

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**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**

Patrícia Rodrigues Orsi

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

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

**Botucatu
2008**

Ao meu marido Ricardo, que com extrema
dedicação e compreensão
me apóia e incentiva em
todos os momentos da minha vida.

À Deus por iluminar os meus dias
e me dar fé para superar as dificuldades;

Aos meus pais Maria Helena e Ozias
e aos meus irmãos Rodrigo e Danilo
pelo apoio e carinho em todas
as etapas da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Luiz Cláudio Di Stasi,
pela oportunidade oferecida e pelos
ensinamentos ao longo destes anos.

Agradecimentos

Aos meus amigos do laboratório, Silvia, Aline, Carol e Léo. Obrigada por cada momento de auxílio e amizade.

À todos do Laboratório, Silvia (ex Lab), Aline, Carol, Léo, Andréa (tagarela), Tassiane, Viviane e Tarina, pela ajuda nas matanças e pelos momentos divertidos, contem sempre com meu carinho e amizade.

À Professora Cláudia, pelo auxílio na histologia.

Ao Prof. Dr Wagner Vilegas, pela paepalantina e artigo prontamente enviado

Aos professores de farmacologia, cujas disciplinas acrescentaram muito a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cris, Janete, Luis, Paulão, por sempre me auxiliarem nos momentos que precisei.

À Luciene, Maria Helena e Sérgio, funcionários da Pós-Graduação, pela simpatia e paciência com que sempre me atenderam.

Ao Departamento de Farmacologia, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

À Meire e Selma da seção de normas técnicas da biblioteca.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro;

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Abreviaturas	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
Introdução	1
1. Doença Inflamatória Intestinal	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Epidemiologia	4
1.3. Etiologia	5
1.3.1. Fatores genéticos	6
1.3.2. Fatores ambientais.....	6
1.3.3. Microbiota intestinal.....	8
1.3.4. Sistema Imune.....	9
1.3.4.1. Mediadores inflamatórios	13
1.4. Defesas antioxidantes.....	16
1.5. Tratamentos farmacológicos.....	18
2. <i>Paepalanthus bromelioides</i> Silveira.....	21
Paepalantina.....	22
Objetivos	25
Material e Métodos	26
1. Substâncias teste.....	26
2. Ensaio <i>in vitro</i>	26
2.1. Peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato	26
3. Ensaio <i>in vivo</i>	28
3.1. Animais de experimentação	28
3.2. Indução da colite	28
3.3. Desenho experimental.....	29
3.3.1. Colite aguda.....	29
3.3.2. Colite crônica com recidiva.....	31
3.4. Avaliação macroscópica do processo inflamatório intestinal.....	32
3.5. Avaliação microscópica da lesão do cólon.....	34
3.6. Determinações bioquímicas	34
3.6.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	34
3.6.2. Determinação do conteúdo de glutatona total.....	35
3.6.3. Determinação do conteúdo de proteínas: método do ácido	

bicinchônico	37
3.6.4. Determinação da atividade da fosfatase alcalina	38
4. Análise Estatística	38
Resultados	39
1. Atividade antioxidante	39
2. Efeito dos tratamentos combinados paepalantina+sulfassalazina (P+S) na colite aguda.....	40
2.1. Avaliação macroscópica da lesão.....	40
2.2. Razão Peso/ comprimento do cólon.....	41
2.3. Incidência de diarréia e aderências.....	41
2.4. Consumo alimentar e Peso corporal.....	42
2.5. Avaliação microscópica da lesão.....	45
2.6. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	47
3. Efeito dos tratamentos combinados paepalantina+sulfassalazina (P+S) na colite crônica com recidiva.....	49
3.1. Avaliação macroscópica da lesão.....	49
3.2. Consumo alimentar e Peso corporal.....	52
3.3. Avaliação microscópica da lesão.....	55
3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	61
Discussão	63
Conclusão	71
Referências	72

ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCA	Ácido bicinchônico
CAT	Catalase
¹³ C NMR	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
CSR	Controle sem recidiva
CU	Colite ulcerativa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	Ácido ditiobisnitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
HE	Hematoxilina-Eosina
5-HETE	5-hidroxeicosatetraenóico
¹ H NMR	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
HTAB	Hexadeciltrimetilâmonio
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB-4	Leucotrieno B-4

MDA	Malonildialdeído
MØ	Macrófago
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OCl ⁻	Hipoclorito
OH	Hidroxila
P5	Paepalantina 5 mg/Kg
P+S	Paepalantina + Sulfassalazina
PBS	Tampão fosfato sódico
PG	Prostaglandina
S25	Sulfassalazina 25 mg/Kg
SOD	Superóxido dismutase
TBAS	Reativo tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Th	Células T auxiliaadoras
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Padrões de distribuição da Doença de Crohn com lesões descontínuas da boca até o ânus e da Colite Ulcerativa com o envolvimento contínuo do cólon.
- Figura 2.** Características histológicas em biópsia retal que auxiliam na distinção entre Colite ulcerativa e Doença de Crohn (MISIEWICZ *et al.*, 1994).
- Figura 3.** Hipótese para a etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais (FIOCCHI, 1998 com modificações).
- Figura 4.** Respostas imunes mediadas por células no cólon (PAVLICK *et al.*, 2002).
- Figura 5.** Conversão do peróxido de hidrogênio a hipoclorito na presença de cloro, pela enzima mieloperoxidase.
- Figura 6.** Conversão da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) após a exposição ao agente oxidante.
- Figura 7.** *Paepalanthus bromelioides* Silveira. A-associada ao cupinzeiro; B- inflorescências (capítulos) (A e B-FIGUEIRA e VASCONCELLOS NETO, 1991); C-vista superior (Prof. Dr WAGNER VILEGAS).
- Figura 8.** Estrutura química da paepalantina isolada de capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*.
- Figura 9.** Desenho experimental da fase aguda da colite.
- Figura 10.** Desenho experimental da fase crônica da colite com recidiva.
- Figura 11.** Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutathiona total nas amostras de cólon.
- Figura 12A.** Avaliação da atividade antioxidante da paepalantina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de lipoperoxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e TEITELBAUM, 1972 com modificações).
- Figura 12B.** Avaliação da atividade antioxidante da quercetina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de lipoperoxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e

TEITELBAUM, 1972 com modificações).

- Figura 13.** Consumo médio diário de ração dos animais na fase aguda
- Figura 14.** Peso corporal dos animais após 6 dias de experimento, constando de 5 dias de tratamento.
- Figura 15.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase aguda da doença, após indução de colite por TNBS/etanol.
- Figura 16A.** Consumo médio diário de ração por animais na primeira semana de tratamento.
- Figura 16B.** Consumo médio diário de ração por animais com 14 dias de tratamento.
- Figura 16C.** Consumo médio diário de ração por animais com 21 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2^a dose foi administrada no 15^o dia.
- Figura 17A.** Média do peso corporal dos animais em cada grupo durante a primeira semana de tratamento.
- Figura 17B.** Média do peso corporal dos animais em cada grupo durante 14 dias de tratamento.
- Figura 17C.** Média do peso corporal dos animais em cada grupo durante 21 dias de tratamento, a indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2^a dose (recidiva) foi administrada no 15^o dia.
- Figura 18.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante a primeira semana de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1
- Figura 19.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante 14 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1
- Figura 20.** Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante 21 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2^a dose (recidiva) foi administrada no 15^o dia

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Critério de determinação de escore de lesão colônica (BELL *et al.*, 1995).
- Tabela 2.** Efeito da paepalantina (5mg/Kg) (P5), das combinações paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 15 mg/Kg (P5+S15), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 25 mg/Kg (P5+S25) e da sulfassalazina (25mg/Kg) (S25) no escore de lesão, mudanças no peso e comprimento colônico, incidência de diarreia e aderência, na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.
- Tabela 3.** Efeito da paepalantina (5mg/Kg) (P5), das combinações paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 15 mg/Kg (P5+S15), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 25 mg/Kg (P5+S25) e da sulfassalazina (25mg/Kg) (S25) no conteúdo de glutathione (GSH), atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade da Fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.
- Tabela 4.** Efeito dos tratamentos com paepalantina (5mg/Kg) (P5), sulfassalazina (25 mg/Kg) (S25) e das combinações paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 5mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 25mg/Kg (P5+S25) no escore de lesão, mudanças do peso-comprimento colônico, incidência de diarreia e aderência, na fase crônica da colite induzida por TNBS em ratos
- Tabela 5.** Efeito dos tratamentos com paepalantina (5mg/Kg) (P5), sulfassalazina (25 mg/Kg) (S25) e das combinações paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 5mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 25mg/Kg (P5+S25) no conteúdo de glutathione total (GSH), na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS em ratos.

Paepalantina, uma isocumarina isolada dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides*, possui atividade antioxidante e antiinflamatória intestinal. Considerando que a sulfassalazina apresenta sérios efeitos colaterais, especialmente quando usada em altas doses ou longos períodos de tratamento, o presente projeto teve como objetivo avaliar a presença de possíveis efeitos sinérgicos da paepalantina sobre a atividade antiinflamatória intestinal da sulfassalazina no modelo experimental de colite ulcerativa na fase aguda e crônica com recidiva induzida pela administração intracolônica de ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Os efeitos da administração de paepalantina 5 mg/Kg (P5) e sulfassalazina 25 mg/Kg (S25), assim como de suas combinações (P5+S5; P5+S15 e P5+S25 mg/Kg) foram avaliados por parâmetros clínicos (presença de diarreia, consumo de alimento e peso corporal), macroscópicos (escore de lesão, relação peso/comprimento colônico, aderência a órgãos adjacentes), microscópicos e bioquímicos (níveis de glutathione, atividade enzimática da mieloperoxidase e fosfatase alcalina). Os resultados indicam que uso da combinação P5+S5 promoveu efeitos preventivos e curativos na mucosa colônica afetada pelo TNBS/etanol, semelhantes aos agentes testados isoladamente (P5 e S25). Apesar da ausência de efeitos sinérgicos da paepalantina sobre a atividade antiinflamatória da sulfassalazina, a associação de paepalantina (5 mg/Kg) com sulfassalazina (5 mg/Kg) promoveu efeitos protetores usando dose 5 vezes menor do fármaco de referência, indicando que esta combinação pode ser usada com menores efeitos adversos e colaterais relacionados à sulfassalazina.

Palavras-chave: paepalantina, *Paepalanthus bromelioides*, colite, efeito sinérgico, atividade antiinflamatória intestinal, TNBS.

Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, shows antioxidant and intestinal anti-inflammatory activities. Since sulfasalazine produces serious side effects, especially when used at high doses or during prolonged periods of time, the present project evaluated the potential synergistic effect of oral administration of paepalantine on the intestinal anti-inflammatory activity (acute and relapse colitis) of sulfasalazine in the experimental rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS). The effects of administration of paepalantine 5 mg/Kg (P5) and sulfasalazine 25 mg/Kg (S25), as well as its combination (P5+S5; P5+S15 and P5+S25 mg/Kg) was evaluated by clinical (diarrhea incidence, food intake and body weight), macroscopical (score of lesion, weight/length ratio and adherence to adjacent tissue), microscopical and biochemical (levels of glutathione, myeloperoxidase and alkaline phosphatase activities) parameters. The results show that the combination P5+S5 promotes preventive and curative effects on colonic mucosa insulted by TNBS/ethanol, similar to those produced by P5 and S25. Despite of the absence of synergistic effect of paepalantine on the anti-inflammatory activity of sulfasalazine, the combination of P5 plus S5 promoted protective effects with a dose 5 times smaller than the reference drug, suggesting that this combination may be used with fewer adverse and side effects related to sulfasalazine.

Key words: paepalantine, *Paepalanthus bromelioides*, colitis, synergistic effect, intestinal anti-inflammatory activity, TNBS.

1. Doença Inflamatória Intestinal

1.1. Aspectos gerais

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) engloba, fundamentalmente, duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC), descrita pela primeira vez em 1932 por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer e a Colite Ulcerativa (CU), descrita por Wilks e Moxon, em 1859 (KIRSNER, 1985). Ambas caracterizam-se por inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (GITNICK, 1996), desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados como diarreia e constipação (SINGH *et al.*, 2003). As recidivas freqüentes que ocorrem nos pacientes acometidos pela DII são maiores nos jovens e parecem diminuir nos mais velhos (ARDIZZONE, 2003).

Tanto a DC como a CU caracterizam-se por transtornos inflamatórios que ocorrem no intestino; entretanto, apresentam diferenças quanto à anatomia patológica, histológica e manifestações clínicas. Distinguir entre DC e CU pode ser um desafio visto que em 10 a 20% dos pacientes não é possível fazer esta identificação (KNIGGE, 2002).

A DC é caracterizada por inflamação transmural envolvendo todas as camadas da parede do trato gastrointestinal, podendo ocorrer formação de abscessos severos e recorrentes, aparecimento de perfurações, estenoses e fístulas com órgãos adjacentes. Também podem atingir a boca, esôfago, apêndice, reto e ânus (Figura1) (LEVINE, 1994; GASCHE, 2000; KNIGGE, 2002). A apresentação clínica da DC é amplamente variada e o nível de atividade flutua em termos de severidade. Os locais mais frequentemente afetados incluem o intestino delgado (30% dos casos), o íleo em associação ao cólon (40% dos casos), o cólon (25% dos casos) e o estômago em associação ao duodeno (5% dos casos) (HANAUER e SANDBORN, 2001).

Em contraste, a CU se limita ao cólon (Figura 1), sendo os locais mais comumente envolvidos o reto e cólon descendente (40% dos casos) e o cólon em toda sua extensão (30% dos casos) (STENSON, 1995).

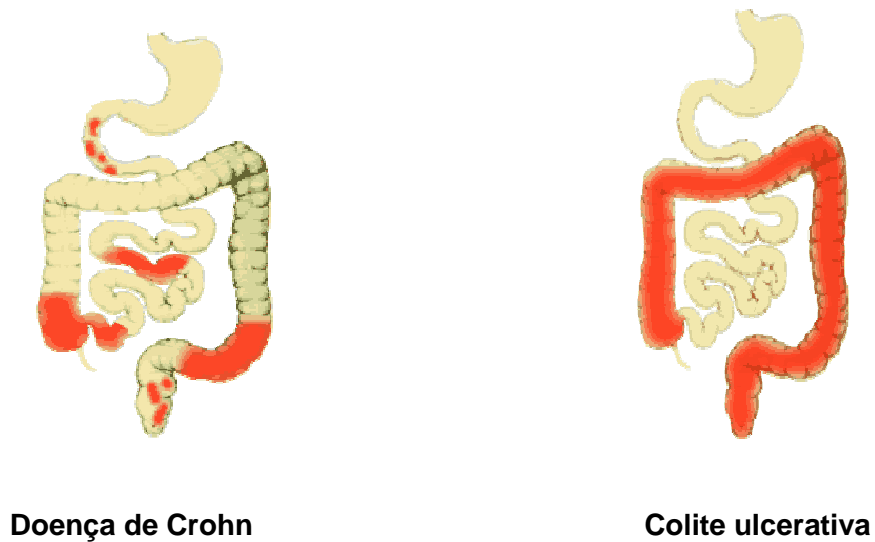


Figura 1. Padrões de distribuição da Doença de Crohn com lesões descontínuas da boca até o ânus e da Colite Ulcerativa com o envolvimento contínuo do cólon.

Histologicamente, a DII é caracterizada por maciça infiltração de células inflamatórias, danos na mucosa e submucosa, com extensiva ulceração no epitélio da mucosa (HENDRICKSON *et al.*, 2002). As características histológicas que ajudam a distinguir a CU da DC podem ser observadas na figura 2.

	Características			
Colite Ulcerativa 	Depletada	Células de muco	Normal	Doença de Crohn 
	Comum	Abscessos nas criptas	Escasso	
	Contorcida, atrofiada	Arquitetura glandular	Preservada	
	Uniformemente pesado	Infiltrado linfocítico	Fragmentado, pesado em alguns locais	
	Ausente	Granulomas	Presente	
	Espessada	Muscular da mucosa	Normal	
	Pouca	Inflamação na submucosa	Desproporcionalmente pesada	

Figura 2. Características histológicas em biópsia retal que auxiliam na distinção entre Colite ulcerativa e Doença de Crohn (MISIEWICZ *et al.*, 1994).

A apresentação clínica da DII é composta de ataques intermitentes de sangramento retal, diarreia, eliminação de muco, dor abdominal e perda de peso. Os pacientes portadores de DII são levados à cirurgia de urgência devido a complicações como perfuração intestinal, hemorragia, megacólon tóxico, como alternativa à falha do tratamento clínico ou como prevenção do câncer colorretal. O risco de câncer de cólon está aumentado nos pacientes com DII, sendo fatores de predisposição a duração da enfermidade, extensão da mesma, complicações extra-intestinais e idade (CLEVERS, 2004). O risco de câncer é superior em pacientes com CU do que com DC (POHL *et al.*, 2000). Na DC os pacientes podem apresentar quadros clínicos relacionados às manifestações extra-intestinais como uveíte, osteoporose, espondilite anquilosante, artrite periférica, eritema nodoso, baqueteamento das pontas dos dedos, pioderma gangrenosa e edema (MISIEWICZ *et al.*, 1994).

Em ambas as doenças podem aparecer complicações do tipo auto-imune ou não. As complicações auto-ímunes podem afetar os órgãos extra-intestinais como as articulações (LICHTMAN e BALFOUR SARTOR, 1994); por outro lado, nas não-auto-ímunes podem destacar-se o aparecimento de episódios tromboembólicos, anemia e osteoporose (GASCHE, 2000; SZULC e MEUNIER, 2001).

1.2. Epidemiologia

Apesar das DII ocorrerem em todo o mundo, a maior incidência é encontrada em brancos da América do Norte (KNIGGE, 2002). Desde a segunda guerra mundial, a incidência de DII tem crescido dramaticamente em países em desenvolvimento (THOMPSON *et al.*, 2000). Dados epidemiológicos sugerem que a incidência crescente da DII está associada com o desenvolvimento social, uma vez que fatores ambientais comuns em populações com baixo nível sócio-econômico estão ligados com uma baixa incidência de DII (BACH, 2002). A DC ocorre no mundo inteiro, mas principalmente nas populações do Ocidente desenvolvido, apontando a influência ambiental na gênese da DII. A CU é mais comum nos caucasianos do que negros ou orientais e tem alta incidência nos judeus (ARDIZZONE, 2003).

Estudos epidemiológicos sobre a CU são difíceis, provavelmente porque casos leves podem ser negligenciados (GORDON e NIVATVONGS, 1992), bem como pode ocorrer uma superestimativa da doença em locais onde as diarreias infecciosas são muito prevalentes (DAMIANI, 2006). Existe ainda a dificuldade de diferenciar a colite ulcerativa da doença de Crohn, podendo passar anos de evolução até o diagnóstico definitivo (KEIGHLEY e WILLIAMS, 1998). As taxas de incidência e mortalidade da DII no Brasil ainda são desconhecidas, devido às dificuldades diagnósticas na formulação da hipótese clínica e no processo de investigação (ZALTMAN, 2007).

Parece existir uma pequena diferença na incidência da DII entre sexos. Em geral, a DC é predominante na mulher, mas em certas regiões é mais freqüente nos homens. Por outro lado, a CU tende a predominar em indivíduos do sexo masculino (LOFTUS *et al.*, 2000). A incidência da DC é de cinco casos em cada 100 mil habitantes, enquanto na CU é de 12 casos para 100 mil habitantes, nos Estados Unidos (ZALTMAN, 2007). Também podem estar relacionadas com a idade do indivíduo. Na CU existe um pico de ocorrência da doença entre a segunda e quarta décadas de vida e, um segundo pico na sexta década (MAZIER *et al.*, 1995;

CORMAN, 2005), embora esta doença tem sido relatada em todas as décadas de vida.

1.3. Etiologia

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, a sua etiologia ainda é desconhecida. Um único agente ou mecanismo isolado não parecem ser suficientes para produzir ou desencadear a doença. A interação de fatores genéticos e ambientais, em combinação com a microbiota intestinal, dispara um mecanismo que ativa as células de origem imune e não-imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal (Figura 3). Portanto, até o momento as DII têm origem multifatorial (FIOCCHI, 1998).

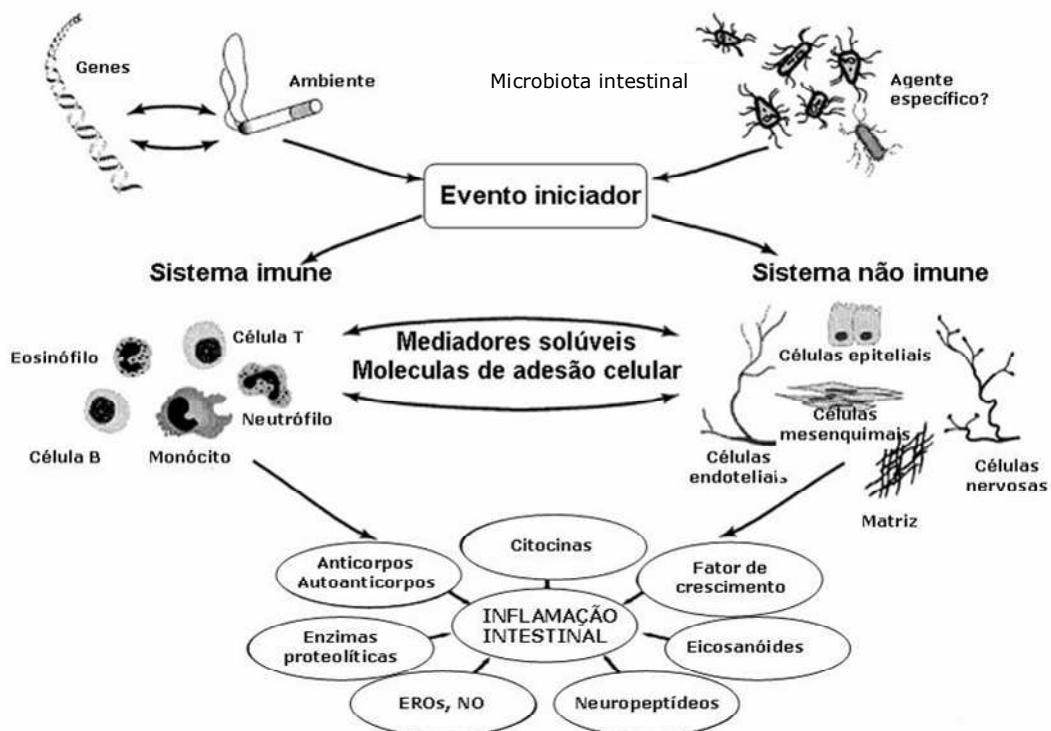


Figura 3 - Hipótese para a etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais (FIOCCHI, 1998, com modificações).

1.3.1. Fatores genéticos

São muitas as evidências da contribuição dos genes na DII. Assim, os familiares de primeiro grau dos indivíduos afetados pela DII mostram um risco de 25-50 e 10-20 vezes maior de desencadear DC e CU, respectivamente, comparados a população geral (ZHENG *et al.*, 2003).

Estudos genéticos realizados identificaram as possíveis ligações de cromossomos específicos com a DII. Um grande estudo revelou ligações de associações nos cromossomos 12 e 16 (CURRAN *et al.*, 1998), com evidência significativa para o locus de susceptibilidade à DC no cromossomo 16, mas não no cromossomo 12, especialmente nas famílias de origem judaica (BRANT *et al.*, 1998). A susceptibilidade para DC e CU também pode envolver os cromossomos 3 e 7 (SATSANGI *et al.*, 1996).

1.3.2. Fatores ambientais

A influência de fatores ambientais no desenvolvimento das DII é evidente dado o dramático aumento na incidência, tanto de CU como de DC, durante a segunda metade do século XX como consequência de profundas mudanças no estilo de vida em países desenvolvidos (WILLS-KARP *et al.*, 2001). Fatores ambientais que parecem estar envolvidos na patogênese da DII incluem: o tabagismo, a dieta, a situação social, o estresse, fármacos como antiinflamatórios não-esteroidais e microorganismos (KNIGGE, 2002; DANESE *et al.*, 2004). Porém até o momento nenhum agente infeccioso isolado ou fator ambiental isolado foi identificado (KNIGGE, 2002).

O melhor exemplo da influência do ambiente na DII é o tabagismo. O tabagismo apresenta um efeito contrário na DC e na CU, apoiando a idéia de que mecanismos distintos estão implicados na patogênese em cada forma da DII

(THOMAS *et al.*, 1998). É um importante fator de risco para a DC, aumentando o efeito das recidivas e da necessidade de cirurgias, onde a interrupção do seu consumo melhora o andamento da doença (RUBIN e HANAUER, 2000). Ao contrário, os pacientes com CU com frequência são fumantes, e os que deixam de fumar há um risco aumentado de desenvolver CU, sugerindo seu papel protetor nesta doença (BRIDGER *et al.*, 2002).

Os mecanismos deste efeito diferencial dos fumantes na DC e na CU não são claros, mas sabe-se que o tabagismo afeta tanto a imunidade sistêmica como a da mucosa intestinal, alterando numerosas funções imunes tanto inatas como adquiridas (SOPORI, 2002). O consumo do cigarro pode gerar aproximadamente 4000 compostos, sendo provável que a nicotina seja o agente ativo mais importante. Assim, a nicotina transdérmica mostra um efeito benéfico em pacientes com CU leve a moderada (PULLAN *et al.*, 1994; GUSLANDI e TITTOBELLO, 1996). Em distintos modelos experimentais de colite, observou-se que a administração de nicotina melhora a doença, coincidindo com uma diminuição local da concentração de várias citocinas pró-inflamatórias (AGRAWAL e RHODES, 2003).

Devido à localização da doença no trato digestório, os componentes da dieta podem estar diretamente implicados na patofisiologia da DII. Levando em consideração que a maior incidência das DII pode ser associada a mudanças nos hábitos de vida nos países ocidentais e que o intestino é o principal local do processo inflamatório, seria provável que alguns nutrientes presentes na luz intestinal pudessem atuar como antígenos, inclusive influenciando os mecanismos imunes e reparadores da mucosa intestinal (DANESE *et al.*, 2004). O consumo de gordura está associado como prejudicial na CU (REIF *et al.*, 1997); por outro lado, estudo realizado por Barbosa *et al.* (2003), com óleo de peixe rico em ômega-3, mostrou efeito anti-inflamatório em pacientes com colite ulcerativa. O consumo de frutas, vegetais e fibras parecem reduzir o risco da DII (REIF *et al.*, 1997).

Outros fatores sugerindo o uso dos anticoncepcionais orais e antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) têm sido muito estudados em uma possível relação epidemiológica ou relação causa-efeito no risco de desencadear a DII. Pacientes que sofrem de remissão clínica podem sofrer recaídas após a administração de AINEs (GODET *et al.*, 1995; EVANS *et al.*, 1997; HANAUER e SANDBORN, 2001). A inflamação colônica está associada com o bloqueio da prostaglandina e alteração na reatividade imune da mucosa (BERG *et al.*, 2002). Alstead (1999) sugere que o uso concomitante de anticoncepcionais orais com a DII ativa, pode agravar a evolução da doença através do risco de tromboembolia, mas resultados que ligam estes fatores são pouco conhecidos.

O estresse tem sido considerado como um desencadeador potencial em cerca de 40% dos pacientes com CU (THEIS e BOYKO, 1994). Evidências de que o estresse pode modular o rumo da DII foi visto através de observações clínicas e estudos de interações neuroimunes em animais de laboratórios onde o estresse foi um agravante da doença (COLLINS, 2001). A duração do estresse pode estar envolvida com a exacerbação da DII, visto que somente o estresse prolongado parece agravar a doença (LEVENSTEIN *et al.*, 2000). Os mecanismos específicos envolvidos na exacerbação da DII induzidos pelo estresse são desconhecidos, mas vários fatores podem contribuir como o sistema nervoso, endócrino e imune (HART e KAMM, 2002).

1.3.3. Microbiota Intestinal

Uma das hipóteses relacionadas à patogênese da DII é que a doença ocorre devido a uma resposta exacerbada às bactérias da microbiota intestinal em indivíduos geneticamente predispostos (SARTOR, 2004). Esta hipótese recebe suporte de estudos realizados em modelos animais. Estudos com modelos de inflamação intestinal que mimetizam o que ocorre em humanos mostraram que a microbiota tem

papel essencial na inflamação experimental já que não ocorre inflamação em roedores livres de patógenos (*germ-free*) (RATH *et al.*, 1996).

Não existe um agente microbiano específico causador da DII; porém, as evidências sugerem que a doença está relacionada ao desequilíbrio entre bactérias patogênicas e benéficas. Diversos estudos mostraram diferenças entre a microbiota de pacientes portadores de DII e os controles saudáveis; biópsias retais de pacientes com DII tem uma redução de *Lactobacillus* sp e *Bacterioides* e um aumento na concentração de *Escherichia coli* e *Clostridium* sp (CAMPIERI e GIONCHETTI, 2001; LINSKENS *et al.*, 2001; MYLONAKI *et al.*, 2005). Esta constatação da redução do *Lactobacillus* sp na microbiota intestinal dos portadores de DII foi observada em estudos experimentais e sugere um papel protetor destas bactérias para prevenir ou atenuar os sintomas da doença (MADSEN *et al.*, 1999).

Os probióticos, definidos como microorganismos vivos, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para a saúde e podem melhorar tanto a DII humana como a colite experimental (CAMPIERI e GIONCHETTI, 1999; SARTOR, 2005). A administração da mistura de bifidobactérias e lactobacilos agem prevenindo a colonização do intestino por microorganismos patogênicos, prolongando a remissão da colite ulcerativa (SHIBA *et al.*, 2003; SETOYAMA *et al.*, 2003). Da mesma forma, prebióticos como a lactulosa, um fármaco usado como laxante, promove o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias e, de acordo com CAMUESCO *et al.* (2005), a lactulosa facilita a recuperação do tecido inflamado na colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos cujo efeito foi associado a uma atenuação da resposta imune.

1.3.4. Sistema Imune

A imunorregulação no intestino é um processo muito complexo mediado por uma variedade de células imunes que estão constantemente protegendo o intestino

dos antígenos presentes no lúmen. Existe uma comunicação entre estas células e, como resultados desta interação e de diferentes processos de sinalização intracelular, ocorrem uma secreção de numerosos produtos como anticorpos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enzimas proteolíticas e neuropeptídios (Figura 3) (FIOCCHI, 1998).

Diferentes estudos têm mostrado que as células T auxiliaadoras tipo-1 (Th1) estão envolvidas na imunidade mediada por células contra os agentes infecciosos (bactérias, fungos e protozoários). Esta resposta imune protetora envolve não somente a ativação da célula Th1 e a subsequente liberação de suas citocinas pró-inflamatórias, mas também envolve a ativação de macrófagos e outros leucócitos para a liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias como, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 assim como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O resultado da ativação de células Th-1 e a ativação da imunidade mediada por células é o recrutamento de leucócitos fagocíticos (macrófagos e neutrófilos) para o intestino onde os antígenos invasores são fagocitados e destruídos (Figura 4). Este é o mecanismo primário pelo qual o lúmen do intestino se protege dos patógenos e a falha deste mecanismo é o evento chave envolvido na patogênese da DII (POWRIE, 1995; FIOCCHI, 1998).

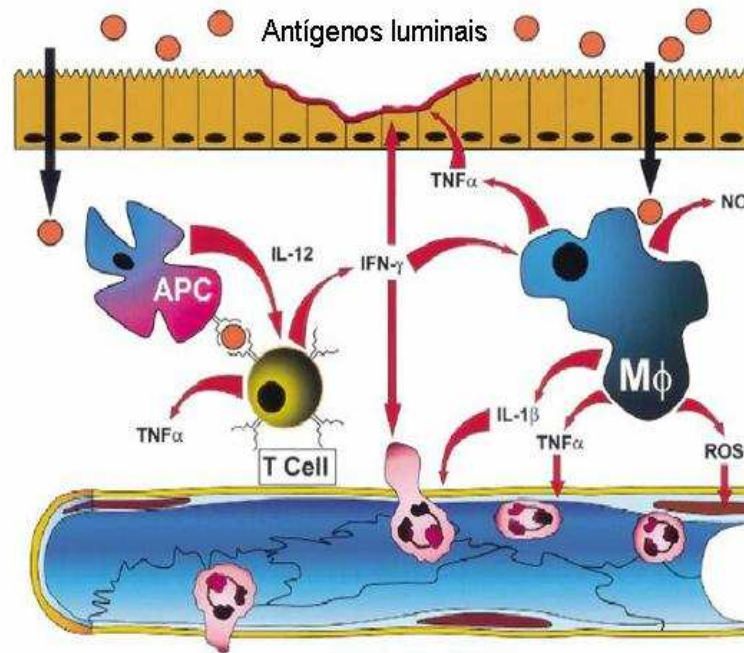


Figura 4. Respostas imunes mediadas por células no cólon. Células apresentadoras de antígenos (APCs) fazem endocitose, processam e apresentam antígenos luminais que continuamente ganham acesso ao interstício da mucosa. A interação entre APCs e células-T (T cell) ativa estas a produzirem Interleucina 2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), os quais ativam macrófagos teciduais ($M\phi$) a liberarem uma variedade de citocinas proinflamatórias e mediadores incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-12, NO e ROS. IL-12 retroalimenta as células T efetoras a induzir diferenciação de células T auxiliares-1 (Th-1). Citocinas e mediadores derivados de Th-1 e $M\phi$ ativam o endotélio microvascular para aumentar a expressão de moléculas de adesão, desse modo promovendo o recrutamento de leucócitos fagocíticos como polimorfonucleares. O resultado é a destruição de patógenos invasores. A resposta imune da mucosa descontrolada pode resultar em injúria tecidual (PAVLICK *et al.*, 2002).

Assim, anormalidades da imunidade celular estão diretamente relacionadas ao processo de dano tecidual nas doenças inflamatórias intestinais devido ao grande número de linfócitos T encontrado no infiltrado inflamatório (ELIA e SOUZA, 2001). Na DC, os linfócitos T auxiliares ativados da mucosa intestinal geram uma resposta predominantemente do tipo T auxiliares-1 (Th1), manifestada pela produção de IFN-gama, ativação de macrófagos e amplificação da produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a resposta de hipersensibilidade tardia. Na CU, predomina a resposta do tipo T auxiliares-2 (Th2), com produção preferencial de IL-4 e IL-5 que favorece a imunidade humoral, com estímulo à diferenciação de linfócitos B, e

anticorpopogênese acentuada. A produção de IL-10 e IL-13 pelos linfócitos Th2 ainda pode exercer efeito inibitório sobre os linfócitos Th1 e sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (ELIA e SOUZA, 2001).

Ao contrário do observado na mucosa intestinal normal, em que existe um predomínio de linfócitos B contendo IgA (imunoglobulina A), nas DII predominam os linfócitos B, produtores de IgG (imunoglobulina G). A resposta imunitária exacerbada, caracterizada pela ativação de linfócitos T e B na mucosa intestinal, resulta em aumento local da secreção espontânea de imunoglobulinas, particularmente as subclasses de IgG, com aumento seletivo de IgG1 na CU e de IgG2 na DC (MACDERMOTT e NAHM, 1987).

Durante uma reação inflamatória, monócitos do sangue migram em grande número para os tecidos. Na DII ocorre um aumento no número de macrófagos na mucosa intestinal, provavelmente em consequência de uma demanda aumentada na mucosa inflamada (ELIA e SOUZA, 2001). Um estudo funcional com macrófagos isolados do intestino normal revelou que estas células podem influenciar na produção de imunoglobulinas a partir de células mononucleares da mesma mucosa. Macrófagos isolados da mucosa intestinal de pacientes com DII são capazes de estimular ainda mais a produção de IgG, sugerindo a existência de uma correlação entre os macrófagos e a exacerbção da resposta imunitária local (WU *et al.*, 1990).

Mastócitos e eosinófilos constituem uma fonte importante de mediadores inflamatórios tais como histamina, enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas, metabólitos do ácido araquidônico e citocinas, e são encontrados em grande número na mucosa do tubo digestivo. No entanto, o papel dessas células na patogênese das DII é incerto, já que os estudos são ainda preliminares e seus resultados contraditórios (ELIA e SOUZA, 2001).

A adesão de leucócitos circulantes no endotélio intestinal depende da expressão coordenada de moléculas de adesão nas células endoteliais, incluindo ICAM-1 (moléculas de adesão intracelular) (PANÉS e GRANGER, 1998).

Concentrações elevadas de ICAM-1 (moléculas de adesão intracelular) no sangue e selectina E em biópsias de mucosa inflamada foram detectadas em pacientes com DII (NIELSEN e RASK-MADSEN, 1996).

O fator de transcrição nuclear NF-*Kappa* B é uma peça chave na regulação da expressão de vários genes envolvidos com a função imunitária no trato gastrointestinal, e foi encontrado em níveis elevados no epitélio e na lâmina própria da mucosa inflamada de pacientes com DII (ROGLER *et al*, 1998). Além de modular a resposta imunitária intestinal através da regulação de genes de citocinas, o NF-*Kappa* B é capaz de regular os genes que codificam outros fatores de transcrição e moléculas de adesão (ELIA e SOUZA, 2001).

1.3.4.1. Mediadores inflamatórios

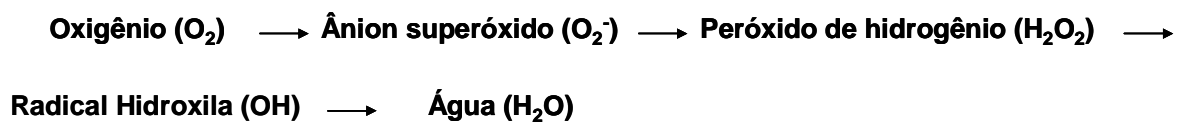
A existência de diversas alterações na síntese e liberação de distintos e variados mediadores estão implicados na manutenção e amplificação da resposta imune-inflamatória (NIELSEN e RASK-MADSEN, 1996). O estudo dos mediadores inflamatórios tem sido importante tanto para a compreensão dos processos inflamatórios crônicos intestinais quanto para a possibilidade de intervenção terapêutica. O processo inflamatório pode ser desencadeado por vários mecanismos. Após a ativação dos macrófagos e dos granulócitos, uma variedade de mediadores inflamatórios é liberada incluindo citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, radicais livres e proteases. A presença destes mediadores pode levar ao dano tecidual direto através de vários mecanismos.

Um grande aumento na síntese colônica de Leucotrieno B-4 (LTB-4) em pacientes com DII, foi observada por Wallace (1994). O LTB-4 é um agente pró-inflamatório devido a sua capacidade quimiotática e ativadora de neutrófilos, sendo um mediador característico nas lesões inflamatórias agudas e que pode ser o responsável por grande parte da destruição celular e necrose que caracterizam a DII (NIELSEN *et*

al., 1987). A destruição celular e necrose, por sua vez, ocorrem devido à secreção de distintas proteases e de mieloperoxidase, assim como da geração de radicais livres derivados do oxigênio e do nitrogênio (MIDDLETON *et al.*, 1993; GRISHAM, 1994).

Na DII, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em excesso pela mucosa inflamada (BABBS,1992; SIMMONDS *et al.*, 1992; GRISHAM,1994). Estes radicais livres desempenham um papel chave na gênese e manutenção da DII, onde as fontes predominantes de EROs na mucosa inflamada são provavelmente de leucócitos ativados (REPINE *et al.*, 1979).

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua camada eletrônica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. O oxigênio normalmente aceita quatro elétrons e é então convertido em água. Porém a redução parcial de oxigênio ocorre nos sistemas biológicos gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs), que são potencialmente lesivas a proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. A redução seqüencial do oxigênio até a formação de água esta ilustrada no esquema abaixo (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).



O peróxido de hidrogênio atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron normalmente do ferro ou cobre, origina o radical hidroxila, altamente lesivo e capaz de reagir com quase todas as substâncias orgânicas (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma

desestruturação da membrana celular e a conseqüente morte da célula. Os radicais livres também podem reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da célula. Finalmente, quando os ácidos nucleicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese protéica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com risco de desenvolvimento de processos do tipo tumoral. Este último poderia justificar a maior incidência de câncer colo-retal descrito em pacientes com colite ulcerativa (OBRADOR, 1994; GITNICK, 1996).

O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido, na presença de cloro a ácido hipocloroso (HClO) ou hipoclorito (OCl⁻) (Figura 5), que são potentes agentes oxidantes e contribuem com o mecanismo de defesa contra os agentes infecciosos, mas que também podem atuar sobre as células, podendo causar muitos danos em enfermidades inflamatórias (KETTLE e WINTERBOURN , 1994). Esta conversão é realizada pela enzima mieloperoxidase (Figura 5), uma enzima amplamente distribuída no organismo, encontrada no interior de neutrófilos e em menores concentrações, em monócitos e macrófagos (MATHESON *et al.*, 1981).

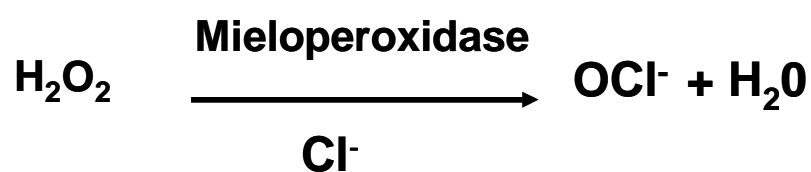


Figura 5: Conversão do peróxido de hidrogênio a hipoclorito na presença de cloro, pela enzima mieloperoxidase.

Embora seja evidente que o óxido nítrico (NO) é um mediador chave nos processos de inflamação intestinal, há atualmente uma enorme controvérsia em relação ao papel deste mediador na fisiopatologia da inflamação intestinal. No entanto, tem-se observado que o sistema enzimático envolvido na síntese do NO parece ser

importante, mas depende do estágio, agudo ou crônico, em que se encontra o processo inflamatório (MILLER e GRISHAN, 1995; KUBES e WALLACE, 1995). A inibição na síntese de óxido nítrico (NO), em modelo experimental de colite, revelou uma diminuição significativa da lesão tecidual (RACHMILEWITZ *et al.*, 1995).

Estes agentes pró-inflamatórios promovem, em primeiro lugar, a aderência dos fagócitos no endotélio vascular e extravasamento destas células para a mucosa intestinal e, em segundo lugar, a ativação destes fagócitos origina a liberação de radicais livres, assim como de enzimas proteolíticas no espaço intersticial intestinal. Tanto os radicais livres como as enzimas proteolíticas dão lugar a formação de mais mediadores inflamatórios, incrementando a permeabilidade da mucosa e, em última instância, favorecendo a entrada de produtos bacterianos prejudiciais, tais como o lipopolissacarídeo (LPS). A introdução destes produtos promove o recrutamento e ativação adicional de leucócitos do intestino, estabelecendo-se um círculo vicioso responsável pela instauração do prejuízo intestinal crônico (SHANAHAN e TARGAN, 1994).

Alterações nos níveis oxidativos de biopsias de mucosas de cólon procedentes de pacientes com DII foram comprovadas por Lih-Brody *et al.*, (1996), e este desequilíbrio se traduz em um incremento no estresse oxidativo acompanhado de uma diminuição nas defesas antioxidantes fisiológicas (LOGUERCIO, 1996). A inibição ou neutralização destes radicais livres, juntamente com ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como não-enzimáticos, poderia ser benéfico no tratamento da DII (NIELSEN e RASK-MADSEN, 1996).

1.4. Defesas antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação desse substrato. Deste modo, os antioxidantes atuam como protetores da oxidação de

biomoléculas por radicais livres e impedem a propagação da reação em cadeia provocada pelos mesmos (FANG *et al.*, 2002).

As principais defesas enzimáticas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPX). Além disso, antioxidantes não-enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH), tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), entre outros, auxiliam no combate às Espécies reativas de oxigênio (EROs) (GUTTERIDGE, 1995; KAYATEKIN *et al.*, 2002). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural de membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986).

A glutathione é um tripeptídeo sintetizado a partir dos aminoácidos precursores: glicina, cisteína e glutamato. Ela está presente na maioria das células nas formas reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG) (SIDO *et al.*, 1998; ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001), como componente principal do estoque endógeno de grupos sulfidrílicos não protéicos (SH-NP) (BOYD *et al.*, 1979). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupo sulfidrílico (-SH) presente na cisteína. Em estudos anteriores foi demonstrado que radicais livres citotóxicos e níveis baixos de compostos sulfidrílicos estão associados com danos teciduais gástricos (MILLER *et al.*, 1985; PARMAR *et al.*, 1988)

A GPX é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos para água e álcool, através da conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG), usando a GSH como doadora de elétrons (BENZI, 1993) (Figura 6). A recuperação da GSH a GSSG é feita pela enzima glutathione redutase (GR), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT e MC LEAN, 1990). A GR não age na remoção de espécies radicalares, porém, é responsável pela regeneração da GSH reduzida na presença de NADPH, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da GSH (MEISTER e ANDERSON, 1983).



Figura 6. Conversão da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG) após a exposição ao agente oxidante.

Fármacos que possuem atividade antioxidante são usadas correntemente no tratamento da DII, tais como os derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), cujas propriedades antioxidantes contribuem para seus efeitos benéficos no processo inflamatório colônico (PAVLICK *et al.*, 2002). Infelizmente, a sulfassalazina e os derivados do 5-ASA, que representam a primeira opção terapêutica para o tratamento da DII, apresentam sérios efeitos colaterais, especialmente quando usados em altas doses ou durante longos períodos de tratamento, aspecto que limita seu uso visto que a DII é um processo crônico que requer tratamento prolongado (RANSFORD e LANGMAN, 2002).

1.5 - Tratamentos farmacológicos

Um grande número de fármacos que atuam na DII têm sido empregados; porém, consegue-se a remissão das crises, mas não a cura da doença. Há muitos anos os fármacos mais utilizados para o tratamento da colite ulcerativa leve e moderada são os aminosalicilatos, em especial a sulfassalazina que é utilizada na dose de dois a quatro gramas diárias na manutenção terapêutica de pacientes com DII (AZAD KHAN *et al.*, 1980).

A sulfassalazina é um pró-fármaco, produto inativo que *in vivo* é convertido em sua forma farmacologicamente ativa, o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), o qual é efetivo no controle do processo inflamatório (MIYACHI *et al.*, 1987; DALLEGRI *et al.*, 1990; PEARSON *et al.*, 1996; CORMAN, 2005). Entretanto, esta conversão da

sulfassalazina por bactérias intestinais produz também a sulfapiridina que serve para transportar o 5-ASA, sendo tóxica e responsável pelos efeitos colaterais (AZAD KHAN *et al.*, 1977), principalmente anemia hemolítica, agranulocitose, reações na pele, hepatite, artrite, pericardite, pancreatite, pleurite, febre, pancitopenia, infertilidade masculina reversível, intolerância gástrica e cefaléia (RANSFORD e LANGMAN, 2002).

Os corticosteróides como a prednisolona têm sido empregados quando o 5-ASA se mostra ineficiente. São efetivos no tratamento da DII aguda e são também utilizados no tratamento da DII moderada e severa (ONUMA e DAS, 1998). Entretanto, não existem evidências de que os corticosteróides sejam efetivos na remissão da doença (ONUMA e DAS, 1998).

Os agentes imunossupressores como azatioprina, methotrexato e ciclosporina são fármacos aceitos como apropriados para o manejo por longo tempo em pacientes com DII. Seu uso racional é baseado na observação de mecanismos imunes envolvidos na patogênese da doença. O tempo necessário para o medicamento tornar-se efetivo é em torno de três meses, tornando-se contra indicados no tratamento agudo. A ciclosporina é mais potente e tem início de ação mais imediato, porém com mais efeitos colaterais (disfunção renal, neurotoxicidade e infecções oportunistas), sendo reservada para o tratamento da doença severa, refratária e com contra-indicações para tratamento cirúrgico (CORMAN 2005).

Sabe-se que a microbiota bacteriana desempenha importante papel na patogênese da DII. Antibióticos como o metronidazol e ciprofloxacina, são utilizados no tratamento da DC com presença de fístulas. O mecanismo de ação dos antibióticos no tratamento da DII ainda não é conhecido, contudo pode envolver a modulação da resposta imune através de suas propriedades antibacterianas (ONUMA e DAS, 1998).

Recentemente, o uso de agentes anti-TNF- α (anti-fator de necrose tumoral alfa) tem demonstrado efetividade em casos de Doença de Crohn em pacientes corticóide-dependentes ou pacientes intratáveis, bem como aqueles com fístulas

crônicas. O TNF- α está associado com injúria tecidual associada à endotoxemia, estimula o crescimento de fibroblastos humanos, ativa neutrófilos e osteoclastos, e é responsável pela indução de IL-1 (interleucina-1) e PGE₂ (Prostaglandina E₂) (WALLACE *et al.*, 1992; CORMAN, 2005).

O infliximab é um anticorpo monoclonal IgG (imunoglobulina G) quimérico humano-murino que se liga especificamente ao fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e está licenciado para uso em doença de Crohn resistente ou complicada e seu uso para colite ulcerativa permanece incerto (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2003). O infliximab melhora os sintomas e a qualidade de vida em 65% de pacientes refratários para os fármacos aminosalicatos (5-ASA), imunossupressores ou corticosteróides (VAN DULLEMEN *et al.*, 1995).

Outros agentes e medidas utilizadas no tratamento das DII incluem enema de sucralfato, enema de butirato, probióticos, nicotina, agentes antidiarréicos, medidas dietéticas e psicoterapia (CORMAN, 2005).

As terapias convencionais utilizadas nas DII nem sempre resultam em sucesso na busca da remissão da sintomatologia ou na prevenção da reincidência desta, e podem causar sérios efeitos colaterais. Por estes motivos cerca de 50% dos pacientes procuram opções alternativas de tratamento (HILSDEN *et al.*, 1998; HILSDEN *et al.*, 1999).

Assim, a avaliação de novos compostos com atividade antioxidante é importante para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de DII, o que é comprovado por inúmeros estudos que mostram os efeitos benéficos de diferentes compostos com propriedades antioxidantes em modelos experimentais de colite ulcerativa, incluindo flavonóides como a quercetrina (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 1996), rutosídeo (GÁLVEZ *et al.*, 1997), silimarina (CRUZ *et al.*, 2001), morina (OCETE *et al.*, 1998; GÁLVEZ *et al.*, 2001), diosmina (CRESPO *et al.*, 1999), hesperidina (CRESPO *et al.*, 1999), vitamina E (GONZALEZ *et al.*, 2001) e tempol (CUZZOCREA *et al.*, 2000).

A garantia do efeito antiinflamatório de fármacos como a sulfassalazina (fármaco de primeira opção terapêutica) deve ser compensada por procedimentos terapêuticos complementares que garantam a eficácia destes compostos em doses menores. Isto pode ser obtido pela utilização de outros compostos que em combinação possam produzir efeitos sinérgicos, garantindo a eficácia do tratamento com conseqüente redução dos efeitos colaterais do fármaco de escolha para o tratamento. Considerando-se ainda que a sulfassalazina e os derivados 5-ASA não têm sido efetivos no controle da recidiva do processo inflamatório colônico (SELLIN e PARISHA, 2006), o uso combinado de outros compostos ativos na DII pode ser uma importante alternativa no controle dos sintomas da recidiva, assim como na prevenção do processo inflamatório intestinal em pacientes com esta doença.

2. *Paepalanthus bromelioides* Silveira (Eriocaulaceae)

A família Eriocaulaceae é uma família de monocotiledôneas existente principalmente no Brasil, e compreende cerca de 1200 espécies (GIULIETTI e HENSOLD, 1990). *Paepalanthus* é um gênero que compreende cerca de 500 espécies, concentrados principalmente na América do Sul, com poucas espécies na América Central e duas na África (GIULIETTI *et al.*, 1988; GIULIETTI e HENSOLD, 1990). *Paepalanthus bromelioides* (Figura 7), é uma das espécies que tem como característica o desenvolvimento de capítulos com pequeninas flores agrupadas (GIULIETTI e HENSOLD, 1990). Várias espécies da família Eriocaulaceae, inclusive *Paepalanthus bromelioides*, são conhecidas popularmente, como “sempre-vivas” porque, mesmo após o corte, conservam cor e forma por vários anos (GIULIETTI *et al.*, 1988). Dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides* (VILEGAS *et al.*, 1990) e *Paepalanthus vellozioides* (VARANDA *et al.*, 1997) foi isolada uma isocumarina denominada de paepalantina, objeto de estudo do presente trabalho.



Figura 7: *Paepalanthus bromelioides* Silveira. A-associada ao cupinzeiro; B-inflorescências (capítulos) (A e B-FIGUEIRA e VASCONCELLOS NETO, 1991); C-vista superior (Prof. Dr WAGNER VILEGAS).

2.1. Paepalantina

A isocumarina, 9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto (2,3c) pirano-1-ona, denominada paepalantina (Figura 8), foi obtida do extrato diclorometano de *P. bromelioides* (VILEGAS *et al.*, 1990). A partir da paepalantina, VILEGAS *et al.*, (1990) semi-sintetizaram várias isocumarinas através de substituições do H das hidroxilas da posição 9 e/ou 10 por grupamentos metil e acetil. Alterações na estrutura química da paepalantina podem mudar suas propriedades biológicas (VARANDA *et al.*, 1997; TAVARES *et al.*, 1999).

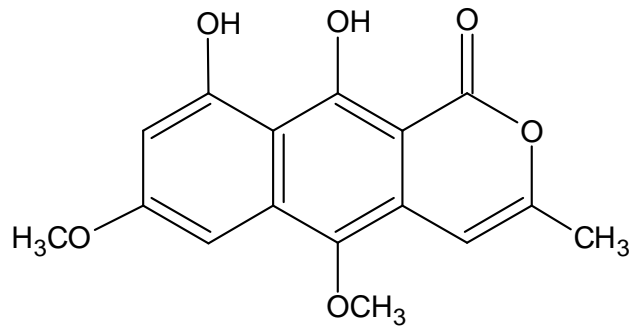


Figura 8: Estrutura química da paepalantina isolada de capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*.

Isocumarinas são polifenóis derivados da via do acetato e estruturalmente semelhantes a cumarinas, possuindo como diferença um anel lactônico invertido. Poucos estudos de atividade biológica foram realizados com estes compostos, sendo que algumas isocumarinas foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico, mutagênico, clastogênico e antimicrobiano (VARANDA *et al.*, 1997; TAVARES *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2000; DEVIENNE *et al.*, 2002; VARANDA *et al.*, 2004). Os efeitos citotóxicos e mutagênicos da paepalantina podem estar relacionados entre si, podendo a citotoxicidade ser consequência da interação desta isocumarina com o DNA (VARANDA *et al.*, 1997). Interessantemente, fármacos que interagem com ácidos nucleicos estão entre os agentes quimioterápicos mais utilizados no tratamento antineoplásico (BURRES *et al.*, 1992).

A presença de dois grupos de hidroxilas nos C9 e C10 da molécula da paepalantina é similar ao arranjo catecólico encontrado em muitos flavonóides e que permite a estes compostos atuarem como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (KITAGAWA *et al.*, 2003). O potencial antioxidante desta isocumarina foi avaliado por Leitão *et al.* (2002), que demonstraram a capacidade antioxidante por técnicas espectrofotométricas, empregando DPPH. Através de testes quimiluminescentes e espectrofotométrico, Kitagawa *et al.* (2003) demonstraram que a paepalantina captura ácido hipocloroso (HOCL) e inibe a mieloperoxidase, enzima

que, na presença de íons cloreto, participa da produção de HOCL e em ensaios dependentes de lucigenina, a paepalantina atuou no seqüestro de radical ânion superóxido.

A atividade antiinflamatória da paepalantina sobre a colite ulcerativa foi demonstrada por Di Stasi *et al.*, (2004), onde a dose de 5 mg/Kg de paepalantina (5 vezes menor que a dose efetiva de sulfassalazina), atenua de forma significativa as lesões induzidas por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos, como evidenciado tanto por estudos histológicos como bioquímicos. Este efeito benéfico da paepalantina foi associado a uma defesa antioxidante, visto que o composto preveniu a redução da glutathiona que ocorre em consequência da inflamação colônica. Adicionalmente, o efeito antiinflamatório intestinal da paepalantina foi relacionado com a inibição da atividade enzimática da fosfatase alcalina, mieloperoxidase e óxido nítrico sintetase colônicas. De acordo com esses autores, a paepalantina atua de forma benéfica principalmente na prevenção da recidiva do processo inflamatório intestinal.

Desta forma, avaliar os efeitos sinérgicos da paepalantina sobre a atividade antiinflamatória intestinal da sulfassalazina e verificar se esta associação pode representar uma nova abordagem de tratamento para a Doença Inflamatória Intestinal, é de grande importância, especialmente considerando-se que o fármaco ideal para o tratamento desta doença ainda não está disponível.

Considerando que a paepalantina apresenta atividade antioxidante e antiinflamatória intestinal e que a sulfassalazina, fármaco de escolha no tratamento da Colite Ulcerativa em humanos apresenta sérios efeitos colaterais, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de possíveis efeitos sinérgicos da paepalantina sobre a atividade antiinflamatória intestinal da sulfassalazina, utilizando-se o modelo de colite induzida por TNBS em ratos em duas situações experimentais:

- Fase aguda de colite experimental – quando a mucosa colônica está intacta, tendo em vista a avaliação do efeito preventivo;
- Fase crônica de colite experimental – quando a mucosa colônica está afetada por um processo inflamatório intestinal, tendo em vista a avaliação do efeito curativo assim como preventivo da recidiva do processo inflamatório, similar ao que ocorre com a colite ulcerativa em humanos.

1. Substâncias teste

A espécie *Paepalanthus bromelioides* Silveira foi coletada na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. A Paepalantina (9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto (2,3c) pirano-1-ona) (Figura 8), isolada a partir dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*, foi fornecida pelo Professor Dr. Wagner Vilegas do laboratório de química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araraquara. A Paepalantina foi isolada de acordo com a metodologia de Vilegas *et al.*, (1990), e identificada por dados espectrofotométricos de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H NMR), de carbono (^{13}C NMR) e infravermelho (IR).

A paepalantina foi utilizada na dose de 5 mg/Kg, conforme estabelecido por Di Stasi *et al.*, (2004). Sulfassalazina (Sigma S-0883) foi utilizada nas doses de 5, 15 e 25 mg/Kg.

2. Ensaio *in vitro*

2.1. Peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato

A atividade antioxidante da paepalantina foi avaliada através do modelo de inibição da lipoperoxidação induzida por solução de sulfato férrico e ácido ascórbico (100 μM) em membranas de cérebro de rato, adaptado a partir de Stocks *et al.* (1974) e Fee e Teitelbaum (1972). Curvas de concentração-resposta da paepalantina foram determinadas e os resultados comparados com a quercetina (flavonóide usado como referência).

A técnica se baseia na produção de malonildialdeído (MDA) como indicativo de lipoperoxidação. Utilizou-se ácido tricloroacético (TCA) para precipitar proteínas da amostra de membranas e o reativo tiobarbitúrico (TBARS) que reage com o

Material e Métodos

malonildialdeído (MDA) gerando coloração cuja intensidade é determinada por espectrofotometria, mediante curva-padrão.

Nestes experimentos, foram utilizados cérebros de ratos normais. Os cérebros foram pesados e triturados com homogeneizador automático, em gelo, com tampão PBS na proporção 1:4 (p/v) (solução A - NaH_2PO_4 10 mM, e solução B- Na_2HPO_4 10 mM, pH 7). O homogenato foi submetido à centrifugação a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e estocado à -80°C em alíquotas de 1 mL. Para a realização do ensaio, o homogenato estocado foi descongelado em temperatura ambiente e diluído em PBS na proporção 1:10 (v/v). A reação de lipoperoxidação foi realizada em tubos *ependorf* de 2 mL. Os grupos testes foram: Branco com incubação, branco sem incubação, controle incubado (DMSO 20%, solvente usado para solubilizar a paepalantina), controle não incubado, controle máximo (tecido, sulfato férrico e ácido ascórbico) e tubos testes (com as concentrações de 4,33; 8,66; 17,32; 34,64; 69,27 e 138,55 μM de paepalantina em soluções de reação e quercetina com concentrações de 0,34; 0,67; 1,34; 2,69 e 5,37 μM em soluções de reação). Para cada amostra, exceto nos brancos, foi adicionado 50 μL da solução de sulfato ferroso ($\text{SO}_4\text{Fe}\cdot\text{H}_2\text{O}$) e ácido ascórbico, ambos para provocar a lipoperoxidação. Os *ependorffs* com as soluções foram incubados á 37°C por 12 minutos em banho-maria, sob agitação constante. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do TBARS 0,5% em TCA 20%. Os tubos foram fechados e colocados novamente sob aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos, sem agitação. Alíquotas de 1 mL foram colocados em *ependorff* de 1,5 mL e centrifugados a 3000rpm, por 15 minutos a 4°C. Foi retirado 200 μL do sobrenadante da amostra e colocado em placa de 96 poços para realização de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532nm. O cálculo da porcentagem de inibição da produção de MDA foi calculado em relação aos valores obtidos com as amostras de lipoperoxidação máxima (cérebro, ferro e ácido ascórbico a 100 μM) e a IC_{50} (concentração inibitória de 50% da lipoperoxidação) determinada por regressão.

3. Ensaio *in vivo*

3.1. Animais de experimentação

Ratos machos albinos da Cepa Wistar, com 21 dias (recém-desmamados), oriundos do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, São Paulo, até atingirem 200 ± 20 g de peso, para o início dos experimentos. Este Biotério possui temperatura ambiental controlada ($21,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo seis animais por caixa, sendo alimentados com ração Nuvital e água filtrada *ad libitum*. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

3.2. Indução de colite

A indução da colite 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 com éter. O ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) foi preparado a partir de um liofilizado obtido da solução aquosa comercial de origem a 5% (p/v), onde 0,25 mL de uma solução de 10 mg de TNBS em etanol a 50% (v/v), foi administrado via retal (intracolônica) com a ajuda de um catéter de teflón (diâmetro de 2 mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo) desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

3.3. Desenho experimental

3.3.1. Colite aguda

Conforme estabelecido por Slinker (1998), o sinergismo entre drogas deverá incluir no mínimo 4 grupos experimentais (controle, grupo com um fármaco, grupo com um segundo fármaco, grupo com os fármacos associados). O desenho experimental de colite na fase aguda está esquematizado na figura 9.

- Branco (B): grupo de animais não-colíticos;
- Controle (C): grupo de animais colíticos e não-tratados;
- Paepalantina (P): grupo de animais colíticos e tratados com paepalantina 5 mg/Kg;
- Paepalantina + sulfassalazina (P+S): grupo de animais colíticos tratados com: paepalantina 5 mg/Kg + sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5 mg/Kg + sulfassalazina 15 mg/Kg (P5+S15), paepalantina 5 mg/Kg + sulfassalazina 25 mg/Kg (P5+S25);
- Sulfassalazina (S): grupo de animais colíticos tratados com sulfassalazina 25 mg/Kg.

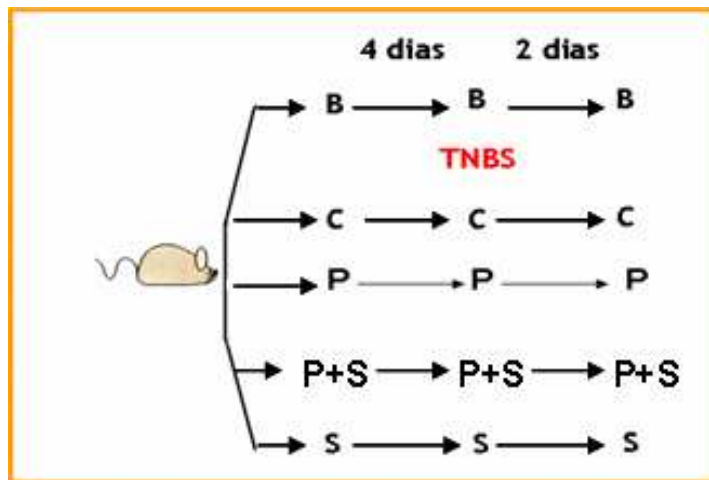


Figura 9. Desenho experimental da fase aguda de colite. B (grupo branco; ratos não-colíticos); C (grupo controle; ratos colíticos); P (grupo colítico tratado com paepalantina); P+S (grupos colíticos tratados com diferentes combinações de paepalantina e sulfassalazina); S (grupo de referência; ratos colíticos tratados com sulfassalazina).

Os ratos receberam, via oral, 5 mg/Kg de Paepalantina (P5), 25 mg/Kg de sulfassalazina (S25) e as combinações (P5+S5), (P5+S15) e (P5+S25), utilizando-se sonda esofágica em volume fixo de 1 mL de solução dissolvida em metilcelulose 1%. A paepalantina e a sulfassalazina foram dissolvidas na metilcelulose conjuntamente para administração das combinações. Os tratamentos foram realizados às 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução de colite, assim como 24 horas após. Como padrão de comparação utilizou-se o grupo controle, ao qual se induziu colite, mas sem tratamento farmacológico e um grupo branco, ao qual não se induziu colite. Os animais dos grupos controle e branco receberam 1 mL de metilcelulose 1% por via oral. Todos os animais foram sacrificados 48 horas após a indução da colite.

3.3.2. Colite crônica com recidiva

Neste protocolo, a colite foi primeiramente induzida com 10 mg de TNBS em 50% de etanol, como descrito anteriormente, e após 14 dias os animais receberam uma segunda dose de 10 mg de TNBS em uma tentativa de mimetizar as recidivas que ocorrem na DII humana. Os grupos experimentais utilizados neste protocolo foram: branco (não-colítico), controle (receberam duas doses de TNBS), controle sem recidiva (receberam uma dose de TNBS), grupos colíticos tratados com paepalantina 5 mg/Kg, com a sulfassalazina 25 mg/Kg e com as combinações (paepalantina 5 mg/kg + sulfassalazina 5 mg/Kg e paepalantina 5 mg/kg + sulfassalazina 25 mg/Kg). Para a preparação dos agentes isolados e combinados a paepalantina e a sulfassalazina, foram dissolvidas em metilcelulose 1%. As combinações foram administradas com um intervalo de 1 hora, sendo primeiro a sulfassalazina e, em seguida, a paepalantina, sendo este intervalo estabelecido de acordo com o tempo de meia vida da sulfassalazina (CHUNGI *et al.*, 1989). Os tratamentos foram iniciados 2 horas após a indução da colite e prosseguiram até um dia antes dos animais serem mortos. Seis animais de cada grupo foram mortos depois de 1, 2 e 3 semanas da indução da colite, exceto o grupo colítico sem recidiva (CSR), que foram mortos após 3 semanas (Figura 10). As combinações escolhidas para o experimento crônico com recidiva foram as que obtiveram melhores resultados na fase aguda da colite.

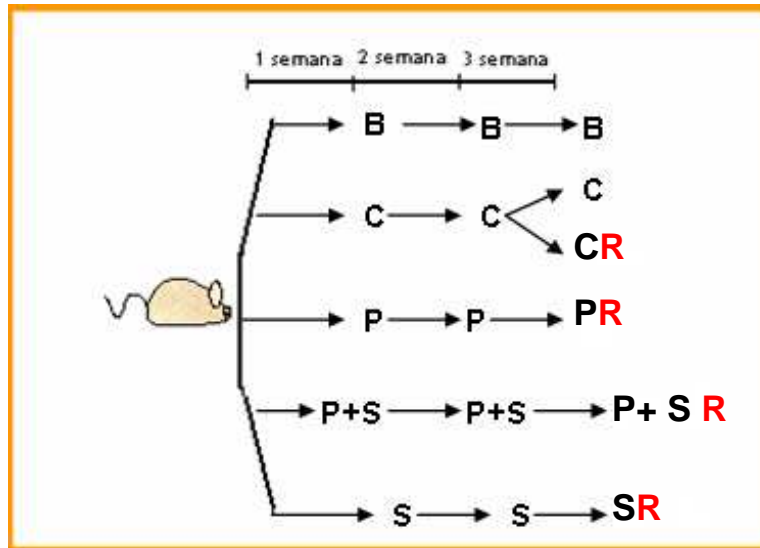


Figura 10. Desenho experimental da fase crônica de colite com recidiva. B (grupo branco; ratos não-colíticos); C (grupo controle; ratos colíticos sem recidiva); CR (grupo controle com recidiva; ratos colíticos que receberam segunda administração de TNBS); P e PR (grupos colíticos tratados com paepalantina sem e com recidiva, respectivamente); P+S e P+S R (grupos colíticos tratados com as combinações paepalantina e sulfasalazina sem e com recidiva, respectivamente); S e SR (grupo referência; ratos colíticos tratados com sulfasalazina sem e com recidiva, respectivamente).

3.4. Avaliação macroscópica do processo inflamatório intestinal

Durante o desenvolvimento do experimento, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros como variações de peso corporal, consumo alimentar, diarreia e lesão no cólon.

Aos animais foram oferecidos 300 gramas de ração diariamente, sendo a avaliação do consumo alimentar diária. Os animais foram pesados todos os dias da experimentação e seus pesos registrados em tabelas, para avaliação do peso após indução da colite. O peso dos animais utilizados para fazer os cálculos e plotar o gráfico foi o peso inicial e peso do final do experimento. As fezes dos animais também foram observadas para verificar presença ou ausência de diarreia, visto que esta é um dos sintomas da doença. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com éter e mortos por deslocamento cervical, o cólon foi retirado e eventuais ocorrências

de adesões entre o cólon e órgãos adjacentes foram anotadas. O cólon foi colocado sobre uma placa de Petri com gelo, onde foi feita a limpeza de restos de gorduras e adesões mesentéricas; em seguida, foram determinados o peso (mg) e o comprimento do cólon (cm). O cólon foi aberto longitudinalmente e a lesão macroscópica recebeu escore através de uma escala de 0-10, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.*, (1995) (Tabela 1), que determina tanto a gravidade como extensão da lesão intestinal.

Após a análise da lesão macroscópica, o cólon foi subsequentemente dividido em cinco fragmentos longitudinais, os quais foram pesados e congelados a -30°C para determinação de proteínas, fosfatase alcalina (FA), mieloperoxidase (MPO) e para determinação dos níveis de glutathiona total (GSH). O fragmento para determinar os níveis de GSH foi congelado em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v), com o objetivo de inibir sua degradação pela gama-glutamiltanspeptidase (Anderson, 1985).

TABELA 1: Critério de determinação de escore de lesão colônica (BELL *et al.*, 1995).

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

3.5. Avaliação microscópica da lesão do cólon

Imediatamente após a avaliação macroscópica do processo inflamatório colônico, amostras de tecido (0,5 mm) foram coletadas 2 cm acima da lesão no cólon e guardadas em cassete para processamento histológico. Essas amostras foram fixadas em Alfac (90 mL de álcool 80% + 5 mL de ácido acético + 10 mL de formaldeído), por 24 horas. Após este período, foram 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 Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise morfológica das lesões. As lâminas histológicas foram observadas no microscópio óptico e as microfotografias tiradas com microscópio Leica Qwin Plus versão 3.3 e 3.40.

3.6. Determinações bioquímicas

3.6.1. 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). A atividade da MPO se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

A determinação foi realizada em fragmentos de cólon (150-300 mg), os quais após descongelamento, foram colocados sobre uma placa de Petri com gelo e picados com tesouras durante 15 segundos. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador automático em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma H-5882) a 0,5% (p/v) com tampão fosfato sódico (50 mM, pH 6,0) na

proporção 1:20 (p/v), até obter um aspecto uniforme. O tampão HTAB funciona como um detergente facilitando a liberação da enzima MPO dos grânulos azurófilos dos neutrófilos. O homogenato foi sonificado (sonicador ultra cleaner 1420) por 10 segundos e submetido a um triplo processo de congelamento-descongelamento, o que facilita a ruptura das estruturas celulares, favorecendo também a liberação da enzima. Após o último descongelamento, a alíquota foi centrifugada a 8300 rpm, por 5 minutos a 4°C e foi realizada a determinação da atividade da MPO seguindo a cinética da reação frente à água oxigenada. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, foram adicionados 50 µL do sobrenadante de cada amostra em poços distintos e 150 µL do reativo de coloração preparado na hora do uso e composto por cloridrato de ortodianisidina (0,167 mg/mL) (Sigma D-3252) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,0005% (p/v) em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) a 37°C. Em seguida, foi determinado o incremento de absorvância a 450 nm usando espectrofotômetro. A atividade da enzima MPO foi calculada por interpolação em curva padrão, realizada com peroxidase de rábano (Sigma P 8250). Uma unidade de mieloperoxidase (U) se considera como aquela que degrada 1 µmol/min de peróxido de hidrogênio a 25°C. Os resultados foram expressos como U/g de tecido.

3.6.2. Determinação do conteúdo de glutathiona total (GSH)

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que se baseia na oxidação total da glutathiona na forma reduzida (GSH) presente na amostra em sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo (Figura 11),

no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorvância a 412 nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH).

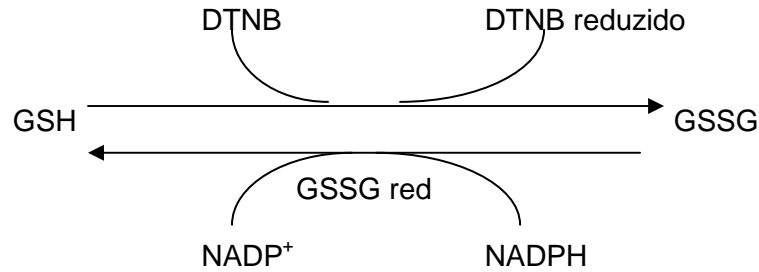


Figura 11. Esquema das reações que ocorrem na determinação do conteúdo de glutathiona total nas amostras de cólon.

Para efetuar a determinação, foram utilizados os fragmentos de cólon congelados com ácido tricloroacético (TCA). As amostras, após descongelamento, foram picadas com tesouras durante 15 segundos aproximadamente, sobre uma placa de Petri com gelo e, posteriormente, homogeneizadas com uma solução de TCA 5% em uma proporção final de 1:20 (p/v), usando homogeneizador automático. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Com o sobrenadante recolhido executou-se nova centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para a determinação da glutathiona total utilizou-se 20 µL do sobrenadante, o qual foi colocado em uma placa de 96 poços, onde se adicionou 140 µL de NADPH (Sigma N-7505) 298µM (0, 248 mg em 1 mL de PBS), 5 µL de tampão fosfato sódico (PBS) com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (PBS-EDTA, solução aquosa de fosfato sódico 143 mM e EDTA 6,3 mM, pH 7,5) e 20 µL DTNB (Sigma D-8130) 6mM (23,778 mg em 10 mL de PBS), respectivamente. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 5 minutos em uma temperatura de 30°C. Após este período, adicionou-se 15µL de glutathiona redutase (Sigma G- 3664) 256 UI/mL (45 µL de glutathiona redutase em 2, 955 mL de PBS) e registrou-se o incremento de absorvância a 412 nm, durante 3 a 5 minutos, no espectrofotômetro. A

concentração de glutatona foi calculada a partir da pendente da curva obtida por interpolação em curva padrão realizada com glutatona, sendo os resultados expressos como nmol/g de tecido.

3.6.3. Determinação do conteúdo de proteínas: método do ácido bicinchônico (BCA)

A determinação do conteúdo total de proteínas foi realizada pela técnica descrita por Smith *et al.* (1985). Este método é utilizado quando no tampão de homogeneização pode haver detergentes ou outro tipo que apresentam interferências com o reativo azul de Coomassie do método convencional de Bradford. O fundamento da técnica se baseia na capacidade das proteínas reduzirem o Cu^{2+} a Cu^{1+} , de forma que o Cu^{1+} reage com o BCA formando um complexo púrpura com absorvância máxima de 562 nm.

Neste método se emprega um corante que se obtém misturando dois reativos A e B na proporção 50:1 (v/v). O reativo A consiste em uma dissolução aquosa de BCA (25,8 mM) na forma de sal sódico (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,16 M), tartrato sódico-potássico (5,7 mM), NaOH (0,1 M) e NaHCO_3 (0,11 M) (pH 11,25). O reativo B é uma dissolução aquosa a 40% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Ambos reativos são estáveis à temperatura ambiente de forma indefinida.

As amostras de cólon foram picadas e homogeneizadas em homogeneizador automático com tampão glicina (50 mM e pH 10,5 com 0,5 mM de MgCl_2) na proporção 1:10 (p/v). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. Do sobrenadante das amostras utilizou-se 4 μL que foi colocado em uma placa de 96 poços, adicionando-se 200 μL do reativo do BCA. A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 25 minutos em temperatura de 37°C. A leitura da placa foi realizada a 562 nm. O cálculo

do conteúdo de produtos foi feito por interpolação em curva padrão de albumina sérica bovina e os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína.

3.6.4. Determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA)

A determinação da atividade da FA foi realizada pelo método clássico descrito por Bessey *et al.* (1946). A FA presente na amostra catalisa a hidrólise do grupo fosfato de um reativo colorido, o nitrofenilfosfato sódico em tampão glicina, que incorpora MgCl_2 , dando lugar a *p*-nitrofenol, molécula que apresenta absorção máxima de 405 nm. Para a avaliação da atividade da fosfatase alcalina, foram colocados 5 μL de amostra do homogenato anterior (para determinação do conteúdo de proteínas) em placa de 96 poços, sendo adicionados 25 μL de água seguido de 50 μL do reativo de coloração, que é composto de 2,2957 gramas do sal *p*-nitrofenilfosfato bis ciclohexilamônio, (Sigma N 3129-5), a 5,5 mM em tampão glicina a 50 mM com 0,5 mM de MgCl_2 (pH 10,5). A placa foi colocada no leitor de placas do espectrofotômetro, onde permaneceu incubada por 25 minutos em temperatura de 37°C. Em seguida, foi adicionado 120 μL NaOH 2N (10 gramas de NaOH em 125 mL de água), para interromper a reação. A leitura da placa foi realizada a 405 nm e a atividade da fosfatase alcalina calculada em mU/mg de proteína.

4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças entre as médias foram testadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida por testes de significância. Dados não paramétricos (scores) foram expressos em mediana (intervalo) e analisados pelo Teste Kruskal-Wallis. A evolução do peso corporal dos animais foi expressa em porcentagem, mas transformada em arcosseno para a análise estatística. Diferenças entre proporções foram analisadas com o Teste Exato de Fisher. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

1. Atividade antioxidante

A paepalantina apresentou atividade antioxidante no modelo de Peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato induzida por ferro e ácido ascórbico onde a IC_{50} (concentração inibitória de 50% da peroxidação lipídica) da paepalantina foi de $27,54 \pm 0,17 \mu\text{M}$ (Figura 12A), resultado este semelhante ao descrito por Di Stasi *et al.* (2004) em modelo de lipoperoxidação em membranas de hepatócitos. No mesmo teste, a quercetina, flavonóide antioxidante usado como referência, apresentou uma IC_{50} de $3,50 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (Figura 12B).

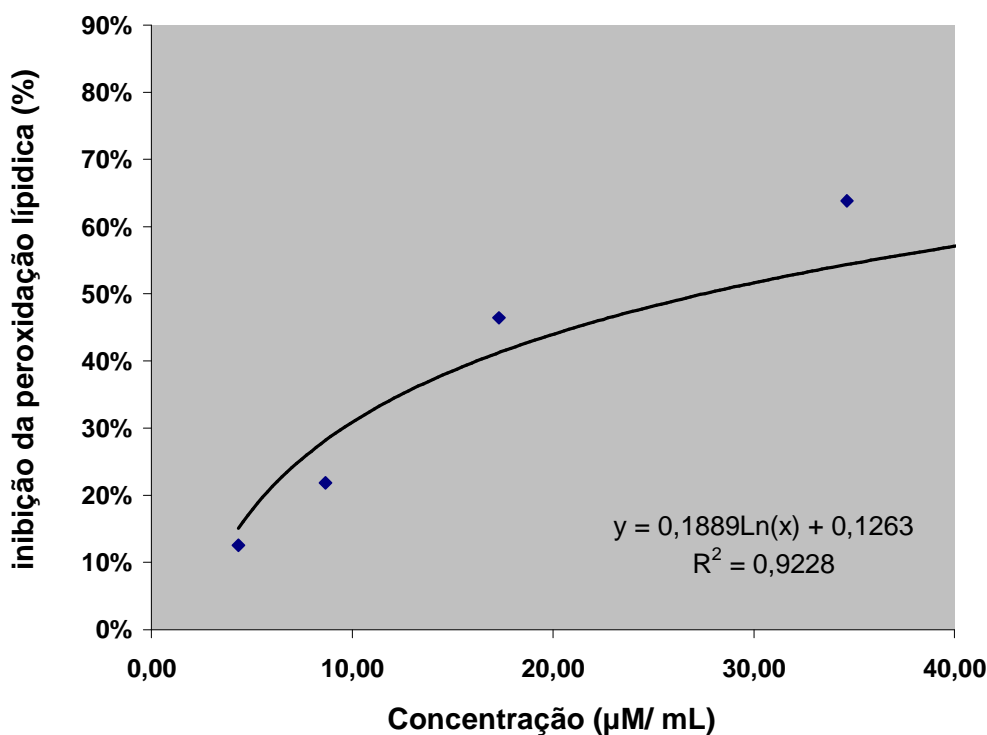


Figura 12A: Avaliação da atividade antioxidante da paepalantina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e TEITELBAUM, 1972, com modificações).

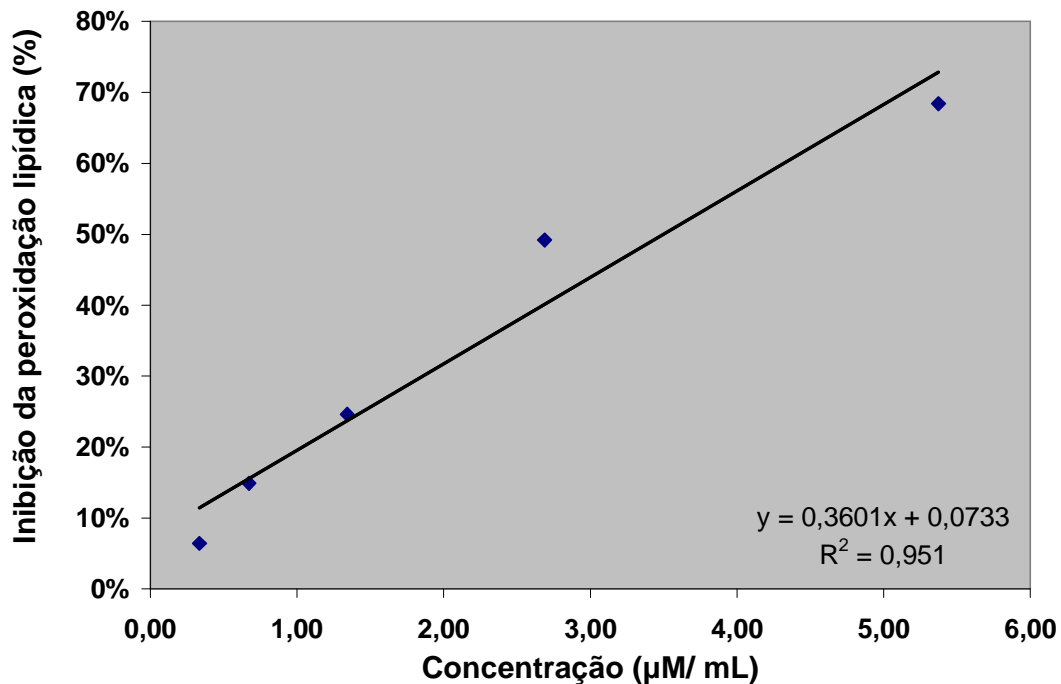


Figura 12B: Avaliação da atividade antioxidante da quercetina em membranas de cérebro de rato, pelo modelo de peroxidação lipídica induzida com sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS *et al.*, 1974; FEE e TEITELBAUM, 1972, com modificações).

2. Efeito dos tratamentos combinados paepalantina + sulfassalazina (P+S) na

Colite aguda

2.1. Avaliação Macroscópica da lesão

A administração de TNBS/etanol nos animais via intracolônica, promoveu inflamação no cólon em todos os grupos experimentais, a qual foi evidenciada 48 horas após a indução da colite, sendo caracterizada por danos na mucosa que variaram de 3,0 a 5,9 cm ao longo do cólon, aos quais foram atribuídos um escore macroscópico, de acordo com Bell *et al.*, (1995) (Tabela 1).

O pré-tratamento oral com a combinação paepalantina 5 + sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), assim como a administração isolada de paepalantina 5 mg/Kg (P5) e

sulfassalazina 25 mg/Kg (S25) promoveram, de forma significativa, efeitos benéficos aos danos causados no tecido, quando comparados ao grupo controle, fato este observado através do escore atribuído à lesão (Tabela 2).

2.2. Razão Peso/ comprimento do cólon (P/C)

O processo inflamatório, responsável pela lesão colônica, também foi associado a um aumento na razão peso-comprimento (mg/cm) do cólon. Nenhuma modificação significativa foi observada em relação ao P/C (mg/cm) do cólon, entre os grupos controle e tratados. Todos os tratamentos produziram aumento significativo na razão P/C do cólon, comparados ao grupo não-colítico (Tabela 2).

2.3. Incidência de diarreia e aderências

A diarreia, decorrente do processo inflamatório induzido pelo TNBS/etanol, ocorreu no grupo controle e em todos os grupos tratados (Tabela 2). Após a indução de colite por TNBS/etanol nos animais, via intracolônica, o processo inflamatório intestinal pode também desencadear a aderência do intestino com os órgãos adjacentes. Estes sinais da inflamação ocorreram em todos os grupos experimentais (Tabela 2).

TABELA 2 - Efeito da paepalantina (5mg/Kg) (P5), das combinações paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 15 mg/Kg (P5+S15), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 25 mg/Kg (P5+S25) e da sulfassalazina (25mg/Kg) (S25) no escore de lesão, mudanças no peso e comprimento colônico, incidência de diarreia e aderência, na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore ^a (0-10)	P/C colônico ^b (mg/cm)	Diarreia (%)	Aderência (%)
Branco	0 (0-0)***	82,30±3,85**	0*	0*
Controle	8,5(7-9)+++	146,98±8,77 ⁺⁺	75,0 ⁺	62,5 ⁺
P5	6,0(2-9)**	126,83±13,03 ⁺⁺	80,0 ⁺	80,0 ⁺
P5+S5	6,0(3-7)**	123,16±7,23 ⁺	40,0	80,0 ⁺
P5+S15	9,0(5-9)+++	128,66±7,66 ⁺⁺	100,0 ⁺	80,0 ⁺
P5+S25	7,0(6-9)**	135,72±6,03 ⁺⁺	20,0	100,0 ⁺
S 25	6,0 (2-8)*	125,64±11,62 ⁺⁺	20,0	40,0

^a Dados de escore expressos em mediana (intervalo), ^b razão peso-comprimento colônico expressos em média ± E.P.M. * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P < 0,001 comparados ao grupo controle e ⁺ P < 0,05, ⁺⁺P < 0,01, ⁺⁺⁺P < 0,001 comparados ao grupo branco.

2.4. Consumo alimentar e Peso corporal

No quarto dia experimental, os animais foram mantidos em jejum alimentar por 24 horas para posterior indução de colite no quinto dia. Após a indução de colite por TNBS/etanol, somente os animais não-colíticos (branco) restabeleceram seu consumo e, conseqüentemente, seu peso corporal no quinto e sexto dias (Figuras 13 e 14).

A instalação do processo inflamatório intestinal está associada a uma redução no consumo alimentar e no peso corpóreo do animal. O consumo alimentar foi reduzido nos grupos colíticos em 54,3% no grupo controle, 66,4% no grupo P5, 56,7% no grupo P5+S5, 79,6% no grupo P5+S15, 71,3% no grupo P5+S25 e 49,6% no grupo S25. Os animais do grupo não-colítico (branco) aumentaram seu consumo em 5%. Similarmente, uma redução estatisticamente significativa do peso (g) foi observada

nos animais controle, os quais perderam $10,23 \pm 1,24\%$ do seu peso (g), quando comparados ao grupo não-colítico (branco), que ganharam em média $3,73 \pm 0,39\%$ de peso (g) (Figura 14).

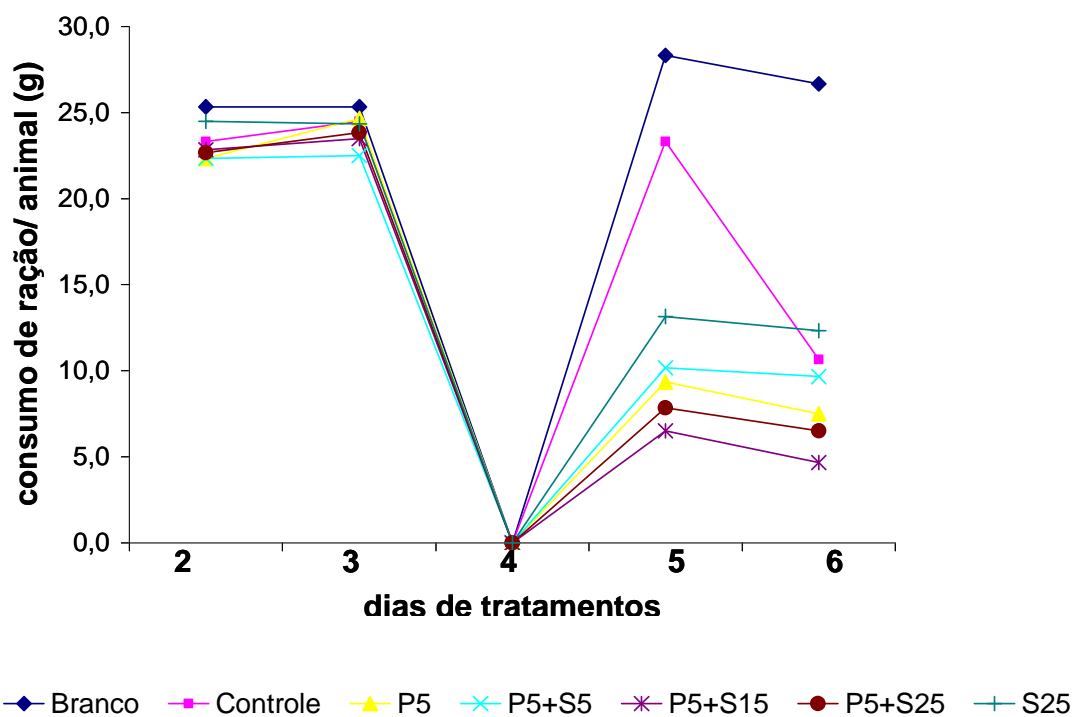


Figura 13: Consumo médio diário de ração dos animais em cada grupo. No quarto dia os animais foram mantidos em jejum por 24 horas para indução de colite por TNBS no quinto dia.

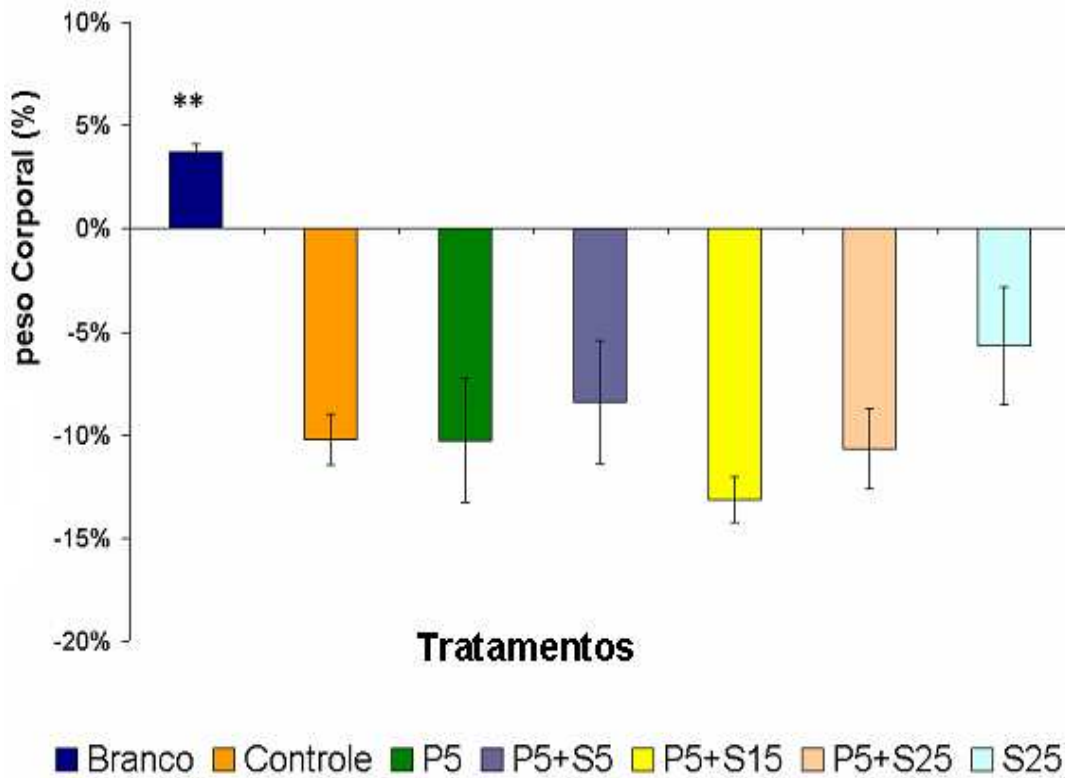


Figura 14: Média do peso corporal dos animais após 6 dias de experimento, constando de 5 dias de tratamento. Peso corporal foi expresso em média \pm E.P.M. ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle.

2.5. Avaliação Microscópica da lesão

Na avaliação histológica, a mucosa e submucosa do cólon dos animais não-colítricos (branco) apresentaram estrutura do cólon normal (Figura 15A). O grupo controle revelou ulceração moderada na mucosa do cólon e inflamação envolvendo as camadas da mucosa e submucosa. Nas criptas houve depleção moderada de muco e na lâmina própria observou-se a presença de infiltração moderada de monócitos e granulócitos; na submucosa foi observada presença marcante de monócitos e granulócitos, e edema severo (Figura 15B).

A paepalantina (P5) administrada isoladamente, assim como a combinação P5+S5 apresentaram suave ulceração na mucosa do epitélio e suave depleção de muco nas criptas, mostrando melhora do processo inflamatório, que foi acompanhada de redução de infiltrado inflamatório. Entretanto, as células caliciformes foram mais preservadas com o tratamento da P5+S5 do que com a P5 (Figura 15C e 15D).

A combinação P5+S15 também apresentou ulceração na mucosa epitelial e suave depleção de muco nas criptas, sendo observada pequena infiltração de monócitos e granulócitos na mucosa e submucosa com presença moderada de edema nesta última camada (Figura 15E).

Na combinação P5+S25 foi verificada leve ulceração na mucosa, depleção moderada de muco nas criptas, suave infiltração de monócitos e granulócitos na lâmina própria, com presença moderada destas células inflamatórias na submucosa, e edema moderado (Figura 15F).

No grupo tratado com S25, a ulceração na superfície da mucosa, a depleção de muco nas criptas, a presença das células inflamatórias na lâmina própria e na submucosa, e o edema na submucosa foram suaves (Figura 15G).

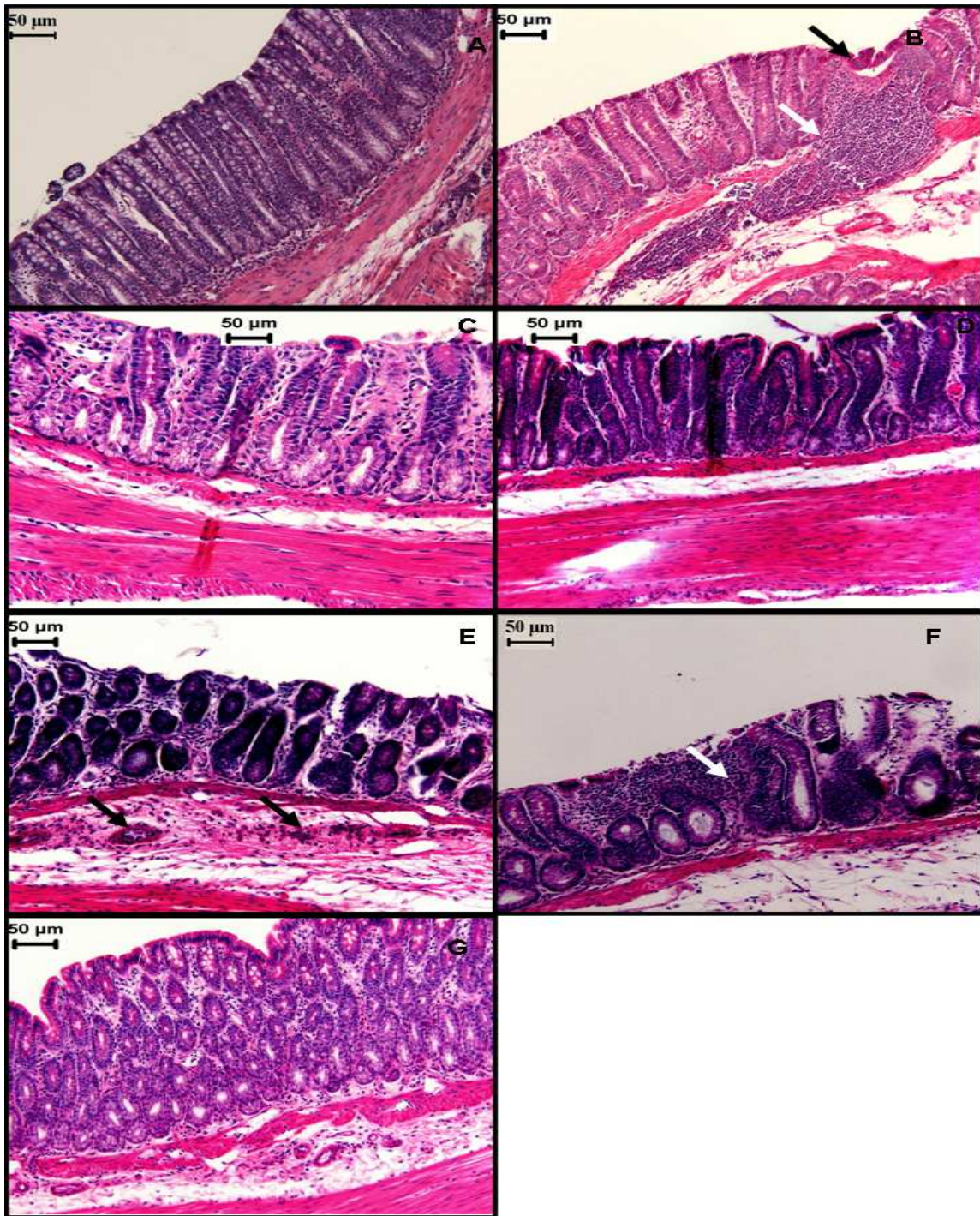


Figura 15: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase aguda da doença, após indução de colite por TNBS/etanol. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). (A) grupo não-colítico (branco), mostrando a histologia do cólon do rato normal; (B) grupo controle, com ulceração moderada (seta preta) e infiltração severa de células inflamatórias na lâmina própria e na submucosa (seta branca); (C) e (D) grupos tratados com paepalantina (P5) e com a combinação P5+S5 respectivamente; (E) grupo tratado com P5+S15, infiltração suave de células inflamatórias na submucosa (seta), promovendo edema moderado nesta camada; (F) grupo tratado com P5+S25, com infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (mucosa) (seta); (G) grupo tratado com S25. (material objetivado em objetiva de 20x).

2.6. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os danos do cólon dos animais também foram caracterizados bioquimicamente, onde foram avaliados os conteúdos de Glutathione (GSH), atividade da Mieloperoxidase (MPO) e atividade da Fosfatase alcalina (FA) (Tabela 3).

O dano colônico foi caracterizado bioquimicamente no grupo controle por um aumento de 8 vezes na atividade da enzima MPO colônica e por um aumento de duas vezes na atividade da enzima FA e significativa depleção de GSH em relação ao grupo não- colítico (Tabela 3).

Após a indução da colite pelo TNBS/etanol, a GSH foi depletada como consequência do estresse oxidativo no local da inflamação, como verificado nos animais do grupo controle, ao contrário do grupo não-colítico que manteve os níveis de GSH (Tabela 3). Os pré-tratamentos com as combinações P5+S5 e P5+S25, assim como com os agentes P5 e S25 impediram a depleção do conteúdo de GSH de forma significativa, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

A infiltração de neutrófilos para o local da inflamação intestinal foi avaliada através da atividade da enzima MPO, a qual foi significativamente aumentada, após a indução de colite por TNBS/etanol, no grupo controle em relação ao grupo não-colítico (branco) (Tabela 3). Os grupos pré-tratados com P5 e com a combinação P5+S5 reduziram de forma significativa a atividade da MPO no cólon dos animais, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Somente os grupos pré-tratados com P5 e S25 foram capazes de reduzir significativamente a atividade da FA, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

A combinação P+S promoveu efeito benéfico na fase aguda da colite como evidenciado pela inibição da depleção dos níveis de GSH pela P5+S5 e P5+S25 e redução na atividade da MPO com a combinação P5+S5 (Tabela 3). Estes resultados

Resultados

foram usados para selecionar as combinações a serem testadas na fase crônica da colite com recidiva.

Tabela 3: Efeito da paepalantina (5mg/Kg) (P5), das combinações paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 5 mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 15 mg/Kg (P5+S15), paepalantina 5 mg/Kg+sulfassalazina 25 mg/Kg (P5+S25) e da sulfassalazina (25mg/Kg) (S25) no conteúdo de glutathiona (GSH), atividade da mieloperoxidase (MPO) e atividade da Fosfatase alcalina (FA) na fase aguda da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo	GSH (nmol/g de tecido)	MPO (U/g de tecido)	FA (mU/mg proteína)
Branco	1357,49±86,54**	84,17±8,73*	6,24±0,35**
Controle	777,01±32,62 ⁺⁺	688,61±64,47 ⁺⁺	14,37±1,16 ⁺⁺
P5	909,08±28,46 ⁺⁺⁺	334,63±86,47*	9,91±0,97*
P5+S5	1044,02±119,69 ⁺⁺	355,04±108,70*	11,74±1,46 ⁺⁺
P5+S15	857,42±57,28 ⁺⁺	514,33±49,75 ⁺	11,95±1,08 ⁺⁺
P5+S25	926,26±35,53 ⁺⁺⁺	674,00±233,26 ⁺⁺	11,67±1,04 ⁺⁺
S25	1047,94±90,64 ⁺⁺	433,88±110,72	9,42±0,77**

Os valores são expressos em média ± EPM, * P<0, 05, ** P<0, 01, comparado ao grupo controle (colítico) e ⁺ P<0, 05, ⁺⁺ P<0, 01, comparado ao grupo branco (não-colítico).

3. Efeito dos tratamentos combinados paepalantina + sulfassalazina (P+S) na Colite Crônica com recidiva

3.1. Avaliação Macroscópica da lesão

Após a indução de colite, o grupo controle apresentou dano colônico máximo na primeira semana de experimento e diminuiu gradativamente nas duas semanas seguintes, sugerindo melhora gradual da mucosa intestinal inflamada. Entretanto, hiperemia, úlceras e inflamação no cólon e aumento na sua razão peso comprimento ainda foram observados.

A recidiva do processo inflamatório intestinal foi induzida com uma segunda dose de 10 mg de TNBS em etanol 50% administrada intracolonicamente duas semanas após a primeira administração. Uma semana após a segunda instilação de TNBS, a reativação do processo inflamatório colônico foi observada no grupo controle, como evidenciada por um aumento no escore macroscópico e na razão entre peso e comprimento colônico (Tabela 4). Nos animais que não receberam a segunda administração de TNBS (controle sem recidiva, CSR) o dano colônico seguiu a evolução normal de recuperação, sendo que estes animais tiveram um menor escore comparado ao grupo controle que sofreu a recidiva (Tabela 4).

A administração da combinação P5+S25 aos animais colíticos, preveniu o impacto da colite com recidiva, evidenciado macroscopicamente por redução dos danos da mucosa colônica, comparados ao grupo controle (Tabela 4). Em adição, as injúrias macroscópicas observadas com a combinação P5+S25 foram significativamente menor que com P5 e S25 (Tabela 4).

O tratamento dos animais com os agentes administrados isoladamente produziu efeito preventivo na primeira semana do processo inflamatório colônico, evidenciado por redução no escore de lesão pela P5 e na razão entre peso e comprimento colônico da P5 e S25 (Tabela 4).

A incidência de diarreia foi freqüente nos animais do grupo controle ao final da 1ª semana, mas foi diminuída depois de 14 dias da indução do processo inflamatório e, voltou a ser freqüente na 3ª semana após a 2ª administração de TNBS. Os animais do grupo CSR não apresentaram diarreia ao final do experimento. A combinação P5+S5 reduziu a incidência de diarreia no impacto da colite com recidiva, onde os animais deste grupo não apresentaram diarreia, em comparação ao grupo controle (50,0%) e ao grupo S25 (66,0%) que apresentaram incidência de diarreia, embora não diferiram estatisticamente. Na ocorrência de diarreia entre os animais tratados com paepalantina e sulfassalazina isoladamente, P5 promoveu baixa incidência de diarreia durante todo o experimento crônico, porém não foi estatisticamente diferente do grupo controle. Com S25 a incidência de diarreia foi estatisticamente reduzida em comparação ao grupo controle na primeira semana, no entanto, na última semana de tratamento, após segunda administração de TNBS, os animais apresentaram incidência de diarreia (Tabela 4).

A aderência do cólon aos órgãos adjacentes foi observada ao final de cada experimento no grupo controle com recidiva e também nos animais do grupo CSR (Tabela 4). Os animais tratados com a combinação P5+S25 não apresentaram aderência do cólon aos órgãos na segunda e terceira semana de experimento (Tabela 4). A aderência aos órgãos também foi prevenida pela combinação P5+S5 na segunda semana (Tabela 4). A P5 isolada também preveniu o cólon da aderência aos órgãos nas duas semanas que antecederam a recidiva (Tabela 4).

Resultados

Tabela 4. Efeito dos tratamentos com paepalantina (5mg/Kg) (P5), sulfassalazina (25 mg/Kg) (S25) e das combinações paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 5mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 25mg/Kg (P5+S25) no escore de lesão, mudanças do peso-comprimento colônico, incidência de diarreia e aderência, na fase crônica da colite induzida por TNBS em ratos.

Grupo	Escore ^a	P/C colônico ^b (mg/cm)	Diarreia (%)	Aderência (%)
1 semana				
Branco	0***	100,56±8,01**	0**	0**
Controle	8(7-9)***	276,05±31,17**	83,3**	83,3**
P5	1,5(0-2) **	149,61±7,66*	16,6	0**
P5+S5	5(1-7) **	201,38±46,24	16,6	50,0
P5+S25	2(2-3) +	187,20±52,41	50,0	25,0
S25	3,5(2-7) +	143,23±20,57*	0**	50,0
2 semanas				
Branco	0*	86,52± 3,58**	0	0***
Controle	2,5(2-3) +	185,40±22,21**	16,6	100,0***
P5	0,5(0-3)	148,90±11,91**	0	0***
P5+S5	4(0-5) +	142,90±10,92 ⁺	20,0	20,0**
P5+S25	2(0-3)	145,62±12,06 ⁺	20,0	0***
S25	4(1-6) **	137,95±10,73 ⁺	0	33,3
3 semanas				
Branco	0**	88,91±4,57** ##	0	0
controle	5(4-5) **	145,26±7,27 **	50,0	66,6
CSR	2,5(0-4)	149,35±13,09**	0	33,3
P5	5(4-6) **	158,28±9,81**	16,6	66,6
P5+S5	2,5(0-6) +	136,88±5,60**	0	33,3
P5+S25	0(0-1) * ^{xx} &&	131,08±10,21**	20,0	0
S25	4,5(3-7) **	158,28±9,82**	66,6	16,6

^a escore são expressos em mediana (intervalo), ^b razão peso-comprimento colônico expressos em média ± E.P.M. * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P < 0,001 comparado ao grupo controle; + P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 comparado ao grupo branco; ## P < 0,01 comparado ao grupo controle sem recidiva (CSR); ^{xx} P < 0,01 comparado a S25 isolada, && P < 0,01 comparado a P5 isolada.

3.2. Consumo alimentar e Peso corporal

A queda do consumo alimentar e conseqüentemente a redução do peso corporal está diretamente relacionado com o processo inflamatório intestinal. Após a administração do TNBS na primeira e terceira (recidiva) semanas, os animais colíticos tiveram seu consumo alimentar reduzido, mas restabeleceram seu consumo no final de cada semana de tratamento (Figura 16A, 16B e 16C). Os grupos tratados com P5 e S25 tiveram evolução de peso corporal na primeira semana, estatisticamente diferente do grupo controle (Figura 17A). Na segunda semana, os grupos tratados com a combinação P5+S25 e P5 restabeleceram seu peso corporal diferindo estatisticamente do grupo controle (Figura 17B). Na terceira semana todos os grupos tiveram evolução de peso não diferindo estatisticamente do grupo controle (Figura 17C).

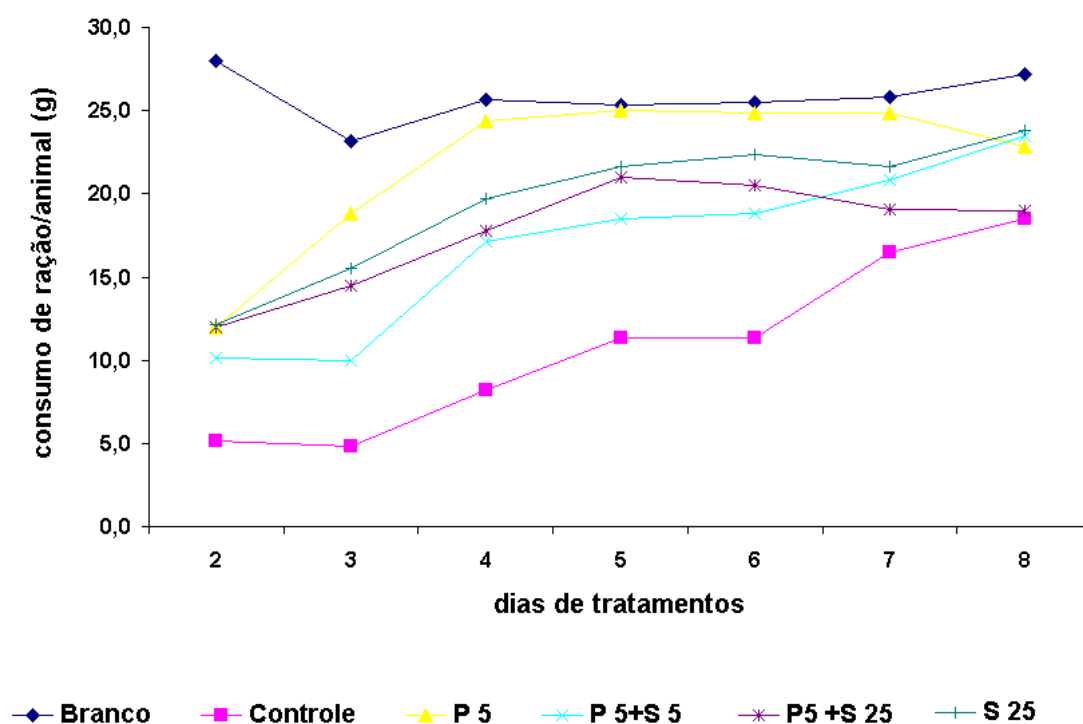


Figura 16A: Consumo médio diário de ração por animal em cada grupo, durante a primeira semana de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1.

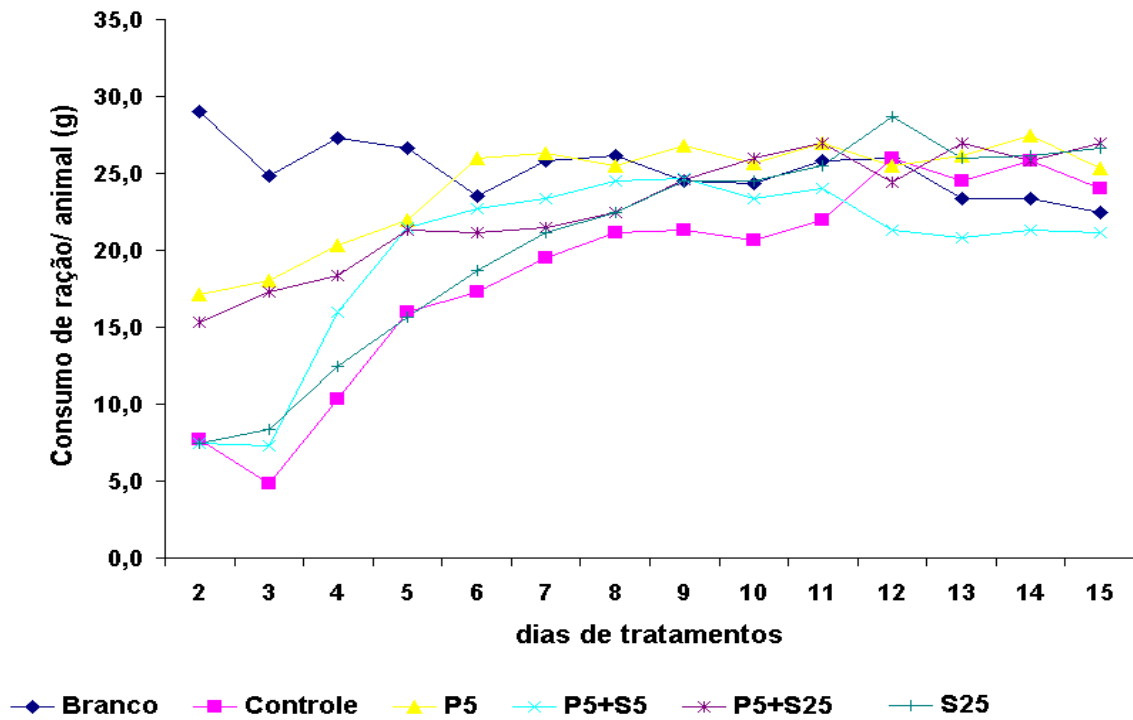


Figura 16B: Consumo médio diário de ração por animal em cada grupo, durante 14 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1.

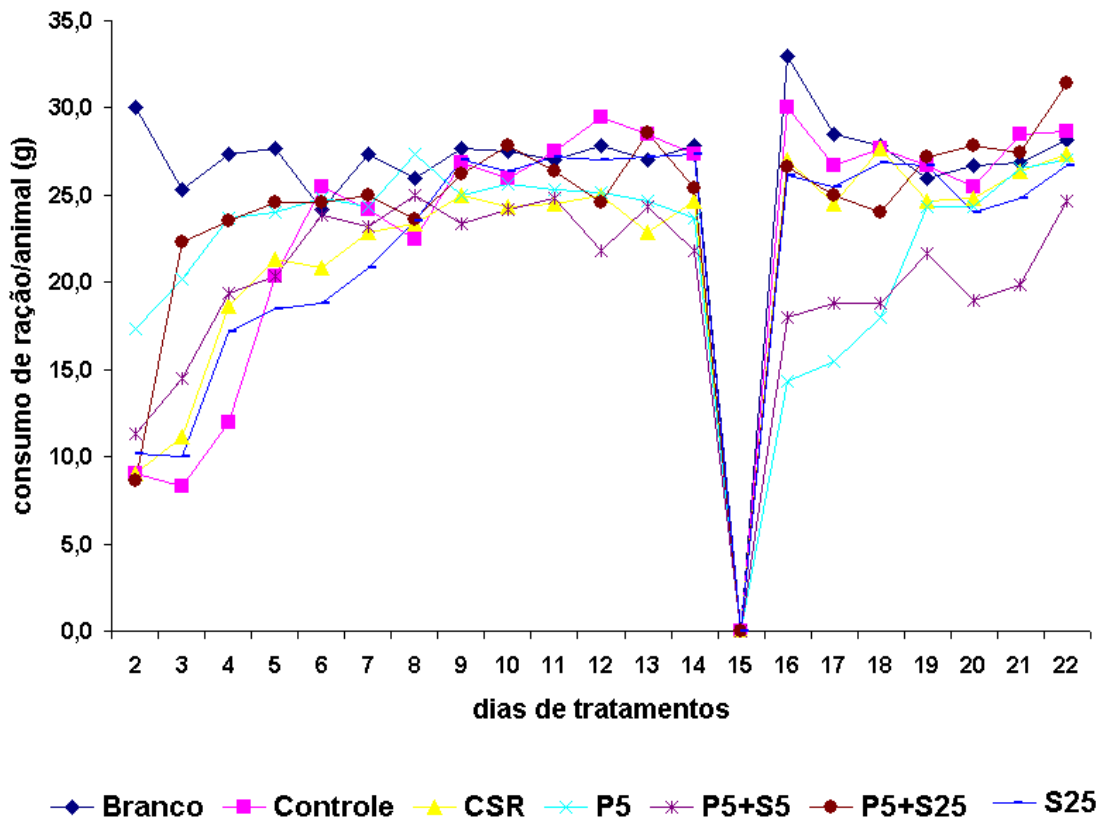


Figura 16C: Consumo médio diário de ração por animal em cada grupo, durante 21 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2ª dose foi administrada no 15º dia (dia 15 jejum).

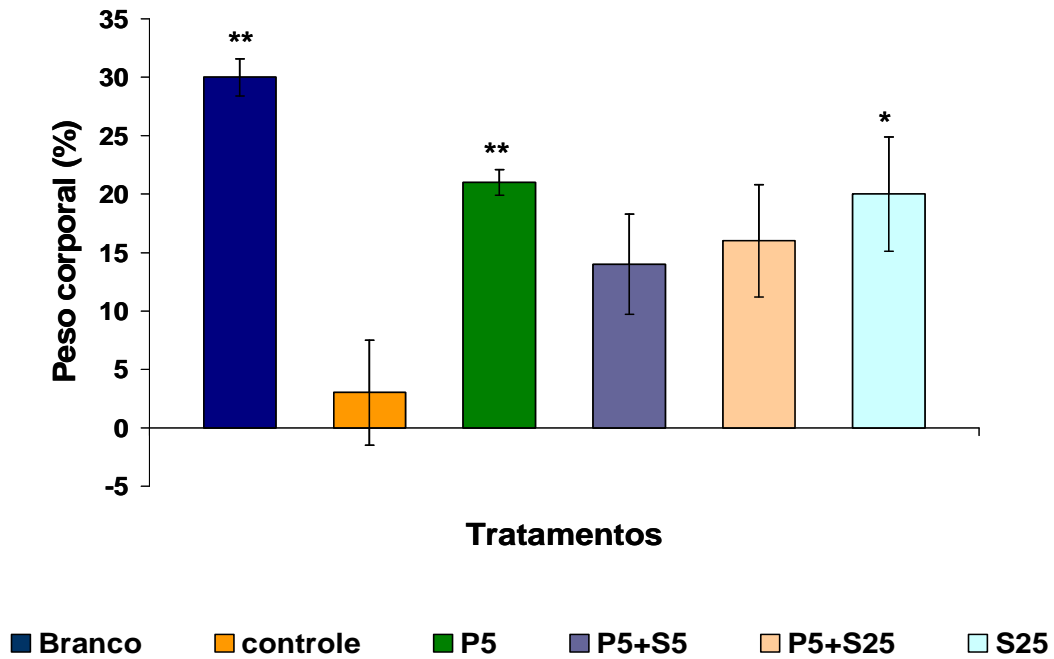


Figura 17A: Média do peso corporal dos animais em cada grupo durante a primeira semana de tratamento. Peso corporal é expresso em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle.

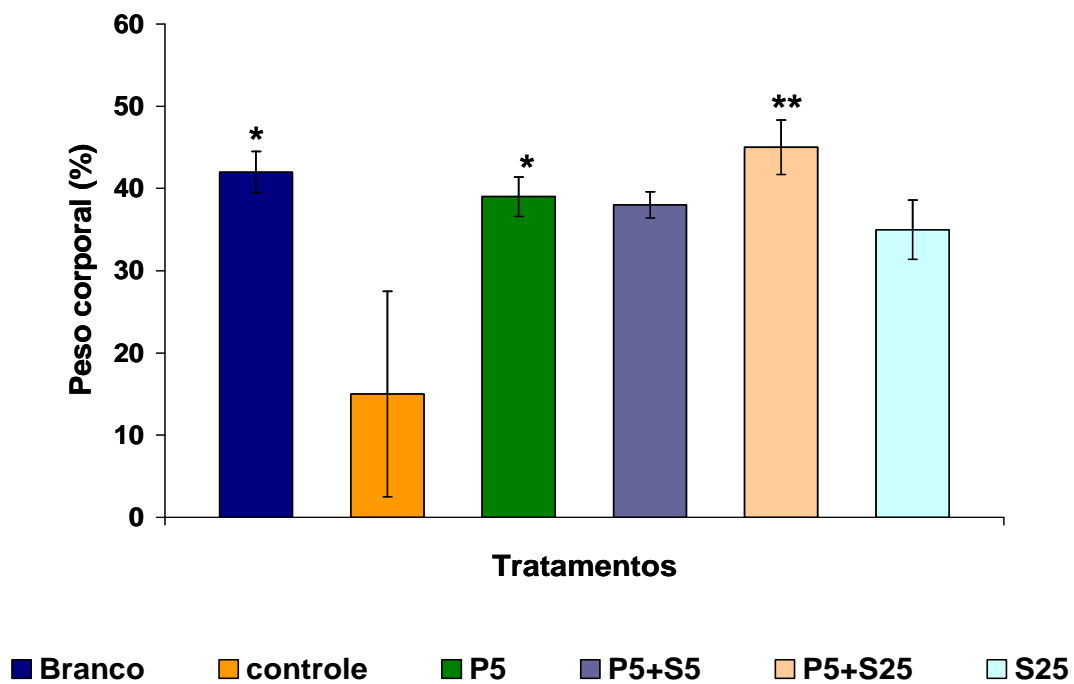


Figura 17B: Média do peso corporal dos animais em cada grupo durante 14 dias de tratamento. Peso corporal é expresso em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

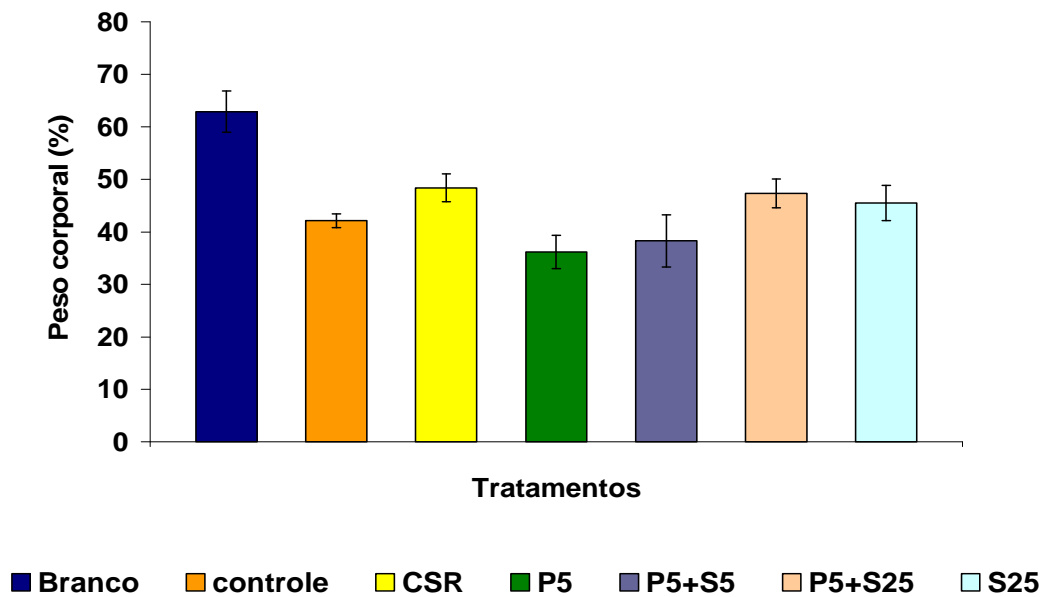


Figura 17C: Média da evolução do peso corporal dos animais em cada grupo durante 21 dias de tratamento, a indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2ª dose (recidiva) foi administrada no 15º dia. Peso corporal é expresso em média \pm E.P.M.

3.3. Avaliação Microscópica da lesão

A administração intracolônica de TNBS causou danos extensivos na superfície do epitélio da mucosa, variando a severidade entre os grupos tratados. Na avaliação histológica, a mucosa e submucosa do cólon dos animais branco (não-colíticos) apresentaram estrutura do cólon normal, onde pode-se observar a mucosa, com as glândulas tubulares retas com células califormes e lâmina própria não edemaciada e, a submucosa com tecido conjuntivo levemente denso e também não edemaciado (Figura.18A, 19A e 20A). O grupo controle apresentou ulceração no epitélio da mucosa do cólon durante as 3 semanas de experimento (Figura 18B, 19B e 20B). Os danos da mucosa foram acompanhados pela presença de células inflamatórias (monócitos e granulócitos) na lâmina própria e na submucosa. Os ratos tratados com P5+S5 durante as 3 semanas de experimento, mostraram a mucosa recuperada sem ulceração e infiltração de células inflamatórias (Figura 18D, 19D e 20E), com

características semelhantes aos ratos do grupo branco (não-colítico) (Figura 18A, 19A e 20A). A combinação P5+S25 apresentou a mucosa recuperada somente na segunda semana de experimento (Figura 19 E). Os grupos tratados com P5 não apresentaram ulceração no epitélio da mucosa durante as 3 semanas de experimento (Figura 18C, 19C e 20 D); porém, após a primeira semana de indução da colite a inflamação foi detectada pela presença de infiltrado de células inflamatórias (Figura 18C). Os animais tratados com o fármaco de referência usada no estudo (S25) apresentaram ulceração no epitélio da mucosa com infiltração de células inflamatórias na primeira semana após a indução da colite (Figura 18 F).

O processo inflamatório nos animais colíticos também foi associado à hiperplasia e dilatação das criptas, com moderada depleção nas células caliciformes com aparente redução na produção de muco (Figura 18B, 19B e 20B). A depleção de células caliciformes foi menos severa no grupo tratado com S25 (Figura 18 F) na primeira semana e, após a recidiva (3ª semana), nos grupos tratados com P5 (Figura 20D), P5+S5 (Figura 20E) e S25 (Figura 19G).

As amostras colônicas foram caracterizadas pela presença de edema na submucosa na primeira semana após a indução de colite; entretanto, no grupo tratado com a combinação P5+S5 nenhum edema foi observado (Figura 18D). Com 14 dias de tratamento com P5, P5+S5 e P5+S25 a submucosa do cólon não apresentou edema (Figura 19C, 19D e 19E), embora o grupo tratado com S25 apresentou edema leve (Figura 19F).

Após a recidiva o processo inflamatório foi reinstalado, danos estes constatados através da visível depleção de células caliciformes e presença de infiltrado celular mononuclear e granulócítico no grupo controle (Figura 20B), além da presença de edema severo na submucosa dos grupos P5+S25 e S25 que receberam a 2ª dose de TNBS (Figura 20F e 20G), comparados ao grupo controle sem recidiva que recuperaram a estrutura colônica (Figura 20C). O grupo tratado com P5+S5 não apresentou edema na submucosa após a recidiva (Figura 20E).

Resultados

Os estudos histológicos confirmam o efeito benéfico da combinação P5+S5 (Figura 18D, 19D e 20E). Os animais tratados com P5+S5 mostraram completa recuperação na estrutura das células do cólon, caracterizada pela restauração da camada epitelial da mucosa, acompanhada pela presença de células caliciformes com a produção de muco. Foi observado também redução no infiltrado celular mononuclear e granulocítico na lâmina própria e submucosa, e nenhum edema visível na submucosa.

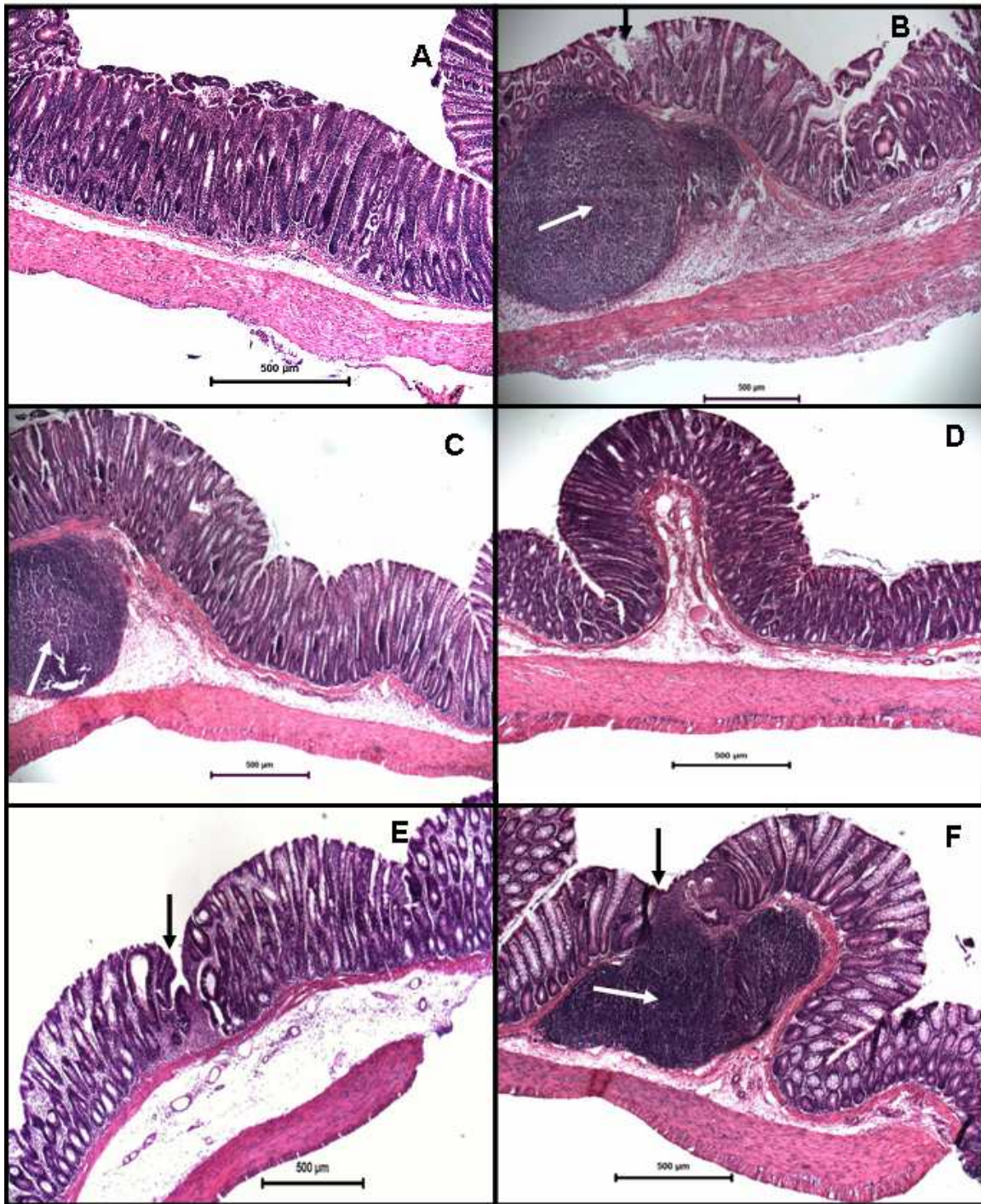


Figura 18: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante a primeira semana de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). (A) grupo não-colítico (branco), mostrando a histologia do cólon do rato normal; (B) grupo controle, com ulceração (seta preta) e infiltração severa de células inflamatórias na submucosa (seta branca); (C) grupo tratado com paepalantina (P5) apresentando infiltração de células inflamatórias na submucosa (seta branca); (D) Combinação P5+S5; (E) grupo tratado com P5+S25, com área de ulceração (seta); (F) grupo tratado com S25 com ulceração (seta preta) e infiltração de células inflamatórias (seta branca). (material objetivado em objetiva de 4X)

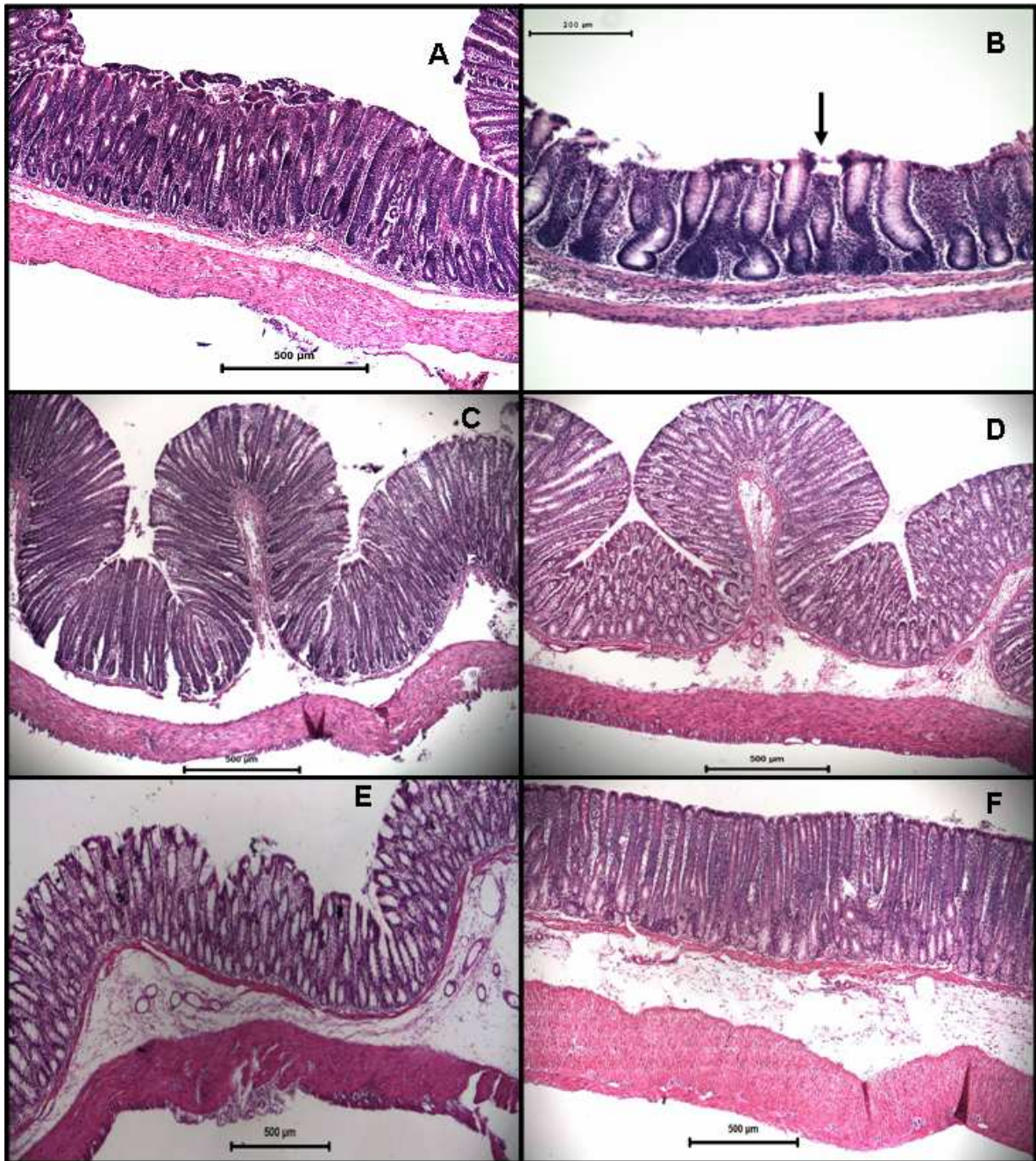


Figura 19: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante 14 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). (A) grupo não-colítico (branco), mostrando a histologia do cólon do rato normal; (B) grupo controle, com ulceração (seta preta) destacando a diminuição da espessura da mucosa nesse material; (C) grupo tratado com paepalantina (P5); (D) Combinação P5+S5; (E) grupo tratado com P5+S25; (G) grupo tratado com S25. (material objetivado em objetiva de 4X em A, C, D E e F e objetiva de 10X em B)

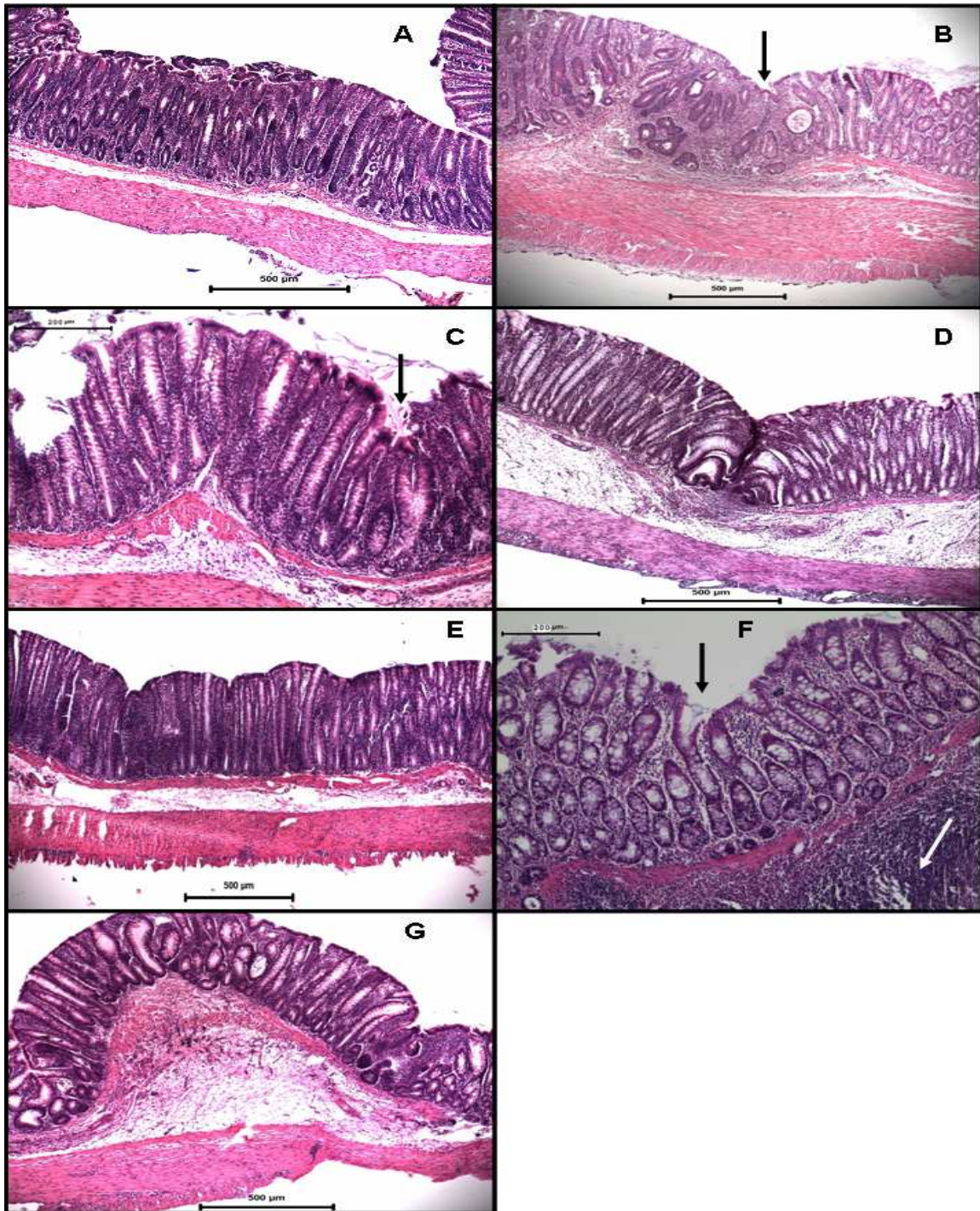


Figura 20: Fotomicrografias da mucosa do cólon de ratos na fase crônica da doença, durante 21 dias de tratamento. A indução de colite com TNBS/etanol foi realizada no dia 1 e uma 2ª dose (recidiva) foi administrada no 15º dia. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). (A) grupo não-colítico (branco), mostrando a histologia do cólon do rato normal; (B) grupo controle, com ulceração (seta preta); (C) controle sem recidiva (CSR) com ulceração no epitélio da mucosa (seta); (D) grupo tratado com paepalantina (P5); (E) Combinação P5+S5; (F) grupo tratado com P5+S25 apresentando ulceração na mucosa (seta preta) e infiltrado de células inflamatórias (seta branca); (G) grupo tratado com S25. (material objetivado em objetiva de 4X em A, B, D, E e G em objetiva de 10 X em C e F)

3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

O progresso do processo inflamatório no grupo controle também foi observado bioquimicamente através das atividades enzimáticas da MPO e FA que foram maximamente aumentadas sete dias após a primeira instilação de TNBS quando comparadas aos níveis enzimáticos dos animais não colíticos (Tabela 5). Esses resultados também foram associados à redução significativa no conteúdo de GSH (Tabela 5).

A combinação P5+S5 preveniu o impacto das lesões causadas pela indução da colite nas duas primeiras semanas de experimento através da manutenção dos níveis de GSH colônicos e redução da atividade enzimática da MPO e FA (Tabela 5). Em adição, este tratamento combinado foi melhor que a S25 testada isoladamente na segunda semana na manutenção dos níveis de GSH. Entretanto a GSH também foi mantida e as atividades enzimáticas da MPO e FA foram reduzidas pelo tratamento com P5 (Tabela 5).

Após a segunda administração de TNBS, a reativação do processo inflamatório colônico não foi observada na GSH e na MPO. Isto foi evidenciado porque nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nestes parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 5). Entretanto, o cólon dos animais tratados com a combinação P5+S25 reduziu a atividade da FA, comparadas ao grupo controle e aos respectivos tratamentos P5 e S25 (Tabela 5).

Resultados

Tabela 5. Efeito dos tratamentos com paepalantina (5mg/Kg) (P5), sulfassalazina (25 mg/Kg) (S25) e das combinações paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 5mg/Kg (P5+S5), paepalantina 5mg/Kg+sulfassalazina 25mg/Kg (P5+S25) no conteúdo de glutathiona total (GSH), na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA) na fase crônica da colite com recidiva induzida por TNBS em ratos.

Grupo	GSH (nmol/g de tecido)	MPO (U/g de tecido)	FA (mU/ mg de proteína)
1 semana			
Branco	2385,75±294,48*	127,59±14,52**	4,20± 0,36**
Controle	1590,06±53,57 ⁺	1038,76±225,94 ⁺⁺	19,15±4,37 ⁺⁺
P5	2359,05±227,36*	264,86±94,13*	6,77±0,92**
P5+S5	2571,86±173,51**	292,17±77,43*	7,36±1,13**
P5+S25	2091,9±175,74	326,47±104,50	21,69±3,90 ⁺⁺
S25	2386,00±177,05*	950,97±327,99 ⁺	7,45± 0,91**
2 semanas			
Branco	2266,04±169,80	115,86±12,91	5,79±0,69**
Controle	1881,33±359,64	220,60±42,94	13,31±1,65 ⁺⁺
P5	2383,19±114,01*	135,48±16,61	6,07±0,42**
P5+S5	2689,82±161,17** ^{XX}	165,46±11,96	8,02±1,44*
P5+S25	2103,06±69,22	219,41±48,48	11,22±0,84 ⁺
S25	1776,58±63,50 ⁺	262,39±59,42 ⁺	11,19±1,28 ⁺⁺
3 semanas			
Branco	1976,16±150,56	90,92±6,73	3,83±0,24* ^{##}
Controle	1702,07±161,98	132,35±18,51	6,86±0,43 ⁺
CSR	1823,10±127,71	96,65±13,83	7,06±0,43 ⁺⁺
P5	1923,81±89,95	214,23±41,83 ⁺	9,58±0,39* ⁺⁺
P5+S5	1975,66±129,78	146,55±37,23	7,57±1,28 ⁺⁺
P5+S25	2117,32±68,75	166,66±24,16	3,94±0,30* ^{XX && ##}
S25	1765,20±120,79	173,90±24,32	7,35±0,89 ⁺⁺

Os dados são expressos como média± E.P. M; * P< 0,05, ** P< 0,01 comparados ao grupo controle; ⁺ P< 0,05, ⁺⁺ P< 0,01 comparados ao grupo branco; [#] P< 0,05, ^{##} P< 0,01 comparados ao grupo controle sem recidiva (CSR); ^{XX} P< 0,01 comparados ao grupo S25; ^{&&} P< 0,01 comparados ao grupo P5.

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma condição que afeta o trato gastrintestinal e é compreendida, fundamentalmente, por duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU), ambas com etiologia desconhecida e vários mecanismos fisiopatológicos envolvidos, como predisposição genética, ação de diversos fatores ambientais e resposta imune anormal (PODOLSKY, 2002). Durante os últimos anos tem ocorrido um aumento gradual na incidência destas doenças intestinais (LOFTUS, 2000), o que justifica o importante esforço que vem sendo realizado por pesquisadores na busca de novos fármacos eficazes no tratamento da DII e na prevenção das recidivas que a caracterizam.

Provavelmente, a dificuldade em encontrar um fármaco realmente eficaz reside no entendimento incompleto da patogênese desta doença, onde inúmeros fatores estão implicados, como infiltração neutrofílica e produção elevada de mediadores inflamatórios, responsáveis por produção excessiva de espécies reativas de oxigênio que ocasiona ou perpetua o processo do dano tecidual (PEARSON *et al.*, 1996; YAVUZ *et al.*, 1999; PRAVDA, 2005).

Considerando-se que a paepalantina, uma isocumarina isolada dos capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides* apresenta atividade antioxidante e antiinflamatória intestinal comprovada (DI STASI *et al.* 2004) e, que a sulfassalazina (fármaco de escolha para o tratamento da Doença Inflamatória Intestinal em humanos) possui sérios efeitos colaterais, especialmente quando usada em altas doses ou em longos períodos de tratamento, a combinação da paepalantina com a sulfassalazina foi alvo de estudo do presente projeto, com o objetivo de avaliar se a paepalantina pode produzir efeitos preventivos e curativos associada a doses menores de sulfassalazina que as comumente utilizadas e, desta forma produzir efeitos protetores com menor incidência de efeitos colaterais e adversos decorrentes da administração da sulfassalazina.

Para testar as combinações nos animais, a escolha do modelo experimental é fundamental e deve-se levar em consideração aquilo que se propõe o estudo. Assim, a

utilização do modelo de indução de colite por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) combinada ao etanol (50%), está justificada em função de reproduzir o que ocorre na doença em humanos, especialmente considerando-se suas características histopatológicas e clínicas, como ulceração, perda de apetite e peso corporal. Neste modelo, a instilação de uma solução alcoólica (etanol 50%) quebra a barreira intestinal e o TNBS age como um hapteno, evocando uma resposta imunológica. A administração separada do hapteno e do etanol (50%) não produz inflamação crônica.

O presente estudo mostra o efeito exercido por diferentes combinações de paepalantina e sulfassalazina na melhora do insulto provocado pela instilação intracolônica de TNBS/etanol em ratos em duas condições experimentais: aguda e crônica com recidiva.

A colite induzida pelo TNBS/etanol via intracolônica, promoveu lesão no cólon dos animais na fase aguda da doença. O pré-tratamento oral com a combinação P5+S5 e com os agentes P5 e S25 promoveram efeitos benéficos nos danos causados no tecido, reduzindo o escore de lesão do cólon, comparados ao grupo controle. Embora não tenha ocorrido diferença estatística com esta combinação e os agentes isolados, a dose de sulfassalazina utilizada na combinação foi cinco vezes menor que o fármaco de referência sulfassalazina (S25).

Entretanto, na fase crônica com recidiva (terceira semana), a combinação P5+S25 foi significativamente melhor que os agentes testados isoladamente nas doses de 5 mg/Kg de paepalantina e de 25 mg/Kg de sulfassalazina na proteção da mucosa colônica causada pelo dano induzido pelo TNBS. Este efeito foi acompanhado pela redução da atividade da FA.

O aumento do peso do tecido do cólon inflamado também é considerado um indicador da severidade e extensão da resposta inflamatória (RACHMILEWITZ *et al.*, 1989). Os resultados do presente estudo demonstraram aumento na relação peso/comprimento do cólon nos grupos tratados com os agentes combinados (P5+S5, P5+S15 e P5+S25) e isolados (P5 e S25) na fase aguda. Somente na primeira

semana da fase crônica os tratamentos com P5 e S25 protegeram o cólon do processo inflamatório, em relação ao grupo controle. Este parâmetro, razão peso/comprimento colônico, é de difícil recuperação como visto por outros autores (OCETE *et al.*,1998), e pode ser explicado pela severa e extensiva lesão induzida no cólon pelo TNBS/etanol, o qual é difícil ser superado por tratamentos farmacológicos (VELJACA *et al.*,1995; VILLEGAS *et al.*,2003).

A presença de aderências entre o cólon e os órgãos adjacentes resulta da inflamação transmural, característica comum da Doença de Crohn em humanos (LEVINE, 1994) e da colite experimental induzida por TNBS (YAMADA *et al.*, 1992; BELL *et al.*, 1995). No presente estudo, após a indução de colite por TNBS/etanol, a incidência de aderências entre o intestino e os órgãos adjacentes ocorreu em todos os grupos tratados na fase aguda, devido à severidade do processo inflamatório agudo. Na fase crônica, os sinais de aderência foram observados com menor incidência após a segunda semana. Na terceira semana a incidência de aderências apresentou-se ausente nos animais tratados com a combinação P5+S25, sugerindo um efeito protetor da combinação, no processo inflamatório.

De acordo com Musch *et al.*, (1982), o processo inflamatório instalado pela infiltração de neutrófilos leva ao desencadeamento da cascata dos metabólitos do ácido araquidônico, com formação do ácido 5-hidroxieicosatetraenóico (5-HETE), que pode ser um dos fatores responsáveis pela diarreia observada na DII. A incidência de diarreia nos animais foi observada nos grupos controle e tratados, nos dois diferentes protocolos experimentais, fase aguda e crônica. Entretanto, a diarreia não foi observada após a recidiva (3ª semana) no grupo que recebeu a combinação P5+S5. Estes dados indicam que a combinação P5+S5 foi eficaz na proteção dos danos causados pelo TNBS, protegendo o cólon da diarreia após a recidiva.

Entre os sintomas da DII está a redução do peso corporal, que ocorre devido à redução no consumo alimentar, resultado de dor abdominal e diarreia durante a fase ativa da doença (CAMPOS *et al.*, 2002). Uma redução no consumo alimentar, seguido

pela perda de peso corporal dos animais, após a indução da colite, foi verificado em todos os grupos controle e tratados na fase aguda da doença. Ao contrário do que foi observado na fase aguda, na fase crônica os animais foram restabelecendo seu consumo alimentar e, conseqüentemente, seu peso corporal. De acordo com Morris *et al.*, (1989), o modelo TNBS produz uma inflamação severa no cólon, mas não afeta significativamente o ganho de peso pelos animais, a longo prazo. Assim, é necessário um período de recuperação para que os animais restabeleçam seu consumo e, conseqüentemente, seu peso corporal.

A ocorrência da inflamação intestinal na colite ulcerativa é caracterizada pela infiltração de numerosos linfócitos e granulócitos na mucosa e submucosa e por depleção de células caliciformes no cólon, em casos moderados a graves da doença (ASAKURA *et al.*, 2007). Através das análises histológicas do cólon dos animais submetidos ao procedimento experimental da fase aguda e crônica, pôde-se constatar um processo inflamatório intestinal visível no grupo controle, com a infiltração de células inflamatórias nas camadas do cólon. O aumento de células inflamatórias na mucosa e submucosa na DII promove a síntese e liberação de uma série de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo eicosanóides, citocinas e metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio, os quais são responsáveis pela perpetuação da resposta inflamatória (PAVLICK *et al.*, 2002). O processo antiinflamatório foi observado nos grupos tratados com a combinação P5+S5, assim como com P5, nas duas fases experimentais, nos quais a proliferação de células inflamatórias na mucosa e submucosa do cólon foi menor. Os neutrófilos e monócitos de pacientes com DII ativa produzem altas concentrações de espécies reativas de oxigênio, comparados à pacientes sadios (D'ORICO, 2000). Segundo McKenzie (1996), há uma elevação das espécies reativas de oxigênio na inflamação da mucosa do cólon na colite ulcerativa, o que pode causar danos diretos na célula epitelial.

No processo inflamatório, um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio debilita as defesas antioxidantes, como a glutatona. A GSH é essencial para

a integridade da função e estrutura do intestino; ratos deficientes em GSH mostraram severa degeneração do jejuno e mucosa colônica e apresentaram perda de peso e diarreia (MARTENSSON *et al.*, 1990). A redução nos níveis de glutathione foi detectada em humanos (LAUTERBURG *et al.*, 1988) e na inflamação colônica experimental (PEH *et al.*, 1989). Através do modelo de indução de colite por TNBS, Grisham *et al.*, (1990) e Barret (1990), observaram uma redução marcante nos níveis de GSH. Nieto *et al.*, (2000) também observaram que há uma redução de GSH no tecido de animais com colite induzida por TNBS. Considerando-se que a administração de um bloqueador de radicais sulfidrílica em ratos promove inflamação colônica (LOGUERCIO *et al.*, 2003) e que a suplementação com GSH melhora o dano colônico em colite experimental (ARDITE *et al.*, 2000), novos compostos que impedem a redução dos níveis deste tripeptídeo caracterizam-se como potenciais no tratamento da DII.

A eficácia da paepalantina (5 mg/Kg), na contenção dos níveis de GSH, já foi observada anteriormente, por Di Stasi *et al.*, (2004), a qual atenuou de forma significativa as lesões induzidas pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. No presente trabalho, a depleção nos níveis de GSH foi observada nos animais submetidos à indução de colite por TNBS/etanol na fase aguda e crônica com recidiva.

O pré-tratamento realizado na fase aguda com os agentes combinados P5+S5 e P5+S25 impediram a depleção do conteúdo de GSH, mas não foram diferentes significativamente dos grupos tratados com P5 e S25, os quais também impediram de forma significativa a depleção do conteúdo de GSH, em relação ao grupo controle. A combinação P5+S5 também impediu a depleção da GSH na primeira e segunda semana da colite crônica. Sendo que na segunda semana foi melhor que a S25 testada isoladamente. Esta combinação, também reduziu a atividade da MPO, na fase aguda e na primeira semana da colite crônica. A inibição da MPO aumenta as defesas antioxidantes no cólon inflamado (GALVEZ *et al.*, 2006).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e, em pequena quantidade, em monócitos e macrófagos. A redução da atividade desta

enzima pode ser interpretada como manifestação da propriedade antiinflamatória de um dado composto (VELJACA *et al.*, 1995). A combinação P5+S5 no pré-tratamento e pós-tratamento reduziu a atividade da MPO, resultados estes comprovados pelos dados microscópicos, onde ocorreu atenuação dos danos da mucosa e da submucosa com redução da infiltração de neutrófilos, promovendo uma atividade antiinflamatória.

A paepalantina é eficaz em interferir nos sistemas MPO/ H₂O₂ e MPO/ H₂O₂/Cl⁻, esta interferência foi relacionada à inibição da mieloperoxidase e pelo efeito de seqüestrar ácido hipocloroso (HOCL) (KITAGAWA *et al.*, 2003). A presença dos grupos OH no C9 e C10 na molécula paepalantina pode permitir a atividade antioxidante desta isocumarina como detectado pelo sistema MPO/H₂O₂/Cl⁻ (KITAGAWA *et al.*, 2003). De acordo com Wasil *et al.*, (1988), seqüestradores de HOCL podem inibir danos potenciais aos tecidos inflamatórios.

Kettle *et al.* (1991), verificaram que a sulfassalazina também é um fármaco anti-inflamatório efetivo em inibir a enzima MPO para converter o H₂O₂ em ácido hipocloroso (HOCL). Entretanto, no presente estudo tanto na fase aguda quanto na fase crônica, a sulfassalazina na dose de 25 mg/Kg não inibiu a atividade da MPO, em relação ao grupo controle, mas foi eficaz nesta inibição quando combinada com a paepalantina na dose de 5 mg/Kg. Cruz *et al.* (2001), verificaram que a sulfassalazina na dose de 100mg/Kg (4 vezes maior que a dose testada no presente estudo) inibiu a atividade da MPO. Woodruff *et al.* (2005), também observaram que o tratamento com a sulfassalazina na dose de 100mg/Kg, na fase aguda da doença reduziu os níveis de MPO no cólon de ratos colíticos. Desta forma, doses baixas de sulfassalazina, como utilizada no presente trabalho, podem interferir com a eficácia da sulfassalazina em inibir os níveis de MPO no cólon inflamado. Este fato sugere que a paepalantina seria o composto responsável por esta inibição na fase aguda e na primeira semana da fase crônica da doença.

Análises bioquímicas e imunohistoquímicas indicam que a infiltração de leucócitos (macrófagos e neutrófilos) é responsável pelo aumento da fosfatase alcalina

(FA) no cólon inflamado (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 2004). Isto ocorre porque a FA está localizada em grânulos específicos de neutrófilos (BORREGAARD *et al.*, 1987; KOBAYASHI e ROBINSON, 1991). A FA participa na absorção de nutrientes no intestino (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 2004) e na manutenção e ou função de algumas estruturas intestinais (SHAO *et al.*, 2000), embora seu papel fisiológico específico seja desconhecido. Entretanto, numerosos estudos sugerem que a FA, presente nas microvilosidades intestinais, tem importante papel no mecanismo de defesa contra alguns patógenos (POESLTRA *et al.*, 1997).

A atividade da fosfatase alcalina pode ser considerada como um marcador sensível à inflamação do intestino, uma vez que a atividade desta enzima está aumentada nos experimentos de colite (SÁNCHEZ DE MEDINA *et al.*, 1996). A atividade da FA também estava aumentada no cólon dos animais colíticos tanto na fase aguda como crônica no presente estudo, devido ao processo inflamatório ocorrido pelo TNBS.

Nenhuma das combinações reduziu a atividade da FA na fase aguda, no entanto, a atividade desta enzima foi reduzida na primeira e segunda semana do experimento crônico pela combinação P5+S5 e pelos grupos isolados P5 e S25, em relação ao grupo controle. Entretanto, após a recidiva, a atividade inibitória desta enzima foi significativamente maior quando os animais foram tratados com P5+S25.

De acordo com Levine (2008), o sinergismo indica um efeito conseguido por uma combinação de agentes terapêuticos, onde o efeito qualitativo e ou quantitativo é maior que o efeito dos agentes administrados isoladamente. Outros autores também estudaram a estratégia terapêutica de combinar a sulfassalazina ou seu metabólito ativo 5-ASA, com compostos com atividade na colite ulcerativa. Pacientes com colite ulcerativa tratados com a combinação de 5-ASA (2g/d) e rosiglitazone (4mg/d) tiveram melhores efeitos terapêuticos do que pacientes tratados somente com 5-ASA (LIANG E OUYANG, 2008). Barbosa *et al.* (2003) concluíram que o estresse oxidativo no plasma de pacientes com colite ulcerativa diminuiu com o uso combinado de

sulfassalazina e óleo de peixe rico em ômega-3, devido à redução na produção de radicais livres. Estudos preliminares também têm investigado a combinação terapêutica do 5-ASA com probióticos na colite ulcerativa (GUSLANDI *et al.*, 2003). Van Assche *et al.* (2002) verificaram que a combinação do 5-ASA com esteróides apresentou efeito sinérgico; entretanto, os autores sugerem que este efeito precisa ser melhor elucidado para ensaios clínicos. Em ensaios experimentais, o 5-ASA foi administrado em combinação com a N-acetilcisteína (NAC) em ratos colíticos induzidos por TNBS, e verificou-se que o tratamento combinado apresentou sinergismo frente aos agentes isolados, promovendo reparo na mucosa inflamada (SIDDIQUI *et al.*, 2006).

Apesar da combinação P5+S5 ter apresentado atividade antiinflamatória intestinal com uma dose de sulfassalazina 5 vezes menor que a dose de sulfassalazina testada isoladamente, nos parâmetros bioquímicos avaliados nos dois experimentos (fase aguda e crônica), não é possível afirmar a presença de sinergismo, visto que a paepalantina produziu efeitos semelhantes a esta combinação, nos mesmos parâmetros estudados. Este fato pode ser parcialmente explicado pela capacidade antioxidante da paepalantina, observada no presente estudo pela redução da peroxidação lipídica induzida em membranas de cérebro por sulfato ferroso e ácido ascórbico e por sua atividade antiinflamatória (DI STASI *et al.*, 2004). Apesar da ausência de efeitos sinérgicos da paepalantina sobre a atividade antiinflamatória da sulfassalazina, a associação de paepalantina (5 mg/Kg) com sulfassalazina (5 mg/Kg) promoveu efeitos protetores usando dose 5 vezes menor do fármaco de referência, indicando que esta combinação pode ser usada com menores efeitos adversos e colaterais relacionados à sulfassalazina.

Em conclusão, os resultados apresentados mostram que o tratamento com a combinação paepalantina e sulfassalazina (P5+S5), promoveu efeito preventivo e curativo na mucosa colônica afetada pelo TNBS/etanol, facilitando a recuperação do tecido inflamado, um efeito que está associado por impedir a depleção da glutathione (GSH) e reduzir as atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA). Contudo, estes efeitos foram semelhantes aos agentes testados isoladamente (P5 e S25) na fase aguda e na primeira semana da fase crônica. No entanto, esta combinação obteve estes resultados com uma dose de sulfassalazina cinco vezes menor que a dose de sulfassalazina testada isoladamente. Esta combinação, na segunda semana da fase crônica, obteve melhores resultados do que S25 na proteção do cólon, impedindo a depleção de GSH; entretanto, não é possível afirmar a presença de sinergismo, visto que a paepalantina testada isoladamente apresentou resultados semelhantes à combinação.

*Referências

- AGRAWAL, A.; RHODES, J.M. Smoking and IBD. **IBD Monitor**, v.4, p.114-119, 2003.
- ALSTEAD, E.M. The pill: safe sex and Crohn's disease? **Gut**, v.45, n.2, p.165-166, 1999.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.**, v.113, p. 548-555, 1985.
- ARDIZZONE, S. Ulcerative Colitis. Orphanet encyclopedia.2003: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-UC.pdf>.
- ARDITE, E.; SANS, M.; PANES, J.; ROMERO, F.J.; PIQUE, J.M.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Replenishment of glutathione levels improve mucosal function in experimental acute colitis. **Lab. Invest.**, v.80, n.5, p.735-744, 2000.
- ASAKURA, H.; SUZUKI, K.; HONMA, T. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? **World J. Gastroenterol.**, v.13, n.15, p.2145-2149, 2007.
- AZAD KHAN, A.K; PIRIS, J.; TRUCLOVE, S.C. An experimental to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. **Lancet**, v.2, p.892-895, 1977.
- AZAD KHAN, A.K.; HOWES, D.T.; PIRIS, J.; TRUEVOLE, S.C. Optimum dose of sulphasalazine for maintenance treatment in ulcerative colitis. **Gut**, v.21, p.232-240, 1980.
- BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. **Free Radic. Biol. Med.**, v.13, p. 169-181, 1992.
- BACH, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.12, p.911-920, 2002.
- BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; EL KADRI, M.Z.; RODRIGUEZ, M.A.M.; BURINI, R.C.; DICHI, I. Decreased colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. **Nutrition**, v.19, p.837-842, 2003.
- BARRET, K.E. Involvement of histamine in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.98, p.653, 1990.
- BELL, C.J.; GALL, D.G; WALLACE, J.L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v.268, p.G622-G630, 1995.

*Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
National Library of Medicine. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2003. 306p.

- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **J. Sports. Med. Phys. Fitness**, v.33, p.205-222, 1993.
- BERG, D.; ZHANG, J.; WEINSTOCK, J.V.; ISMAIL, H.F.; EARLE, K.A.; ALILA, H.; PAMUKCUT, R.; MOORES, S.; LYNCH, R.G. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. **Gastroenterology**, v.123, p.1527-1542, 2002.
- BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROOK, M.J. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. **J. Biol. Chem.**, v.164, p.321-329, 1946.
- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELI, K.K.; PEREIRA, M.A.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: Revisão. **Rev. Bras. Coloproct.**, v.23, n.3, p.172-182, 2003.
- BORREGAARD, N.; MILLER, L.J.; SPRINGER, T.A. Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. **Science**, v.237, p.1204-1206, 1987.
- BOYD, S.C.; SASAME, H.A.; BOYD, M.K. High concentration of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Science**, v.205, p. 1010-1112, 1979.
- BRANT, S.R.; FU, Y.; FIELDS, C.T.; BALTAZAR, R.; RAVENHILL, G.; PICKLEST, M.R.; ROHAL, P.M.; MANN, J.; KIRSCHNERS, B.S.; JABS, E.W.; BAYLESS, T.M.; HANAUER, S.B.; CHO, J.H. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. **Gastroenterology**, v.115, p.1056-1061, 1998.
- BRIDGER, S.; LEE, J.C.; BJARNASON, I.; JONES, J.E.; MACPHERSON, A.J. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. **Gut**, v.5, n.1, p.21-25, 2002.
- BURRES, N.; FRIGO, A.; RASMUSSEN, R.R.; MCALPINE, J.B. A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. **J. Nat. Prod.**, v.5, p.1582-1587, 1992.
- CAMPIERI, M.; GIOCHETTI, P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? **Gastroenterology**, v.116, n.5, p.1246-1249, 1999.
- CAMPIERI, M.; GIOCHETTI, P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. **Gut**, v.48, p.132-135, 2001.
- CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; TEIXEIRA, M.G.; MUSCERINO, D.R.; HABR-GAMA, A.; KISS, D.R. Inflammatory bowel diseases, principles of nutritional therapy. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd.**, v.57, n.4, p.187-198, 2002.
- CAMUESCO, D.; PERAN, L.; COMALADA, M.; NIETO, A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUEZ-CABEZAS, E.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Preventive effects of lactulose in the Trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, n.3, p.265-271, 2005.

- CHUNGI, V.S.; DITTERT, L.W.; SHARGEL, L. Pharmacokinetics of sulfasalazine metabolites in rats following concomitant oral administration of riboflavin. **Pharm. Res.**, v.6, n.12, p.1067-1072, 1989.
- CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, v.118, n.6, p.671-674, 2004.
- COELHO, R.G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M.S.G. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**. v.71, p.497-500, 2000.
- COLLINS, S.M. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.280, n.3, p.G315-G318, 2001.
- CORMAN, M.L. **Colon and rectal surgery**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1743p.
- 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.
- CURRAN, M.E.; LAU, K.F.; HAMPE, J.; [SCHREIBER, S.](#); [BRIDGER, S.](#); [MACPHERSON, A.J.](#); [CARDON, L.R.](#); [SAKUL, H.](#); [HARRIS, T.J.](#); [STOKKERS, P.](#); [VAN DEVENTER, S.J.](#); [MIRZA, M.](#); [RAEDLER, A.](#); [KRUIS, W.](#); [MECKLER, U.](#); [THEUER, D.](#); [HERRMANN, T.](#); [GIONCHETTI, P.](#); [LEE, J.](#); [MATHEW, C.](#); [LENNARD-JONES, J.](#) Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. **Gastroenterology**, v.115, p.1066-1071, 1998.
- CUZZOCREA, S.; MC DONALD, M.C.; MASÓN, E.; DUGO, L.; LEPORE, V.; FONTI, M.T.; CICCOLO, 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.127-137, 2000.
- DALLEGRI, C.; OTTONELLO, L.; BALLESTRELO, A.; BOGLIOLO, F.; FERRANDO, F.; PATRONE, F. Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. **Gut**, v.31, p.184-186, 1990.
- DAMIANI, C.R. **Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmun. Rev.**, v.3, n.5, p.394-400, 2004.
- D'ODORICO, A.; D'INCA, R.; MESTRINER, C.; DI LEO, V.; FERRONATO, A.; STURNIOLO, G.C. Influence of disease site and activity on peripheral neutrophil function in inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, p.1594-1600, 2000.

- DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G; VARANDA, E.A.; VILEGAS, W. *In vitro* cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Z. Naturforsch.**, v.57c, p 85-88, 2002.
- 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.
- ELIA, C.C.S.; SOUZA, H.S.P. *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito*. São Paulo: Atheneu, 2001. 187p.
- EVANS, J.M.; MCMAHON, A.D.; MURRAY, F.E.; MCDEVITT, D.G.; MACDONALD, T.M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. **Gut**, v.40, n.5, p.619-622, 1997.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, n.10, p.872-879, 2002.
- FEE, J.A. ; TEITELBAUM, H.D. Evidence that superoxide desmutase play a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.49, n.1, p.150-58, 1972.
- FIGUEIRA, J.E.C.; VASCONCELLOS NETO, J. *Paepalanthus*, cupins e aranhas. **Ciência Hoje**, v.13, n.75, p.20-25, 1991.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, n.1, p.182-205, 1998.
- 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 Med.**, v.63, p.409-414, 1997.
- GÁLVEZ, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in natural products chemistry. Bioactive natural products (Part f)**. Amsterdam: Elsevier, 2001. p.607-649.
- GÁLVEZ, J.; GRACIOSO, J.S.; CAMUESCO, D.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; ZARZUELO, A. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. **Fitoterapia**, v.77, p.515-520, 2006.
- GASCHE, C. Complications of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.47, n.31, p.49-56, 2000.
- GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.63, p.69-172, 1990.
- GIULIETTI, A.M.; HENSOLD, N.C. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Bot. Bras.**, v.4, p.133-159, 1990.
- GIULIETTI, N.; GIULIETTI, AM.; PIRANI, J.R.; MENEZES, NL. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.1, n.2, p.179-93, 1988.

- GITNICK, G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v.220, p.83-86, 1996.
- GODET, P.G.; MAY, G.R.; SUTHERLAND, L.R. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.37, n.5, p.668-673, 1995.
- GONZALEZ, R.; SANCHES DE MEDINA, F.; GALVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZA, M.E.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.71, n.4, p.243-250, 2001.
- GORDON, P.H.; NIVATVONGS, S. **Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus**. St. Louis: Quality Medical Publishing, 1992. 1097p.
- GRISHAM, M.B.; BENIOT, J.N.; GRANGER, D.N. Assesment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. **Methods Enzymol.**, v.186, p.729-742,1990.
- GRISHAM, M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. **Lancet**, v.344, n.8926, p.859-861, 1994.
- GUSLANDI, M.; TITTOBELLO, A. Pilot trial of nicotine patches as an alternative to corticosteroids in ulcerative colitis. **J. Gastroenterol.**, v.31, n.40, p.627-629, 1996.
- GUSLANDI, M.; GIOLLO, P.; TESTONI, P.A. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.15, p.697-698, 2003.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v.41, p.1819-1828, 1995.
- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overvien. **Methods Enzymol.**, v.186, p.1-85, 1990.
- HANAUER, S.B; SADBORN, W. Management of Crohn's disease in adults. **Am. J. Gastroenterol.**, v.96, n.3, p.635-643, 2001.
- HART, A.; KAMM, M.A. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.16, n.12, p.2017-2028, 2002.
- HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.**, v.107, p.401-404, 1986.
- HENDRICKSON, B.A.; GOKHALE, R.; CHO, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatpry bowel disease. **Clin. Microbiol. Rev.**,v.15, n.1, p.79-94, 2002.
- HILSDEN, R.J.; SCOTT, C.M.; VERHOEF, M.J. Complementary medicine use by patients with inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v.93, n.5, p.697-701, 1998.
- HILSDEN, R.J.; MEDDINGS, J.B.; VERHOEF, M.J. Complementary and alternative medicine use by patients with inflammatory bowel disease: An internet survey. **Can. J. Gastroenterol.**, v.13, n.4, p.327-332, 1999.

- KAYATEKIN, B.M.; GÖNENÇ, S.; AÇIKGÖZ, O.; UYSAL, N.; DAYI, A. Effect of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. **Eur. J. App. Physiol.**, v.87, p. 141-144, 2002.
- KEIGHLEY, M.; WILLIAMS, N.S. **Cirurgia do ânus, reto e colo**. São Paulo: Manole, 1998. 2335p.
- KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v.41, n.10, p.1485-1492, 1991.
- KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Assays for the chlorination activity of mieloperoxidase. **Methods Enzymol.**, v.233, p.502-512, 1994.
- KIRSNER, J.B. Inflammatory bowel disease at the University of Chicago - the first 50 years: some personal reflections. **Am. J. Gastroenterol.**, v.80, p. 219-226, 1985.
- KITAGAWA, R.R.; RADDI, M.S.G.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L.M. Effect of the isocoumarin Paepalantine on the luminal and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.6, p.905-908, 2003.
- KNIGGE, K.L. Inflammatory bowel disease. [review]. **Clin. Cornestone**, v.4, n.4, p.49-60, 2002.
- KOBAYASHI, T.; ROBINSON, J.M. A novel intracellular compartment with unusual secretory properties in human neutrophils. **J. Cell. Biol.**, v.113, p.743-756, 1991.
- 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.
- KUBES, P.; WALLACE, J.L. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. **Mediators Inflamm.**, v.4, n.6, p.397-405, 1995.
- LAUTERBURG, B.H.; BILZER, M.; ROWEDER, E.; INAUEN, W. Decreased glutathione in inflamed colonic mucosa in man. A possible role of hypochlorous acid and prevention by 5-aminosalicylic acid. In: MAC DERMOTT, (Ed) **Inflammatory Bowel Disease: current status and future approach**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988, p.273-277.
- LEITÃO, G.G.; LEITÃO, S.G.; VILEGAS, W. Quick preparative separation of natural maphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. **Z. Naturforsch.**, v.57, p.1051-1055, 2002.
- LEVENSTEIN, S.; PRANTERA, C.; VARVO, V.; SCRIBANO, M.L.; ANDREOLI, A.; LUZI, C.; ARCA, M.; BERTO, E.; MILITE, G.; MARCHEGGIANO, A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. **Am. J. Gastroenterol.**, v.95, n.5, p.1213-1220, 2000.
- WEBB & ASSOCIATES., Rehovot (IL), Arie Levine. Synergistic compositions for Crohn's disease and inflammatory gastrointestinal disorders. PCT/ 2007/000828. US. N. WO/2008/004224. 10 jan.2008.
- LEVINE, D.S. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: TARGAN, S. R.; SHANAHAN, F. (Eds). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: WILLIAMS & WILKINS, 1994. p.296-316,

- LIANG, L.L.; OUYANG, Q. A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. **World. J. Gastroenterol.**, v.7, n.14, p.114-119, 2008.
- LICHTMAN, S.N.; BALFOUR SARTOR, R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds). **Inflammatory bowel disease: from to bedside**. Baltimore: Willinas and Wilkins, 1994, p.317-335.
- 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. **Digest. Dis. Sc.**, v.41, n.10, p.2078-2086, 1996.
- LINSKENS, R.K.; HUIJSDENS, X.W.; SAVELKOUL, P.H.; VANDERBROUCKE-GRAULS, C.M.; MEUWISSEN, S.G. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. **Scand J. Gastroenterol. Suppl.**, v.234, p.29-40, 2001.
- LOFTUS Jr., E.V.; SILVERSTEIN, M.D.; SANDBORN, W.J.; TREMAINE, W.J.; HARMSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence and survival. **Gut**, v.46, n.3, p.336-343, 2000.
- 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. **Digestive Diseases Sciences**, v.41, n.6, p.1204-1211, 1996.
- 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. **Digest. Liver Dis.**, v.35, n.9, p.635-641, 2003.
- MACDERMOTT, R.P.; NAHM, M.H. Expression of human immunoglobulin G subclassed in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.93, p.1127-1129, 1987.
- MADSEN, K.L.; DOYLE, J.S.; JEWELL, L.D.; TAVERNINI, M.M.; FEDORAK, R.N. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin-10 gene-deficient mice. **Gastroenterology**, v.116, p.1107-1114, 1999.
- MARTENSSON, J.; JAIN, A.; MEISTER, A. Glutathione is required for intestinal function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.1715-1719, 1990.
- MATHESON, N.R.; WONG, P.S.; TRAVIS, J. Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.20, p.325-330, 1981.
- MAZIER, W. P.; LEVIEN, D.H.; LUCHTEFELD, M.A.; SENAGORE, A.J. **Surgery of the colon, rectum, and anus**. Pennsylvania: Saunders Company, 1995. 1196p.
- MCKENZIE, S.J.; BAKER, M.S.; BUFFINGTON, G.D.; DOE, W.F. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.136, 1996.

- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v.52, p.711-760, 1983.
- MIDDLETON, S.J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J.D. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. **Lancet**, v.341, p.465-466, 1993.
- MILLER, T.A.; LI, D.; KUO, Y.J.; SCHIMIDT, K.L.; SHANBOUR, L.L. Nonprotein sulphidryl compounds in canine gastric mucosa: effects PGE2 and ethanol. **Am. J. Physiol.**, v.249, p.G137-G144, 1985.
- MILLER, M.J.S.; GRISHAM, B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediat. Inflamm.**, v.4, p.387-396, 1995.
- MISIEWICZ, J.J.; POUNDER, R.E.; VENABLES, C.W. (Eds.). **Diseases of the gut and pancreas**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- MIYACHI, Y.; YOSHIOKA, A.; IMAMURA, S.; NIWA, Y. Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen. **Gut**, v.28, n.2, p.190-195, 1987.
- 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.
- MUSCH, M.; MILLER, R.J.H.; FIELD, M.; SIEGEL, M.I. Stimulation of colonic secretion by lipooxygenase metabolites of arachidonic acid. **Science**, v.217, p.1255-1256, 1982.
- MYLONAKI, M.; RAYMENT, N.B.; RAMPTON, D.S.; HUDSPITH, B.N.; BROSTOFF, J. Molecular characterization of rectal mucosal-associated flora in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.11, p.481-487, 2005.
- NIELSEN, O.H.; AHNFELT-RØNNE, I.; ELMGREEN, J. Abnormal metabolism of arachidonic acid in chronic inflammatory bowel disease: enhanced release of leucotriene B4 from activated neutrophils. **Gut**, v.28, n.2, p.181-185, 1987.
- NIELSEN, O.H.; RASK-MADSEN, J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.31, suppl.216, p.149-159, 1996.
- NIETO, N.; TORRES, M.I.; FERNANDEZ, M.I.; GIRON, M.D.; RIOS, A.; SUAREZ, M.D. Experimental colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, n.9, p.1820-1827, 2000.
- OBRADOR, A.; RIERA, J. Definitions. In: GASSULL, M.A.; OBRADOR, A.; CHANTAR, C. (Eds.). **Management of inflammatory bowel disease**. Barcelona: Prous Science, 1994. p.1-6.
- OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; CRESPO, M.E.; CRUZ, T.; GONZALEZ, M.; TORRES, M.I.; ZARZUELO, A. Effects of morin on experimental model of acute colitis in rats. **Pharmacology**, v.57, p.261-270, 1998.
- ONUMA, E.K.; DAS, K.M. Current medical therapy of inflammatory bowel disease. **Pract. Gastroenterol.** p.19-30, 1998.
- PANÉS, J.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell interactions: Molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. **Gastroenterology**, v.114, p.1066-1090, 1998.

- PARMAR, N.S.; TARIA, M.; AGEEL, A.M. Gastric anti-ulcer and cytoprotective affect of selenium in rats. **Toxicol Appl. Pharmacol.**, v.91, n.1, p.122-130, 1988.
- PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAN, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.331, n.3, p.311-322, 2002.
- PEARSON, D.C.; JOURD'HEUIL, D.; MEDDINGS, J.B. The antioxidant properties of 5-aminosalicylic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v.21, n.3, p.367-373, 1996.
- PEH, K.H.; WAN, B.Y.C.; PARKE, D.V. Determination of glutathione content and myeloperoxidase activity in rat models of induced rectocolonic inflammation (Abstract). **Br. J. Pharmacol.**, v.97, p.548, 1989.
- PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.6, p.417, 2002.
- POELSTRA, K.; BAKKER, W.W.; KLOK, P.A.; KAMPS, J.A.; HARDONK, M.J.; MEIJER, D.K. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase *in vivo*. **Am. J. Pathol.**, v.151, n.4, p.1163-1169, 1997.
- POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Inflammatory bowel disease and cancer. **Hepatogastroenterology**, v.47, n.31, p.57-70, 2000.
- POWRIE, F.T. Cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. **Immunity.**, v.3, p.171-174, 1995.
- PRAVDA, J. Radical Induction Theory of ulcerative colitis. **World J. Gastroenterol.**, v.11, p.2371-2384, 2005.
- PULLAN, R.D; RHODES, J; GANESH, S; MANI, V; MORRIS, J.S; WILLIAMS, G.T; NEWCOMBE, R.G; RUSSEL, M.A; FEYERABEND, C; THOMAS, G.A; SAWE, U. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **N. Engl. J. Med.**, v.330, n.12, p.811-815, 1994.
- RACHMILEWITZ, D.; SIMON, P.L.; SCHWARTZ, L.W.; DON GRISWOLD, E.; FONDACARO, J.D.; WASSERMANN, M.A. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v.312, p.326-337, 1989.
- RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F.; OKON, E.; BURSZTYN, M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. **Gut**, v.37, p.247-255, 1995.
- RANSFORD, R.A.; LANGMAN, M.J.S. Sulfasalazine 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.
- RATH, H.C.; HERFARTH, H.H.; IKEDA, J.S.; GRENTHER, W.B.; HAMM, T.E.; BALISH, E.; TAUROG, J.D.; HAMMER, R.E.; WILSON, K.H.; SARTOR, R.B. Normal luminal bacteria, especially Bacteriodes species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β_2 microglobulin transgenic rats. **J. Clin. Invest.**, v.98, p.945-953, 1996.
- REIF, S.; KLEIN, I.; LUBIN, F.; FARBSTAIN, M.; HALLAK, A.; GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.40, n.6, p.754-760, 1997.

- REPINE, J.E.; EATOM, J.W.; ANDERS, M.W.; HOIDAL, J.R.; FOX, R.B. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals and human phagocytes *in vitro*. Detection with the anti-inflammatory agent dimethyl sulfoxide. **J. Clin. Invest.**, v.64, n.6, p.1642-1661, 1979.
- ROGLER, G.; BRAND, K.; VOGL, D.; PAGE, S.; HOFMEISTERR, R.; ANDUS, T.; KNUECHEL, R.; BAEUERLE, P.A.; SCHÖLMEIRICH, J.; GROSS, V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. **Gastroenterology**, v.115, n.2, p.357-369, 1998.
- ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.
- RUBIN, D.T.; HANAUER, S.B. Smoking and inflammatory bowel disease. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, n.8, p.855-862, 2000.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GALVEZ, J.; ROMERO, J.A.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.278, n.2, p.771-779, 1996.
- SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; NIETO, A.; GÁLVEZ, J.; ZARAUELO, A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacol.**, v.68, p.2317-2326, 2004.
- SARTOR, R.B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics, and prebiotics. **Gastroenterology**, v.126, p.1620-1633, 2004.
- SARTOR, R.B. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p.44-50, 2005.
- SATSANGI, J.; PARRKES, M.; LOUIS, E.; HASHIMOTO, L.; KATO, N.; WELSH, K.; TERWILLIGER, J.D.; LATHROP, G.M.; BELL, J.I.; JEWELL, D.P. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. **Nature Genetics**, v.14, p.199-202, 1996.
- SELLIM J. H.; PARICHA, P. J. Pharmacotherapy of inflammatory bowel disease. In: Bunton, L.L (Ed). **Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: Mc Graw- Hill, 2006, p.1009-1019.
- SETOYAMA, H.; IMAOKA, A.; ISHIKAWA, H, et al. Prevention of gut inflammation by Bifidobacterium in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with Bacterioides strains isolated from ulcerative colitis patients. **Microbes Infect.**, v.5, p.115-122, 2003.
- SHANAHAN, F.; TARGAN, S.R. Mechanisms of tissue injury in inflammatory bowel disease. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.78-88.
- SHAO, J.S.; ENGLE, M.; XIE, Q.; SCHIMIDT, R.E.; NARISAWA, S.; MILLAN, J.L. Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach. **Microsc. Res. Tech.**, v.51, p.121-128, 2000.

- SHIBA, T.; AIBA, Y.; ISCHIKAWA, H.; USHIYAMA, A.; TAKAGI, A.; MINE, T.; KOGA, Y. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgates*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. **Microbiol. Immunol.**, v.47, p.371-378, 2003.
- SIDDIQUI, A.; ANCHA, H.; TEDESCO, D.; LIGHTFOOT, S.; STEWART, C.A.; HARTY, R.F. Antioxidant therapy with N-Acetylcysteine plus mesalamine accelerates mucosal healing in a rodent model of colitis. **Dig. Dis. Sci.**, v.51, n.4, p.698-705, 2006.
- 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.
- SIMMONDS, N.J.; ALLEN, R.E.; STEVENS, T.R.J.; VAN SOMEREN, R.N.M.; BLAKE, D.R.; RAMPTON, D.S. Chemiluminescence assay of mucosal reactive metabolites in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.103, p.186-196, 1992.
- 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 Other Lipid Mediat.**, v.71, p.163-175, 2003.
- SLINKER, B.K. The Statistics of Synergism. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.30, p.723-31, 1998.
- SMITH, P.D.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H. Measurement of protein using BCA. **Anal. Biochem.**, v.150, n.1, p.76-85, 1985.
- SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, n.5, p.372-377, 2002.
- STENSON, W. Inflammatory bowel disease. In: YAMADA, T.; ALPES, D.; CHUNG, O. (Eds.) **Textbook of Gastroenterology**. Filadélfia: JB Lippincott, 1995. v.1, p.1754-1757.
- STOCKS, J.G.; GUTTERIDGE, J.M.C.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v.47, p.215-222, 1974.
- SZULC, P.; MEUNIER, P.J. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? **Lancet**, v.357, n.9273, p.1995-1996, 2001.
- TAVARES, D.C.; VARANDA, E. A.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic potencial of the isocoumarin paepalantine *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. **J. Ethnopharmacol.**, v.68, p.115-120, 1999.
- THEIS, M.K.; BOYKO, E.J. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v.89, n.10, p.1920, 1994.
- THOMAS, G.A.; SWIFT, G.L.; GREEN, J.T.; NEWCOMBE, R.G.; BRANIFF- MATHEWS, C.; RHODES, J.; WILKINSON, S.; STROHMEYER, G.; KREUZPAINTER, G. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease : a five year follow up study. **Gut**, v.42, n.4, p.497-500, 1998.
- THOMPSON, N.P.; MONTGOMERY, S.M.; WADSWORTH, M.E.; POUNDER, R.E.; WAKEFIELD, A.J. Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two

- national longitudinal birth cohorts. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, n.1, p.25-30, 2000.
- VAN ASSCHE, G.; BAERT, F.; DE REUCK, M.; DE VOS, M.; DE WIT, O.; HOANG, P.; LOUIS, E.; MANA, F.; PELCKMANS, P.; RULGEERTS, P.; VAN GOSSUM, A.; D'HAENS, G. The role of aminosalicylates in the treatment of ulcerative colitis. **Acta Gastroenterol. Belg.**, v.65, p.196-199, 2002.
- [VAN DULLEMEN, H.M.](#); [VAN DEVENTER, S.J.](#); [HOMMES, D.W.](#); [BIJL, H.A.](#); [JANSEN, J.](#); [TYTGAT, G.N.](#); [WOODY, J.](#) Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). **Gastroenterology**, v.109, n.1, p.129-135, 1995.
- VARANDA, E.; RADDI, M.S.G.; DIAS, F.L.; ARAUJO, M.C.P.; GIBRAN, S.C.A.; TAKAHASHI, C.S.; VILEGAS, W. Mutagenic and citotoxicity activity of an isocoumarin (Paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v.17, p.85-95, 1997.
- VARANDA, E.; DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; FURUYA, E.M.; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantine dimmer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicol. In Vitro**, v.18, p.109-114, 2004.
- VELJACA, M.; LESCH, C.A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.102, p.1524-1534, 1995.
- VILEGAS, W.; ROQUE, N.F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A.M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v.29, n.7, p.2299-2301, 1990.
- VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; ORJALES, A.; DE LA LASTRA, C.A. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.460, p.209-218, 2003.
- WALLACE, J.L.; HIGA, A.; McKNIGHT, G.W.; McINTIRE, D.E. Prevention and reversal of experimental colitis by a monoclonal antibody which inhibits leukocyte adherence. **Inflammation**, v.16, p.343-354, 1992.
- WALLACE, J.L. Eicosanoids. In: TARGAN, S.R.; SHANAHAN, F. (Eds.). **Inflammatory bowel disease: from bench to bedside**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.123-132.
- WASIL, M.; HALLIWEL, B.; MOORHOUSE, C.P. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline. **Biochem. Pharmacol.**, v.37, p.775-778, 1988.
- WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C.L. The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat. Rev.**, v.1, p.69-75, 2001.
- WOODRUFF, T.M.; ARUMUGAM, T.V.; SHIELS, I.A.; NEWMAN, M.L.; ROSS, P.A.; REID, R.C.; FAIRLIE, D.P.; TAYLOR, S.M. A potent and selective inhibitor of group IIa secretory phospholipase A₂ protects rats from TNBS-induced colitis. **International Immunopharmacol.**, v. 5, p.883-892, 2005.

WU, K.C.; MAHIDA, Y.R.; PRIDDLE, J.D.; JEWELL, D.P. Effect of human intestinal macrophages on immunoglobulin production by human intestinal mononuclear cells isolated from patients with inflammatory bowel disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.79, p.35-40, 1990.

YAMADA, T.; MARSHALL, S.; SPECIAN, R.D.; GRISHAN, M.B. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v.102, p.1524-1534, 1992.

YAVUZ, Y.; YÜKSEL, M.; YEGEN, B.Ç.; ALICAN, I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in rat. **Res. Exp. Med.**, v.199, p.101-110, 1999.

ZALTMAN, C. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? **Cad. Saúde Pública**, v.23, p.992-993, 2007.

ZHENG, C.Q.; HU, G.Z.; ZENG, Z.S.; LIN, L.J.; GU, G.G. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. **World J. Gastroenterol.**, v.9, n.8, p.1646-1656, 2003.