

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**SANDIELLY REBECA BENITEZ DA FONSECA**

**AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DA  
*Campsiandra laurifolia* NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA  
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR**

**Porto Alegre  
2021**

SANDIELLY REBECA BENITEZ DA FONSECA

**AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DA  
*Campsiandra laurifolia* NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA  
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Possa Marroni

Porto Alegre  
2021

#### CIP - Catalogação na Publicação

Fonseca, Sandielly Rebeca Benitez  
AÇÃO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO  
AQUOSO DA Campsiandra laurifolia NA COLITE ULCERATIVA  
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR / Sandielly  
Rebeca Benitez Fonseca. -- 2021.  
66 f.  
Orientadora: Norma Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2021.

1. colite ulcerativa. 2. estresse oxidativo. 3.  
antioxidante. 4. anti-inflamatório. 5. Campsiandra  
laurifolia. I. Marroni, Norma Possa, orient. II.  
Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me permitir chegar até aqui, por ter proporcionado-me tantas conquistas e também conviver com pessoas tão queridas e amáveis. Obrigada, Senhor, por ter me sustentado até aqui e ser a minha fortaleza nos momentos de dificuldade.

Agradeço aos meus pais, Sebastião e Estela, pelo apoio e compreensão durante estes anos, por me darem todo o suporte necessário, por terem enchido-me de amor, carinho, abraços e sempre orarem por mim. Amo muito vocês e saibam que são o que eu tenho de mais precioso nessa vida. Sem a ajuda de vocês eu não estaria onde estou. E posso dizer com orgulho que tenho o melhor pai e a melhor mãe do mundo.

Agradeço ao meu amor, Misael, por estar ao meu lado em todos os momentos, por compreender-me em todas as vezes que estive ocupada e necessitei ausentar-me, por incentivar-me a conquistar meus sonhos, por sempre me oferecer palavras de coragem e proporcionar-me momentos de alegria em tempos difíceis.

Meu agradecimento a todos os meus familiares e amigos que, de perto ou de longe, sempre me cobriram com suas orações e com tanto afeto, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Agradeço especialmente aos meus avós que sempre demonstram seu amor e carinho por mim. Eu amo vocês sem medida e sou grata ao Senhor por tê-los em minha vida.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Norma Marroni, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos e por permitir-me alcançar mais esta conquista com a sua ajuda e sabedoria. Minha gratidão a todos os doutores, mestres e futuros mestres que fazem parte do Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação do HCPA. Vocês foram essenciais durante essa caminhada. Sempre foram muito solícitos e atenciosos; tornaram-se verdadeiros amigos.

A trajetória até aqui não foi fácil. Houve muitas dificuldades, dias de apreensão e incertezas diante de uma pandemia que afetou a todos nós, mas com a ajuda de Deus e de cada um que já foi citado anteriormente pude alcançar meu objetivo e concluir mais uma etapa da minha vida com uma grande vitória.

## RESUMO

**Base teórica:** As doenças inflamatórias intestinais crônicas são alterações recorrentes que possuem etiologia desconhecida e as duas principais formas são a retocolite ulcerativa indeterminada (RCUI) e a Doença de Crohn. A RCUI afeta somente a mucosa e a submucosa do reto e do cólon. Apresenta como características principais a presença de úlceras superficiais, infiltrado inflamatório e edema. A demasiada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) causa o estresse oxidativo e este mecanismo está diretamente envolvido no processo inflamatório da RCUI. Estudos demonstraram que o extrato aquoso da *Campsiandra laurifolia*, popularmente conhecida como acapurana, tem elevado teor de compostos fenólicos e taninos totais, bem como alto potencial antioxidante, por este motivo o extrato é um possível agente terapêutico na RCUI, visto que essas substâncias conseguem reduzir a produção de ERO. **Objetivo:** Analisar os efeitos da *C. laurifolia* sobre o modelo experimental de colite ulcerativa induzida através do ácido acético. **Métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do HCPA (2019-0196) e nele foram utilizados 24 ratos Wistar machos, com 60 dias e peso médio de 350 gramas. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (CO), controle + acapurana (CO+A), colite (CL) e colite + acapurana (CL+A). A indução da colite foi feita através de enema com 4 ml de ácido acético a 4%. O extrato da *C. laurifolia* foi administrado na dose de 25mg/kg via gavagem por dois dias nos grupos CO+A e CL+A e os animais dos grupos CO e CL receberam NaCl 0,9% pela mesma via. No 4º dia de experimento foi aferida a pressão anal esfinteriana (PAE). Logo após, os animais foram mortos e o tecido intestinal foi coletado para análise histológica, avaliação da lipoperoxidação (LPO), análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e dos níveis de glutatona (GSH), e análise imunohistoquímica do fator nuclear kappa B (NF-κB) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A análise estatística foi ANOVA seguido do teste Student Newman Keuls (média±EP) significativo quando  $p < 0,05$ . **Resultados:** A histologia do grupo CL+A demonstrou regeneração das criptas, redução do infiltrado inflamatório e dos danos na mucosa intestinal em relação ao grupo CL, onde se observou destruição das criptas, úlceras na mucosa, edema e infiltrado inflamatório na submucosa. Através da utilização de uma escala de danos histológicos, observou-se redução significativa dos danos no grupo CL+A em relação ao grupo CL. A administração do extrato aquoso da *C. laurifolia* a animais do grupo CL+A também foi capaz de aumentar significativamente a PAE quando comparada aos animais do grupo CL. Na avaliação da LPO por TBARS, observou-se redução significativa no grupo CL+A em relação ao grupo CL. A atividade da SOD reduziu significativamente no grupo CL+A em comparação ao grupo CL. Os níveis de GSH aumentaram significativamente nos animais do grupo CL+A em relação aos animais do grupo CL. Na análise imunohistoquímica, observou-se redução significativa da expressão do NF-κB e da iNOS no grupo CL+A em relação ao grupo CL. Através de uma análise de correlação simples entre a PAE e a expressão da iNOS, verificou-se uma correlação negativa entre essas duas variáveis; portanto, quanto mais alta a expressão da iNOS, menor é a PAE. No grupo CO+A não se observou diferença significativa em nenhuma das análises realizadas quando comparado ao grupo CO. **Conclusão:** Os dados obtidos sugerem que a administração do extrato da *C. laurifolia* reduziu a lesão tecidual, elevou a pressão anal esfinteriana, diminuiu a lipoperoxidação, restaurou a atividade da enzima SOD e os níveis de GSH, e reduziu a expressão dos mediadores inflamatórios iNOS e NFκB. **Palavras-chave:** colite ulcerativa; ácido acético; estresse oxidativo; inflamação; antioxidante; anti-inflamatório; *Campsiandra laurifolia*.

## ABSTRACT

**Background:** Chronic inflammatory bowel diseases are recurrent changes that have an unknown etiology and the two main forms are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease. UC affects the mucosa and submucosa of the rectum and colon, presenting as main characteristics the presence of superficial ulcers, inflammatory infiltrate and edema. Excessive production of reactive oxygen species (ROS) causes oxidative stress and this mechanism is directly involved in the inflammatory process in UC. Studies have shown that the aqueous extract of *Campsiandra laurifolia*, popularly known as acapurana, has a high content of phenolic compounds and total tannins, as well as high antioxidant potential, so this extract is a possible therapeutic agent in UC, as these substances can reduce the ROS production. **Objective:** Analyse the effects of *C. laurifolia* in the experimental model of ulcerative colitis induced by acetic acid. **Methods:** The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the HCPA (2019-0196) and 24 male Wistar rats aged 60 days and 350 grams average weight. The animals were divided into 4 groups: control (CO), control + acapurana (CO+A), colitis (CL) and colitis + acapurana (CL+A). Colitis induction was done by enema with 4 ml of 4% acetic acid. Acapuran extract was administered at a dose of 25 mg/kg by gavage for two days in groups CO+A and CL+A and animals from groups CO and CL received 0.9% NaCl. On the 4th day of the experiment, sphincter anal pressure (SAP) was measured, soon after the animals were killed and the intestinal tissue was collected for histological analysis, evaluation of lipoperoxidation (LPO), analysis of superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and glutathione (GSH) levels, and immunohistochemical analysis of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Statistical analysis was ANOVA followed by Student Newman Keuls test (mean $\pm$ SE) significant when  $p < 0.05$ . **Results:** The histology of the CL+A group showed regeneration of the crypts, reduction of the inflammatory infiltrate and damage to the intestinal mucosa compared to the CL group, where destruction of the crypts, mucosal ulcers, edema and inflammatory infiltrate in the submucosa were observed. Through the use of a histological damage scale, a significant reduction of damage was observed in the CL+A group compared to the CL group. The administration of the aqueous extract of acapuran to animals in the CL+A group was also able to significantly increase the SAP when compared to the animals in the CL group. In the assessment of LPO by TBARS, a significant reduction was observed in the CL+A group compared to the CL group. SOD activity significantly reduced in the CL+A group compared to the CL group. GSH levels increased significantly in animals in group CL+A compared to animals in group CL. The immunohistochemical analysis showed a significant reduction in the expression of NF- $\kappa$ B and iNOS in the CL+A group compared to the CL group. Through a simple correlation analysis between PAE and iNOS expression, a negative correlation was verified between these two variables, so the higher the iNOS expression, the lower the PAE. In the CO+A group there was no significant difference in any of the analyzes performed when compared to the CO group. **Conclusion:** The data obtained suggest that the administration of acapuran extract reduced tissue damage, increased anal sphincter pressure, decreased lipoperoxidation, restored SOD enzyme activity and GSH levels, and reduced the expression of inflammatory mediators iNOS and NF- $\kappa$ B.

**Key Words:** ulcerative colitis; acetic acid; oxidative stress; inflammation; antioxidant; anti-inflammatory; *Campsiandra laurifolia*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	13
<b>Figura 2:</b> Ativação do NF- $\kappa$ B e resposta inflamatória .....	20
<b>Figura 3:</b> Processo de formação das espécies reativas de oxigênio .....	21
<b>Figura 4:</b> <i>Campsiandra laurifolia</i> .....	29
<b>Figura 5:</b> Marco conceitual do estudo.....	32
<b>Figura 6:</b> Efeito da <i>C. laurifolia</i> na colite ulcerativa.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
$^1\text{O}_2$	Oxigênio <i>singlet</i>
AA	Ácido acético
CAT	Catalase
CL	Colite
CO	Controle
CUI	Colite ulcerativa indeterminada
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Dextran sulfato de sódio
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GRd	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e eosina
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
kg	Quilograma
LPO	Lipoperoxidação
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzimas óxido nítrico sintases

O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion radical superóxido
ONOO-	Peróxinitrito
PAE	Pressão anal esfinteriana
RCUI	Retocolite ulcerativa indeterminada
RL	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
α	Alfa
β	Beta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Retocolite ulcerativa indeterminada</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 Modelos experimentais de colite ulcerativa .....	16
<b>2.3 Mediadores inflamatórios na RCU</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres</b> .....	<b>20</b>
2.4.1 Estresse oxidativo .....	20
2.4.2 Colite e estresse oxidativo .....	23
<b>2.5 Estresse nitrosativo</b> .....	<b>24</b>
2.5.1 Óxido nítrico .....	24
2.5.2 Colite e óxido nítrico .....	25
<b>2.6 Antioxidantes</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7 <i>Campsiandra laurifolia</i></b> .....	<b>28</b>
<b>3 MARCO CONCEITUAL</b> .....	<b>32</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 Objetivo geral .....	34
5.2 Objetivos específicos .....	34
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>
<b>7 ARTIGO</b> .....	<b>41</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>61</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>63</b>
<b>10 ANEXOS</b> .....	<b>64</b>
10.1 Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	64
10.2 Checklist Arrive versão E-10 .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação intestinal crônica e fazem parte deste grupo de doenças a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa indeterminada (RCUI), que se diferenciam a partir de algumas características e requerem tratamento medicamentoso contínuo, sendo que em alguns casos necessitam de intervenção cirúrgica. A RCUI atinge somente a mucosa e a submucosa do reto e do cólon (KIM *et al.*, 2021; SINOPOULOU *et al.*, 2021).

A etiologia da RCUI ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que os fatores genéticos, ambientais, dietéticos e mediadores inflamatórios como citocinas, eicosanoides e espécies reativas de oxigênio estejam envolvidos na origem e progressão desta doença (ORDÁS *et al.*, 2012; DOGAN *et al.*, 2014).

Os sintomas clássicos da RCUI são cólicas abdominais intensas, disenteria e perda de peso, sendo que no período agudo da doença podem ocorrer abscessos nas criptas e ulcerações, e na fase crônica pode haver rompimento das criptas para o interior da lâmina própria e da submucosa, causando expansão do processo inflamatório (MISIEWICZ, POUNDER, VENABLES, 1994; AWAAD, EL-MELIGY, SOLIMAN, 2012; SOUFLI *et al.*, 2016).

O envolvimento de vários mediadores inflamatórios na RCUI já é alvo de estudos há muito tempo e sabe-se que o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) têm importante relação no processo inflamatório desta doença, sendo que estes mediadores são estimulados quando ocorre aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (PAVLICK *et al.*, 2002; COBURN *et al.*, 2012; GORETSKY *et al.*, 2012; ORDÁS *et al.*, 2012).

Muitos modelos experimentais de colite ulcerativa indeterminada são usados para investigar as causas da RCUI e os mecanismos relacionados ao seu desenvolvimento, bem como para buscar novas estratégias terapêuticas e tratamentos. Os modelos mais utilizados são de indução química através dos agentes 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), dextran sulfato de sódio (DSS) e o ácido acético (AA) (KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2014; MANZO *et al.*, 2015; SOLIMAN *et al.*, 2019).

Devido ao envolvimento das ERO e ERN na RCUI, a utilização de antioxidantes no tratamento desta doença pode causar efeitos benéficos ao auxiliar

o sistema antioxidante endógeno, visto que uma regulação dos níveis de ERO e ERN também influenciam diretamente nos mediadores inflamatórios envolvidos na RCUI. Muitos antioxidantes têm sido aplicados experimentalmente no tratamento da colite ulcerativa em ratos. Dentre eles podemos citar o extrato de *Zingiber officinale* Roscoe, o extrato da *Boswellia serrata*, a glutamina e o extrato da *Eucommia ulmoides* e tais substâncias apresentaram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, amenizando as lesões teciduais, melhorando a atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica e os níveis de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , interferon gama (INF- $\gamma$ ), cicloxigenase-2 (COX-2) e NF- $\kappa$ B, assim como reduziram a expressão da enzima iNOS, produtora do óxido nítrico que é classificado como uma ERN (EL-ABHAR, HAMMAD, GAWAD, 2008; KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2014; MURAKAMI *et al.*, 2018).

Afim de combater os radicais livres e os danos gerados por eles, o organismo tem o sistema de defesa antioxidante composto por enzimas e antioxidantes não enzimáticos, sendo que alguns antioxidantes não enzimáticos são endógenos e outros exógenos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos exógenos temos as vitaminas C, E e K, minerais e compostos fenólicos como flavonóides, taninos, antocianinas e estilbenos (CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Flavonóides são compostos fenólicos capazes de realizar a quelatação de metais, atuar como *scavengers* de radicais livres (RL) e neutralizantes do oxigênio *singlet*, já os taninos atuam na inflamação através da formação de uma camada protetora no tecido danificado, o que auxilia o epitélio a regenerar-se. Os taninos também agem como sequestradores de RL e inibidores da lipoperoxidação (HARRIS, 1992; SIMÕES *et al.*, 2010; JOO *et al.*, 2015; LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

A *Campsiandra laurifolia* é uma leguminosa da família Fabaceae conhecida popularmente como acapurana. É utilizada na medicina popular para tratar infecções uterinas, artrite, reumatismo, resfriados, impigem, malária, úlceras e doenças hepáticas. Também já foram atribuídas a esta planta propriedades anti-inflamatória, analgésica e antifúngica (VAN DEN BERG, SILVA, 1988; VÁSQUEZ, 1992; BELÉM, MENEZES, 2003; FERREIRA *et al.*, 2015; CHAGAS *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2014).

Um estudo recente verificou que o extrato aquoso da *C. laurifolia* possui um alto potencial antioxidante devido ao elevado teor de compostos fenólicos identificado neste extrato incluindo saponinas, taninos e flavonóides. Este mesmo

estudo investigou a atividade antioxidante do extrato aquoso da *C. laurifolia* na dose de 50 mg/kg sobre um modelo experimental de colite ulcerativa e observou redução dos danos na mucosa do intestino, redução da lipoperoxidação e reestabelecimento da atividade da enzima antioxidante SOD e dos níveis da glutathione (SOUZA *et al.*, 2021).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar a potencial ação antioxidante e anti-inflamatória do extrato da *C. laurifolia* na dose de 25 mg/kg no modelo de colite ulcerativa induzida experimentalmente por ácido acético em ratos Wistar.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura para o desenvolvimento deste estudo é focada nos aspectos relacionados à retocolite ulcerativa, modelos experimentais de colite ulcerativa, estresse oxidativo e possíveis tratamentos utilizando antioxidantes. As bases de dados utilizadas na estratégia de busca foram PubMed e SciELO. Foram utilizados termos-chave e suas combinações (figura 1). Para complementar a pesquisa, também foram utilizados resumos, dissertações e teses de universidades nacionais e internacionais.

PubMed	Palavras-chave	SciELO
52861	1. Ulcerative colitis	394
191043	2. Acetic acid	893
803367	3. Inflammation	3817
264314	4. Oxidative Stress	2251
137473	5. Flavonoids	1187
2	6. <i>Campsiandra laurifolia</i>	2
$1+2 = 434$ $1+3 = 9553$ $1+4 = 635$ $1+5 = 238$ $1+6 = 0$ $1+2+3 = 201$ $1+2+3+4 = 61$ $1+2+3+4+5 = 4$ $1+2+3+4+5+6 = 0$		$1+2 = 10$ $1+3 = 33$ $1+4 = 4$ $1+5 = 0$ $1+6 = 1$ $1+2+3 = 1$ $1+2+3+4 = 1$ $1+2+3+4+5 = 0$ $1+2+3+4+5+6 = 0$

**Figura 1:** Estratégia de busca de referências bibliográficas

**Fonte:** autora.

## 2.2 Retocolite ulcerativa indeterminada

A retocolite ulcerativa indeterminada (RCUI) e a doença de Crohn (DC) fazem parte do grupo das doenças inflamatórias intestinais (DII). São caracterizadas por inflamação crônica e requerem tratamento medicamentoso por toda a vida e, em alguns casos, intervenção cirúrgica. A RCUI e a DC diferem-se em algumas características: enquanto a DC pode afetar todo o trato gastrointestinal, a RCUI limita-se ao reto e cólon (KIM *et al.*, 2021; SINOPOULOU *et al.*, 2021).

A RCUI é uma doença que apresenta inflamação crônica na mucosa e submucosa do reto e do cólon, o que gera lesão no epitélio intestinal. A RCUI pode ser mais limitada ao reto distal ou mais extensa quando se estende continuamente por todo o cólon. As principais características clínicas da doença são sangramento retal, dor abdominal, diarreia, urgência de evacuação e tenesmo. Plasmocitose, depleção de mucina e de células caliciformes, distorção, ramificação e atrofia das criptas e abscessos nas criptas são as características histológicas mais observadas no intestino de pacientes com RCUI (PAVLICK *et al.*, 2002; ORDÁS *et al.*, 2012; CONRAD, ROGGENBUCK, LAASS, 2014; BASTAKI *et al.*, 2018).

Segundo dados epidemiológicos, a prevalência da RCUI varia de 90 a 505 casos por 100.000 habitantes no norte da Europa e na América do Norte e é 10 vezes menos comum nos asiáticos, africanos e orientais. Foi evidenciado aumento na incidência e na prevalência nos grupos étnicos em que a doença era menos comum, o que sugere a influência do estilo de vida e do ambiente no desenvolvimento da RCUI. A doença ocorre tanto em homens quanto em mulheres, sendo que há um primeiro pico de início da doença entre os 15 e 30 anos de idade e outro pico menor de ocorrência entre os 50 e 70 anos de vida. O diagnóstico, tanto da RCUI quanto da DC, geralmente é tardio, mas cerca de 20% a 30% dos pacientes apresentam os primeiros sintomas antes dos 18 anos de idade (ORDÁS *et al.*, 2012; CONRAD, ROGGENBUCK, LAASS, 2014).

Uma meta-análise de estudos de coorte populacional que avaliou o risco de câncer colorretal em pacientes com RCUI foi conduzida por Jess, Rungoe e Peyrin-Biroulet (2012) e revelou que indivíduos com RCUI possuem 2,4 vezes mais risco de desenvolver câncer colorretal durante os primeiros 14 anos de acompanhamento do que a população geral. Este dado foi relacionado com pacientes do sexo masculino,

diagnóstico em idade precoce e a retocolite na forma extensa (JESS, RUNGOE, PEYRIN-BIROULET, 2012).

Os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes são diarreia com presença de sangue e muco, cólicas abdominais intensas e perda de peso, sendo que os sinais clínicos podem ser classificados em leves, moderados ou graves de acordo com a frequência de evacuações diárias, presença de distúrbios sistêmicos (febre, taquicardia e anemia) e aumento da velocidade de hemossedimentação. No período agudo da doença podem ocorrer abscessos nas criptas e ulcerações. Já na fase crônica há rompimento das criptas para o interior da lâmina própria e da submucosa, expandindo a inflamação por todo tecido (MISIEWICZ, POUNDER, VENABLES, 1994; AWAAD, EL-MELIGY, SOLIMAN, 2012; SOUFLI *et al.*, 2016).

Acredita-se que diversos mecanismos estão implicados na etiologia da RCUI. Dentre eles podemos citar os fatores genéticos, ambientais, dietéticos e mediadores inflamatórios (citocinas, eicosanoides e espécies reativas de oxigênio). Estudos propõem que 5,7-15,5% dos pacientes com RCUI possuem um parente de primeiro grau com a mesma enfermidade. Outro exemplo a ser citado é a taxa de três a cinco vezes maior de RCUI em judeus Ashkenazi. Tais fatos reforçam a existência de envolvimento de fatores genéticos no desenvolvimento da doença (MISIEWICZ, POUNDER e VENABLES, 1994; FIOCCHI, 1998; ORDÁS *et al.*, 2012; DOGAN *et al.*, 2014).

Os mediadores inflamatórios estão presentes na fase de iniciação e de progressão da doença, mas ainda não está bem elucidada a forma como se desenvolvem os processos inflamatórios na RCUI. O que se sabe é que a disfunção celular e as bactérias da microbiota intestinal, associadas com a resposta imunológica do paciente, parecem estar envolvidas no desenvolvimento da doença (MISIEWICZ, POUNDER, VENABLES, 1994; FIOCCHI, 1998; ORDÁS *et al.*, 2012; DOGAN *et al.*, 2014).

Na RCUI há destruição celular que causa danos à barreira epitelial e esses danos levam ao aumento da permeabilidade, o que causa maior captação de antígenos luminais. Ainda não está claro se essa alteração precede a RCUI ou se ela é causada pela inflamação crônica presente na doença. O que se sabe é que esse transtorno pode ser desencadeado pela elevação na síntese de ERO e de ERN que, por sua vez, comprometem a barreira da mucosa intestinal e estimulam mediadores inflamatórios como o fator nuclear kappa B (NF-κB), citocinas pró-

inflamatórias como as interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), contribuindo para o processo inflamatório na doença. Já foi constatado em alguns estudos que a principal causa da inflamação na RCUI é uma resposta exagerada das células T na mucosa às bactérias comensais de hospedeiros que possuem uma predisposição genética (PAVLICK *et al.*, 2002; COBURN *et al.*, 2012; GORETSKY *et al.*, 2012; ORDÁS *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Modelos experimentais de colite ulcerativa

Diversos modelos experimentais de colite ulcerativa foram desenvolvidos nas últimas décadas visando auxiliar na descoberta da etiologia precisa da DII, que inclui a DC e a colite ulcerativa indeterminada (CUI). Os modelos experimentais de CUI utilizados atualmente já contribuíram de forma consistente para muitos avanços na compreensão dos aspectos envolvidos na inflamação presente na doença, bem como nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da CUI (PAVLICK *et al.*, 2002; MIZOGUCHI, 2012).

A utilização de modelos experimentais de CUI também visa investigar novas estratégias terapêuticas, uma vez que os tratamentos mais comuns utilizados atualmente geram muitos efeitos colaterais indesejáveis. Os modelos são classificados em quimicamente induzidos, mutagênicos, de transferência de células e geneticamente modificados, conforme suas características em agudos ou crônicos e pela via de indução, oral ou retal (PAVLICK *et al.*, 2002; MIZOGUCHI, 2012).

Os modelos animais de colite são uma importante forma de estudo da fisiopatologia da doença que possibilita a caracterização do mecanismo imunológico e inflamatório presentes no surgimento e na perpetuação da doença. Modelos de colite induzidos com agentes químicos são muito úteis, pois reproduzem diversas características observadas na RCUI nos humanos e caracterizam-se pelo aumento na liberação de citocinas (FILLMANN *et al.*, 2007; KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2012; MIZOGUCHI, 2012; HARTMANN *et al.*, 2014; COLARES *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2016).

Para a indução da colite ulcerativa alguns modelos utilizam um cateter para instilar um agente químico no cólon do animal (camundongos, ratos e coelhos). As características geradas pelos modelos induzidos quimicamente incluem perda de peso, diarreia, sangramento retal, encurtamento do intestino, presença de ulceração

e necrose na mucosa. Os agentes químicos indutores mais utilizados são o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), o dextran sulfato de sódio (DSS) e o ácido acético (AA) (KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2014; MANZO *et al.*, 2015; SOLIMAN *et al.*, 2019).

O modelo de colite induzida por DSS tem sido amplamente utilizado para investigar os mecanismos da doença e novos métodos terapêuticos por ser um modelo que economiza tempo e por ser de baixo custo. As características histológicas observadas nesse modelo são: a perda grave de células caliciformes, danos na arquitetura das criptas, infiltração de células inflamatórias, dano na mucosa do cólon, aumento da permeabilidade, reação imunológica contra antígenos luminiais e úlceras na mucosa (MIZOGUCHI, 2012; YU *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2019).

A colite induzida por TNBS gera muitas características presentes na RCUI que ocorre em humanos. Neste modelo observa-se microscopicamente inflamação na mucosa e submucosa, influxo de neutrófilos e macrófagos na mucosa do cólon, produção aumentada de mediadores inflamatórios e de ERO. Já em uma análise macroscópica observam-se ulcerações e erosões na mucosa, aderência a tecidos próximos, aumento da espessura da parede intestinal e hiperemia. O modelo de colite por TNBS pode ser adaptado de acordo com os objetivos do estudo, podendo ser um modelo crônico ou agudo de acordo com a dose de TNBS instilada e a duração do experimento. Para diluição do TNBS utiliza-se etanol 50% para que ocorra a quebra da barreira da mucosa intestinal, o que gera um grave processo inflamatório, transmural e granulomatoso no cólon, sendo que a ulceração causada pode durar por até oito semanas (KRETZMANN *et al.*, 2008; LEE, HYUN, KIM, 2010; MIZOGUCHI, 2012; WEISS *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2018).

A colite induzida experimentalmente pela instilação de AA através de enema é um modelo de indução simples e de fácil reprodução que possibilita a observação de muitas características similares às que estão presentes na RCUI em humanos das quais podemos citar os aspectos histológicos, metabólicos e o infiltrado inflamatório por macrófagos e neutrófilos na mucosa do cólon, além de elevada produção de mediadores inflamatórios e de ERO. Os primeiros modelos de colite induzida por AA eram realizados utilizando 0,5 ml de AA 10-50%, mas com o passar dos anos foram sendo feitas algumas modificações que resultaram nos modelos que são utilizados

atualmente em que se instila AA 4% ou 5% no cólon dos animais (JURJUS, KHOURY, REIMUND, 2002; FILLMANN *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2012; COLARES *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2016).

A indução realizada com AA é capaz de gerar danos severos como necrose, edema grave na submucosa intestinal, infiltrado de células inflamatórias, hemorragia, hiperemia, ulcerações, depleção das células caliciformes, vasculite e destruição nas criptas. Este modelo apresenta características agudas da doença e por isso possibilita a investigação de fatores envolvidos na inflamação, bem como verificar a eficácia de novas terapias nesta fase da doença (FILLMANN *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2012; COLARES *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2016; BASTAKI *et al.*, 2018).

### **2.3 Mediadores inflamatórios na RCUI**

O fator de necrose tumoral (TNF) é um dos principais mediadores inflamatórios apontados no desenvolvimento do processo inflamatório que ocorre na RCUI. Ele pode ser produzido por neutrófilos, macrófagos e células do epitélio intestinal, principalmente logo no início do processo inflamatório. Os principais indutores da produção de TNF são os microrganismos (PALLIO *et al.*, 2016).

Os dois tipos de TNF são TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  que exercem atividade pró-inflamatória após a ligação com os receptores de TNF (TNFR) presentes em todos os tipos de células, com exceção das hemácias. Quando ocorre a ligação do TNF no receptor várias vias de sinalização são ativadas, dentre elas a ativação do NF- $\kappa$ B, caspases e proteínas quinases. Com essa sinalização, inicia-se a resposta inflamatória e imune incluindo a ativação de macrófagos, células T e células B, liberação de interleucinas pró-inflamatórias, produção de quimiocinas, expressão de moléculas de adesão, indução de apoptose e outros efeitos (GERRIETS *et al.*, 2021).

As interleucinas são citocinas muito importantes na sinalização imunológica, pois enviam sinais para diversos tipos de leucócitos. As interleucinas são moléculas que possuem a capacidade de acionar ou inativar funções de células e que, além de realizar a comunicação entre células imunológicas, também atuam sobre células

endoteliais dos capilares sanguíneos, células hepáticas, células epiteliais, células tronco e neurônios (DELVES *et al.*, 2018).

Atualmente, em torno de 37 interleucinas já foram descritas, sendo algumas pró-inflamatórias e outras anti-inflamatórias. A interleucina-1 (IL-1) apresenta-se de duas formas, alfa (IL-1 $\alpha$ ) e beta (IL-1 $\beta$ ), e ela atua principalmente no início da resposta imune com funções como a coestimulação da ativação de linfócitos T através do aumento na geração de citocinas, estímulo da migração de leucócitos, intensificação da maturação de linfócitos B, indução da febre e da expressão de proteínas de fase aguda, dentre outras funções (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2017; DELVES *et al.*, 2018).

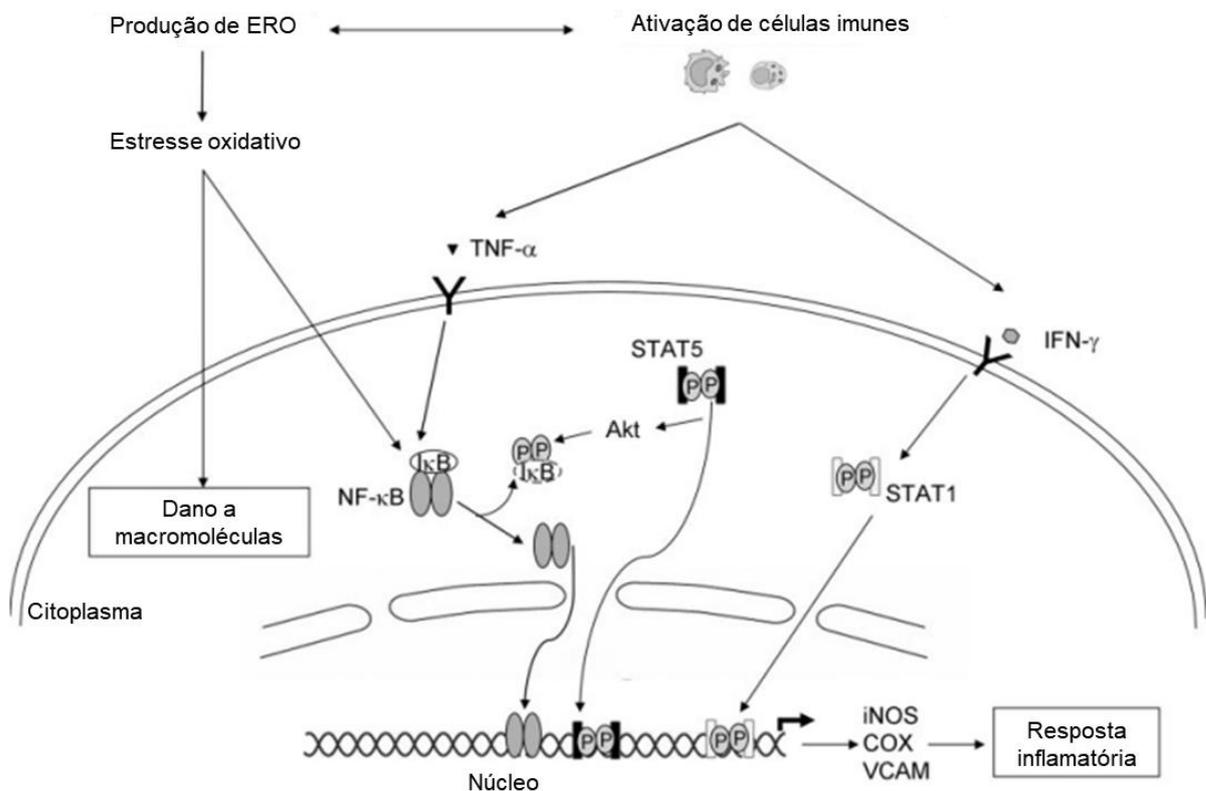
Como dito anteriormente, a IL-1 atua no aumento da geração de citocinas e dentre essas está a IL-6. A IL-6 é uma molécula pró-inflamatória que pode ser produzida por muitas células como as células T, monócitos e células dendríticas. Dentre as funções da IL-6 estão: induzir a expressão de proteínas de fase aguda, intensificar a diferenciação de células T e seu envolvimento em outros mecanismos associados ao processo inflamatório em geral. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória gerada principalmente por linfócitos T e B, monócitos e macrófagos, sendo esta capaz de inibir a secreção de IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e outras citocinas, assim como inibir a proliferação de células T (SOUFLI *et al.*, 2016; DELVES *et al.*, 2018).

Estudos que analisaram parâmetros inflamatórios revelaram que os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias apresentavam-se elevados em animais com colite experimental. Dentre as citocinas investigadas estavam IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (LEE *et al.*, 2010; TAHAN *et al.*, 2011; COBURN *et al.*, 2012; DENG *et al.*, 2016). Em um estudo que analisou a expressão de citocinas em animais com colite induzida por ácido acético foi observado que a expressão relativa de IL-10 estava reduzida nos animais doentes (MOTAWEA *et al.*, 2020).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que desempenha função essencial no processo inflamatório. Em situações de homeostase, ele permanece inativo no citoplasma associado à proteína inibidora I $\kappa$ B (figura 2). Espécies reativas de oxigênio, endotoxinas, citocinas e outras vias de sinalização estimulam a ativação do NF- $\kappa$ B e então é realizada a fosforilação do I $\kappa$ B. Livre de seu inibidor, o NF- $\kappa$ B transloca-se para o núcleo celular. As cinco subunidades do NF- $\kappa$ B são p50, p52, p65, c-Rel e RelB, sendo que a subunidade p65 desempenha função crucial na

expressão de genes envolvidos no processo inflamatório e é considerado um regulador chave do processo inflamatório das DII (MOHAMED, SUDDEK, EL-KASHEF, 2021).

No estudo de Kretzmann *et al.* (2008) foi observado aumento na expressão da COX-2, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, assim como elevação nos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  em animais com colite induzida por TNBS (KRETZMANN *et al.*, 2008).



**Figura 2:** Ativação do NF- $\kappa$ B e resposta inflamatória

**Fonte:** adaptada (KRETZMANN *et al.*, 2008).

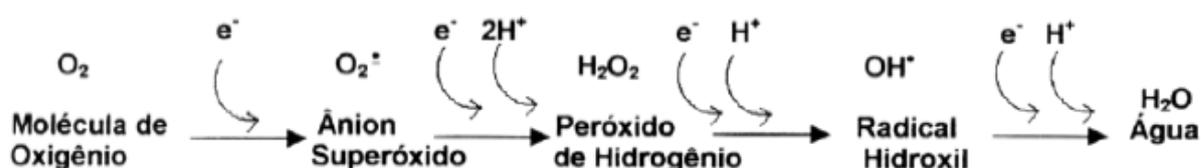
## 2.4 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres

### 2.4.1 Estresse oxidativo

As ERO são produzidas durante reações enzimáticas como as envolvidas na cadeia respiratória, na síntese de prostaglandinas, na fagocitose e no sistema do citocromo P450, e em reações não enzimáticas, sendo que o principal local de geração de ERO são as mitocôndrias. Para manter a homeostase, os organismos

aeróbios possuem um sistema de defesa antioxidante que visa manter as ERO em baixas concentrações nas células. As ERO são essenciais em diversos processos bioquímicos, servindo como mensageiras durante o ciclo celular, estimulando a diferenciação, a progressão, interrupção do crescimento e apoptose. Elas também atuam na defesa contra microrganismos e na regulação imunológica (MATÉS, PÉREZ-GÓMES, CASTRO, 1999; PIZZINO *et al.*, 2017).

A formação das ERO dá-se por meio de reduções sucessivas de um elétron do oxigênio molecular ( $O_2$ ) gerando o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), sendo que o ânion radical superóxido e o radical hidroxila são denominados radicais livres (RL). Este processo pode ser observado na figura 3 (WOJTASZEK, 1997; DRÖGE, 2002; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).



**Figura 3:** Processo de formação das espécies reativas de oxigênio

**Fonte:** adaptada (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007)

A exposição a fatores ambientais como a radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, poluentes e metais pesados, a ingestão de xenobióticos, e outros fatores auxiliam no aumento da produção de ERO, o que causa um desequilíbrio entre a produção e a capacidade das células de eliminar ERO. Esse quadro é denominado de estresse oxidativo (EO) (VALKO *et al.*, 2007; PIZZINO *et al.*, 2017).

Em 2007, Halliwell e Gutteridge descreveram os RL como qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados e que seja capaz de existir de maneira independente. Os RL são formados em vários processos como na ativação de células do sistema imune, inflamação, isquemia, estresse mental e físico, infecção, câncer e envelhecimento (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres têm importante papel fisiológico na fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, síntese de estruturas celulares, defesa contra patógenos e regulação de cascatas de sinalização em diversos tipos de células; porém, quando produzidos excessivamente, causam o EO, que é um processo

nocivo capaz de atingir várias estruturas das células como a membrana fosfolipídica, proteínas, lipoproteínas, lipídios e o material genético (PIZZINO *et al.*, 2017).

O ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é gerado pelas enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase e pelas peroxidases através do acréscimo de um elétron à molécula de  $O_2$ . O  $O_2^{\cdot-}$  participa de várias reações que formam outras ERO como na formação de  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ , peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) e ácido hipocloroso (PIZZINO *et al.*, 2017). O  $H_2O_2$  é formado nos peroxissomas por enzimas a partir da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  e sua eliminação é realizada principalmente pelas enzimas catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx). Embora o  $H_2O_2$  não seja um radical livre, ele é capaz de reagir com o  $Fe^{2+}$  e essa reação irá gerar  $Fe^{3+}$ , radical hidroxila e íon hidroxila. Tal reação é denominada como reação de Fenton. Quando o  $H_2O_2$  reage com o ânion superóxido ocorre a reação de Haber-Weiss, formando  $O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  e  $OH^-$  (DRÖGE, 2002; VALKO *et al.*, 2007; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

O radical hidroxila é altamente reativo e possui um período de meia vida *in vivo* muito curto, por isso é considerado o RL mais perigoso. Ele também é o maior gerador de toxicidade intracelular por ser capaz de reagir com qualquer macromolécula como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Não há uma enzima que seja capaz de eliminar o  $^{\cdot}OH$ ; portanto, o seu acúmulo acaba causando morte celular. Foi comprovado que há outra forma de geração de  $^{\cdot}OH$ . Esta ocorre através de íons férricos sem haver a necessidade de outro agente redox e ela é considerada uma adaptação da reação de Fenton. Nessa reação um elétron do íon hidroxila é transferido para o  $Fe^{3+}$ , formando  $Fe^{2+}$  e o radical hidroxila (VALKO *et al.*, 2007; PATLEVIČ *et al.*, 2016; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

A lipoperoxidação (LPO) é uma das consequências geradas pelo excesso de radicais livres, mas também ocorre fisiologicamente para manutenção das membranas celulares. Quando a LPO ocorre de forma descontrolada, pode causar disfunção celular e danos teciduais generalizados por ser uma reação em cadeia que se propaga rapidamente, sendo capaz de afetar uma quantidade elevada de moléculas lipídicas. A LPO inicia com a remoção de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado por um RL, o que resulta na formação de um radical lipídico ( $L^{\cdot}$ ) e este se estabiliza através de rearranjo molecular, tendo como produto dienos conjugados que farão a propagação da reação ao reagirem com o  $O_2$ , formando o radical peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ) e este reage com outro lipídeo, formando um

peróxido lipídico (LOOH) (BUEGE, AUST, 1978; PIZZINO *et al.*, 2017; RAMANA, SRIVASTAVA, SINGHAL, 2017).

Na finalização da reação o peróxido lipídico pode decompor-se por uma reação catalisada por ferro ou cobre gerando malondialdeído, etano e pentano. A degradação também pode ocorrer pela reação com outro radical que resultará na formação de  $^1O_2$ . O malondialdeído e os compostos de dieno conjugados que são gerados durante a LPO são citotóxicos e também mutagênicos (BUEGE, AUST, 1978; PIZZINO *et al.*, 2017; RAMANA, SRIVASTAVA, SINGHAL, 2017).

#### 2.4.2 Colite e estresse oxidativo

Um desbalanço entre as substâncias pró-oxidantes e as antioxidantes leva ao estresse oxidativo e este está relacionado com a resposta inflamatória presente na colite ulcerativa. Sabe-se atualmente que o EO está envolvido na propagação, na exacerbação, assim como na patogênese das DII, gerando destruição celular/tecidual, quebra da barreira epitelial do cólon e alterações na microbiota intestinal. As principais enzimas produtoras de ERO no trato gastrointestinal são a xantina oxidase, a amina oxidase, a aldeído oxidase e a NADPH oxidase, sendo que o  $\cdot OH$  é apontado como um dos mediadores de toxicidade mais fortes (PATLEVIČ *et al.*, 2016).

O aumento da permeabilidade intestinal tem sido apontado como um importante mediador da inflamação na CUI, isso porque ele causa um maior influxo de granulócitos à membrana intestinal. Sabe-se que neutrófilos ativados são grandes produtores de ERO na mucosa do intestino e, portanto, são indutores de EO (HANAI *et al.*, 2004; NAITO, TAKAGI, YOSHIKAWA, 2007).

Hanai *et al.* (2004) comprovaram que pacientes com colite ulcerativa apresentam níveis significativamente elevados de neutrófilos circulantes em comparação com indivíduos saudáveis. Neutrófilos e macrófagos ativados são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteases, assim como importantes produtores de ERO; portanto, níveis elevados dessas células em pacientes com colite ulcerativa estão diretamente relacionados com o processo inflamatório observado na doença e com EO, que gera consequências como a lipoperoxidação (HANAI *et al.*, 2004).

Estudos já demonstraram que na retocolite ulcerativa há uma produção excessiva de ERO e que isso causa uma elevação na lipoperoxidação, deixando as células do epitélio intestinal danificadas e suscetíveis à morte celular, comprometendo todo o epitélio e suas funções (TÜZÜN *et al.*, 2002). Muitos estudos já comprovaram que animais com colite ulcerativa induzida experimentalmente com ácido acético apresentam um aumento significativo de lipoperoxidação no intestino quando comparados a animais controles (FILLMANN *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2012; COLARES *et al.*, 2016).

Macrófagos ativados também estão presentes na mucosa intestinal e são produtores de interleucinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e também óxido nítrico (NO) através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A produção excessiva de NO gera uma série de danos teciduais durante a inflamação e na colite ulcerativa o NO está envolvido na redução da pressão anal esfinteriana (LIAUDET, 2000; FILLMANN *et al.*, 2007; PATLEVIČ *et al.*, 2016).

## **2.5 Estresse nitrosativo**

### 2.5.1 Óxido nítrico

O NO é produzido por diversas células do organismo e em diversos tecidos pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) que convertem a L-arginina em L-citrulina. São conhecidas três formas de NOS. As duas formas constitutivas são NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) que são fundamentais no funcionamento do organismo. A terceira forma está mais envolvida em processos patológicos que é a NOS induzível (iNOS). Sintetizada por macrófagos, apresenta alto rendimento na produção de NO e está relacionada a processos inflamatórios, danos teciduais e apoptose (FILLMANN *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

O NO desempenha diversas funções fisiológicas como a regulação da pressão arterial, transmissão de impulsos nervosos, relaxamento de músculo liso, integridade dos vasos sanguíneos, manutenção tecidual e participação em respostas imunes (FILLMANN *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007; BENHAR, 2018).

As ERN são derivadas da reação entre o NO e o oxigênio ou compostos derivados do oxigênio. Uma ERN importante é o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é formado a partir da reação do óxido nítrico com o  $\text{O}_2^-$ . O  $\text{ONOO}^-$  é um oxidante forte capaz de reagir com lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). A nitração de proteínas e lipídeos é uma forma importante do peróxinitrito causar danos e a interação dele com proteínas geralmente modifica as proteínas de forma irreversível, o que pode levar à morte celular. O peroxinitrito é capaz de causar a nitração de tirosina, que gera a nitrotirosina, e a detecção desta geralmente é utilizada como marcador de estresse nitrosativo (BENHAR, 2018).

A superprodução de ERN pode gerar o estresse nitrosativo, que é quando a capacidade de um sistema antioxidante é ultrapassada e não consegue suprir a necessidade de neutralizar ou eliminar as ERN (BOVERIS, CHANCE, 1973; KURUTAS, 2016; BENHAR, 2018).

### 2.5.2 Colite e óxido nítrico

O óxido nítrico exerce a função de relaxamento da musculatura lisa como citado anteriormente, e sabe-se que o esfíncter anal é composto por músculo liso; portanto, a produção aumentada de NO pode afetar diretamente a pressão anal esfíncteriana. Estudos comprovaram que na colite experimental induzida por ácido acético há um aumento da expressão da enzima iNOS, que conseqüentemente gerou um aumento nos níveis de NO. Estes mesmos estudos detectaram que a pressão anal esfíncteriana estava reduzida em animais com colite. Este fato foi relacionado à ação inibitória do NO sobre a musculatura lisa, causando o relaxamento do esfíncter anal (FILLMANN *et al.*, 2007; KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2014).

Estudos também já comprovaram o papel de mediador inflamatório do óxido nítrico em doenças inflamatórias, incluindo as doenças inflamatórias intestinais. Dentre os seus papéis na inflamação podemos citar o aumento na regulação de leucócitos e moléculas de adesão no endotélio, causando agravamento da inflamação. Pela atuação do óxido nítrico como vasodilatador ele também gera características clássicas da inflamação como a hiperemia e a hipertermia (SHARMA, AL-OMRAN, PARVATHY, 2007; POLUHA, GROSSMANN, 2018).

## 2.6 Antioxidantes

As células e os organismos necessitam de mecanismos para defender-se das ERO, e para isso possuem o sistema de defesa antioxidante que é composto por enzimas antioxidantes e substâncias antioxidantes não-enzimáticas. Os antioxidantes podem atuar em diferentes níveis de defesa, seja na prevenção seja na interceptação das substâncias oxidantes, assim como no reparo dos danos causados por elas. A função dos antioxidantes no organismo é manter baixos níveis de ERO no interior das células no intuito de evitar o estresse oxidativo (SIES, 1993).

Para que uma substância seja classificada como um antioxidante ela deve ser capaz de retardar, prevenir ou eliminar o dano oxidativo já causado a uma molécula (HALLIWELL, 2007). Três enzimas são citadas como as principais componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático. Elas fazem parte da defesa primária contra oxidantes, são elas: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx). A primeira forma de defender o organismo contra danos oxidativos é através do controle dos níveis intracelulares do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. Em seguida vem a segunda linha de defesa que visa interromper a propagação de reações em cadeia como a peroxidação lipídica e, por último, temos a terceira linha de defesa que tem por objetivo reparar os danos oxidativos quando já tiverem sido causados à uma molécula (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; VALKO *et al.*, 2007; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

A SOD é considerada como o antioxidante mais potente das células e ela é responsável por realizar a conversão de duas moléculas de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e em oxigênio molecular. A atividade da SOD é dependente de um cofator metálico e por isso existem três formas dessa enzima que são classificadas de acordo com o íon metálico ligado a ela. As três formas de SOD são: Fe-SOD, contém ferro e é normalmente encontrada em procariotos e plantas; Mn-SOD, contém manganês e está presente em procariotos e na matriz mitocondrial de eucariotos; Cu/Zn-SOD, encontrada predominantemente em eucariotos e nestes se encontram no citoplasma - também é encontrada em cloroplastos e nos peroxissomos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

A enzima CAT é um antioxidante que está presente em muitos tecidos vivos que fazem uso do oxigênio. É encontrada principalmente nos peroxissomos e é

altamente específica, pois exerce atividade apenas sobre o peróxido de hidrogênio e sobre os hidroperóxidos de etila e metila. Através da utilização de ferro ou manganês como co-fator, a enzima CAT realiza degradação ou redução de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água (H<sub>2</sub>O) e uma molécula de O<sub>2</sub> (HARRIS, 1992; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

A enzima GPx tem como função realizar a decomposição do peróxido de hidrogênio e também de peróxidos lipídicos. Muitas vezes esta enzima necessita de selênio como cofator para poder exercer sua atividade e ela atua principalmente na mitocôndria, mas também no citoplasma. A GPx utiliza a glutathione (GSH) para doar elétrons e assim poder realizar a redução do peróxido de hidrogênio. Utilizando duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), a enzima glutathione reductase (GRd) realiza a regeneração da glutathione (VALKO *et al.*, 2007; IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

Como citado anteriormente, além dos antioxidantes enzimáticos, também existem os não enzimáticos e estes podem ser classificados em endógenos e exógenos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos endógenos podemos citar a glutathione (GSH), a vitamina A, o ácido úrico e a coenzima Q10. Embora o sistema antioxidante endógeno seja muito eficiente, ele não é suficiente para demanda exigida pelo organismo do ser humano e por essa razão são necessários os antioxidantes exógenos que estão presentes na dieta. Os principais antioxidantes exógenos são as vitaminas C, E e K, minerais como o zinco e o selênio, carotenóides e compostos fenólicos como flavonóides, taninos, antocianinas e estilbenos (CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Os flavonoides são substâncias capazes de quelar metais e atuam como *scavengers* de RL e neutralizantes do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Já os taninos atuam no processo inflamatório formando uma camada protetora na pele ou mucosa danificada, auxiliando na regeneração do epitélio. Taninos também atuam como sequestradores de RL e inibidores da lipoperoxidação (HARRIS, 1992; SIMÕES *et al.*, 2010; JOO *et al.*, 2015; LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm utilizado antioxidantes como tratamento em modelos experimentais de colite ulcerativa induzida quimicamente, seja pela administração de ácido acético, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico seja por dextran sulfato de sódio. Estes estudos demonstraram que a administração de substâncias antioxidante reduziu os danos teciduais e oxidativos, assim como o infiltrado inflamatório. No

estudo conduzido por El-Abhar, Hammad e Gawad (2008), comprovou-se que o extrato de *Zingiber officinale* Roscoe quando administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg em ratos com colite ulcerativa induzida por AA ameniza a extensão e a gravidade das lesões teciduais, aumenta a atividade das enzimas SOD e CAT, assim como os níveis de GSH, e reduz a ação da enzima mieloperoxidase e os níveis de TNF- $\alpha$  e prostaglandina E<sub>2</sub> no cólon, apresentando, portanto, efeito antioxidante e anti-inflamatório (EL-ABHAR, HAMMAD, GAWAD, 2008).

O estudo desenvolvido por Hartmann *et al.* (2014) demonstrou que o uso do extrato de *Boswellia serrata* na dose de 34,2 mg por kg de peso corporal como tratamento da colite induzida por AA reduziu a peroxidação lipídica, diminuiu os níveis de óxido nítrico e da enzima iNOS, melhorou a lesão tecidual e aumentou a pressão anal esfinteriana. Kretzmann *et al.* (2008), ao administrarem 25 mg/kg de glutamina a ratos com colite induzida por TNBS, comprovaram o efeito antioxidante desta substância obtendo como resultado a redução significativa dos danos teciduais, aumento da pressão anal esfinteriana, redução da lipoperoxidação, da atividade da enzima mieloperoxidase e das concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , diminuição da expressão das subunidades p50 e p65 do NF- $\kappa$ B, assim como redução da expressão de iNOS, COX-2 e VCAM-1. Murakami *et al.* (2018) constataram que a administração do extrato das folhas de *Eucommia ulmoides* (3% e 9%) reduziu os danos no epitélio do cólon e a inflamação em animais com colite ulcerativa induzida por DSS (KRETZMANN *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2014; MURAKAMI *et al.*, 2018).

Diante destes dados, propomo-nos a avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato aquoso da *C. laurifolia* em ratos com colite induzida por ácido acético, levando em consideração o alto potencial antioxidante deste extrato, assim como a sua composição química rica em flavonoides, taninos e saponinas.

## **2.7 *Campsiandra laurifolia***

Diversos produtos naturais são usados na medicina popular com o intuito de tratar doenças e aliviar dores, sendo que a população chinesa é um grande exemplo por utilizar chás como tratamento e que desenvolve muitos estudos procurando entender o mecanismo de ação e isolar princípios ativos de espécies vegetais (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

Tem sido cada vez maior a procura por fitoterápicos afim de substituir os fármacos sintéticos, que por muitas vezes causam diversos efeitos colaterais indesejáveis. Um exemplo é a popularização da *Curcuma longa* como fitoterápico que vem demonstrando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas, causando também alívio da dor. Diversos estudos têm investigado a utilização da cúrcuma em doenças inflamatórias como artrite reumatoide, osteoartrite, psoríase, periodontite crônica, estomatite aftosa recorrente e colite ulcerativa (RAZAVI, RAHBARDAR, HOSSEINZADEH, 2021).

Encontrada em matas de igapó e florestas ombrófilas, a *C. laurifolia* (figura 4) é uma espécie arbórea da família Fabaceae que pode ser encontrada em diversos países latino-americanos como Venezuela, Colômbia, Guiana, Peru e no Brasil, sendo que no Brasil pode ser achada nos estados do Pará, Amapá, Amazonas e Roraima (ULIBARRI, 2008; COTA, 2020).



**Figura 4:** *Campsiandra laurifolia*  
**Fonte:** CARDOSO (2012).

Alguns estudos etnofarmacológicos citam a *C. laurifolia*. Um deles é o estudo de Van Den Berg e Silva (1988), que relatou sua utilização no tratamento de infecções uterinas por meio de uma infusão produzida com as suas cascas. No estudo de Vásquez (1992) executado na Amazônia peruana, nativos relataram o uso da *C. laurifolia* para tratar a artrite, o reumatismo e resfriados. Quando

Belém e Menezes (2003) realizaram um estudo em uma comunidade quilombola descobriram que as folhas, as cascas e as sementes da *C. laurifolia* são utilizadas para produzir infusões que são utilizadas para tratar impigem, malária e úlceras. No estudo de Ferreira *et al.* (2015) realizado no Amazonas e no Acre, habitantes de comunidades ribeirinhas relataram usar a infusão das cascas da *C. laurifolia* no tratamento de doenças hepáticas (VAN DEN BERG, SILVA, 1988; VÁSQUEZ, 1992; BELÉM, MENEZES, 2003; FERREIRA *et al.*, 2015).

Chagas *et al.* (2010) evidenciaram que o extrato hidroalcolólico da casca e os extratos aquosos das folhas e das sementes da *C. laurifolia* apresentaram baixa atividade contra amastigostas e promastigotas da *Leishmania amazonensis* e na produção do óxido nítrico por macrófagos ativadas. Já o extrato aquoso das sementes foi capaz de impedir o crescimento de esplenócitos de camundongos BALB/c em 87%, podendo ser esta a explicação para o uso terapêutico contra a leishmaniose cutânea pela população quilombola com o extrato exercendo ação anti-inflamatória sobre as feridas, reduzindo os danos gerados pelo sistema imunológico e auxiliando na cicatrização (CHAGAS *et al.*, 2010).

Rodrigues *et al.* (2014) evidenciaram que extratos obtidos a partir dos ramos, das frutas e das vagens da *C. laurifolia* exercem potencial antifúngico sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Os resultados apresentados foram obtidos através da técnica de microdiluição em caldo (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Recentemente Souza *et al.* (2021) comprovaram que o extrato aquoso das cascas de *C. laurifolia* possui um elevado teor de compostos fenólicos (670,64 ± 7,94 mg/g EAG/g), sendo este devido ao alto teor de taninos totais (476,78 ± 23,44 mg/g EAG) e a um pequeno teor de flavonóides totais (1,16 ± 0,03 mg/g EQ/g). O mesmo trabalho verificou que o extrato de *C. laurifolia* possui alto potencial antioxidante (IC<sub>50</sub> = 16,51 ± 0,65 µg/mL), comprovando ser maior do que o da quercetina isolada utilizada como padrão, sendo que este alto potencial antioxidante do extrato da *C. laurifolia* pode ser devido ao alto teor de compostos fenólicos e taninos encontrados no extrato. O estudo de Souza *et al.* (2021) também se propôs a avaliar a ação antioxidante do extrato aquoso da *C. laurifolia* na dose de 50 mg/kg no modelo de colite induzida por ácido acético em ratos e comprovaram que o extrato

foi capaz de reduzir a lipoperoxidação, reestabelecer a atividade de uma enzima antioxidante e níveis de um antioxidante não enzimático, assim como a redução dos danos intestinais (SOUZA *et al.*, 2021).

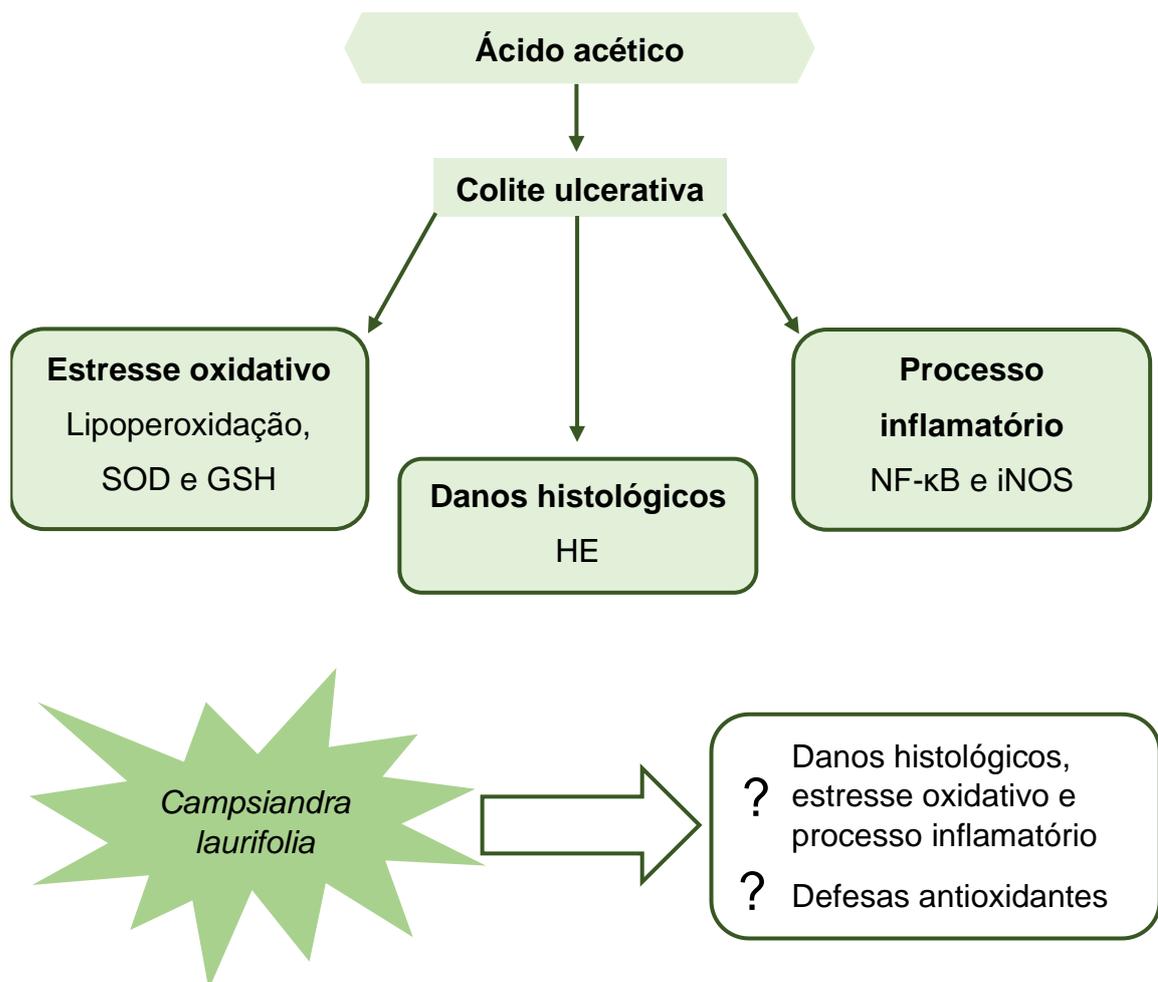
Diante dos resultados obtidos no estudo desenvolvido por Souza *et al.* (2021) que utilizou a dose de 50 mg/kg do extrato aquoso da *C. laurifolia*, propomo-nos a avaliar se a dose de 25 mg/kg também seria capaz de reduzir os danos oxidativos e, além disso, exercer ação anti-inflamatória na colite ulcerativa. Em nossa pesquisa a redução da dose foi motivada pela comprovação de que o extrato aquoso da *C. laurifolia* possui efeito antioxidante superior ao da quercetina, que no trabalho de Hartmann *et al.* 2019 foi utilizada na dose de 50 mg/kg para tratar ratos com colite ulcerativa (HARTMANN *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2021).

### 3 MARCO CONCEITUAL

Diversos estudos observaram o envolvimento do estresse oxidativo e de mediadores inflamatórios na fisiopatologia da retocolite ulcerativa e esses fatores são capazes de ativar outros mecanismos que levam ao processo inflamatório observado na retocolite ulcerativa.

O uso de modelos experimentais para a investigação de novos tratamentos para a RCUI está bem consolidado na literatura, sendo que a indução da doença através do ácido acético reproduz muito bem as características observadas na doença em seres humanos e por isso esse modelo tem sido amplamente utilizado.

O elevado potencial antioxidante do extrato aquoso das cascas da *C. laurifolia* caracteriza-o como um possível agente terapêutico nas doenças relacionadas ao estresse oxidativo.



**Figura 5:** Marco conceitual do estudo  
**Fonte:** autora

#### **4 JUSTIFICATIVA**

A RCUI é uma DII de etiologia não totalmente conhecida que acomete pessoas jovens e está em aumento de prevalência mundial. Caracteriza-se por processo inflamatório crônico recorrente, com comprometimento intestinal, repercussões sistêmicas e elevada morbimortalidade.

As possibilidades terapêuticas atuais para a RCUI são medicamentosas, de eficiência variável, com muitos efeitos adversos, elevado custo e sem evidência de cura. O uso de extratos naturais, com acentuada ação antioxidante, anti-inflamatória e de restauração tecidual pode ser uma nova via terapêutica que, aperfeiçoada no futuro, beneficie estes pacientes.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso da *C. laurifolia* sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório no intestino de animais com colite induzida por ácido acético.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analisar as alterações histológicas no intestino pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e classificá-las de acordo com uma escala de danos;
- Avaliar as alterações na pressão anal esfinteriana nos animais com colite induzida por ácido acético e tratados com *C. laurifolia*;
- Avaliar a lipoperoxidação (TBARS) no intestino de animais submetidos à colite experimental e a ação da *C. laurifolia*;
- Aferir a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutatona (GSH) no intestino;
- Avaliar a expressão da iNOS e do NF-kB pela técnica de imunohistoquímica no intestino.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2017.

AWAAD, Amani S.; EL-MELIGY, Reham M.; SOLIMAN, Gamal A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi chemical society**, v. 17, n. 1, p. 101-124, 2013.

BASTAKI, Salim M. A. *et al.* Menthol inhibits oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rat colonic mucosa. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 12, p. 4210, 2018.

BELÉM, H. R. F.; MENEZES, C. C. S. **As terapias tradicionais dos quilombolas de Arancuã**. 2003. Monografia (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário do Pará: Belém, 2003.

BENHAR, Moran. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 127, p. 160-164, 2018.

BOVERIS, Alberto; CHANCE, Britton. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARDOSO, André. *Campsiandra laurifolia* Benth. In: FLICKR. [S. l.], 2012. Disponível em: [https://www.flickr.com/photos/andre\\_cardoso/8220302553](https://www.flickr.com/photos/andre_cardoso/8220302553). Acesso em: 18 dez. 2019.

CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CHAGAS, Anadeiva Portela *et al.* Potencial anti-leishmaniasis e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth (Fabaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 117-124, 2010.

COBURN, Lori A. *et al.* L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33546, 2012.

COLARES, Josieli Raskopf *et al.* Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid. **Journal of Coloproctology**, v. 36, n. 2, p. 97-103, 2016.

CONRAD, Karsten; ROGGENBUCK, Dirk; LAAS, Martin W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 2014, p. 463-466, 2014.

COTA, M. M. T. *Campsiandra*. In: **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82740>. Acesso em: 30 set. 2021

DELVES, P. J. *et al.* **Roitt, fundamentos de imunologia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

DENG, Quan-Jun *et al.* Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation reduces intestinal injury in rats with ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 14, p. 3769-3776, 2016.

DOGAN, Z. *et al.* The antioxidant effect of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* in rat colitis model induced by acetic acid. **Bratislava Medical Journal**, v. 115, n. 7, p. 411-415, 2014.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

EL-ABHAR, Hanan S.; HAMMAD, Lamiaa N. A; GAWAD, Hala S. A. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 367-372, 2008.

FERREIRA, Almecina B. *et al.* Plants used to treat malaria in the regions of Rio Branco-Acre state and southern Amazonas state – Brazil. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 2, n. 9, p. 1-5, 2015.

FILLMANN, Henrique *et al.* Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and downregulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**, v. 236, n. 3, p. 217-226, 2007.

FIOCCHI Claudio. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 182-205, 1998.

GERRIETS, Valerie *et al.* **Tumor Necrosis Factor Inhibitors**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482425/>. Acesso em: 30 out. 2021.

GORETSKY, Tatiana *et al.* p53mediates TNF-induced epithelial cell apoptosis in IBD. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 4, p. 1306-1315, 2012.

HALLIWELL, Barry. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HANAI, Hiroyuki *et al.* Relationship Between Fecal Calprotectin, Intestinal Inflammation, and Peripheral Blood Neutrophils in Patients with Active Ulcerative Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 9, p. 1438-1443, 2004.

HARRIS, Edward D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, v. 6, n. 9, p. 2675-2683, 1992.

HARTMANN, Renata Minuzzo *et al.* *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 9, p. 1392-1408, 2014.

HARTMANN, Renata Minuzzo *et al.* Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, n. 8, p. 2038-2044, 2012.

HARTMANN, Renata Minuzzo *et al.* Efeito da quercetina no modelo de colite experimental em ratos. *In*: 39ª Semana Científica do HCPA. **Clinical & Biomedical Research**, v. 39, p. 216, 2019.

IGHODARO, Osasenaga M.; AKINLOYE, Oluseyi A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JESS, Tine; RUNGOE, Christine; PEYRIN-BIROULET, Laurent. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 10, n. 6, p. 639-645, 2012.

JOO, Minjae *et al.* Anti-inflammatory effects of flavonoids on TNBS-induced colitis of rats. **The Korean Journal Physiology & Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 43-50, 2015.

KIM, Seong K. *et al.* The Clinical Features of Inflammatory Bowel Disease in Patients with Obesity. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2021, n. 1, p. 1-9, 2021.

KRETZMANN, Nelson A. *et al.* Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1504-1513, 2008.

KURUTAS, Ergul Belge. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2016.

JURJUS, Abdo R.; KHOURY, Naim N.; REIMUND, Jean-Marie. Animal models of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 50, n. 2, p. 81-93, 2004.

- LEE, In-Ah; HYUN, Yang-Jin.; KIM, Dong-Hyun. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- $\kappa$ B activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 648, ed. 1-3, p. 162-170, 2010.
- LEYVA-LÓPEZ, Nayely *et al.* Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 921, 2016.
- LIAUDET, Lucas; SORIANO, Francisco Garcia; SZABÓ, Csaba. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 4, p. N37-N52, 2000.
- MANZO, Luis Paulo *et al.* Royal Jelly and its dual role in TNBS colitis in mice. **Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-7, 2015.
- MATÉS, José M.; PERÉZ-GÓMEZ, Cristina; CASTRO, Ignacio N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.
- MISIEWICZ, Jerzy Jacek; POUNDER, Roy E.; VENABLES, Christopher Wilfred. **Diseases of the gut and pancreas**. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- MIZOGUCHI, Atsushi. Animal models of inflammatory bowel disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 105, p. 263-320, 2012.
- MOHAMED, Nagwa I.; SUDDEK, Ghada M.; EL-KASHEF, Dalia H. Molsidomine alleviates acetic acid-induced colitis in rats by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. **International Immunopharmacology**, v. 99, 2021.
- MOTAWEA, Muhammed H *et al.* Evaluation of Anti-inflammatory and Antioxidant Profile of Oleuropein in Experimentally Induced Ulcerative Colitis. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 224-233, 2020.
- MOURA, Rosa Maria *et al.* Antioxidant effect of mesalazine in the experimental colitis model induced by acetic acid. **Journal of Coloproctology**, v. 36, n. 3, p. 139-148, 2016.
- MURAKAMI, Satoshi *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* leaf extract on chronic dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 6, p. 864-868, 2018.
- NAITO, Yuji; TAKAGI, Tomohisa; YOSHIKAWA, Toshikazu. Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Ulcerative Colitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 18-26, 2007.
- ORDÁS, Ingrid *et al.* Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606-1619, 2012.
- PALLIO, Giovanni *et al.* Use of a balanced dual cyclooxygenase-1/2 and 5-lypoxygenase Inhibitor in experimental colitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 789, p. 152-162, 2016.

- PATLEVIČ, Peter *et al.* Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. **Integrative Medicine Research**, v. 5, n. 4, p. 250-258, 2016.
- PAVLICK, Kevin P. *et al.* Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 311–322, 2002.
- PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- POLUHA, Rodrigo L.; GROSSMANN, Eduardo. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018.
- RAMANA, Kota V.; SRIVASTAVA, Sanjay; SINGHAL, Sharad S. Lipid peroxidation products in human health and disease 2016. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- RAZAVI, Bibi M.; RAHBARDAR, Mahboobeh G.; HOSSEINZADEH, Hossein. A review of therapeutic potentials of turmeric (*Curcuma longa*) and its active constituent, curcumin, on inflammatory disorders, pain, and their related patents. **Phytotherapy Research**, p. 1-25, 2021.
- RODRIGUES, Katiane *et al.* Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of *Candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 5, n. 6, p. 445-453, 2014.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252-259, 2007.
- SIES, Helmut. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, ed. 6, 2010.
- SINOPOULOU, Vassiliki *et al.* Interventions for the management of abdominal pain in ulcerative colitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7, n. 7, 2021.
- SOLIMAN, Nema Ali *et al.* The possible ameliorative effect of simvastatin versus sulfasalazine on acetic acid induced ulcerative colitis in adult rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 298, p. 57-65, 2019.
- SOUFLI, Imene *et al.* Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 353-360, 2016.

SOUZA, Lucas Petitemberte de *et al.* Antioxidant Evaluation of the Aqueous Extract of Hulls of *Campsiandra laurifolia* in Colitis Induced by Acetic Acid in Wistar Rats. **Journal of Coloproctology**, v. 41, n. 2, p. 138-144, 2021.

TAHAN, Gulgun *et al.* Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Canadian Journal of Surgery**, v. 54, n. 5, p. 333-338, 2011.

TÜZÜN, Ahmet *et al.* Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 569-572, 2002.

ULIBARRI, Emilio A. Los géneros de Caesalpinioideae (Leguminosae) presentes en Sudamérica. **Darwiniana**, v. 46, p. 69-163, 2008.

VALKO, Marian *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DEN BERG, Maria Elisabeth; SILVA, Milton Hélio Lima. Contribuição ao Conhecimento da Flora Medicinal de Roraima. **Acta Amazônica**, v. 18, p. 23-35, 1988.

VÁSQUEZ, Rodolfo. Sistemática de las plantas medicinales de uso frecuente en el área de Iquitos. **Folia Amazonica**, v. 4, n. 1, p. 65-80, 1992.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEISS, Carolyn R. *et al.* The potential protective role of caveolin-1 in intestinal inflammation in TNBS-induced murine colitis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

WOJTASZEK, Przemyslaw. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 3, p. 681-692, 1997.

YU, Wangui *et al.* Effects of the Sijunzi decoction on the immunological function in rats with dextran sulfate-induced ulcerative colitis. **Biomedical Reports**, v. 5, n. 1, p. 83-86, 2016.

ZHAO, Gang *et al.* A macromolecular Janus Kinase (JAK) inhibitor prodrug effectively ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 4, p. 64, 2019.

ZHOU, Jiangtao *et al.* Brusatol ameliorates 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats: Involvement of NF- $\kappa$ B pathway and NLRP3 inflammasome. **International Immunopharmacology**, v. 64, p. 264-274, 2018.

## 7 ARTIGO

### ***Campsiandra laurifolia* reduces oxidative stress and inflammation in rats with ulcerative colitis**

### **A *Campsiandra laurifolia* reduz o estresse oxidativo e a inflamação em ratos com colite ulcerativa**

Sandielly Rebeca Benitez da Fonseca<sup>a,c,\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2662-5116>

Lucas Petitemberte de Souza<sup>b</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2308-4334>

Renata Minuzzo Hartmann<sup>c</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-8667-517X>

Josieli Raskopf Colares<sup>c</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-0482-204X>

Marilda da Silva Brasil<sup>c,d</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8420-3045>

Edna Sayuri Suyenaga<sup>e</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1528-6008>

Norma Anair Possa Marroni<sup>a,c,d</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-7856-7953>

<sup>a</sup> Post-graduation Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Post-graduation Program in Biotechnology, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Experimental Laboratory of Pulmonary Sciences and Inflammation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Post-graduation Program in Biological Sciences - Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>e</sup> Health School, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil.

\* Sandielly Rebeca Benitez da Fonseca.

Postal Address: Ramiro Barcelos, 2400 – Santa Cecília, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90035-002; sandielly.benitez@gmail.com.

Support Sources: CAPES; CNPq; FIPE-HCPA.

Este artigo sera enviado para publicação na revista “Journal of Coloproctogy”

Versão impressa ISSN: 2237-9363. Versão on-line ISSN: 2317-6423.

## RESUMO

A colite ulcerativa (CU) afeta a mucosa e submucosa do intestino grosso. Um dos mecanismos envolvidos na sua etiologia é o estresse oxidativo, diretamente envolvido no processo inflamatório característico da CU. O fator nuclear kappa B (NFkB) é ativado por espécies reativas de oxigênio (ERO), estimulando a transcrição de genes ligados à resposta inflamatória e aumentando a expressão de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e iNOS. A colite experimental induzida por ácido acético (AA) é um modelo simples que reproduz diversas características da CU que ocorre em humanos. A *Campsiandra laurifolia*, popularmente conhecida como Acapurana, é uma leguminosa da família Fabaceae e seu extrato aquoso possui alto teor de compostos fenólicos e elevado potencial antioxidante. Para o modelo de CU foram utilizados 24 ratos Wistar machos divididos em quatro grupos: controle (CO), controle+Acapurana (CO+A), colite (CL) e colite+Acapurana (CL+A). Neste estudo foi realizada análise histológica, aferida a pressão anal esfinteriana (PAE), e a lipoperoxidação (LPO). Avaliou-se a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e os níveis de glutathiona (GSH), analisou-se a expressão por imuno-histoquímica do NFkB e iNOS. A análise estatística utilizada foi ANOVA one-way seguido do teste Student Newman Keuls, os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância foi de  $p < 0,05$ . Nos animais do grupo CL foi observada destruição das criptas e presença de úlceras na mucosa, edema e infiltrado inflamatório submucoso, danos na mucosa do intestino, redução da PAE, aumento da LPO e da atividade da SOD, redução da GSH, e aumento da expressão do NFkB e da iNOS. A administração da *C. laurifolia* a animais do grupo CL+A demonstrou causar regeneração das criptas e redução do infiltrado inflamatório, redução de danos na mucosa intestinal, aumento da PAE, redução da LPO com restabelecimento da atividade da SOD e dos níveis de GSH. A imuno-histoquímica do NFkB e da iNOS apresentou-se significativamente reduzida. O extrato aquoso da *C. laurifolia* parece exercer um efeito antioxidante e anti-inflamatório em ratos com colite induzida por AA.

**Palavras chave:** colite ulcerativa; antioxidante; anti-inflamatório; *Campsiandra laurifolia*.

## ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) affects the mucosa and submucosa of the large intestine. One of the mechanisms involved in its etiology is oxidative stress (OS), directly involved in the inflammatory process characteristic of UC. The nuclear factor kappa B (NFκB) is activated by reactive oxygen species (ROS), stimulating the transcription of genes linked to the inflammatory response and increasing the expression of inflammatory mediators such as TNF-α and iNOS. The experimental colitis induced by acetic acid (AA) is a simple model that reproduces several features of UC that occur in humans. *Campsiandra laurifolia*, popularly known as Acapurana, is a legume of the Fabaceae family. It is an aqueous extract with a high content of phenolic compounds and high antioxidant potential. For the UC model, 24 male Wistar rats were used, divided into four groups: control (CO), control+Acapurana (CO+A), colitis (CL) and colitis+Acapurana (CL+A). This study performed histological analysis, measuring anal sphincter pressure (ASP) and lipoperoxidation (LPO). The activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) levels were evaluated. The expression of the inflammatory mediators NFκB and iNOS was analyzed by immunohistochemistry. The statistical analysis used was one-way ANOVA followed by Student Newman Keuls test, values were expressed as mean ± standard error, and the significance level was  $p < 0.05$ . In animals in the CL group, were observed destruction of the crypts and the presence of mucosal ulcers, edema, and submucosal inflammatory infiltrate, increased damage to the intestinal mucosa, reduced ASP, increased LPO and SOD activity, reduced GSH levels, and increased expression of NFκB and iNOS. The administration of *C. laurifolia* to animals in the CL+A group has been shown to cause regeneration of crypts and reduction of inflammatory infiltrate, reduction of damage to the intestinal mucosa, increase in ASP, reduction in LPO with the restoration of SOD activity and GSH levels. The immunohistochemistry of NFκB and iNOS was significantly reduced. *C. laurifolia* aqueous extract appears to exert an antioxidant and anti-inflammatory effect in rats with AA-induced colitis.

**Keywords:** ulcerative colitis; antioxidant; anti-inflammatory; *Campsiandra laurifolia*.

## INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease that affects the mucosa and submucosa of the large intestine; it could be more limited, affecting only the rectum, or in a more extensive form when it involves the entire colon. Some typical features of the disease are crypt abscesses, inflammatory infiltrate, superficial ulcerations, edema, necrosis, and hemorrhage. Several mechanisms may be involved in the etiology of UC, such as genetic, environmental, dietary factors, inflammatory mediators and OS.<sup>1-6</sup>

The induction of experimental colitis in rats by AA instillation by enema is a reproducible model that allows the observation of many similarities with UC in humans, including histological, metabolic and inflammatory infiltrate by macrophages and neutrophils in the colon mucosa, in addition to increased production of inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS).<sup>5,7-10</sup>

OS is a process established from an imbalance between the amount of oxidizing substances and the antioxidant capacity, and this imbalance can be caused by the high production of ROS or by the reduction of antioxidant defenses.<sup>11,12</sup>

Experimental studies have shown a correlation between nitric oxide (NO) and anal sphincter pressure (ASP) reduction through an inhibitory action on smooth muscles, which causes anal sphincter relaxation. An important source of NO is the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme, which is induced by pro-inflammatory cytokines and which has a fundamental role in the inflammatory process.<sup>7,13,14</sup>

The nuclear factor kappa B (NFκB) is present in the cytoplasm in its inactive form and, when activated, migrates to the nucleus and triggers the transcription of genes involved in the inflammatory response. Studies have shown that NFκB causes an increase in inflammatory mediators such as interleukins, TNF-α, COX-2 and iNOS.<sup>7,13,15</sup>

*Campsiandra laurifolia*, popularly known as Acapurana, is used to treat abscesses, impingement, uterine infections, malaria, ulcers, arthritis, rheumatism, and especially in lesions caused by leishmaniasis, as it reduces its inflammatory reactions.<sup>16-20</sup> Recently, a study showed that the aqueous extract obtained from the leaves of *C. laurifolia* has saponins, tannins and flavonoids, it was also found a high content of phenolic compounds and total tannins, a small content of total flavonoids and a high antioxidant potential, surpassing the potential quercetin antioxidant.<sup>21</sup>

Taking into account the high antioxidant potential of the aqueous extract of *C. laurifolia* already evidenced, as well as the lack of information about its toxicity, we aimed to analyze the antioxidant effect of the 25 mg/kg dose in rats UC, as well as analyze the expression of inflammatory mediators iNOS and NFκB in these animals.

## METHODOLOGY

Colitis induction was performed using an enema containing 4 ml of 4% AA, this model being an adaptation of what was described by YAMADA et al. and TANNAHILL et al. The animals in the control groups received 0.9% saline solution by enema in a volume of 4 mL.<sup>22,23</sup>

Twenty-four male Wistar rats, 60 days old and weighing 350 grams, were used, purchased according to the specifications of the Animal Experimentation Unit from registered suppliers of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The animals were kept on a 12-hour light/dark cycle, a temperature of 22 +/- 2 °C, water and feed were freely given. The animals were randomly divided into 4 experimental groups, each with 6 animals: in the animals in the control (CO) and control + Acapurana (CO+A) groups, an enema with 0.9% saline solution was performed, whereas in the animals in the colitis (CL) and colitis + Acapurana (CL+A) groups were performed to induce colitis with AA. The aqueous extract of *C. laurifolia* hulls was provided by the Phytochemistry Laboratory of the Lutheran University of Brazil (Canoas, RS, Brazil). The extract (25 mg/kg) was administered orally by gavage 24 and 48 hours after the enema in animals in the CO+A and CL+A groups.

On the third day after colitis induction, the animals were anesthetized with isoflurane (4-5% induction and 2-3% maintenance) diluted in 100% O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> flow = 0.5 L/min), and 8 cm were removed from the distal portion of the large intestine, with a tissue's part immersed in 10% formalin for histological and immunohistochemical analyses. The other portion was frozen at -80 °C for further analysis. All procedures performed were approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais of the HCPA under number 2019-0196, and were in accordance with the established by the Comitê de Ética em Pesquisa of the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) of the HCPA and as recommended by the European Animal Research Association (EARA).

## **Histological Analysis**

Histological analysis was performed with the material included in paraffin blocks, 3  $\mu\text{m}$ -thick sections were made with a microtome, and slides were produced that underwent staining techniques with hematoxylin-eosin (HE). The changes observed microscopically were classified according to the following scale: 0 = no damage and mucosal inflammatory infiltrate; 1 = presence of mild damage and little inflammatory infiltrate in the mucosa; 2 = presence of damage and moderate inflammatory infiltrate in two or more areas of the mucosa; 3 = damage and severe inflammatory infiltrate in the mucosa with ulceration and presence of edema and hemorrhage in the submucosa. The slides were analyzed in a BX51 binocular microscope (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) at 100x magnification.

## **Anal Sphincter Pressure**

Anal sphincter pressure was measured before euthanasia, and the animals were anesthetized at the time of the procedure. Three consecutive measurements were taken using an anorectal manometer (Proctosystem-Viotti, São Paulo, SP, Brazil) with a balloon catheter, and the mean between the three values was calculated for the pressure result, which was expressed in cm of  $\text{H}_2\text{O}$ .

## **Intestinal Homogenized**

For tissue homogenate, 5ml of phosphate buffer (1.15% KCl) per gram of tissue and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10  $\mu\text{L}/\text{ml}$  of KCl) were used. A homogenizer (QIAGEN, Hilden, NRW, Germany) was used for one minute to obtain the tissue homogenate, subsequently centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm in a refrigerated centrifuge. The supernatant was removed and stored in a freezer at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  for biochemical analysis.<sup>24</sup>

## **Proteins**

Protein concentration was determined by the Bradford method, using bovine albumin as a standard. The samples were analyzed in a spectrophotometer at 595

nm, and the results were expressed in mg/ml and used to analyze lipoperoxidation, superoxide dismutase activity and glutathione levels.<sup>25</sup>

### **Lipoperoxidation**

Lipoperoxidation was evaluated by analyzing thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A mixture of trichloroacetic acid (TCA) 10% and thiobarbituric acid (TBA) 0.67% was added to the homogenate. The samples were heated to 100°C and aftercooled, and butanol was added to extract the pigment formed from the reaction of TBA with the lipoperoxidation products, and centrifugation was carried at 3000 pm. The supernatant containing the colored product was analyzed in a spectrophotometer at 535 nm. The concentration of TBARS was expressed in nmol per milligram of protein.<sup>26</sup>

### **Superoxide dismutase activity and glutathione levels**

The analysis of the superoxide dismutase activity was made through the enzyme's ability to inhibit the reaction of the superoxide anion radical with adrenaline. The adrenochrome is formed when adrenaline oxidation occurs, which is detected spectrophotometrically at 480 nm. Results were expressed in SOD units per milligram of protein (USOD/mg prot).<sup>27</sup>

A phosphate buffer and dithionitrobenzoic acid (DTNB) solution measured GSH levels in tissue homogenates. The spectrophotometer measured the GSH level at 412 nm in micromol per milligram of protein.

### **Immunohistochemical analysis**

The expression of inflammatory mediators NFκB and iNOS was determined by immunohistochemical analysis. Sections of the material included in paraffin blocks were obtained; these sections were deparaffinized and rehydrated. Afterwards, antigen recovery and blocking of endogenous peroxidase activity were performed. The slides were incubated with monoclonal antibodies to NFκB and iNOS (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA). After washing them with buffer, we

incubated secondary anti-mouse IgG antibodies (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA) on the slides.

The results were evaluated through a microscope equipped with a digital camera to capture images using the QCapture software version 2.9.13. The quantification of NFκB and iNOS expression was performed with the Adobe Photoshop® version CS3 program, which quantifies the expression of positive pixels.

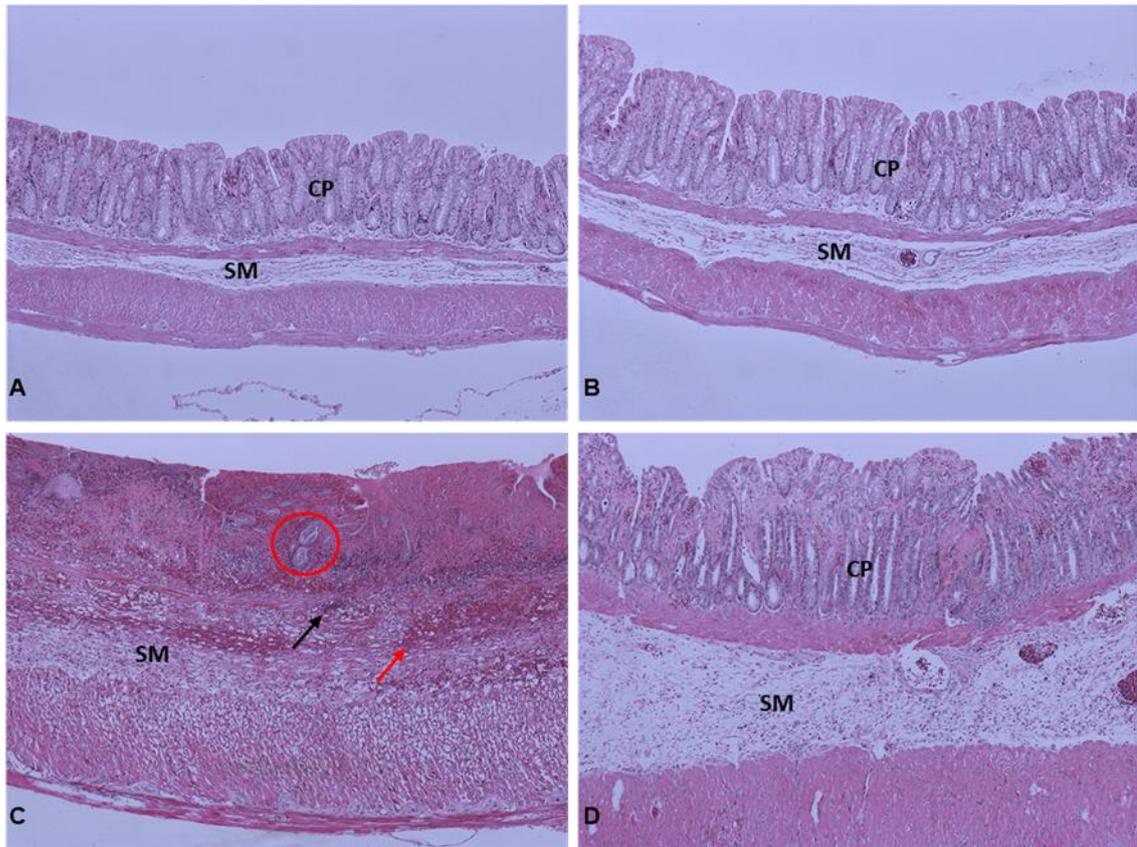
### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed with the GraphPad InStat version 3.0 program. The one-way ANOVA test was used to analyze the results' variance, followed by the Student Newman Keuls test for parametric data. The results are expressed as mean ± standard error, and the adopted significance level was at least 5% ( $p < 0.05$ ).

## **RESULTS**

### **Histological Analysis**

In the histological slides of the animals in the CO and CO+A groups (Figures 1a and 1b), it was possible to observe the typical architecture of the intestine. The animals in the CL group (Figure 1c) showed destruction and abscess in the crypts, inflammatory infiltrate, edema and hemorrhage in the submucosa. In the animals in the CL+A group (Figure 1d), it was possible to visualize crypt regeneration, reduction of inflammatory infiltrate and hemorrhage. The administration of the aqueous extract of *C. laurifolia* significantly ( $p < 0.01$ ) reduced the damage to the intestinal mucosa, as well as the edema and the inflammatory infiltrate in the CL+A group compared to the CL group (Table 1).



**Figure 1:** Histological analysis of the intestine of healthy rats with colitis and treated with *C. laurifolia*.

**Note:** A - control (CO); B - control+Acapurana (CO+A); C - colitis (CL); D - colitis+Acapurana (CL+A). Magnification 100x. Legend: CP – crypts; SM – submucosa; black arrow – inflammatory infiltrate; red arrow – hemorrhage; red circle – abscess in the crypts.

**Source:** The author (2021)

### Anal Sphincter Pressure

In measuring ASP, a significant reduction ( $p < 0.01$ ) was observed in the CL group compared to the CO and CO+A groups. The same parameter, when analyzed in the CL+A group, showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) concerning the CL group, with the reestablishment of the ASP in the animals treated with *C. laurifolia* (Table 1).

Group	Histological Score	ASP (cmH <sub>2</sub> O)	TBARS (nmol/mg prot)	SOD (USOD/mg prot)	GSH (μmol/mg prot)
CO	0±0	30.4±1.3	0.34±0.03	6.18±1.17	0.088±0.005

<b>CO+A</b>	0±0	30.6±2,5	0.30±0.03	5.18±1.41	0.084±0.002
<b>CL</b>	3±0*	13.7±0,7*	0.88±0.12*	12.78±1.63*	0.046±0.005*
<b>CL+A</b>	1.5±0.22#	23.0±0.7#	0,51±0.10#	3.90±1.40#	0.089±0.010#

**Table 1:** Microscopic damage rating values, ASP, TBARS, SOD activity and GSH levels.

**Note:** \* Statistically significant difference between the CL group with the CO and CO+A groups; # Statistically significant difference between CL+A and CL group.

**Source:** The author (2021)

### Lipoperoxidation

The evaluation of lipoperoxidation by TBARS showed a significant increase ( $p<0.01$ ) in the CL group when compared to the CO and CO+A groups, it also revealed a significant reduction ( $p<0.01$ ) in the CL+A group when compared to the group CL (Table 1).

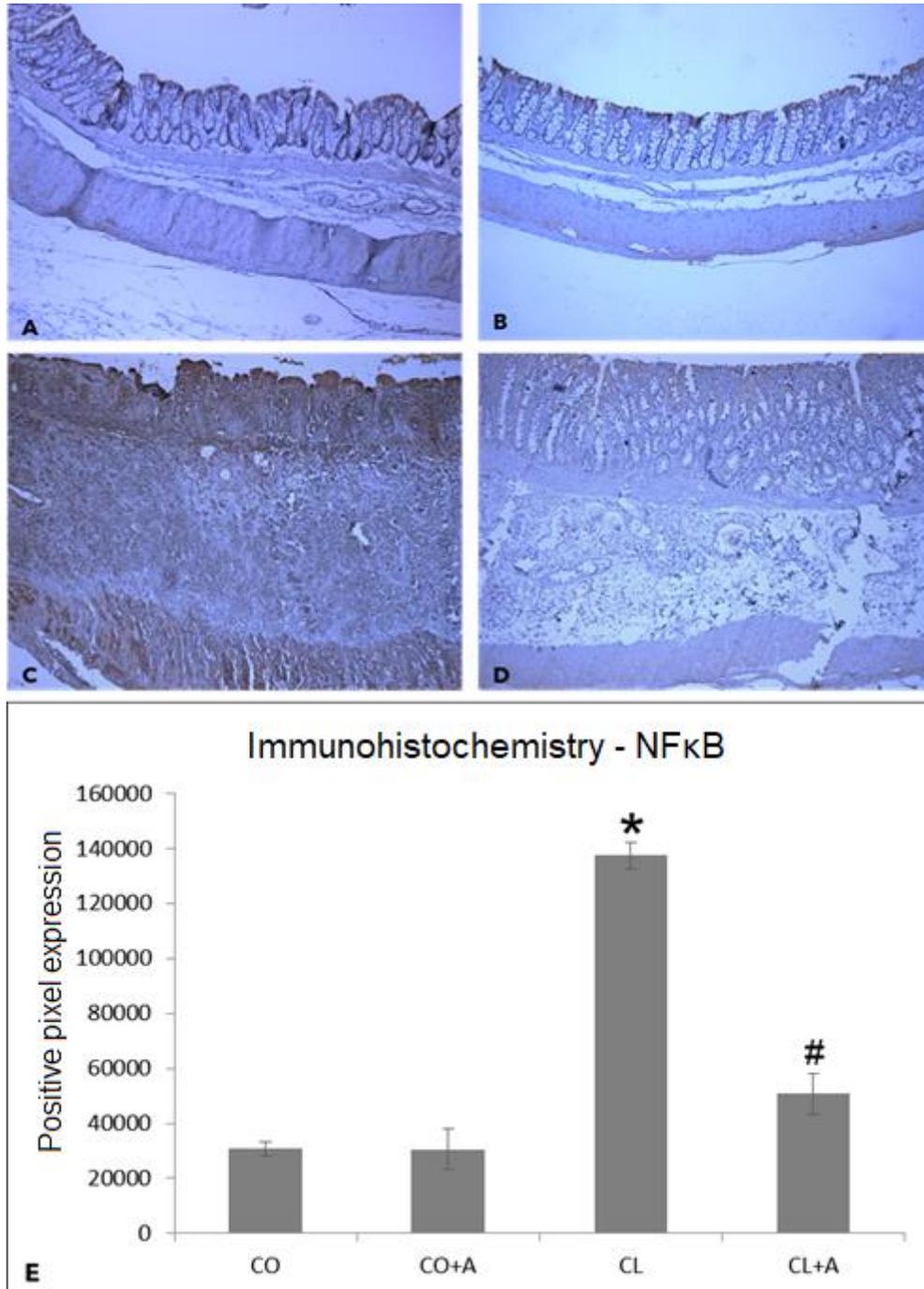
### Superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH) levels

The SOD activity increased significantly ( $p<0.01$ ) in the CL group when compared to the control groups, whereas in the colitis group that received *C. laurifolia* treatment (CL+A), there was a significant reduction ( $p<0.01$ ) of the enzyme activity when compared to the CL group (Table 1). In the evaluation of glutathione levels, it was possible to observe a significant reduction ( $p<0.01$ ) in the CL group when compared to the CO and CO+A groups, it was also observed through this analysis a significant increase ( $p<0.01$ ) in the levels of glutathione in the CL+A group when compared to the same parameter in the CL group (Table 1).

### Immunohistochemical analysis

In the evaluation of NFκB by immunohistochemistry, it was possible to observe a low marking, visible by the brown coloration, in the CO and CO+A groups (Figure 2a and 2b), in the CL group (Figure 2c), there was intense marking, and in the CL+A group, treated with *C. laurifolia* extract, the marking visibly reduced (Figure 2d). The

quantification of NF $\kappa$ B expression (Figure 2e) showed that in the CL group, there was a significant increase ( $p<0.01$ ) compared to the control groups (CO and CO+A), and this expression was significantly reduced ( $p<0.01$ ) when the animals were treated with *C. laurifolia*.



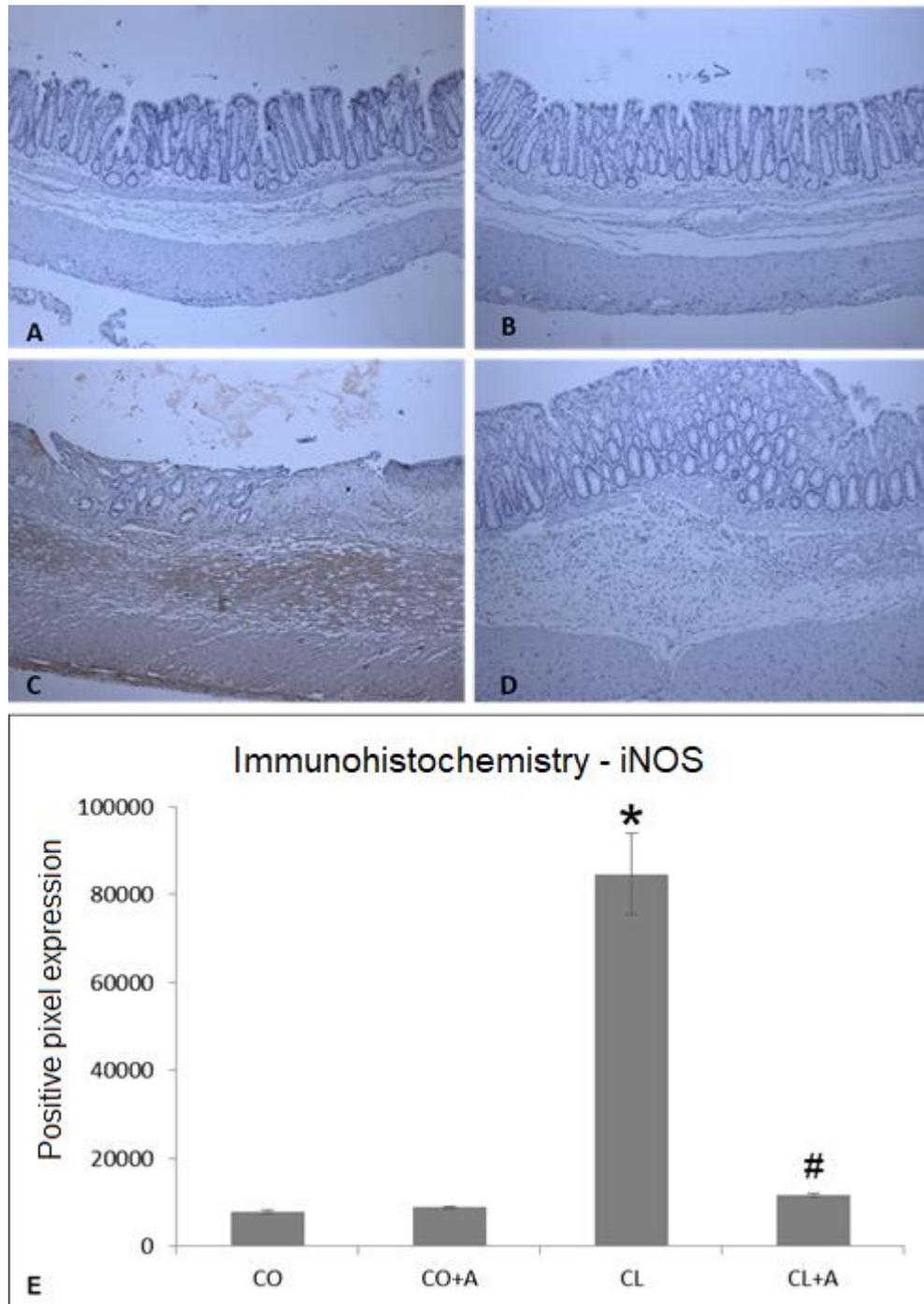
**Figure 2:** NF $\kappa$ B immunohistochemical analysis.

**Note:** A - control (CO); B - control+Acapurana (CO+A); C - colitis (CL); D - colitis+Acapurana (CL+A). Magnification 100x. E – NF $\kappa$ B expression. \*Statistically significant difference

( $p < 0.01$ ) of the CL group regarding the CO and CO+A groups; #Statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) of group CL+A compared to group CL.

**Source:** The author (2021).

In the animals in the CL group (Figure 3c), intense labeling for the iNOS enzyme was observed through immunohistochemistry, whereas the CO and CO+A groups (Figure 3a and 3b) showed low labeling for the enzyme. *C. laurifolia* treatment reduced the positive labeling for iNOS in the CL+A group (Figure 3d). By quantifying the expression of iNOS (Figure 3e), it was found that there was a significant increase ( $p < 0.01$ ) in the colitis group compared to the control groups and that when *C. laurifolia* was administered in the CL+A group, there was a significant reduction ( $p < 0.01$ ) of the expression of this enzyme compared to that observed in the colitis group.

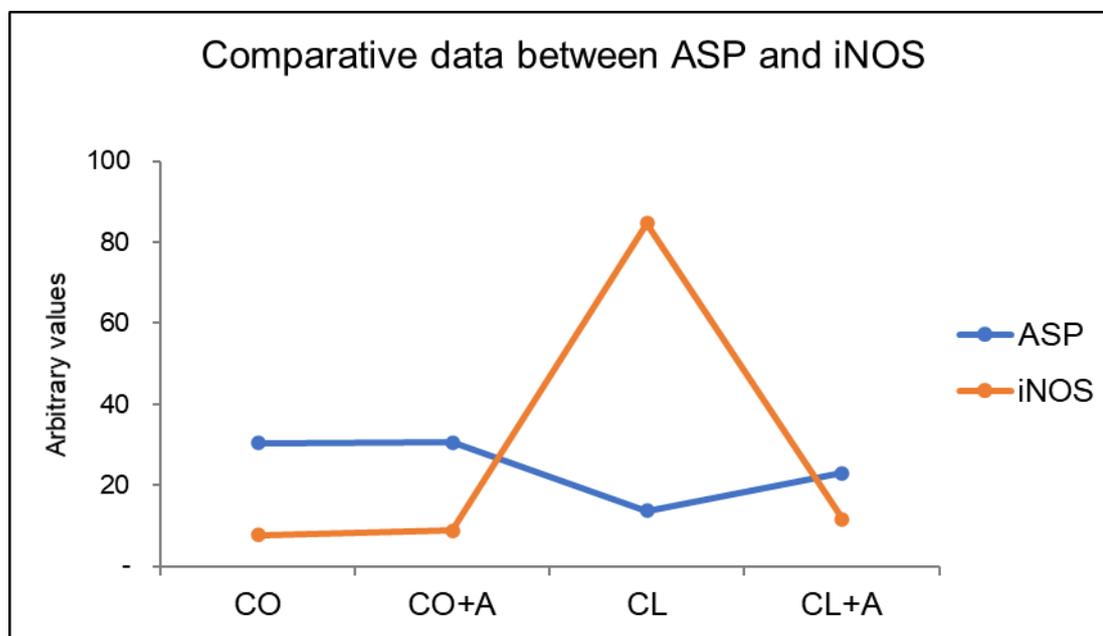


**Figure 3:** iNOS immunohistochemical analysis

**Note:** A - control (CO); B - control+Acapurana (CO+A); C - colitis (CL); D - colitis+Acapurana (CL+A). Magnification 100x. E –iNOS expression. \*Statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) of the CL group compared to the CO and CO+A groups; #Statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) of group CL+A compared to group CL.

**Source:** The author (2021).

Through simple correlation analysis between ASP and iNOS expression, it was found that there is a negative correlation between the two variables. That is, as iNOS expression increases, anal sphincter pressure decreases (Figure 4).



**Figure 4:** Simple correlation analysis between ASP and iNOS expression.

**Note:** Control (CO); Control+Acapurana (CO+A); Colitis (CL); Colitis+Acapurana (CL+A).

Significance level =  $p < 0.05$ ; Correlation coefficient ( $r$ ) = -0.9893.

**Source:** The author (2021).

## DISCUSSION

Although the etiology of ulcerative colitis is not fully known, it is known that OS is a mechanism directly linked to the inflammatory process present in this disease. Chemical models of colitis are widely used and can be adapted to acute or chronic models, with AA, TNBS and SDS being the main inducing agents used. The AA colitis induction model was used for this study to reproduce many acute features of ulcerative colitis in humans.<sup>7-10</sup>

A study examining the antioxidant properties of *C. laurifolia*, an aqueous extract, has shown the ability to regrow intestinal crypts, reduce inflammatory infiltrates and edema, and increase anal sphincter pressure glutathione levels. In addition, it reduces lipoperoxidation and increases superoxide dismutase activity in rats treated with AA-induced colitis and given 50 mg/kg of the extract.<sup>21</sup> Based on the

results obtained in the study as mentioned above, we propose investigating whether a dose of 25 mg/kg of the same extract would provide the observed antioxidant effects and whether it was capable of reducing the expression of inflammatory markers involved in the pathophysiology of ulcerative colitis.

When examining the histology of the CO and CO+A groups under the microscope, it can be seen that the crypts and submucosa are preserved, and the intestinal mucosa is intact. In the CL group, inflammatory focuses and severe lesions in the intestinal mucosa are observed. In the colitis group treated with *C. laurifolia* (CL+A), regeneration of the crypts, reduction of hemorrhage, edema, and inflammatory infiltrate can be seen, with a 50% reduction in the histopathological score of bowel damage compared to the CL group. We found these same results in other studies using antioxidants. FILMANN et al. used glutamine to treat AA-induced colitis, and HELAL and ELHAMEED used soursop in their studies and SOUZA et al., who used 50 mg/kg *C. laurifolia* extract and found no difference between the two doses.<sup>7,21,29</sup>

Nitric oxide (NO) acts in smooth muscle relaxation, as the anal sphincter is composed of smooth muscle, NO is directly linked to anal sphincter pressure (ASP). Previous studies have shown that in AA-induced colitis, NO production increases, causing anal sphincter relaxation, a reduction in ASP, and loss of control over evacuation.<sup>7,13</sup> When *C. laurifolia* extract was administered to animals with colitis, it increased 68.3% in ASP, which is similar to the increase observed in the CO+A group. ASP was reduced by 55.2% in the CL group compared to the control group. According to these results, we found the 25 mg/kg dose to be as effective in restoring ASP of rats with colitis as the 50 mg/kg dose used in the study.<sup>21</sup>

A significant increase of 173.9% in LPO in the intestine was measured using the TBARS technique in animals in the colitis group (CL) compared to the control groups. Moreover, Figure 1c illustrates tissue degradation due to the increase in LPO, which leads to the destruction of crypts and cell structures. When animals with colitis were treated with *C. laurifolia*, there was a significant reduction of 41.8% in LPO compared to the CL group. SOUZA et al. found a reduction in LPO in the intestine of animals with colitis treated with *C. laurifolia*, which can be attributed to the composition of the extract rich in flavonoids and phenolic compounds since these substances can reduce free radicals by their free radical scavenger action.<sup>21</sup>

The SOD enzyme activity showed a significant increase of 125% in the CL group compared to the enzyme activity in the control groups. The observed increase in enzyme activity may result from an attempt to reduce the damage caused by the AA. When animals with colitis were treated with *C. laurifolia*, there was a significant reduction of 70% in SOD enzyme activity compared to animals in the CL group, approaching the values found in the control groups. This result agrees with what was observed by SOUZA et al., who used the 50 mg/kg dose of *C. laurifolia* aqueous extract to treat AA-induced UC, and our results demonstrate that half of this dose was also successful in re-establishing SOD activity. The result obtained in the CL+A group can be attributed to the presence of flavonoids and tannins in the aqueous extract of *C. laurifolia*, as they are capable of scavenging free radicals reorganizing the intestinal mucosa.<sup>21,30</sup>

Analyzing the GSH levels, a significant reduction of 47% in the CL group is observed compared to the controls. This data corroborates the experimental findings observed in other studies, and the reduction in GSH levels may be due to an increase in OS. In the CL+A group, there was a significant 96% increase in GSH levels compared to the CL group. By evaluating this data along with lipoperoxidation results, it is believed that the antioxidant action of the *C. laurifolia* extract reduced the OS, causing a lower consumption of GSH, keeping its levels similar to those observed in the CO and CO+A groups. The results obtained in this work corroborate the data obtained in other studies such as the one carried out by HARTMANN et al. in which *Boswellia serrata* was used as an antioxidant in the treatment of AA-induced colitis, as well as with the results observed by SOUZA et al. who administered the aqueous extract of *C. laurifolia* at a dose of 50 mg/kg in rats with colitis.<sup>8,21</sup>

Through immunohistochemical analysis, it was observed that there was a significant increase of 348% in the expression of NFκB in animals with colitis induced by AA compared to animals in the control groups and that when the *C. laurifolia* extract was administered to animals with colitis, this expression reduced 63% regarding the CL group.

In the present study, we have shown that animals with colitis have an increased OS because of an increase in reactive oxygen species (ROS), which caused a rise in NFκB expression due to EROs has known how to activate NFκB.<sup>7,13,15</sup> There was also a decrease in lipoperoxidation and an increase in GSH,

as *C. laurifolia* at a dose of 25 mg/kg protected the intestinal mucosa in animals with colitis.

Several studies have shown that NF $\kappa$ B activation in animals with colitis causes an increase in other inflammatory mediators such as iNOS, which was also investigated in this study and found a significant increase of 921% in the CL group compared to control groups. It was also observed that when *C. laurifolia* was administered, iNOS expression reduced to 86% compared to the CL group, being similar to controls.<sup>30</sup> The iNOS is one of the main NO-producing enzymes, and this is directly linked to anal sphincter relaxation, so the increase in iNOS expression in animals with colitis indeed increased NO levels and consequently reduced ASP. *C. laurifolia* reduced iNOS expression in animals from the CL+A group and consequently reduced NO levels, which caused an increase in ASP. What was demonstrated through the simple correlation analysis where it was possible to evidence that there is a negative correlation between the ASP and the expression of iNOS being  $(r) = 0.9893$ .

## **CONCLUSION**

As a consequence of the results of this study, *C. laurifolia* aqueous extract exerted an anti-inflammatory and antioxidant effect in rats with ulcerative colitis induced by AA, restoring the crypts, decreasing inflammatory infiltrates in the tissue, increasing the SOD, lowering LPO, and restoring superoxide dismutase enzyme activity and glutathione levels, thereby restoring intestinal mucosal architecture. It is suggested that these results are attributed to the high antioxidant and anti-inflammatory potential and the high concentration of phenolic compounds such as tannins found in the aqueous extract of *C. laurifolia*.

## REFERENCES

1. Misiewicz JJ, Pounder, RE, Venables, CW. Diseases of the gut and pancreas 2th. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
2. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115(1):182-205.
3. Awaad AS, El-Meligy RM, Soliman GA. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *J Sau Chem. Soci*. 2013;17:101-124.
4. Dogan Z, Ergul B, Sarikaya M, Filik L, Gonultas MA, Hucumenoglu S, Can M. The antioxidant effect of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* in rat colitis model induced by acetic acid. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(7):411-415.
5. Bastaki SMA, Adeghate E, Amir N, Ojha S, Oz M. Menthol inhibits oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rat colonic mucosa. *Am J Transl Res*. 2018;12:4210-4222.
6. Bademci R, Erdoğan MA, Kara AY, Yiğittürk G, Erbaş O. Therapeutic effects of vitamin D on acetic acid-induced colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2020;35(4):e202000404.
7. Fillmann HS, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappa B pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicol*. 2007;236:217-226.
8. Hartmann RM, Morgan Martins MI, Tieppo J, Fillmann HS, Marroni NP. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Dig Dis Sci*. 2012;57:2038-2044.
9. Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Moura RM, Morgan-Martin MI, Filmann HS, et al. Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid. *J Of Coloproctol*. 2016;36:97-103.
10. Moura RM, Hartmann RM, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, Soares MC, et al. Antioxidant effect os mesalazine in the experimental colits model induced by acetic acid. *J Coloproctol*. 2016;36:139-148.
11. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine* 4th. Oxford Uni Press,2007:851.
13. Kretzman FNA, Fillman HS, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni NAP, González-Gallego J, et al. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Infl B Dis*. 2008;14:1504-1513.

14. Hartmann RM, Fillmann HS, Martins MI, Meurer L, Marroni NP. *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. *Phytother Res.* 2014;28(9):1392-1398.
15. Wu XF, Ouyang ZJ, Feng LL, Chen G, Guo WJ, Shen Y, Wu XD, Sun Y, Xu Q. Suppression of NF- $\kappa$ B signaling and NLRP3 inflammasome activation in macrophages is responsible for the amelioration of experimental murine colitis by the natural compound fraxinellone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281(1):146-156.
16. Van Den Berg ME, Silva MHL. Contribuição ao Conhecimento da Flora Medicinal de Roraima. *Acta Amazônica.* 1988;18:23-35.
17. Vásquez, R. Sistemática de las plantas medicinales de uso frecuente en el área de Iquitos. *Folia Amazonica.* 1992;4(1):65-80.
18. Belém HRF, Menezes CCS. As terapias tradicionais dos quilombolas de Arancuã. 2003. Cen Univ do Pará: Belém. 2003.
19. Chagas AP, Müller AH, Soares MBP, Garcez LM. Anti-Leishmania and immunomodulatory potential of extracts of *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010;1(1):117-124.
20. Ferreira AB, Ming LC, Haverroth M, Daly DC, Caballero J, Ballesté AM. Plants used to treat malaria in the regions of Rio Branco-Acre state and southern Amazonas state – Brazil. *Int J of Phytocos Nat Ingrid.* 2015;2(9):1-5.
21. Souza LP, Fillmann HS, Fonseca SRB, Brasil, MS, Marroni NAP, Ferraz ABF. Antioxidant Evaluation of the Aqueous Extract of Hulls of *Campsiandra laurifolia* in Colitis Induced by Acetic Acid in Wistar Rats. *J Coloproctol.* 2021; 41(2):138-144.
22. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterisation of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:251-255.
23. Tannahill CL, Stevenot SA, Campbell-Thompson M, Nick HS, Valentine JF. Induction and immunolocalization of manganese superoxide dismutase in acute acetic acid-induced colitis in the rat. *Gastroenterology.* 1995;109(3):800-811.
24. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardia damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. *Tumori.* 1985;71:241-249.
25. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72(1-2):248-254.
26. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1978;52:302-310.

27. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-3175.

28. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888.

29. Helal MG, Abd Elhameed AG. Graviola mitigates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats: insight on apoptosis and Wnt/Hh signaling crosstalk. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28(23):29615-29628.

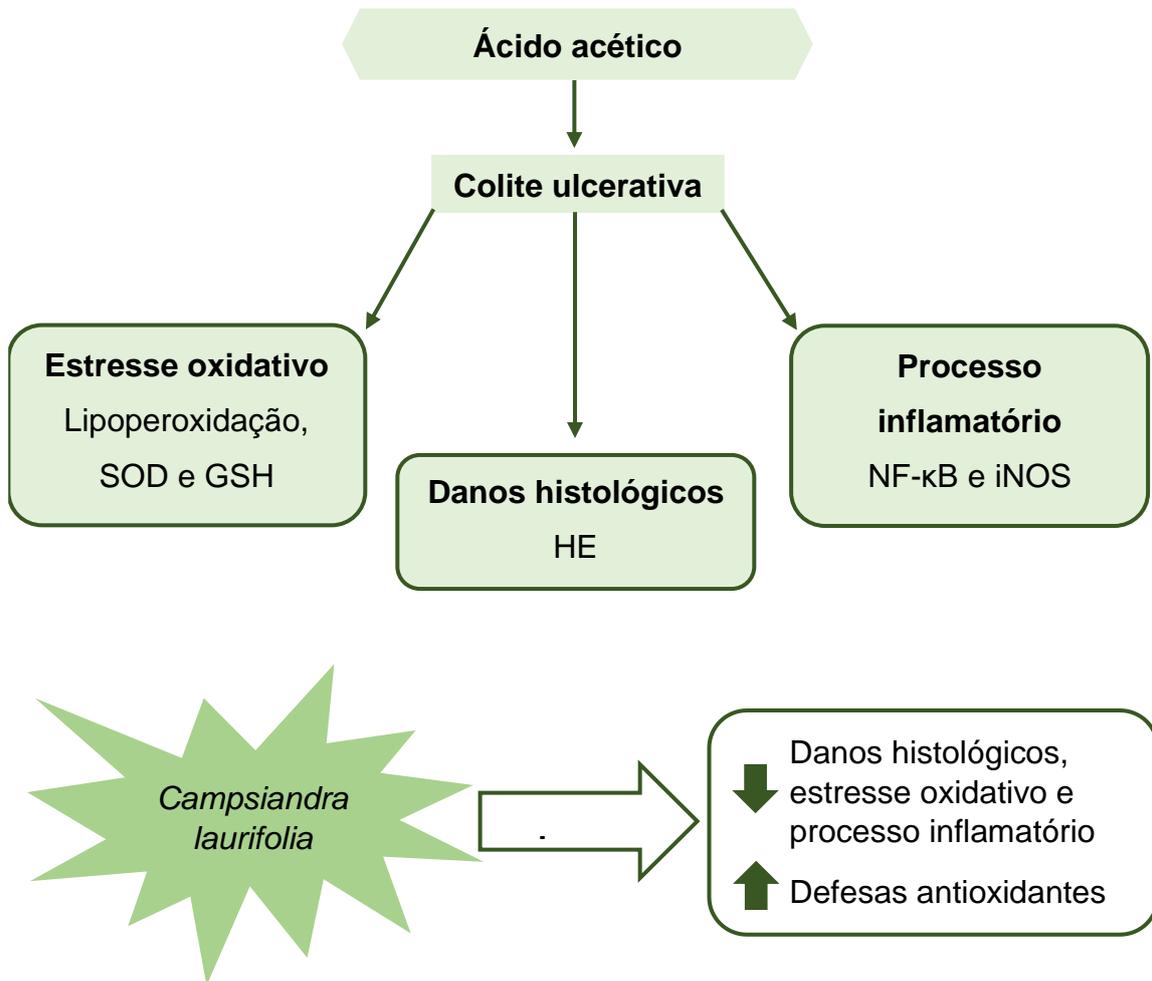
30. Kazi HA, Qian Z. Crocetin Reduces TNBS-Induced Experimental Colitis in Mice by Downregulation of NF $\kappa$ B. *Saudi J Gastroenterol.* 2009;15(3):181-187.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A RCUI afeta os seus portadores física, psicológica e emocionalmente. Também gera redução da qualidade de vida e outros transtornos devido aos seus períodos de fase aguda e pelo tratamento oferecido atualmente que ocasiona muitos efeitos colaterais desagradáveis, implicando também em redução da autoestima desses pacientes.

A busca por tratamentos alternativos que possibilitem que os portadores de RCUI tenham mais qualidade de vida é extremamente importante, por isso nos propusemos a investigar se a *C. laurifolia* seria capaz de reduzir o estresse oxidativo e a inflamação em ratos com colite ulcerativa, utilizando uma dose baixa do extrato aquoso dessa planta.

Através deste estudo, comprovamos que o extrato aquoso das cascas da *C. laurifolia* administrado na dose de 25 mg/kg foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, a inflamação e os danos intestinais em ratos com colite induzida por ácido acético (figura 6). Os efeitos observados podem ser atribuídos ao alto potencial antioxidante e aos compostos fenólicos presentes no extrato.



**Figura 6:** Efeito da *C. laurifolia* na colite ulcerativa  
**Fonte:** autora

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Pretendemos dar continuidade a este estudo analisando outros marcadores inflamatórios e também marcadores de apoptose para melhor elucidar as vias envolvidas na etiologia da RCUI, assim como analisar outros mecanismos passíveis de bloqueio ou ativação que possam reduzir os danos intestinais e extra intestinais causados por essa doença. Paralelamente também serão desenvolvidos outros estudos com modelos animais e o uso de antioxidantes já investigados em nosso grupo de pesquisa.



## 10.2 Checklist Arrive versão E-10

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free [here](#)) is recommended for completion.



### The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

#### The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item	Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
<b>Study design</b> 1	For each experiment, provide brief details of study design including:	Página 44
	a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	Página 44
<b>Sample size</b> 2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used.	Página 44
	b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.	Página 44
<b>Inclusion and exclusion criteria</b> 3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i> . If no criteria were set, state this explicitly.	Página 44
	b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so.	Página 45
	c. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.	Página 45
<b>Randomisation</b> 4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence.	Os animais foram alocados nos grupos de forma aleatória como consta na página 44.
	b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	Para minimizar potenciais confundidores os animais tinham numeração de acordo com seus respectivos grupos e todos os pesquisadores envolvidos no experimento receberam treinamento
<b>Blinding</b> 5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	Durante a alocação e condução do experimento: os pesquisadores que manipulavam os animais. Durante a análise dos dados: apenas o pesquisador responsável.
<b>Outcome measures</b> 6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes).	Páginas 45-47
	b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Não se aplica
<b>Statistical methods</b> 7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.	Página 47
	b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Página 47
<b>Experimental animals</b> 8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.	Página 44
	b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Página 44
<b>Experimental procedures</b> 9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	Páginas 44 e 45
	a. What was done, how it was done and what was used.	Páginas 44 e 45
	b. When and how often.	Páginas 44 e 45
	c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	Páginas 44 e 45
d. Why (provide rationale for procedures).	Páginas 44 e 45	
<b>Results</b> 10	For each experiment conducted, including independent replications, report:	Páginas 48-53
	a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range). b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	Não se aplica