible for the development of chronic intestinal inflammation which is characterised by alternating periods of remission and active inflammation [1]. Chronic inflammation is associated with the generation of reactive oxygen species that may be capable of contributing to or even initiating an inflammatory response. It is also known that oxidative stress is a major contributor to colorectal cancer development in inflammatory bowel disease patients [2]. Kruidenier et al. [3] reported that oxidative stress is increased while antioxidant defences are decreased in colonic mucosa biopsies of patients with inflammatory bowel disease. In this manner, the antioxidant compounds may be useful in limiting damage in inflammatory bowel disease. In fact, it has been proposed that the free radical scavenger

activity may be responsible for the beneficial effects shown by sulphasalazine and other aminosalicilates used in the treatment of human inflammatory bowel disease [4,5].

Previous studies have shown the beneficial effects of different natural antioxidant compounds in experimental models of rat colitis, including the flavonoids quercitrin, rutoside, morin, diosmin and hesperidin [6], vitamin E [7] and tempol [8]. Recently, paepalantine, a natural antioxidant isocoumarin isolate from *Paepalanthus bromelioides* [9] and coumarin and 4-hydroxycoumarin [10] have shown protective effects in a model of rat colitis.

Coumarins comprise a large class of natural phenolic substances found in plants and are constituted of fused benzene and  $\alpha$ -pyrone rings. This class of compounds influences the formation and scavenging of reactive oxygen species and processes involving free radical-mediated injury [11–13]. The coumarins vary widely in structure due to the various types of substitutions in their basic rings, which can influence their biological activity [14,15].

Esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) is an antioxidant coumarin derivative that inhibits the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways of arachidonate metabolism [12,16]. Among other important pharmacological activities, esculetin promotes analgesic [17], immunomodulatory [18] and anti-tumoural effects [19,20];

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 34 38116253.  
E-mail address: [ldstasi@ibb.unesp.br](mailto:ldstasi@ibb.unesp.br) (L.C. Di Stasi).

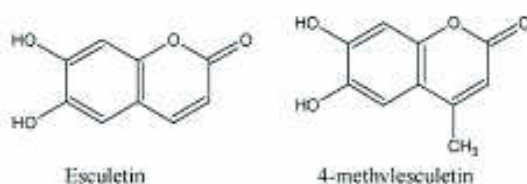


Fig. 1. Chemical structures of esculetin and 4-methylesculetin.

decreases neutrophil infiltration [13], subepithelial fibrosis and TGF- $\beta$  1 levels in the lung [21]; protects DNA against oxidative stress [16]; inhibits synthesis of leukotriene B<sub>4</sub>, thromboxane B<sub>2</sub> [11], platelet aggregation [22], matrix metalloproteinases production [23,24], growth of human leukaemia cells [25] and the production of IL-6 and IL-8 [26]. In turn, 4-methylesculetin (6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin) is a coumarin derivative with antioxidant [12] and anti-inflammatory properties [11]; it has an inhibitory effect on vascular smooth muscle cells [27], subcutaneous tumour proliferation, and hyaluronan synthesis by mouse pancreatic cancer cells [28].

Based especially in the antioxidant and anti-inflammatory properties of these coumarins, the present study aimed to investigate the effects of esculetin and 4-methylesculetin on the experimental model of trinitrobenzenesulphonic (TNBS) acid-induced rat colitis. For this purpose, we assayed the effects of these compounds in preventing the inflammatory response induced by TNBS in two different experimental settings, i.e., when the colonic mucosa is intact and when the mucosa is healing after an initial insult.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Drug preparation

Esculetin, 4-methylesculetin (Fig. 1) and sulphasalazine provided by Sigma were dissolved in 5% (v/v) ethanol. They were freshly prepared each time for animal administration.

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) obtained from the Central Animal House of the Univ Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil were housed in standard environmental conditions (21 °C, 60–70% humidity) under a 12 h light/dark cycle and air-filtration. Animals had free access to water and food (Biobase). Experimental protocols met the "Guidelines of Animal Experimentation" approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation (Protocol number 042/04-CEEA), Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista (UNESP).

### 2.3. Induction of colitis and assessment

Colitis was induced using the method originally described by Morris et al. [29]. Animals were fasted overnight and then anaesthetised with halothane. Under anaesthesia, they were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm into the anus. During and after TNBS administration, the rats were kept in a head-down position until they recovered from the anaesthesia. Rats from the non-colitic (normal) group received 0.25 ml of saline. Two different protocols were followed:

#### 2.3.1. Acute colitis

Rats received 5, 10 and 25 mg/kg of esculetin and 2.5, 5, 10 and 25 mg/kg of 4-methylesculetin orally at 72, 48, 24, and 2 h before

Table 1

Criteria for assessment of macroscopic colonic damage.

Score	Criteria
0	No damage
1	Hyperaemia, no ulcers
2	Linear ulcer with no significant inflammation
3	Linear ulcer with inflammation on one site
4	≥2 sites of ulceration/inflammation
5	≥2 major sites of ulceration and inflammation or one site of ulceration/inflammation extending >1 cm along the length of the colon
6	If damage covers >2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional centimetre of involvement

colitis induction as well as 24 h thereafter. The drugs were administered by means of an oesophageal catheter (volume: 5 ml/kg). Rats from non-colitic and TNBS-control groups were orally administered with vehicle (5 ml/kg 5% ethanol). Animal body weights, occurrence of diarrhoea (as detected by perianal fur soiling) and total food intake for each group were recorded daily. Animals from all groups (n=7) were sacrificed 48 h after colitis induction by an overdose of halothane.

#### 2.3.2. Colitis relapse

In this protocol, colitis was initially induced with 10 mg of TNBS in 50% ethanol, as described previously. After 14 days, animals were given a second dose of 10 mg of TNBS in an attempt to mimic the common relapses in human inflammatory bowel disease. The animals were divided in four groups that were treated daily with 5 or 10 mg/kg (p.o.) of esculetin or 4-methylesculetin. One group received 25 mg/kg (p.o.) of sulphasalazine, and one was treated with 5% ethanol (control). Two additional groups were included for reference: a non-colitic group that received saline intracolonic and the oral vehicle, and a colitic group that received only the first dose of TNBS (TNBS-control without relapse) and the vehicle (5 ml/kg 5% ethanol) orally. Treatments started 2 h after the first administration of TNBS and continued until the day before the animals were sacrificed. Animals from each group were sacrificed after 1, 2 or 3 weeks of colitis induction, whereas all animals from the colitic control group without relapse were sacrificed after 3 weeks.

The animals were euthanised by an overdose of halothane. The colonic segments were obtained after laparotomy and the eventual occurrence of adhesions between the colon and adjacent organs were noted. They were placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper, and the colon was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The colon was opened longitudinally and scored for macroscopically visible damage on a 0–10 scale by two observers unaware of the treatment, according to the criteria described by Bell et al. [30] (Table 1). The colon was subsequently divided longitudinally into different pieces to be used for the biochemical determinations: myeloperoxidase (MPO) activity, alkaline phosphatase (AP) activity and total glutathione (GSH) content.

#### 2.4. Biochemical determinations

MPO activity was measured according to the technique described by Krawisz et al. [31]. Samples were suspended in 1 ml of 50 mM phosphate buffer incorporating 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (pH 6.0) and minced with scissors for 15 s on an ice-cold plate. The resultant suspension was subsequently diluted to a final 1:20 (w/v) ratio and homogenised for 1 min with an automatic Heidolph homogenizer, sonicated for 10 s and subjected to three freeze-thaw cycles. The homogenates were then centrifuged at 7000 × g and 4 °C for 10 min, and the supernatants were assayed for MPO activity. The results are expressed as MPO units

per gram (U/g) of wet tissue. AP activity was measured spectrophotometrically using disodium nitrophenyl phosphate (5.5 mM) as a substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mM  $MgCl_2$ , pH 10.5 [32]. Results are expressed as mU per milligram (mU/mg) of protein. Total GSH content was quantified with the recycling assay described by Anderson [33]. Samples were thawed, minced, diluted 1:20 (w/v) in ice-cold 5% (w/v) trichloroacetic acid and homogenised. The homogenates were centrifuged at  $7000 \times g$  for 15 min at 4 °C, and the supernatants were used to quantify glutathione content. The results are expressed as nanomoles per gram (nmol/g) of wet tissue.

### 2.5. Antioxidant activity

Additional *in vitro* experiments were performed in order to test the antioxidant activity of esculetin and 4-methylsculetin (1–100  $\mu M$ ). These were evaluated by the assay of lipid peroxidation in rat brain membranes modified from the original protocol described by Gálvez et al. [34]. Briefly, rat brain samples were obtained from 4-month-old male Wistar rats. Tissue samples were homogenised 1:4 (w/v) in buffer containing 19 parts of  $NaH_2PO_4$  (10 mM) and 81 parts of  $Na_2HPO_4$  (10 mM) (pH 7.4) to obtain membrane supernatant after centrifugation ( $22176 \times g$  for 15 min/4 °C). This membrane suspension was diluted 1:10 (v/v) in the above-mentioned buffer solution. Then, buffer (in the assays without inhibitors) or different concentrations of esculetin and 4-methylsculetin were added. Lipid peroxidation was induced non-enzymatically with 100  $\mu mol/L$  of both ferrous sulphate and ascorbic acid. After incubation at 37 °C for 12 min, the reaction was stopped and malondialdehyde (MDA) was determined by 0.5% thiobarbituric acid reaction in 20% trichloroacetic acid, and measurement of supernatants' absorbance at 532 nm. The products resulting from the thiobarbituric acid reaction were taken as indicators of lipid peroxidation in membrane fractions. The flavonoid quercetin was used as reference and tested in the same assay system.

### 2.6. Statistics

All results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., and differences between means were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* least significance tests. Nonparametric data (score) are expressed as the median (range) and were analysed with the Kruskal–Wallis test. Differences between proportions were analysed with the  $\chi^2$  test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Acute colitis

Intracolonic administration of TNBS resulted in colonic inflammation, which was evidenced after 48 h with severe necrosis of the mucosa, typically extending 3.8–5.8 cm along the colon, bowel wall thickening and hyperaemia (Table 2). This inflammatory process was associated with an increase in the colonic weight/length ratio and a reduction in food intake (data not shown) when compared to non-colitic rats. In addition to signs of diarrhoea in 80% of the colitic animals (Table 2). As a result, a significant reduction in body weight was observed in colitic animals ( $12.2 \pm 3.07\%$  weight loss vs.  $5.2 \pm 0.69\%$  weight gain in non-colitic rats,  $p < 0.05$ ). The colonic damage was biochemically characterised by a 7-fold increase in colonic myeloperoxidase activity, as an index of neutrophil infiltration, and by a 3-fold increase in phosphatase alkaline activity and significant colonic glutathione depletion (Table 3), both a consequence of the oxidative stress that takes place in the inflamed colon.

Esculetin showed a beneficial preventative effect in colitic rats, as evidenced by a decrease in the extension of the lesion and in diarrhoea incidence in comparison with the non-treated colitic group at dose of 5 mg/kg (Table 2), but this partial protective effect was not accompanied by improvements in the biochemical parameters evaluated. Indeed, administration of 10 mg/kg of esculetin was able to counteract glutathione depletion (Table 3). On the other hand, 4-methylsculetin showed a better protective effect in colitic rats, as evidenced by the absence of diarrhoea at all tested doses, a reduction in the damage score values, extension of the lesion, colonic weight/length ratio at a dose of 5 mg/kg, and similar effects at the dose of 10 mg/kg, except in the damage score values (Table 2). These beneficial effects showed by 4-methylsculetin were associated with a counteraction in glutathione depletion at the doses of 2.5 and 5 mg/kg, as well as a significant reduction of colonic myeloperoxidase activity at the doses of 5 and 10 mg/kg, and of alkaline phosphatase activity at the doses of 2.5, 5 and 10 mg/kg (Table 3). These results prompted us to investigate the doses of 5 and 10 mg/kg of esculetin and 4-methylsculetin in the colitis relapse protocol.

Sulphasalazine treatment of colitic rats, at the dose of 25 mg/kg, showed a preventative effect in acute colitis evidenced by reduction of the damage score and extension of the lesion (Table 2). This effect was associated with a reduction in myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities (Table 3). In addition, sulphasalazine treatment was able to counteract the glutathione depletion that occurs following inflammatory process (Table 3).

**Table 2**  
Effects of esculetin (5, 10 and 25 mg/kg), 4-methylsculetin (2.5, 5, 10 and 25 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) treatment on damage score, extension of lesion, changes in colonic weight and incidence of diarrhoea in acute TNBS colitis.

Group	Damage score (0–10)	Extension of lesion (cm)	Colonic weight (mg/cm)	Diarrhoea (%)
Non-colitic	0 <sup>**</sup>	0 <sup>*</sup>	74.33 $\pm$ 3.29 <sup>**</sup>	0 <sup>**</sup>
TNBS-control	8.0 (7–10)	4.90 $\pm$ 0.18	144.00 $\pm$ 6.45	80
Esculetin – 5 mg/kg	6.5 (1–8)	2.72 $\pm$ 0.69 <sup>*</sup>	132.15 $\pm$ 10.18	34 <sup>*</sup>
Esculetin – 10 mg/kg	7.0 (5–9)	3.83 $\pm$ 0.73	141.70 $\pm$ 9.30	34 <sup>*</sup>
Esculetin – 25 mg/kg	8.0 (2–10)	3.73 $\pm$ 1.23	122.15 $\pm$ 14.7	34 <sup>*</sup>
4-Methylsculetin – 2.5 mg/kg	7.0 (6–9)	3.90 $\pm$ 0.44	150.87 $\pm$ 5.85	0 <sup>**</sup>
4-Methylsculetin – 5 mg/kg	3.0 (2–7) <sup>**</sup>	1.46 $\pm$ 0.95 <sup>**</sup>	95.09 $\pm$ 13.2 <sup>**</sup>	0 <sup>**</sup>
4-Methylsculetin – 10 mg/kg	6.5 (3–8)	3.03 $\pm$ 0.73 <sup>*</sup>	113.77 $\pm$ 10.1 <sup>*</sup>	0 <sup>**</sup>
4-Methylsculetin – 25 mg/kg	7.0 (5–9)	3.60 $\pm$ 0.74	129.37 $\pm$ 10.3	0 <sup>**</sup>
Sulphasalazine – 25 mg/kg	6.0 (2–10) <sup>*</sup>	2.39 $\pm$ 0.36 <sup>**</sup>	130.10 $\pm$ 8.57	80

Score data are expressed as the median (range). Extension of lesion and colonic weight data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$  vs. TNBS-control group.

<sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$  vs. TNBS-control group.

**Table 3**

Effects of esculletin (5, 10 and 25 mg/kg), 4-methylresculetin (2.5, 5, 10 and 25 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) treatment on glutathione (GSH) content, myeloperoxidase (MPO) activity and alkaline phosphatase (AP) activity in acute TNBS colitis.

Group (n)	GSH content (nmol/g tissue)	MPO activity (U/g tissue)	AP activity (mU/mg protein)
Non-colitic	2120.79 ± 92.82 <sup>††</sup>	93.37 ± 5.83 <sup>††</sup>	6.24 ± 0.64 <sup>††</sup>
TNBS-control	1177.25 ± 40.49	653.49 ± 80.99	17.03 ± 1.31
Esculetin – 5 mg/kg	1406.22 ± 118.7	364.22 ± 57.41	12.77 ± 1.39
Esculetin – 10 mg/kg	1517.63 ± 128.00 <sup>†</sup>	592.26 ± 151.1	13.07 ± 2.34
Esculetin – 25 mg/kg	1318.02 ± 81.76	481.49 ± 170.8	11.75 ± 1.89
4-Methylresculetin – 2.5 mg/kg	1520.79 ± 109.05 <sup>†</sup>	591.60 ± 114.49	8.83 ± 1.15 <sup>††</sup>
4-Methylresculetin – 5 mg/kg	1557.12 ± 147.83 <sup>†</sup>	180.66 ± 63.23 <sup>†</sup>	12.43 ± 1.67 <sup>††</sup>
4-Methylresculetin – 10 mg/kg	1260.66 ± 119.87	226.69 ± 54.24 <sup>†</sup>	10.02 ± 2.04 <sup>††</sup>
4-Methylresculetin – 25 mg/kg	1175.03 ± 79.36	751.87 ± 223.72	13.02 ± 2.32
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1594.37 ± 63.86 <sup>†</sup>	391.34 ± 59.29 <sup>†</sup>	13.87 ± 1.23 <sup>†</sup>

Data are expressed as mean ± S.E.M.

<sup>†</sup> p < 0.05 vs. TNBS-control group.<sup>††</sup> p < 0.01 vs. TNBS-control group.

### 3.2. Colitis relapse

The inflammatory process induced by intracolonic instillation of 10 mg of TNBS in 50% ethanol (v/v) progressed in time with characteristics similar to those previously reported by Di Stasi et al. [9]. Thus, the colonic damage was maximal at the first week and decreased gradually during the following 2 weeks; although, the colonic segments still appeared macroscopically ulcerated and inflamed, with a concomitant increase in the colonic weight/length ratio and extension of the lesion (Table 4). The progress of the inflammatory process was also biochemically observed because myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities were maximally increased in the days after the first TNBS instillation as compared to non-colitic animals and decreased with time (Table 5). These results were also associated with a significant reduction in colonic glutathione content evidenced in all weeks (Table 5).

Colitis relapse was induced with a second dose of 10 mg of TNBS in 50% ethanol administered intracolonicly 2 weeks after the first administration. One week after this second instillation of TNBS, a reactivation of the colonic inflammatory process was evidenced by a significant increase in the macroscopic damage score, extension of the lesion and the weight/length ratio (Table 4) when compared to the normal evolution of colonic damage in those animals that did not receive the second dose of TNBS (TNBS-control without relapse). Indeed, an alteration of the colonic absorptive function was observed as 75% of the colitis-relapsing rats displayed evidence of diarrhoea (Table 4). In addition, reactivation of the intestinal inflammatory process was associated with colonic oxidative damage that caused a reduction in glutathione content when compared to animals without colitis relapse (Table 5).

Treatments with esculletin at the doses of 5 and 10 mg/kg were not effective in preventing the increase in the damage score, but treatment with 5 mg/kg was able to significantly reduce the exten-

**Table 4**

Effects of esculletin (5 and 10 mg/kg), 4-methylresculetin (5 and 10 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) treatment on damage score, extension of lesion, changes in colonic weight and incidence of diarrhoea in reactivated TNBS colitis.

Group	Damage score (0–10)	Extension of lesion (cm)	Colonic weight (mg/cm)	Diarrhoea (%)
<b>First week</b>				
Non-colitic	0.0 <sup>†††</sup>	0 <sup>††</sup>	84.14 ± 1.22 <sup>††</sup>	0 <sup>†</sup>
TNBS-control	6.0 (5–7)	2.98 ± 0.49	180.04 ± 7.63	75
Esculetin – 5 mg/kg	2.0 (0–6)	1.22 ± 0.41 <sup>†</sup>	173.13 ± 20.03	100
Esculetin – 10 mg/kg	2.0 (1–7)	1.77 ± 0.27 <sup>†</sup>	167.11 ± 24.86	100
4-Methylresculetin – 5 mg/kg	3.0 (1–9)	1.93 ± 0.69	201.52 ± 61.38	83
4-Methylresculetin – 10 mg/kg	3.0 (1–9)	2.07 ± 0.73	214.46 ± 70.27	83
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1.0 (0–3) <sup>†</sup>	0.56 ± 0.20 <sup>†</sup>	130.17 ± 4.72 <sup>††</sup>	50
<b>Second week</b>				
Non-colitic	0.0 <sup>†††</sup>	0 <sup>††</sup>	86.32 ± 3.85 <sup>††</sup>	0
TNBS-control	4.5 (4–6)	1.16 ± 0.17	132.49 ± 6.81	25
Esculetin – 5 mg/kg	3.0 (0–5)	0.98 ± 0.28	137.35 ± 10.82	33
Esculetin – 10 mg/kg	2.5 (0–4)	0.73 ± 0.17	138.91 ± 13.90	33
4-Methylresculetin – 5 mg/kg	2.0 (0–5)	0.90 ± 0.37	136.58 ± 11.86	33
4-Methylresculetin – 10 mg/kg	1.5 (0–4) <sup>†</sup>	0.40 ± 0.18 <sup>†</sup>	156.03 ± 22.01	33
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1.5 (0–3) <sup>††</sup>	0.73 ± 0.29	136.73 ± 3.23	0
<b>Third week</b>				
Non-colitic	0.0 <sup>††</sup>	0 <sup>††</sup>	78.99 ± 3.40 <sup>††</sup>	0 <sup>†</sup>
TNBS-control with relapse	4.0 (3–9)	1.60 ± 0.29	137.89 ± 6.70	75
TNBS-control without relapse	1.0 (1–1) <sup>†</sup>	0.60 ± 0.23 <sup>††</sup>	106.98 ± 3.45 <sup>††</sup>	0
Esculetin – 5 mg/kg	2.0 (1–7)	1.20 ± 0.50	140.87 ± 10.7	100
Esculetin – 10 mg/kg	3.0 (1–7)	1.83 ± 0.59	147.85 ± 10.9	100
4-Methylresculetin – 5 mg/kg	0.5 (0–4) <sup>†</sup>	0.55 ± 0.33 <sup>††</sup>	158.39 ± 22.15	83
4-Methylresculetin – 10 mg/kg	2.0 (0–4)	0.83 ± 0.20 <sup>†</sup>	135.46 ± 3.61	100
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1.0 (0–3) <sup>†</sup>	0.26 ± 0.15 <sup>††</sup>	131.68 ± 5.38	50

Score data are expressed as the median [range]. Extension of lesion and colonic weight data are expressed as the mean ± S.E.M.

<sup>†</sup> p < 0.05 vs. TNBS-control with the relapse group.<sup>††</sup> p < 0.01 vs. TNBS-control with the relapse group.<sup>†††</sup> p < 0.001 vs. TNBS-control with the relapse group.



**Table 5**

Effects of esculletin (5 and 10 mg/kg), 4-methylesculetin (5 and 10 mg/kg) and sulphasalazine (25 mg/kg) treatment on glutathione (GSH) content, myeloperoxidase (MPO) activity and alkaline phosphatase (AP) activity in reactivated TNBS colitis.

Group	GSH content (nmol/g tissue)	MPO activity (U/g tissue)	AP activity (mU/mg protein)
<b>First week</b>			
Non-colitic TNBS-control	1714.10 ± 62.14 <sup>††</sup>	67.05 ± 5.82 <sup>††</sup>	4.77 ± 0.43 <sup>††</sup>
Esculetin – 5 mg/kg	1141.04 ± 75.21	615.50 ± 159.6	15.94 ± 2.43
Esculetin – 10 mg/kg	1392.27 ± 122.9	610.58 ± 136.8	18.03 ± 0.96
4-Methylesculetin – 5 mg/kg	1636.26 ± 90.88 <sup>††</sup>	99.55 ± 282.3	22.99 ± 1.81
4-Methylesculetin – 10 mg/kg	1775.29 ± 149.4 <sup>††</sup>	390.89 ± 162.6	17.07 ± 2.16
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1758.26 ± 120.5 <sup>††</sup>	984.79 ± 296.8	19.28 ± 1.65
	1783.03 ± 172.2 <sup>††</sup>	457.23 ± 71.57	11.01 ± 0.87
<b>Second week</b>			
Non-colitic TNBS-control	2123.19 ± 96.81 <sup>††</sup>	56.48 ± 2.90 <sup>††</sup>	3.76 ± 0.29 <sup>††</sup>
Esculetin – 5 mg/kg	1547.65 ± 33.42	85.70 ± 3.73	7.14 ± 0.33
Esculetin – 10 mg/kg	1325.94 ± 139.3	46.47 ± 13.2 <sup>†</sup>	5.36 ± 0.75
4-Methylesculetin – 5 mg/kg	1451.78 ± 80.82	79.72 ± 17.7	7.26 ± 1.33
4-Methylesculetin – 10 mg/kg	1633.59 ± 57.25	35.41 ± 10.40 <sup>†</sup>	6.28 ± 1.11
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1747.22 ± 42.13	79.30 ± 20.93	7.16 ± 1.73
	1933.06 ± 111.3 <sup>†</sup>	68.55 ± 10.23	5.65 ± 0.46 <sup>†</sup>
<b>Third week</b>			
Non-colitic TNBS-control with relapse	2136.99 ± 37.45 <sup>††</sup>	80.43 ± 4.20 <sup>††</sup>	3.66 ± 0.29 <sup>††</sup>
TNBS-control without relapse	1634.57 ± 84.07	195.33 ± 37.79	6.66 ± 0.41
Esculetin – 5 mg/kg	2121.66 ± 38.82 <sup>††</sup>	100.94 ± 6.83	4.52 ± 0.24
Esculetin – 10 mg/kg	1884.10 ± 150.9	208.26 ± 108.9	7.76 ± 0.56
4-Methylesculetin – 5 mg/kg	1766.61 ± 152.8	292.79 ± 85.63	8.46 ± 1.11
4-Methylesculetin – 10 mg/kg	2118.17 ± 64.96 <sup>††</sup>	109.48 ± 17.72 <sup>†</sup>	7.24 ± 0.43
Sulphasalazine – 25 mg/kg	1708.61 ± 51.32	116.13 ± 19.72	7.30 ± 1.73
	1906.81 ± 47.99 <sup>†</sup>	136.95 ± 16.13	5.06 ± 0.64

Data are expressed as mean ± S.E.M.

<sup>†</sup>  $p < 0.05$  vs. TNBS-control group.<sup>††</sup>  $p < 0.01$  vs. TNBS-control group.

sion of lesions in the first week. In addition, restoration of colonic glutathione content was observed when animals were treated with 10 mg/kg of esculletin. Neither esculletin doses prevented the rats from the impact of the colitis relapse (third week) as measured macroscopically (Table 4) and biochemically (Table 5). On the other hand, oral administration of 5 mg/kg of 4-methylesculetin was able to prevent animals from the impact of the colitis relapse, demonstrated by a significant reduction in the damage score and extension of the lesion (Table 4). Biochemically, the preventative effect showed that all tested doses of 4-methylesculetin, in the first week of treatment, restored the colonic glutathione content. In the second week, the 4-methylesculetin at the dose of 5 mg/kg significantly reduced the colonic myeloperoxidase activity. After colitis relapse, both doses were able to restore the colonic glutathione content and reduce the colonic myeloperoxidase activity (Table 5). No significant modification was observed in alkaline phosphatase activity at any tested doses of esculletin and 4-methylesculetin in this experimental model (Table 5).

Sulphasalazine treatment of colitic rats at the dose of 25 mg/kg also showed a preventative effect on colitis and colitis relapse, evidenced by a reduction in the damage score and extension of the lesion (Table 4). Biochemically, sulphasalazine treatment was able to counteract the glutathione depletion that occurred in the first and second weeks after the administration of TNBS as well as after the second administration; despite this, no significant modifications were observed on myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities when compared to the corresponding control animals (Table 5).

### 3.3. Antioxidant activity

The *in vitro* experiments performed showed that esculletin and 4-methylesculetin exert a concentration-dependent inhibitory effect on the lipid peroxidation induced in rat brain membranes, with an  $IC_{50}$  value of  $36.18 \pm 0.77$  and  $15.79 \pm 1.61$   $\mu$ M,

respectively. The corresponding  $IC_{50}$  value of quercetin was  $5.73 \pm 0.10$   $\mu$ M.

## 4. Discussion

Intestinal inflammation is accompanied by the excessive production of reactive oxygen and nitrogen metabolites [35]. As the beneficial effects of 5-aminosalicylic derivatives have been partially attributed to their antioxidant and free radical scavenging properties [5,36], the evaluation of other compounds with antioxidant properties, such as coumarins, may be interesting for the development of new treatment strategies for these diseases [37]. The antioxidant activity of esculletin and 4-methylesculetin observed in our study and in others [13], as well as their inhibitory activity on the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways [16], suggest that these coumarins may be beneficial in the pathological inflammatory processes of the intestine.

In the present study, we evaluated the activity of esculletin and its derivative 4-methylesculetin in acute colitis and chronic colitis with relapse induced by TNBS in rats. Colitis induced by instillation of TNBS manifests many of the clinical features of colonic inflammatory bowel disease [29]. This model of colonic ulceration and transmural inflammation of the mucosa has been employed to study the pathogenesis of colonic inflammation and to investigate potential IBD treatments [38]. In the acute colitis model, esculletin reduced the extension of the lesion, which was accompanied by a reduction of diarrhoea incidence, thus indicating a restoration of the absorptive functions of the colon that is profoundly altered by the inflammatory process [39]. These effects were biochemically related to restoration of colonic glutathione content, a reduction of which is a marker of tissue oxidative damage [37]. Similar effects were produced by the administration of the C-4-methylated derivative of esculletin, but this compound also inhibited the myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities in the intestinal inflammatory process. Both enzymes are impor-

tant biochemical markers of active inflammation in experimental models. Myeloperoxidase is a marker of neutrophil infiltration, and measurement of its activity has been widely used to detect intestinal inflammatory processes [40,41]. Reductions in myeloperoxidase activity can be interpreted as a manifestation of the anti-inflammatory property of a given compound [42]. Alkaline phosphatase is also a sensitive biochemical marker of intestinal inflammation [43,7,39], which is increased as a consequence of inducing of tissue-nonspecific isoform [44]. Therefore, taking into account the macroscopic and biochemical achievements of the tested coumarins, both esculetin and 4-methylsculetin showed a preventative effect against the acute intestinal damage induced by TNBS in rats.

In another set of experiments, both compounds were tested in the chronic colitis model in which a relapse was induced by a second TNBS instillation. This chronic colitis model with latter induced relapse allows for evaluation of drugs for remission induction as well as prevention of disease reactivation. Treatment with esculetin reduced the extension of the lesion and restored glutathione content only in the first week of treatment, but it did not prevent the relapse induced by the second administration of TNBS. On the other hand, treatment with 4-methylsculetin reduced the colonic weight/length ratio and the damage score after the first and the second administration of TNBS. The beneficial effects of 4-methylsculetin were also evidenced by a decrease in colonic myeloperoxidase activity and a restoration of colonic glutathione levels in comparison to the colitic control group. However, a reduction of alkaline phosphatase activity was not observed, perhaps because the up-regulated expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase was at its maximum between 3 and 5 days after the induction of inflammation due to oxidative stress and epithelial necrosis [45]. These results were better than those observed after treatment with sulphasalazine because 4-methylsculetin was used at doses 2–5 times lower than sulphasalazine. Thus, considering the effects of esculetin and of 4-methylsculetin on the chronic colitis model, we can observe both coumarins as inducing remission, although only 4-methylsculetin was able to prevent the reactivation of the inflammatory process.

Based on the biochemical findings presented above, we must have to make some considerations relative to the nature of the tested compounds and their possible actions in biological systems. In our study, we observed that esculetin and 4-methylsculetin have protective effects at low doses (2.5 and 5 mg/kg), but at higher doses (10 and 25 mg/kg), a loss of efficacy occurred. Apparently, these anti-inflammatory effects follow a bell-shaped dose-dependent curve. Some phenolic compounds have been described to present antioxidant and anti-inflammatory activity at low doses, but at higher doses these compounds could reverse to demonstrate pro-oxidant and pro-inflammatory activities [46,47]. This pattern can be observed with silymarin [48], diosmin, hesperidin [49], quercetin [43], paepalantine [9], psoralen and imperatorin [50], coumarin and 4-hydroxycoumarin [10]. Some of these phenolic compounds, including the flavonoids, isocoumarins and coumarins described above, were tested in the same rat colitis assay and showed activity at lower doses, while higher doses were reported to abolish the anti-inflammatory effect, as was observed for esculetin and 4-methylsculetin.

The effect of esculetin and 4-methylsculetin in inflammatory processes could be due to the antioxidant properties of these compounds observed in this study and others [12] and also evidenced by the restoration of colonic glutathione content. Glutathione is essential in controlling the redox state of the cell through several mechanisms, including the scavenging of reactive oxygen species and keeping the enzyme glutathione peroxidase in a reduced state [51]. Decreases in glutathione levels, which are indicative of oxidant stress, have been detected in humans [52] and experimental

model of colitis [9,43,53]. Indeed, it has been reported that glutathione supplementation improves oxidative damage in TNBS colitis [54].

The recruitment and activation of leukocytes results in an increase in free radical production that overwhelms the tissue's antioxidant protective mechanisms, resulting in a situation of oxidative stress, which definitively perpetuates colonic inflammation [55,4]. A rapid inhibition of free radical generation could contribute to a lower level of leukocyte infiltration into the inflamed tissue, thus preventing colonic tissue from becoming inflamed [56].

Additionally, the anti-inflammatory activities of esculetin and 4-methylsculetin could be associated with their inhibition of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways [57,58]. These coumarins have been reported to reduce eicosanoid generation by acting on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase rather than by affecting phospholipase A2 [12].

Coumarins comprise a broad class of phenolic compounds that are chemically variable due to the various types of substitutions in their basic structure, which can influence their biological activity [14]. Coumarins with two hydroxyl groups (and in some cases other substituents) present an additional interest in biological activities [12]. Conspicuously, all of the potentially active natural compounds possess at least two phenolic groups at either the 6, 7- or 6, 8-positions [14]. In addition, Hoult and Payá [59] found that *ortho*-dihydroxy coumarins are moderately powerful inhibitors of arachidonate metabolism via pro-inflammatory 5-lipoxygenase pathways and that 4-methyl coumarin derivatives are known to be less toxic when compared to other coumarins. Sharma et al. [60] demonstrated that the presence of adjacent phenolic hydroxyl groups is an important factor in the antioxidant and apoptosis-inducing activity of dihydroxy-4-methylcoumarins. Luchini et al. [10] suggested that the presence of the hydroxyl radical at C-4 in the coumarin molecule improves its anti-inflammatory effect in the TNBS rat colitis model.

The demonstrated better effects of 4-methylsculetin in comparison to those shown by esculetin in both experimental settings could be related to the presence of the methyl group at C-4. In fact, the pharmacological and biochemical properties and therapeutic applications of these coumarins depend upon the substitution pattern in their basic structure, as confirmed by the present work.

## 5. Conclusions

The present study shows that esculetin and 4-methylsculetin treatments prevent colonic damage induced by TNBS in rats. This effect can be attributed to the antioxidant and anti-inflammatory properties of the tested compounds. The higher activity of 4-methylsculetin suggests that the methyl group at C-4 in the esculetin molecule improves its antioxidant and anti-inflammatory activities. Thus, 4-methylsculetin demonstrates better activity than esculetin or sulphasalazine in these experimental conditions, because treatment prevents the colonic damage induced by TNBS in rats, both in intact and previously damaged mucosa. Further studies are still necessary for elucidating the molecular mechanisms that could be involved in these effects.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Grants number 03/09324-1, 06/55209-8 and 07/54516-7), CAPES for awarding a fellowship

to Seito LN and CNPq (Science and Technology Ministry, Brazil) for awarding a fellowship to L.C. Di Stasi (Grant number 399176/2006-09). This work was funded by BZG.

## References

- [1] J.A. Katz, J. Itoh, C. Focacci, Pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 15 (1999) 291–297.
- [2] M. Magnani, R. Crinelli, M. Bianchi, A. Antonelli, The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), *Curr. Drug Targets* 1 (2000) 387–399.
- [3] L. Kruidenier, I. Kuiper, W. Van Duijn, M.A. Mieremet-Ooms, R.A. van Hogezand, C.B. Lamers, H.W. Verspaget, Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease, *J. Pathol.* 201 (2003) 17–27.
- [4] M.B. Grisham, Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease, *Lancet* 344 (1994) 850–851.
- [5] I. Ahnfelt-Ronne, O. Haagen Nielsen, A. Christensen, E. Langholz, V. Binder, P. Ris, Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid, *Gastroenterology* 98 (1990) 1162–1169.
- [6] J. Gálvez, F. Sánchez de Medina, J. Jiménez, A. Zarzuolo, Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry*, vol. 25, Elsevier Science, Amsterdam, 2001, pp. 607–649.
- [7] R. González, F. Sánchez de Medina, J. Gálvez, M.E. Rodríguez-Cabeza, J. Duarte, A. Zarzuolo, Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 71 (2001) 243–250.
- [8] S. Cuzzocrea, M.C. McDonald, E. Masón, L. Diogo, V. Lepore, M.T. Fonti, A. Ciccolo, M.L. Terranova, A.P. Caputi, C. Thiemermann, Tempol, a membrane permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, *Eur. J. Pharmacol.* 406 (2000) 27–37.
- [9] L.C. Di Stasi, D. Camuesco, A. Nieto, W. Villegas, A. Zarzuolo, J. Gálvez, Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capsule of *Paepalantia bromelioides*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis, *Planta Med.* 70 (2004) 315–320.
- [10] A.C. Lochini, P. Rodrigues-Osti, S.H. Cestari, L.N. Seito, A. Witarcenis, C.H. Pellizzon, L.C. Di Stasi, Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis, *Biol. Pharm. Bull.* 37 (1) (2008) 1343–1350.
- [11] J.R.S. Hoult, R.A. Forrier, B. Heras, I. Lobo, M. Payá, Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation, *Agents Actions* 42 (1994) 44–49.
- [12] M. Payá, B. Halliwell, J.R.S. Hoult, Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals, *Biochem. Pharmacol.* 44 (2) (1992) 205–214.
- [13] W.L. Lin, C.J. Wang, Y.Y. Tsal, C.L. Liu, J.M. Hwang, T.H. Tseng, Inhibitory effect of esculletin on oxidative damage induced by *t*-butyl hydroperoxide in rat liver, *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 467–472.
- [14] I. Kostova, Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem.* 5 (2005) 29–46.
- [15] M.E. Rivero, A. Moggioli, R. Vazquez, N. Gomez, G. Faccio, L. Piel, E.R. Celis, C. Shayo, C. Davio, Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 2665–2675.
- [16] T. Kaneko, S. Tahara, F. Takabayashi, Suppression of lipid hydroperoxide-induced oxidative damage to cellular DNA by esculletin, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 840–844.
- [17] A. Tubaro, P.D. Negro, E. Ragazzi, S. Zampron, R.D. Loggia, Anti-inflammatory and peripheral analgesic activity of esculletin in vivo, *Pharmacol. Res. Commun* 20 (1998) 83–85.
- [18] K.N. Leung, P.V. Leung, L.P. Kong, P.K. Leung, Immunomodulatory effects of esculletin [6,7-dihydroxycoumarin] on murine lymphocytes and peritoneal macrophages, *Mol. Immunol.* 2 (2005) 181–188.
- [19] H.C. Kuo, H.J. Lee, C.C. Hu, H.J. Shun, T.H. Tseng, Enhancement of esculletin on taxol-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells, *Toxicol. Appl. Pharm.* 210 (2006) 55–62.
- [20] S.H. Koli, C.C. Yeh, M.L. Chen, M.Y.P. Kuo, Esculetin enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral cancer SAS cells, *Oral Oncol.* (2009), doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.018.
- [21] U. Mabalirajan, A.K. Dinda, S.K. Sharma, B. Ghosh, Esculetin restores mitochondrial dysfunction and reduces allergic asthma features in experimental murine model, *J. Immunol.* 183 (2009) 2059–2067.
- [22] Y. Okada, N. Miyazaki, K. Suzuki, T. Kobayashi, C. Tsutsui, K. Mayuzumi, S. Nishibe, T. Okuyama, Inhibitory effect of coumarin and flavonoids derivatives on bovine reductase and rabbit platelet aggregation, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995) 1385–1387.
- [23] H. Yamada, K. Watanabe, T. Seito, H. Hayashi, Y. Nishizaki, T. Kikuchi, A. Ito, K. Fujizawa, L.S. Lohmeyer, Esculetin (dihydroxycoumarin) inhibits the production of matrix metalloproteinases in cartilage explants, and oral administration of its prodrug, CIA-926, suppresses cartilage destruction in rabbit experimental osteoarthritis, *J. Rheumatol.* 26 (3) (1999) 654–662.
- [24] K. Watanabe, A. Ito, T. Sato, H. Hayashi, Y. Nishizaki, Esculetin suppresses proteoglycan metabolism by inhibiting the production of matrix metalloproteinases in rabbit chondrocytes, *Eur. J. Pharmacol.* 16 (1999) 297–305 (Erratum in: *Eur. J. Pharmacol.* 379 (2–3) (1999) 379–243).
- [25] C.J. Wang, Y.J. Hsieh, C.Y. Chu, Y.L. Lin, T.H. Tseng, Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculletin, *Cancer Lett.* 183 (2002) 163–168.
- [26] Y. Hu, X. Chen, H. Duán, Y. Hu, X. Ma, Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB2 in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31 (4) (2009) 550–555.
- [27] V. Bertini, L. Calà, S. Cantaro, R. Martino, L. Munari, E. Salvarico, P. Tosi, Liberation of prostaglandin-like substances from the isolated coronary artery in presence of angiotensin and of 4-methylsculetin, *Acta Vitaminol. Enzymol.* 7 (3–4) (1985) 257–267.
- [28] M. Hajime, Y. Shuichi, N. Makoto, Y. Masanori, K. Ituko, K. Atsushi, S. Masuo, T. Keichi, Inhibitory effect of 4-methylsculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice, *Int. J. Cancer* 120 (2007) 2704–2709.
- [29] G.P. Morris, P.L. Beck, W. Herridge, W. Depew, M.R. Szcwczulá, J.L. Wallace, Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon, *Gastroenterology* 96 (1989) 795–803.
- [30] C.J. Bell, D.G. Gell, J.L. Wallace, Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) G632–G630.
- [31] J.E. Krawitz, P. Sharon, W.F. Stenson, Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model, *Gastroenterology* 87 (1984) 1344–1350.
- [32] O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock, A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem.* 164 (1946) 321–329.
- [33] M.E. Anderson, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 548–555.
- [34] J. Gálvez, J.P. Cruz, A. Zarzuolo, F. Sánchez de la Cuesta, Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differ from its influence on the glutathione-related enzymes, *Pharmacology* 51 (1995) 127–133.
- [35] L. Kruidenier, H.W. Verspaget, Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16 (2002) 1997–2015.
- [36] K.P. Pavlic, F.S. Laroux, J. Fuesler, R.E. Wolf, L. Gray, J. Hoffman, M.B. Grisham, Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease, *Free Radic. Bio. Med.* 33 (2002) 311–322.
- [37] D.G. Buffinton, W.F. Doe, Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease, *Free Radic. Bio. Med.* 19 (1995) 911–918.
- [38] S. Wirtz, M.F. Neurath, Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease, *Int. J. Colorectal Dis.* 15 (2000) 144–160.
- [39] F. Sánchez de Medina, J. Gálvez, J.A. Romero, A. Zarzuolo, Effect of quercetin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, *Life Sci.* 70 (2002) 3097–3108.
- [40] T. Yamada, S. Marshall, R.D. Specian, M.B. Grisham, A comparative study of two models of experimental colitis in rats, *Gastroenterology* 102 (1992) 1524–1534.
- [41] I. Villegas, C. La Casa, A. Orjales, C. Alarido de la Lastra, Effects of doxanilfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 460 (2003) 209–218.
- [42] M. Veljaca, C.A. Lesch, R. Pliana, B. Sanchez, K. Chan, A. Gugliotta, BPC-15 reduces trinitrobenzenesulfonic acid-induced colonic damage in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (1995) 417–422.
- [43] F. Sánchez de Medina, J. Gálvez, J.A. Romero, A. Zarzuolo, Effect of quercetin on acute and chronic experimental colitis in the rat, *J. Pharm. Exp. Ther.* 278 (1996) 771–779.
- [44] F. Sánchez de Medina, O. Martínez-Augustín, R. González, I. Ballester, A. Nieto, J. Gálvez, A. Zarzuolo, Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 2317–2326.
- [45] I. Ballester, R. González, A. Nieto, A. Zarzuolo, F. Sánchez de Medina, Monochloramine induces acute and protracted colitis in the rat: response to pharmacological treatment, *Life Sci.* 76 (2005) 2985–2990.
- [46] H. Ohshima, Y. Yoshie, S. Aunoi, I. Gilbert, Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on dna damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxy anion, *Free Radic. Bio. Med.* (1998) 1057–1065.
- [47] F.C. Skibola, M.T. Smith, Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Bio. Med.* 29 (2000) 375–383.
- [48] T. Cruz, J. Gálvez, E. Crespo, M.A. Doite, A. Zarzuolo, Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis, *Planta Med.* 67 (2001) 94–96.
- [49] M.E. Crespo, J. Gálvez, T. Cruz, M.A. Doite, A. Zarzuolo, Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS, *Planta Med.* 65 (1999) 661–663.
- [50] A.N. García-Argaez, T.O.R. Apan, H.P. Delgado, G. Velasquez, M. Martínez-Vázquez, Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decasotis bicolor* on TP6 ear mice model, *Planta Med.* 66 (2000) 279–281.
- [51] H. Sies, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radic. Bio. Med.* 27 (9–10) (1999) 916–921.
- [52] I. Morgenstern, M.T.M. Rajmalikar, W.H.M. Peters, H. Hoensch, W. Kirch, Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa, *Dig. Dis. Sci.* (2003) 2083–2090.
- [53] D. Camuesco, L. Peran, M. Comalada, A. Nieto, L.C. Di Stasi, M.E. Rodríguez-Cabezas, A. Concha, A. Zarzuolo, J. Gálvez, Preventative effects of lactulose in

- the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 11 (3) (2005) 265–271.
- [54] C. Loguercio, G. D'Argenio, M. Delle Cave, V. Cosenza, N. Della Valle, G. Mazzaoca, C. Del Vecchio Blanco. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Dig. Liver Dis.* 35 (9) (2003) 635–641.
- [55] T. Yamada, M.B. Graham. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. in: S.R. Targan, F. Shanahan (Eds.), *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Beside*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994, pp. 133–150.
- [56] S.H. Cestari, J.K. Bastos, L.C. Di Szazi. Intestinal anti-inflammatory activity of *Berchemia ibacunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Evid.-Based Compl. Alt.* (2009) 1–9.
- [57] T. Neichi, Y. Koshihara, S.I. Mutoa. Inhibitory effects of esculetin on lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 753 (1983) 130–132.
- [58] R.D. Loggia, E. Ragazzi, A. Tubaro, G. Fassina, R. Vertua. Anti-inflammatory activity of benzopyrone that are inhibitors of cyclo- and lipoxygenase. *Pharmacol. Res. Commun.* 20 (1988) 91–94.
- [59] J.R.S. Hault, M. Peyz. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. *Gen. Pharmacol.* 27 (4) (1996) 713–722.
- [60] S.D. Sharma, H.K. Rajor, S. Chopra, R.K. Sharma. Studies on structure activity relationship of some dihydroxy-4-methylcoumarin antioxidants based on their interaction with Fe (III) and ADP. *BioMetals* 18 (2005) 143–154.