

**CARLOS EDUARDO VITOR**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E  
IMUNOMODULADOR DO TRITERPENO PENTACÍCLICO  $\alpha,\beta$ -AMIRINA  
SOBRE A COLITE INDUZIDA PELO ÁCIDO 2,4,6-TRINITROBENZENO  
SULFÔNICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia L. Mazzuco

Florianópolis - SC

2007

VITOR, Carlos Eduardo. **Avaliação do efeito antiinflamatório e imunomodulador do triterpeno pentacíclico  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico em camundongos.** Florianópolis, 2007. 83 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto  
Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco

Defesa: 30/04/2007.

A [ $\alpha,\beta$ -Amirina] é uma mistura 1:1 de dois [triterpenos] pentacíclicos isolados a partir das resinas da planta [*Protium kleinii*]. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento sistêmico curativo com  $\alpha,\beta$ -amirina era capaz de melhorar a inflamação intestinal, comparativamente com a dexametasona. A colite experimental foi induzida em camundongos pela injeção intracolônica de [ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico] (TNBS). Os tratamentos com  $\alpha,\beta$ -amirina ou com dexametasona melhoram significativamente o dano macro e microscópico e praticamente aboliram a infiltração de células polimorfonucleares observada no cólon dos animais. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina, bem como com a dexametasona, também diminuiu os níveis teciduais da citocina [interleucina 1 $\beta$ ] (IL-1 $\beta$ ) e recuperou os níveis basais da citocina IL-10. A expressão do [fator de crescimento do endotélio vascular] (VEGF) também foi diminuída pelo tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina. Curiosamente, o tratamento com dexametasona não exibiu tal efeito. Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir drasticamente a expressão da forma fosforilada do [fator nuclear  $\kappa$ B] (NF- $\kappa$ B). No entanto a IL-10 parece não desempenhar o papel mais relevante para o efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina, nem para a dexametasona, uma vez que o tratamento de animais IL-10<sup>-/-</sup> com colite com  $\alpha,\beta$  amirina causou inibição semelhante àquela observada. Ao contrário do observado para a dexametasona, nenhuma alteração histopatológica na estrutura do timo foi observada nos animais tratados com a  $\alpha,\beta$ -amirina. Os níveis plasmáticos de corticosterona e o peso do baço também não foram alterados pela  $\alpha,\beta$ -amirina. Este trabalho sugere que a  $\alpha,\beta$ -amirina pode ser um potencial agente terapêutico para o tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

“...The finish line is a good place we could start...”

*Gary Lightbody*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por guiar os meus passos e confortar meu coração nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Nelson e Roseli pela educação, amor, e por me ensinarem a jamais desistir ainda que as dificuldades pareçam não ter fim. À minha irmã Viviane e ao meu cunhado Daniel por todo apoio e carinho.

Ao Sr. Victor Siaulys, o grande responsável pela minha guinada profissional, por ter confiado em meu trabalho e me dado essa indescritível oportunidade.

Ao Aché Laboratórios Farmacêuticos pelo apoio financeiro e por todo o suporte técnico durante esses três anos em que estive ausente das minhas atividades na empresa.

Ao Professor Dr. João Batista Calixto por ter aberto as portas do seu laboratório, pelo carinho, preocupação e atenção e pela formação exemplar que me concedeu.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina por todo o conhecimento passado que enriqueceram a minha formação.

Às minhas amigas e parceiras de trabalho Daniela Balz, Tânia Mazzuco e Cláudia Figueiredo pelos conhecimentos passados e por enriquecerem meu trabalho.

Aos meus grandes amigos Allisson, Andrey, Daniela Leite, Fernanda, Rafaela e Rodrigo Marcon pelo companheirismo, paciência e amizade que tornaram vocês minha segunda família.

Aos meus grandes amigos que hoje alçam vôos mais altos Cândia Kassuya, Daniela Cabrini, Elisabeth Fernandes, Eunice André, Juliano Ferreira e Martina Spagnol, Michel e Valfredo e que foram tão importantes pra mim no âmbito pessoal e profissional.

À Maria Martha Campos por ter me auxiliado durante os primeiros passos pelo campo da farmacologia e por toda a ajuda e atenção dispensada enquanto trabalhamos juntos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Alexandre, Ana Carolina, Ana Flávia, Ângela, Denise, Diogo, Edinéia, Gecioni, Giselle, Gustavo, Isa, Janice, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Júlio, Marianne, Nara, Octávio, Robson, Rodrigo Medeiros e Willian pela convivência, amizade e conhecimentos passados.

À Aline, Juliana Gonçalves e Patrícia por todo suporte e amizade.

Aos meus amigos extra-laboratório, Adriano, Ana Luiz, Bruno (B1), Edson, Evandro, Igor, Jean e Rodrigo Shardosim pelos ótimos momentos que passamos juntos e pela amizade incondicional.

Aos demais funcionários do departamento de farmacologia Diana, Pedro, Rita pela atenção e suporte.

A todos os meus amigos do Aché Laboratórios pela amizade, companheirismo e torcida. Não vou colocar o nome de todos aqui porque senão eu encheria páginas e mais páginas.

E por fim a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
1. A resposta inflamatória.....	1
2. O trato gastrintestinal.....	1
3. Doenças inflamatórias intestinais.....	3
4. Tratamentos atuais para o tratamento de IBD.....	13
5. O uso de produtos naturais para o tratamento de IBD.....	16
6. O potencial terapêutico da $\alpha,\beta$ -amirina.....	17
OBJETIVOS.....	20
1. Objetivo geral.....	21
2. Objetivos específicos.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
1. Animais.....	23
2. Indução de colite.....	23
3. Tratamentos.....	24
4. Escore macroscópico.....	25
5. Análise histológica.....	26
6. Escore microscópico.....	26
7. Atividade da enzima MPO.....	27

8. Dosagem de citocinas.....	27
9. Dosagem de corticosterona.....	28
10. Imunoistoquímica.....	28
11. Drogas e reagentes.....	30
12. Análise estatística.....	31
RESULTADOS.....	32
1. Caracterização do modelo curativo de colite experimental induzida pelo TNBS.....	33
2. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico e a atividade da enzima MPO.....	33
3. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano microscópico .....	36
4. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfometria da glândula adrenal.....	36
5. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.....	38
6. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o peso do baço.....	39
7. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfologia do timo.....	40
8. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis teciduais de IL-1 $\beta$ .....	41
9. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis teciduais de IL-10.....	41

10. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico em camundongos IL-10 <sup>-/-</sup> .....	42
10. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão de VEGF.....	43
12. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão da forma fosforilada da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B.....	45
DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

**ABREVIÇÕES**

<b>APC</b>	<i>Antigen-presenting cells</i> Células apresentadoras de antígenos
<b>CARD</b>	<i>Caspase activation and recruitment domain</i> Domínio de ativação e recrutamento de caspases
<b>CD</b>	<i>Crohn disease</i> Doença de Chron
<b>HPA</b>	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>IBD</b>	<i>Inflammatory bowel disease</i> Doença inflamatória intestinal
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN</b>	Interferon
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i> Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MPO</b>	<i>Myeloperoxydase</i> Enzima mieloperoxidase
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa-B</i> Fator nuclear kappa-B
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain molecules</i> Moléculas com domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
<b>OCT</b>	<i>Organic cations transporters</i> Transportadores de cátions orgânicos

<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> Padrões moleculares associados à patógenos
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i> Proteína quinase do tipo A
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i> Proteína quinase do tipo C
<b>pNF-<math>\kappa</math>B p65</b>	<i>Phosphorylated nuclear factor kappa-B p65 subunit</i> Subunidade p65 do fator nuclear kappa-B fosforilado
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> Receptores ativados por agentes de proliferação peroxissomal
<b>PRR</b>	<i>Patterns-recognition receptor</i> Receptor de reconhecimento padrão
<b>TNBS</b>	<i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i> Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>T<sub>H</sub></b>	<i>T helper cell</i> Célula T auxiliar
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i> Receptor do tipo Toll
<b>TMB</b>	<i>Tetrametilbenzidine</i> Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i> Fator de necrose tumoral
<b>TPA</b>	<i>12-o-Tetradecanoilforbol acetate</i>

	Acetato de 12-o-tetradecanoilforbol
<b>UC</b>	<i>Ulcerative colitis</i>
	Colite ulcerativa
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
	Fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química dos dois triterpenos pentacíclicos, $\alpha$ e $\beta$ -amirina, isoladas da resina da <i>Protium kleinii</i> .....	18
<b>Figura 2</b> - Protocolo experimental.....	24
<b>Figura 3</b> - Estabelecimento do quadro aguda 24 h após a administração de TNBS.....	34
<b>Figura 4</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico e a infiltração de células polimorfonucleares no cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	35
<b>Figura 5</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano microscópico do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	37
<b>Figura 6</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfometria da glândula adrenal de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	38
<b>Figura 7</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de corticosterona no plasma de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	39

<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o peso do baço de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	40
<b>Figura 9</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a estrutura do timo de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	41
<b>Figura 10</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de IL-1 $\beta$ no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	43
<b>Figura 11</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de IL-10 no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	43
<b>Figura 12</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico do cólon de animais IL-10 <sup>-/-</sup> com colite experimental induzida pelo TNBS.....	44
<b>Figura 13</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão de VEGF no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	45
<b>Figura 14</b> - Efeito do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão da forma fosforilada do NF- $\kappa$ B no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS.....	46

<b>Figura 15</b> - Possível mecanismo de ação da $\alpha,\beta$ -amirina na colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.....	57
--	----

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS.....	25
<b>Tabela 2</b> - Grade de escores para avaliação de dano histológico na colite induzida por TNBS.....	26

## RESUMO

$\alpha,\beta$ -Amirina é uma mistura 1:1 de dois triterpenos pentacíclicos isolados a partir das resinas da planta *Protium kleinii*. Alguns trabalhos têm mostrado que a  $\alpha,\beta$ -amirina possui atividade antiinflamatória e antinociceptiva. No entanto, seus efeitos sobre doenças inflamatórias intestinais ainda não foram descritos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento sistêmico curativo com  $\alpha,\beta$ -amirina era capaz de melhorar a inflamação intestinal, comparativamente com a dexametasona, em um modelo de colite experimental induzida em camundongos. A colite experimental foi induzida em camundongos pela injeção intracolônica de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Vinte e quatro horas depois foi iniciado o tratamento sistêmico com  $\alpha,\beta$ -amirina de 12 em 12 horas ou com a dexametasona. Setenta e duas horas após a indução de colite, os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros foram avaliados: o dano macro e microscópico, a infiltração de células polimorfonucleares, os níveis teciduais de citocinas e a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular e do NF- $\kappa$ B p65 fosforilado foram avaliados. Alterações fisiopatológicas na estrutura do timo, no peso do baço e nos níveis de corticosterona plasmáticas também foram analisadas. O mesmo protocolo foi realizado utilizando-se camundongos com deleção gênica para a IL-10 (camundongos IL-10<sup>-/-</sup>) e o dano macroscópico foi avaliado. Os tratamentos com  $\alpha,\beta$ -amirina ou com dexametasona melhoram significativamente o dano macro e microscópico e praticamente aboliram a infiltração de células polimorfonucleares observada no cólon dos animais. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina, bem como com a dexametasona, também diminuiu os níveis teciduais da citocina IL-1 $\beta$  e

recuperou os níveis basais da citocina IL-10. A expressão de VEGF também foi diminuída pelo tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina. Curiosamente, o tratamento com dexametasona não exibiu tal efeito. Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir drasticamente a expressão da forma fosforilada do NF- $\kappa$ B. No entanto a IL-10 parece não desempenhar o papel mais relevante para o efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina, nem para a dexametasona, uma vez que o tratamento de animais IL-10<sup>-/-</sup> com colite com  $\alpha,\beta$  amirina causou inibição semelhante àquela observada. Ao contrário do observado para a dexametasona, nenhuma alteração histopatológica na estrutura do timo foi observada nos animais tratados com a  $\alpha,\beta$ -amirina. Os níveis plasmáticos de corticosterona e o peso do baço também não foram alterados pela  $\alpha,\beta$ -amirina. Esses resultados em conjunto demonstram pela primeira vez que o tratamento com a  $\alpha,\beta$ -amirina foi tão eficaz quanto a dexametasona na inibição da colite experimental induzida por TNBS em camundongos, sendo isento de alguns dos efeitos imunossupressores típicos dos glicocorticóides. Este trabalho sugere que a  $\alpha,\beta$ -amirina pode ser um potencial agente terapêutico para o tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais.

## ABSTRACT

$\alpha$ -Amyrin and  $\beta$ -amyrin are a 1:1 mixture of two pentacyclis triterpenes isolated from the resin of the plant *Protium kleinii*. Previous works have shown that  $\alpha,\beta$ -amyrin has anti-inflammatory and anti-nociceptive effects. However, the effect of  $\alpha,\beta$ -amyrin on intestinal inflammation has not been evaluated yet. The aim of this study was to determine whether or not the curative treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin ameliorates colonic inflammation, in comparison to dexamethasone treatment, in a mouse model of inflammatory bowel disease. Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-colitis was induced and 24 h later mice were treated systemically with  $\alpha,\beta$ -amyrin twice a day. Seventy two hours after colitis induction the animals were sacrificed and the following parameters were evaluated: the macro and microscopical damage, polymorphonuclear cells infiltration, tissue cytokine levels, vascular endothelium growth factor (VEGF) and phosphor-NF- $\kappa$ B p65 expression. Histopathologic changes on thymus structure, spleen weight and corticosterone levels in the plasma were also analyzed. The same protocol was performed using gene-modified that lack the protein interleukin-10 (IL-10<sup>-/-</sup> mice) and macroscopic damage was assessed. Both  $\alpha,\beta$ -Amyrin and dexamethasone treatment markedly improved the macro and microscopic damage and completely abolished the polymorphonuclear cells infiltration into the colon tissue. The treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin, as well as with dexamethasone, also diminished the tissue levels of IL-1 $\beta$  and recovered the basal levels of IL-10. The expression of VEGF was also diminished by the  $\alpha,\beta$ -amyrin treatment. Curiously, the treatment with dexamethasone did not exhibited such effect. The treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin as well as the

treatment with dexamethasone markedly reduced the phospho-NF- $\kappa$ B p65 expression. However, IL-10 does not seem to play a key role in  $\alpha,\beta$ -amyrin antiinflammatory effect since the TNBS-induced colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice was ameliorated by both treatment. In contrast to dexamethasone, no histopathologic change in thymus structure was observed in animals treated with  $\alpha,\beta$ -amyrin. The plasma levels of corticosterone and the spleen weight were neither altered by  $\alpha,\beta$ -amyrin treatment. These results altogether show for the first time that treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin exhibited the same efficacy as the treatment with dexamethasone in improving murine experimental colitis without exhibited some of the immunosuppressive effects typically observed after the treatment with glucocorticoids. This work suggests that  $\alpha,\beta$ -amyrin could be a potential therapeutic agent for the treatment of patients with inflammatory bowel disease.

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### 1. A resposta inflamatória

A resposta inflamatória tem como principal objetivo proteger o organismo contra infecções e reparar os eventuais danos teciduais que possam ter ocorrido. Sendo assim, pode ser definida como uma resposta do sistema imune a danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física (Haanen e Vermes, 1995; Weiss, 2002). O processo inflamatório é caracterizado por três eventos principais que incluem o aumento substancial do suprimento de sangue para o local afetado, o aumento da permeabilidade vascular e a migração celular para o sítio inflamatório (Sharma e Buchanan, 1994; Levy, 1996).

### 2. O trato gastrintestinal

O trato gastrintestinal (TGI) compreende o trajeto entre a boca e o ânus. Cada órgão que o compõe possui funções específicas. Algumas estão adaptadas apenas para a passagem do alimento, como o esôfago, por exemplo. Outras para o armazenamento do alimento, como o estômago. O intestino delgado é o responsável pela digestão do alimento e absorção de nutrientes. É também no intestino delgado onde o mecanismo de defesa do hospedeiro recebe um grande investimento do organismo (Guyton e Hall, 2005)

Muitas doenças infecciosas se desenvolvem neste local e por conta disso, é grande o investimento do organismo na sua auto-proteção. Vários são os exemplos que podemos dar a este respeito a começar pelo grande número

de estruturas linfóides e de células do sistema imune que estão presentes no TGI (Macdonald e Monteleone, 2005).

O epitélio intestinal é formado por uma única camada de células que atuam como barreira primária e têm como principal função prevenir que os antígenos e bactérias do lúmem encontrem as células do sistema imune na lâmina própria. Em contrapartida, o epitélio que envolve o tecido linfóide contém um tipo de células epiteliais chamadas de células M. Essas células são especializadas em transportar bactérias e antígenos do lúmem para o tecido linfóide. As células dendríticas da lâmina própria também podem alcançar o lúmem através das células epiteliais e também experimentam o ambiente luminal constantemente. O epitélio é repleto de células T CD8<sup>+</sup> e a lâmina própria contém células T CD4, macrófagos e células plasmáticas produtoras de anticorpos. Uma possível ativação da resposta imune local pode ter proporções enormes, no entanto, uma ativação indesejada dessa resposta imune é inibida por citocinas imunossupressoras e células T regulatórias que têm a função de manter a homeostasia do sistema imune local (Neutra *et al.*, 2001; Rescigno *et al.*, 2001; Macdonald e Monteleone, 2005).

### 3. Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) compreendem um grupo de doenças inflamatórias crônicas que afetam o trato gastrintestinal e em particular a mucosa colônica. As duas principais classes de IBD são a colite ulcerativa (UC, do inglês *ulcerative colitis*), que acomete a região do cólon e a doença de Crohn (CD, do inglês *Crohn disease*), que pode atingir todo o TGI. Desde primeira vez que essa

classe de doenças recebeu sua primeira descrição moderna, há cerca de 100 anos, cientistas buscam novas técnicas investigativas as quais buscam esclarecer os principais processos fisiopatológicos que medeiam essas doenças, permitindo assim o desenvolvimento e a descoberta de novas terapias (Strober *et al.*, 2007).

Recentes trabalhos têm mostrado que a CD está associada a um excessivo aumento na produção das citocinas IL-12, IL-23, IFN $\gamma$  e IL-17, o que afeta o intestino delgado e cólon causando ulcerações, espessamento da parede intestinal e granulomas. Pacientes com CD sofrem de intensas dores abdominais, diarreia e sangramento retal bem como sintomas sistêmicos como perda de peso, febre e fadiga. Muitas vezes o desenvolvimento de fístulas também é observado. Em comparação, a UC está associada a uma produção excessiva da citocina IL-13, com inflamação da mucosa intestinal envolvendo o reto e o intestino proximal. Os sintomas são similares aos da CD, no entanto, sem o desenvolvimento de fístulas (Mcleod, 2003; Fuss *et al.*, 2004).

As IBD possuem etiologia ainda desconhecida. As atuais hipóteses de trabalho sugerem que essa classe de doenças resulta de variações genéticas que conferem predisposição à doença e de fatores ambientais que afetam o sistema imune. Esses fatores combinados desencadeariam uma resposta inflamatória que acabaria resultando em uma IBD. O dano da mucosa intestinal estaria então relacionado a uma disfunção do sistema imune, especialmente das células T da mucosa, produção de citocinas e migração celular anormal para o local da infecção. Sabe-se também que o sistema imune inato também desempenha um papel importante na iniciação da cascata inflamatória (Podolsky, 2002).

Recentemente, cerca de dez regiões genômicas que aparentemente contêm genes que podem contribuir para o risco de desenvolvimento de ambas as formas de IBD foram mapeadas. O primeiro gene específico associado com IBD identificado foi o membro 15 da família dos domínios de ativação e recrutamento de caspases (CARD15, do inglês *caspase activation and recruitment domain molecule 15*; também conhecido como NOD2, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain 2* (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Mais recentemente, o transportador de cátions orgânicos do tipo N1 (OCTN1, do inglês *organic cation transporter N1*) foi identificado como mais um gene susceptível ao desenvolvimento de IBD (Lamhonwah *et al.*, 2003).

O envolvimento dos fatores ambientais na iniciação e progressão da UC ou da CD permanece como um dos pontos menos compreendidos no que diz respeito à patogênese das IBD e parecem ter a mesma importância da predisposição genética. O efeito dicotômico do cigarro para cada uma das principais formas de IBD representa certamente a mais intrigante conexão entre os fatores ambientais e as IBD. Diversos trabalhos têm mostrado que os fumantes possuem grande predisposição para o desenvolvimento de CD, enquanto que os não fumantes apresentam grande predisposição para o desenvolvimento de UC (Harries *et al.*, 1982; Somerville *et al.*, 1984; Reif *et al.*, 1995). Embora os componentes do cigarro responsáveis por essas observações não tenham sido identificados, o uso de adesivos transdérmicos de nicotina, juntamente com terapias convencionais, amenizam os sintomas de pacientes com UC moderada (Pullan *et al.*, 1994).

Além disso, outros fatores como a produção de muco e a permeabilidade intestinal podem contribuir para o desenvolvimento das IBD. Embora a conexão entre a dieta e as IBD pareça algo lógico, uma vez que as IBD afetam diretamente o sítio de absorção de nutrientes, ainda não está claro qual seu real papel no desenvolvimento das IBD.

O epitélio do trato gastrointestinal, através de receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *patterns-recognition receptors*), tem a sensibilidade de perceber as bactérias comensais e os patógenos presentes na microflora intestinal. Os PRR reconhecem estruturas que são conservadas em vírus e bactérias e geralmente ativam vias pró-inflamatórias alertando o hospedeiro quanto à infecção (Philpott e Girardin, 2004). Neste processo dois tipos de PRR estão envolvidos: os receptores do tipo *toll* (TLR, do inglês *toll-like receptors*) e as moléculas NOD. Os TLR são receptores geralmente associados à membrana celular que possuem um domínio extracelular de reconhecimento rico em leucina e um domínio intracelular semelhante ao do receptor de interleucina (IL)-1, sendo este responsável pelo desencadeamento da sinalização (Takeda e Akira, 2004). As moléculas NOD estão presentes no citoplasma de células epiteliais e imunes. Essas proteínas também possuem um domínio C-terminal rico em leucina e um domínio de N-terminal de ligação e oligomerização (Inohara *et al.*, 2003). Fortes evidências sugerem que a sinalização através de CARD ou TLR leva à ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B do inglês *nuclear factor kappa B*) e conseqüente à expressão de proteínas pró-inflamatórias (Inohara *et al.*, 2003; Takeda e Akira, 2004). NOD1 e NOD2 reconhecem sítios derivados de peptidoglicanos bacterianos. Já os TLR reconhecem diferentes componentes de bactérias e vírus. O TLR4, por

exemplo, reconhece lipopolissacarídeos de parede de bactérias Gram-negativas (Philpott e Girardin, 2004).

Uma vez que os PRR na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen-presenting cells*) são ativados, o processo de apresentação de antígenos se inicia culminando na diferenciação de células T *helper* do tipo 1 (Th1) em pacientes com doença de Crohn (CD) ou do tipo 2 (Th2) em pacientes com colite ulcerativa (UC) (Podolsky, 1991a; 1991b). No entanto, essa divisão entre as respostas Th1 e Th2 ainda não foi esclarecida e talvez não seja possível caracterizar uma nítida divisão entre as duas respostas na IBD (Strober *et al.*, 2002).

Há um mutualismo aparente entre a flora comensal e o epitélio intestinal na tentativa de manter a integridade epitelial. Um exemplo disso é que o reconhecimento de ligantes pelos TLR2 e TLR9 na superfície de células epiteliais aumenta a função de barreira do TGI. As células epiteliais intestinais expressam de modo constitutivo receptores TLR2, os quais contêm múltiplos sítios de ligação para a proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*). A proteína quinase C está implicada na regulação da integridade do epitélio intestinal em resposta às bactérias presentes no lúmen intestinal (Madsen *et al.*, 2001; Cario *et al.*, 2004). A flora normal também induz as proteínas citoprotetoras hsp25 e hsp72 (do inglês *heat shock proteins*) nas células epiteliais do cólon (Kojima *et al.*, 2003). Curiosamente, camundongos deficientes para a proteína MyD88, uma molécula adaptadora essencial para a sinalização dos TLR, não expressam as proteínas hsp25 e hsp72 no epitélio e são altamente susceptíveis a modelos de doenças inflamatórias intestinais induzidos pelo sulfato de dextrana sódica (DSS, do inglês *dextran sodium*

*sulfate*) (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Sugerindo assim, que através da sinalização dos TLR a flora bacteriana exerce um papel protetor o epitélio intestinal contra danos não-específicos.

As citocinas também desempenham um importante papel na modulação do processo inflamatório. Elas são proteínas rapidamente sintetizadas e secretadas por células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e neutrófilos polimorfonucleares. A síntese dessas citocinas é induzida pela ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) (Rogler e Andus, 1998). Após serem liberadas, essas citocinas são capazes de induzir a produção de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e mediadores lipídicos, como as prostaglandinas e leucotrienos. De modo geral, as citocinas participam da indução, amplificação, prolongamento e resolução do processo inflamatório (Aggarwal e Puri, 2004). Seu papel no sistema imune da mucosa intestinal vem sendo amplamente estudado e evidências sugerem que durante as IBD ocorre um desequilíbrio entre citocinas anti e pró-inflamatórias.

A interleucina (IL)-1 é uma importante citocina capaz de ativar muitas células imunes e inflamatórias. É produzida por vários tipos celulares, entre eles, monócitos/macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Essa citocina existe em duas isoformas (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) que exercem suas ações ao se ligar em dois tipos de receptores nas células-alvo, o receptor de IL-1 do tipo I e II (Dinarello e Thompson, 1991). Muitos trabalhos têm demonstrado que a expressão de IL-1 $\beta$  encontra-se aumentada em pacientes com IBD (Mahida *et al.*, 1989; Ligumsky *et al.*, 1990; Isaacs *et al.*, 1992; Youngman *et al.*, 1993;

Casini-Raggi *et al.*, 1995; Radford-Smith e Jewell, 1996; Reimund *et al.*, 1996; Andus *et al.*, 1997).

A IL-10 é produzida por células T, células B ou por monócitos ativados por lipopolissacarídeos (Mosmann, 1991). Ela é responsável pela inibição da produção de citocinas por células T. Isso acontece porque a IL-10 reduz a expressão do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHCII, do inglês *major histocompatibility complex II*) reduzindo a capacidade dos monócitos de apresentar antígenos e, conseqüentemente, diminuindo a proliferação das células T (De Waal Malefyt *et al.*, 1991). Outro papel importante da IL-10 é a inibição da produção de IL-1, IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) por macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1991). Além do mais, Davidson *et al.* (2000) demonstraram que camundongos com deleção gênica para esta citocina desenvolviam resposta imune anormal como resultado de alterações descontroladas entre as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T, culminando no desenvolvimento de enterocolite espontânea. Portanto, a IL-10 parece ter um importante papel não apenas na regulação da ativação das células T, mas também na diminuição da resposta inflamatória aguda.

O TNF $\alpha$  é um importante mediador do processo inflamatório e exerce suas ações ao se ligar a dois tipos de receptores, o p55 e o p75 (nome atribuído aos receptores pelas suas massas moleculares). Ambos os receptores existem também na forma solúvel derivados da clivagem proteolítica dos receptores ligados à membrana celular (Seckinger *et al.*, 1989). Esses receptores solúveis competem com os receptores presentes na membrana celular pela ligação com o TNF $\alpha$ , reduzindo assim os efeitos biológicos que o

TNF $\alpha$  exerceria ao se ligar nos receptores de membrana (Loetscher *et al.*, 1991). Porém, os níveis de TNF $\alpha$  nas IBD são contraditórios. Enquanto alguns pesquisadores demonstram um aumento nos níveis de TNF $\alpha$  em pacientes com IBD (Braegger *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1992; Andus *et al.*, 1993) outros não conseguem detectar tal aumento (Youngman *et al.*, 1993).

A angiogênese é o processo de formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes. É um constituinte fundamental de muitos processos biológicos como o crescimento, o desenvolvimento e o reparo (Folkman, 1971; Folkman e Shing, 1992). A importância da angiogênese vai além da biologia do câncer, sendo identificado como componente da inflamação crônica e de diversas doenças auto-imunes (Folkman, 1995; Gould e Wagner, 2002; Carmeliet, 2003). Desse modo, o principal objetivo do crescimento de novos vasos é colaborar com o processo inflamatório. Isso porque, com essa expansão, o influxo de células inflamatórias pode aumentar, ocorrendo um aumento no suprimento de nutrientes que colaboram com a manutenção do sistema imune. Por último, o endotélio contribui para a produção local de citocinas e quimiocinas (Firestein, 1999; Szekanecz e Koch, 2004). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelium growth factor*) é uma glicoproteína com várias atividades biológicas, incluindo atividade mitogênica de células endoteliais, aumento da permeabilidade das células endoteliais a proteínas circulantes, ativação de monócitos e estimulação da migração de monócitos através das células endoteliais (Leung *et al.*, 1989; Clauss *et al.*, 1990; Yeo *et al.*, 1993; Dvorak *et al.*, 1995). Griga *et al.* (1998) demonstrou um aumento significativo nos níveis séricos de VEGF em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. Mais recentemente, a

localização do VEGF na mucosa colônica também foi demonstrada (Griga *et al.*, 2002), sugerindo que o VEGF desempenha um importante papel nas IBD.

O NF- $\kappa$ B foi primeiro identificado como um regulador da expressão do gene que codifica a cadeia leve kappa em linfócitos B de murinos (Sen e Baltimore, 1986). Subsequentemente, sua expressão foi também identificada em diferentes tipos de células. A forma ativa do NF- $\kappa$ B é um heterodímero usualmente formado por duas proteínas, a subunidade p65 (também chamada de relA) e a subunidade p50. Outras subunidades como a rel, relB, v-rel e p52 também podem compor o dímero ativo do NF- $\kappa$ B. Em células não estimuladas o NF- $\kappa$ B é encontrado no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, a I $\kappa$ B, que previne sua migração para o núcleo (Baldwin, 1996). Quando essas células são ativadas, quinases específicas (IKK) fosforilam a I $\kappa$ B, fazendo com que elas sejam rapidamente degradadas por proteosomas (Chen *et al.*, 1996; Didonato *et al.*, 1996). Uma vez que a I $\kappa$ B foi degradada, o dímero ativo do NF- $\kappa$ B migra para o núcleo da célula, onde se liga a seqüências específicas nas regiões promotoras de seus genes alvo (Barnes e Karin, 1997).

O NF- $\kappa$ B é o fator de transcrição responsável pela regulação da expressão de vários genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias. Dentre eles podemos citar as citocinas pró-inflamatórias, as quimiocinas, as enzimas que serão responsáveis pela geração de outros mediadores inflamatórios, receptores e moléculas de adesão (Kopp e Ghosh, 1995). Além do mais, alguns dos mediadores formados pela ativação do NF- $\kappa$ B provocam a sua própria ativação, funcionando como uma alça reguladora positiva que amplifica, e em alguns casos até perpetua, a resposta inflamatória local (Barnes e Karin, 1997).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal desempenha um papel central na regulação da sinalização do receptor de glicocorticóide. Este receptor se encontra expresso em praticamente todas as células do organismo. O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotrofina que, ao atuar sobre a hipófise, estimula a liberação de corticotrofina. A corticotrofina atua sobre a glândula adrenal provocando a síntese e a liberação de diversos glicocorticóides, sendo o cortisol o mais importante na espécie humana, e a corticosterona a molécula bioequivalente em roedores. Aproximadamente 90 % do cortisol secretado encontram-se ligado a globulinas no sangue. Os 10 % restantes são convertidos em cortisona pela ação da 11 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase do tipo 2. De forma oposta a 11 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase do tipo 1 converte cortisona em cortisol. O cortisol liga-se com alta afinidade ao receptor de glicocorticóide (GR, do inglês *glucocorticoid receptor*). Uma vez dentro da célula o cortisol age de três maneiras diferentes. Na primeira delas, o complexo cortisol-GR migra para o núcleo onde se liga a uma seqüência no DNA chamada de elemento responsivo ao glicocorticóide, promovendo transcrição gênica. O complexo cortisol-GR pode, ainda, interferir com outros fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, por exemplo. Um terceiro mecanismo pelo qual o cortisol pode atuar é através de receptores associados à membrana celular e segundos mensageiros (também conhecidos como efeitos não genômicos) (Rhen e Cidlowski, 2005).

Fisiologicamente, o eixo HPA desempenha um papel muito importante na patogênese de doenças inflamatórias (Chrousos, 1995) e sua atividade é modulada por algumas citocinas como o TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Besedovsky e Del Rey, 1996). Os efetores finais do eixo, o cortisol e a corticosterona, reprimem

a resposta imune inata e a resposta imune mediada por células T (Boumpas *et al.*, 1993; Wilckens e De Rijk, 1997). Recentemente, Shibolet *et al.* (2005) demonstraram que camundongos adrenalectomizados exibiam exacerbação da colite induzida pelo TNBS e diminuição significativa da capacidade de ligação de dexametasona marcada à mucosa colônica.

#### 4. Tratamentos atuais para o tratamento de IBD

Muito se tem investido cientificamente para o desenvolvimento de novas terapias que sejam eficazes no tratamento das IBD. Atualmente, as terapias disponíveis e mais utilizadas incluem glicocorticóides, 5-aminosalicilato e agentes imunossupressores (Rizzello *et al.*, 2002). Mais recentemente, o tratamento com anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  foi introduzido na clínica (Cottone *et al.*, 2006). No entanto, existem pacientes que não respondem a esses tratamentos ainda que combinados e, em muitos casos uma intervenção cirúrgica se faz necessária. Lapidus *et al.* (1998) demonstraram que cerca de metade dos pacientes que sofrem de CD sofrem intervenção cirúrgica nos primeiros 10 anos após o diagnóstico da doença.

O 5-aminosalicilato e compostos relacionados são a terapia de primeira escolha para o tratamento de pacientes com UC e CD ativa tanto média quanto moderada. Suas ações devem-se ao bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos, inibição da quimiotaxia de neutrófilos induzida por peptídeos bacterianos, neutralização de metabólitos reativos do oxigênio e inibição da ativação do NF- $\kappa$ B (Podolsky, 2002). O tratamento com o ácido 5-aminosalicílico pode colaborar na remissão da UC, porém, sua eficácia na remissão da CD é questionável (Podolsky, 2002).

Os glicocorticóides são comumente utilizados para o tratamento de IBD quando a terapia com 5-aminosalicilatos não produz efeitos satisfatórios (Podolsky, 2002). Eles exercem suas ações ao se ligarem ao receptor de glicocorticóide (GR, do inglês *glucocorticoid receptor*) que está localizado no citoplasma das células alvo. Duas isoformas do GR foram originalmente descritas, o GR $\alpha$  e o GR $\beta$ . No citoplasma, o GR encontra-se ligado à proteína hsp90. Uma vez que a molécula de glicocorticóide se liga ao GR, a proteína hsp90 se dissocia do receptor expondo a localização nuclear do complexo glicocorticóide-GR permitindo, então, que ele migre para o núcleo e se ligue ao DNA promovendo transcrição e/ou repressão gênica (Ito *et al.*, 2006). Uma vez dentro da célula, o mecanismo pela qual os glicocorticóides podem agir é o mesmo que o citado anteriormente no tópico 3.6. Embora os glicocorticóides sejam frequentemente efetivos, o tratamento com os mesmos pode causar muitos efeitos colaterais, tais como imunossupressão, resistência insulínica e diabetes, osteoporose, erosão gástrica, hipertensão e atrofia muscular.

Ainda que o aumento nos níveis de TNF $\alpha$  durante as IBD seja controverso, pois alguns pesquisadores conseguem detectar um aumento nos níveis desta citocina e outros não (Rogler e Andus, 1998), algumas das terapias mais atuais para o tratamento dessas doenças são os anticorpos solúveis contra o TNF $\alpha$ , também conhecidos como infliximab. O infliximab atua ao se ligar ao TNF $\alpha$  impedindo que ele se ligue em seus receptores nas membranas das células alvo. No entanto, existem evidências de que sua ação no tratamento de doenças inflamatórias crônicas é devida também a sua habilidade em induzir a apoptose de monócitos (Podolsky, 2002). Seu uso é

indicado para o tratamento de pacientes que não respondem às terapias convencionais, como o ácido 5-aminosalicílico, os glicocorticóides e os imunomodulares. Seu uso foi bem tolerado durante os estudos clínicos, porém, foi geralmente associado ao aparecimento de efeitos colaterais como infecção no trato respiratório, dores de cabeça, náuseas, tosse, sinusite e diarreia. Além disso, pode estar associado ao aumento no risco de reativação da tuberculose em pacientes com a doença latente (Keating e Perry, 2002). Outro grande problema do tratamento com infliximab é alto preço. O tratamento anual pode custar até 30 mil dólares.

A terapia com agentes imunomoduladores é recomendada apenas para pacientes cuja dose de glicocorticóides não pode ser diminuída ou descontinuada. O grande problema desses agentes terapêuticos é que eles aumentam o risco dos pacientes a infecções oportunistas.

A azatioprina e seu metabólito ativo mercaptopurina são os agentes imunomoduladores mais utilizados. Estudos clínicos mostram que esses agentes são eficazes quando administrados em doses adequadas à pacientes com UC ou CD, permitindo que a dose de corticosteróides seja diminuída e prolongando a remissão da doença (Present *et al.*, 1980; Bouhnik *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2000). Os mecanismos de ação dessas drogas responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos permanecem desconhecidos embora já se tenha conhecimento de que suprimem a geração de subgrupos específicos de células T, o que pode explicar o tempo prolongado que é necessário para que estes agentes exibam seus efeitos (Podolsky, 2002).

O metotrexato é efetivo no tratamento de CD ativa é eficaz na manutenção da remissão da doença (Feagan *et al.*, 1995; Oren *et al.*, 1996;

Feagan *et al.*, 2000). A forma de tratamento através de injeções intramusculares ou subcutâneas é um fator que torna esta terapia um tanto quanto inconveniente. Seu mecanismo de ação nas IBDs permanece ainda incerto. Os efeitos colaterais são imunossupressão e risco de desenvolvimento de pneumonia intersticial e de fibrose hepática.

## 5. O uso de produtos naturais para o tratamento de IBD

Por milênios os produtos medicinais de origem natural têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças. Embora a medicina convencional tenha superado muitas dessas terapias, ressurgiu nos últimos anos um grande interesse, especialmente pela indústria farmacêutica, em examinar os recursos potenciais dos produtos naturais em busca de novos compostos biologicamente ativos (Zhang e Ghosh, 2001).

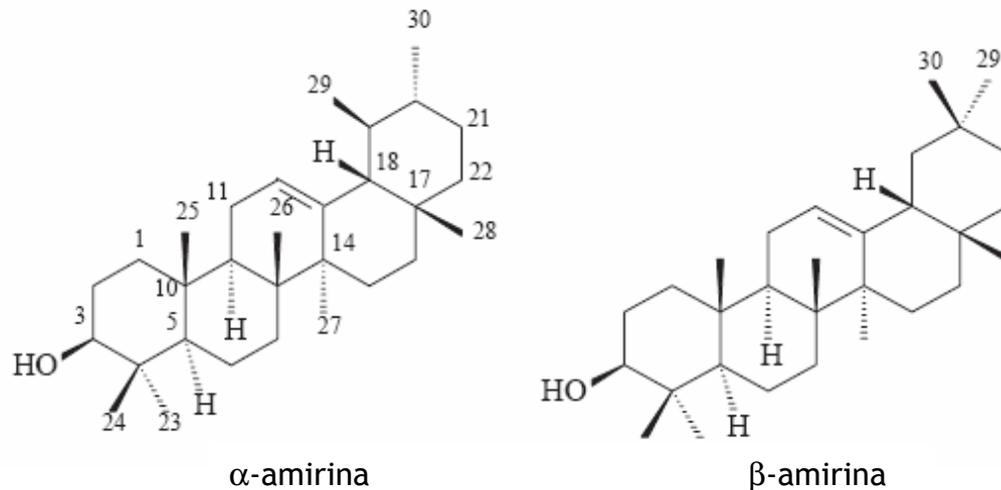
Recentes trabalhos reforçam a idéia de que os produtos naturais compõem uma fonte importante para a descoberta de novas terapias para as IBD. Em 1999, a dehidroleucodina, um sesquiterpeno isolado da planta *Artemisia douglasiana* Bresser, apresentou eficácia em diversos modelos de colite experimental (Wendel *et al.*, 1999). A curcumina, substância responsável pela coloração amarela do condimento *curry* e extraído da planta *Curcuma longa* Linn, mostrou-se eficaz na prevenção e no tratamento da colite induzida por TNBS em camundongos por suprimir a ativação do NF- $\kappa$ B (Sugimoto *et al.*, 2002; Ukil *et al.*, 2003). Mais recentemente Cheng *et al.* (2006) demonstram a eficácia da matrinalina, um alcalóide encontrado em plantas do gênero *Sophora*, em melhorar a colite induzida pelo TNBS por diminuir os níveis de TNF $\alpha$ .

Não só as substâncias isoladas de plantas, mas também os extratos padronizados têm demonstrado eficácia em modelos animais de colite. Um exemplo disso é o extrato de *Ginko biloba*, extraído das folhas verdes da árvore de mesmo nome, que foi recentemente descrito por inibir a expressão de TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 e IL-6 no tecido do cólon de ratos com colite experimental induzida pelo TNBS (Zhou *et al.*, 2006).

## 6. O potencial terapêutico da $\alpha,\beta$ -amirina

As plantas pertencentes ao gênero *Protium* (Burseraceae) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de sintomas inflamatórios. No Brasil, as resinas e folhas são popularmente utilizadas para o tratamento de úlceras e outros sintomas inflamatórios (Corrêa, 1984). O extrato solúvel em éter das resinas da *Protium kleinii* também demonstrou atividade antinociceptiva em modelos de dor inflamatória, além de ação antiinflamatória tópica em modelos de inflamação induzida pelo acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA, do inglês *12-o-tetradecanoylphorbol-acetate*) (Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005). Análises fitoquímicas deste extrato revelaram a presença de uma série de triterpenos pentacíclicos, dentre eles uma mistura de dois isômeros, a  $\alpha$ -amirina e a  $\beta$ -amirina (figura 1) (Recio *et al.*, 1995). A  $\alpha$ -amirina demonstrou atividade antiinflamatória quando avaliada em modelos de inflamação tópica induzidas por TPA por diminuir a formação de edema, o influxo de leucócitos polimorfonucleares, e a expressão da citocina IL-1 $\beta$  (Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005). Já a mistura 1:1 dos dois triterpenos ( $\alpha,\beta$ -amirina) demonstrou antinocicepção em nível periférico, espinhal e supra-espinhal em roedores por inibir as vias da proteína quinase A e C (PKA e PKC) (Otuki, Vieira-Lima *et al.*,

2005). Recentemente, foi demonstrado que a diminuição dos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) através da inibição da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), via inibição das proteínas quinases ERK, p38 MAPK e PKC $\alpha$ , e bloqueio da ativação do NF- $\kappa$ B parece ser o principal mecanismo envolvido nas ações antiinflamatórias tópicas da  $\alpha$ - $\beta$  amirina (Medeiros *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Estrutura química dos dois triterpenos pentacíclicos,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, isoladas da resina da *Protium kleinii*.

A  $\alpha,\beta$ -amirina isolada das resinas da planta *Protium heptaphyllum* também demonstrou ser eficaz na proteção contra o dano hepático induzido pelo acetaminofeno (Oliveira, Chaves *et al.*, 2005), na atenuação da dor aguda e da dor visceral induzida pela capsaicina (Oliveira, Costa *et al.*, 2005) e em outros modelos de dor visceral (Lima-Junior *et al.*, 2006), além de uma possível atividade ansiolítica e antidepressiva (Aragao *et al.*, 2006).

Tendo em vista a crescente necessidade de novas terapias para o tratamento de IBD e a atividade antiinflamatória exercida pela  $\alpha,\beta$ -amirina e a sua interação com várias vias de sinalização da resposta inflamatória, o presente trabalho propôs avaliar se a  $\alpha,\beta$ -amirina administrada

sistemicamente possui atividade antiinflamatória e imunomodulatória sobre o modelo de colite induzida pelo TNBS e alguns dos possíveis mecanismos de ação que porventura estariam envolvidos.

# **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Investigar através de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular o possível efeito antiinflamatório e imunomodulador da  $\alpha,\beta$ -amirina, no modelo de colite experimental induzido pelo TNBS em camundongos e comparar seus efeitos com a dexametasona.

### 2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar, através de estudos *in vivo*, o efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o modelo de colite curativa induzida pelo TNBS.

2.2. Investigar alguns dos mecanismos que podem estar relacionados com o possível efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina.

2.3. Avaliar, através de estudos *in vivo*, o efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a homeostase do sistema imune de camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## MATERIAIS E MÉTODOS

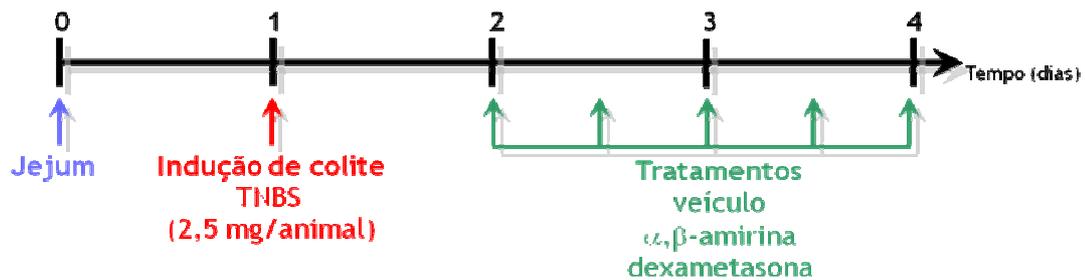
### 1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando entre 35 - 40 g, camundongos *wild type* C57BL/6 pesando entre 25 - 30 g e camundongos IL-10<sup>-/-</sup> C57BL/6 obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 °C) e com ciclo de 12 horas claro-escuro e tiveram livre acesso à água e ração. Os animais permaneceram sob essas condições por no mínimo duas semanas para aclimatização antes de serem incluídos em algum grupo experimental. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo comitê de ética local (processo número 262/CEUA e 23080.035334/2003-16/UFSC).

### 2. Indução de Colite

A colite experimental foi induzida conforme descrito originalmente para ratos (Wallace *et al.*, 1989) e modificado para camundongos (McCafferty *et al.*, 1999) com poucas adaptações às nossas condições experimentais (Hara *et al.*, 2007). Após 24h de jejum sólido, utilizando uma grade no fundo da caixa para evitar a coprofagia, e com livre acesso a solução de glicose 5% os animais foram aleatoriamente divididos em grupos. Após o período de jejum os animais foram anestesiados com xilaizina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (80 mg/kg, i.p.) e a indução de colite foi realizada através da administração intracolônica de 0,1 ml de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS; 2,5 mg em 50% etanol). Os animais controle receberam 0,1 ml de uma solução

salina 0.9 %. Após indução de colite os animais foram mantidos em posição inclinada a 45° por dois minutos. Decorridas 4h, os animais passaram a ter livre acesso a comida e água filtrada.



**Figura 2. Protocolo experimental.** Após 24 h de jejum os animais receberam 2,5 mg de TNBS em 100 µl via intracolônica. Os animais controle receberam 100 µl de salina 0,9 %. Vinte e quatro horas após a indução, quando o quadro de colite aguda já estava instalado, iniciaram-se os tratamentos.

### 3. Tratamentos

Para avaliar os efeitos terapêuticos da administração de diferentes doses de  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a colite experimental induzida pelo TNBS, a mistura 1:1 de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina foi isolada como previamente descrito (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005), diluída em 5 % de Tween 80 e 5 % de etanol momentos antes do uso e administrada duas vezes ao dia, tendo início 24 h após a indução de colite (figura 2). Setenta e duas horas após a indução de colite e 4 h após o último tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Com o objetivo de investigarmos os mecanismos envolvidos no efeito curativo da  $\alpha,\beta$ -amirina, a dose mais efetiva (3 mg/kg, i.p.) foi utilizada nos

experimentos seguintes. Dexametasona (1 mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo.

#### 4. Escore Macroscópico

Após o sacrifício, a porção final do cólon foi removida, longitudinalmente aberta e cuidadosamente limpa com solução salina 0.9%. A severidade do dano no cólon foi avaliada usando-se uma escala de dano macroscópico conforme tabela publicada por Wallace (1989) para ratos e adaptado para camundongos por McCafferty (1999) com poucas adaptações para as nossas condições experimentais (tabela 1).

Grade numérica	Parâmetros
0	Ausência de danos
1	Hiperemia sem úlceras
2	Hiperemia e espessamento da parede do intestino sem a presença de úlceras.
3	Um sítio de úlceração sem espessamento da parede do intestino.
4	Dois ou mais sítios de úlceração ou inflamação.
5	0,5 cm de inflamação.
6-10	1 cm de inflamação. O escore é aumentado em 1 para cada 0,5 cm de dano observado chegando ao máximo de 10.
0 or 1	Ausência ou presença de diarreia
0 or 1	Ausência ou presença de estreitamento (estreitamento do lúmen dificultando a passagem das fezes).
0,1, or 2	Ausência ou presença de adesão média ou severa.

**Tabela 1.** Grade de escores para avaliação de dano macroscópico na colite induzida por TNBS (Wallace et al., 1989; Mccafferty et al., 1999; Hara et al., 2007).

## 5. Análise Histológica

Em uma nova série de experimentos, 72 h após a administração de TNBS, a porção distal do cólon foi removida e imediatamente fixada em solução de formaldeído 10%. A glândula adrenal, timo e baço foram dissecados, pesados e fixados. Todos os tecidos foram emblocados em parafina e seccionados a uma espessura de 5 µm, transferidos para lâminas de vidro e desparafinizados. Para análise histológica geral, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As amostras foram analisadas em microscópio.

## 6. Escore Microscópico

Após divisão do cólon em regiões distais, médias e proximais, o tecido foi histologicamente analisado em microscópio, com aumento de 200x. A severidade do dano foi avaliada usando-se escala publicada por Neurath (1995) (tabela 2).

Grade Numérica	Descrição
0	Sem sinais de inflamação.
1	Pouca infiltração celular para o tecido.
2	Moderada infiltração celular para o tecido.
3	Grande quantidade de infiltração celular; aumento da densidade vascular; espessamento da parede do intestino.
4	Infiltração transmural; perda de células goblet.

*Tabela 2. Grade de escores para avaliação de dano histológico na colite induzida por TNBS (Neurath et al., 1995).*

## 7. Atividade da Enzima MPO

A migração de neutrófilos para o tecido do cólon foi quantificada indiretamente através da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Os tecidos foram removidos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (pH 4.7), e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi suspenso em tampão 1 gelado (pH 7.4; NaCl 0.1 M; NaPO<sub>4</sub> 0.02 M; Na/EDTA 0.015 M). Foi adicionado então, NaCl 0.2% gelado e após 30 segundos; NaCl 1.6% contendo glicose 5% (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 rpm, 15 minutos a 4°C. O precipitado formado foi suspenso em tampão 2 gelado (pH 5.4; NaPO<sub>4</sub> 0.5 M e 5% de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB), e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 rpm, 15 minutos, 4°C; e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1.6 mM, NaPO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.3 mM. A absorbância foi medida em 650 nm. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o método publicado por Bradford (1976). Os resultados foram expressos em densidade óptica por mg de proteína.

## 8. Dosagem de Citocinas

Os níveis teciduais de IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 foram avaliados de acordo com Francischi (2000) (Francischi *et al.*, 2000) com poucas modificações. Resumidamente, os tecidos foram removidos e homogeneizados com PBS contendo Tween 20 (0.05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0.1 mM, cloreto de

benzometônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. A solução formada foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento da análise. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se *Kits* específicos de ELISA (enzyme immuno sorbent assay) de acordo com as recomendações do fabricante.

### 9. Dosagem de corticosteona

Ao final dos tratamentos os camundongos foram anestesiados com xilazina 10 mg/kg e quetamina 80 mg/kg. Com o objetivo de eliminar os efeitos do estresse sobre a secreção de corticosterona, as amostras de sangue foram retiradas 15 min após a indução da anestesia. Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados usando-se um kit EIA (enzyme immunoassay), de acordo com instruções do fabricante. Todas as amostras de sangue foram coletadas no mesmo período do dia.

### 10. Imunoistoquímica

A expressão do VEGF (C-1) (1:100) e do Phospho-NF-K p65 (Ser 276) (1:50) foi detectada em cortes histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras do tecido do cólon. Os cortes teciduais de espessura de 3 µm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene) a 5 % em acetona, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 1h para fixação dos cortes nas lâminas. Após fixação, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, etanol 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da

peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % e metanol absoluto (v/v), em uma passagem de 20 min, com posterior lavagem através de duas passagens em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M pH 6,0. Após preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em tampão salina fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4).

O anticorpo monoclonal primário anti-VEGF (C1) foi diluído a 1:100, em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos composta por TRIS-NaCl (Tris Base 13,9 g; Tris-HCl 60,6 g; NaCl 87,66 g; pH 7,6) e um reagente comercial bloqueador de reação inespecífica. Após esta etapa, a solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a 37°C durante 1h. A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada, à temperatura

ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase pronto para uso em câmara úmida durante 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com *kit* comercial (através de uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) previamente diluído em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3 %. Após a revelação, foram realizadas a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em ENTELLAN®. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200x e 400x, sendo analisados todos os campos da lâmina. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos.

## 11. Drogas e Reagentes

$\alpha,\beta$ -Amirina (mistura 1:1) foi isolada das resinas da planta *P. kleinii* como descrito previamente, com grau de pureza de 92 % (Otuki et al., 2005a). Dexametasona, brometo de hexadecilmetilamonio, tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio, Tween 20, Tween 80, fluoreto de fenilmetilsulfonil, cloreto de benzametônio, EDTA, aprotinina, eosina tamponada em tampão fosfato, hematoxilina, ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico foram adquiridos

da Sigma (St. Louis, EUA). Formaldeído foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Xilazina foi adquirida da Vetbrands (São Paulo, Brasil) e quetamina da Sespo (São Paulo, Brasil). Reagente de Bradford foi adquirido da Bio-Rad Laboratories (Richmond, EUA). Mouse IL-10 e mouse IL-1beta/IL-1F2 DuoSet *kits* foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Corticosterona EIA *kit* foi adquirido da Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA). O anticorpo monoclonal (mouse) VEGF (C-1) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EUA). O anticorpo monoclonal (rabbit) phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser 276) foi adquirido da Cell Signaling (Boston, EUA). O anticorpo secundário Envision Plus e 3,3-diaminobenzidina foram adquiridos da Dako Cytomation (Carpinteria, EUA).

## 12. Análise Estatística

Todos os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística de dados não paramétricos entre 2 grupos o teste Mann-Whitney U foi utilizado. Para análise de dados não paramétricos entre mais de 2 grupos o teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para dados paramétricos as diferenças estatísticas entre dois grupos o teste t não pareado foi utilizado. A análise estatística entre mais de 2 grupos foi realizada através de ANOVA de uma via seguida do teste Student Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software Graphpad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

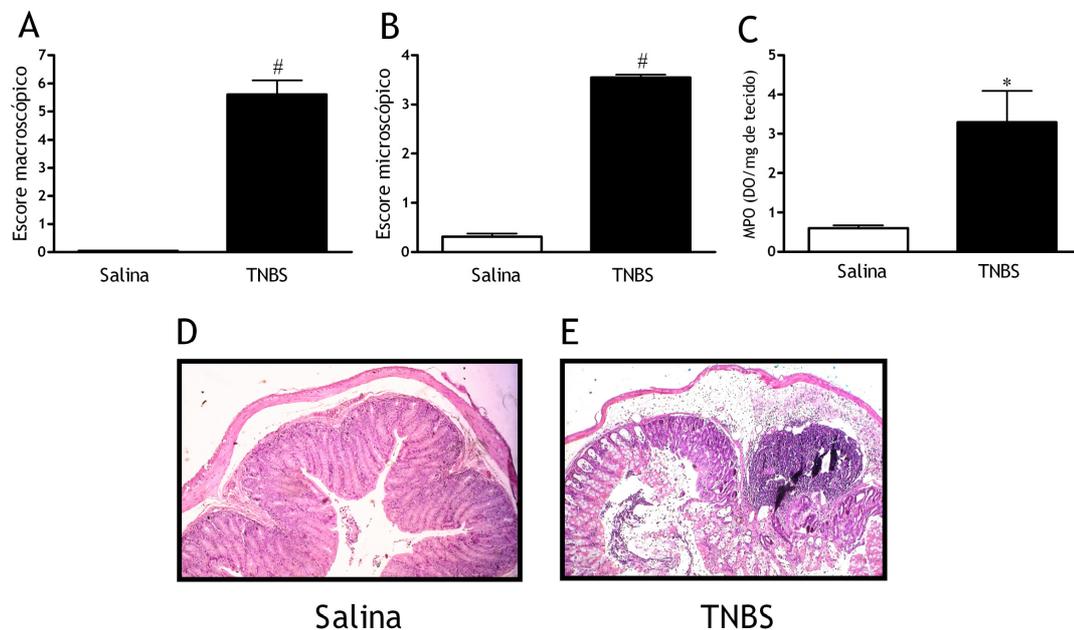
### 1. Caracterização do modelo curativo de colite experimental induzida pelo TNBS

Em uma série inicial de experimentos para se determinar o efeito do TNBS sobre o cólon, a colite experimental foi induzida como descrito previamente e 24 h após a indução os animais foram sacrificados e os escores macro e microscópicos além da atividade da MPO analisados. Como pode ser observado na figura 3A, a administração intracolônica de TNBS causou grande dano elevando o escore macroscópico em 16,8 vezes. Os cortes histológicos revelaram um grande influxo de células polimorfonucleares para o tecido além de um extensivo dano tecidual que elevou o escore em 12,5 vezes (figura 3B e D). O influxo de células polimorfonucleares pôde ser confirmado pela medida da atividade da MPO que foi aumentada em 5,5 vezes (figura 3C).

### 2. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico e a atividade da enzima MPO

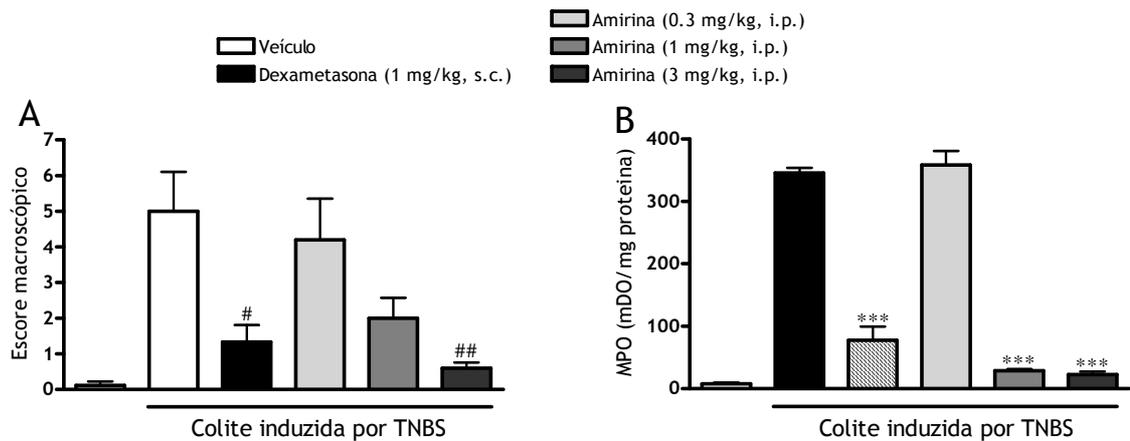
Com o objetivo de se avaliar o efeito do tratamento curativo da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a colite experimental induzida pelo TNBS,  $\alpha,\beta$ -amirina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 0,3; 1 e 3 mg/kg, doses estas baseadas em publicações preliminares (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2007). A dexametasona (1 mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo. O tratamento teve início 24 h após a

indução de colite, quando um quadro de colite aguda já havia se instalado, e foi realizado duas vezes ao dia.



**Figura 3.** Estabelecimento do quadro de colite aguda 24 h após a administração de TNBS. (A) Dano macroscópico. (B) Dano microscópico. (C) Migração de polimorfonucleares, medido indiretamente pela atividade da enzima MPO no tecido do cólon. As colunas representam a média de 3 - 5 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$  (teste Mann-Whitney U). \*  $p < 0.05$  (teste t não pareado). (D-E) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido do cólon fixados em H & E dos grupos salina e TNBS, respectivamente (aumento de 100x).

O tratamento com  $\alpha, \beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) reduziu o dano macroscópico alcançando uma inibição estatisticamente significativo com a dose de 3 mg/kg. As porcentagens de inibição foram  $16,36 \pm 9,64$ ,  $61,36 \pm 11,81$  e  $90,00 \pm 3,34$  %, respectivamente. O tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p., 2x/dia) também foi eficaz em inibir esse parâmetro com porcentagem de inibição de  $75,00 \pm 9,64$  % (figura 4A).



**Figura 4. Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico e a infiltração de células polimorfonucleares no cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. (A) Dano macroscópico. (B) Migração de polimorfonucleares, avaliado indiretamente pela atividade da enzima MPO no tecido do cólon. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$  comparado ao grupo salina + TNBS (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn); \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc Newman-Keuls).**

O acúmulo de células polimorfonucleares, indicado pela atividade da MPO no tecido do cólon, foi 45 vezes maior em animais com colite experimental do que em animais controle. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina nas doses de 1 e 3 mg/kg (i.p., 2x/dia) inibiu de maneira marcante a atividade da MPO. As porcentagens de inibição foram  $90,95 \pm 0,74$  e  $93,34 \pm 1,37$  %, respectivamente. A dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) inibiu também a atividade da enzima MPO com porcentagem de inibição de  $76,95 \pm 6,35$  (figura 4B).

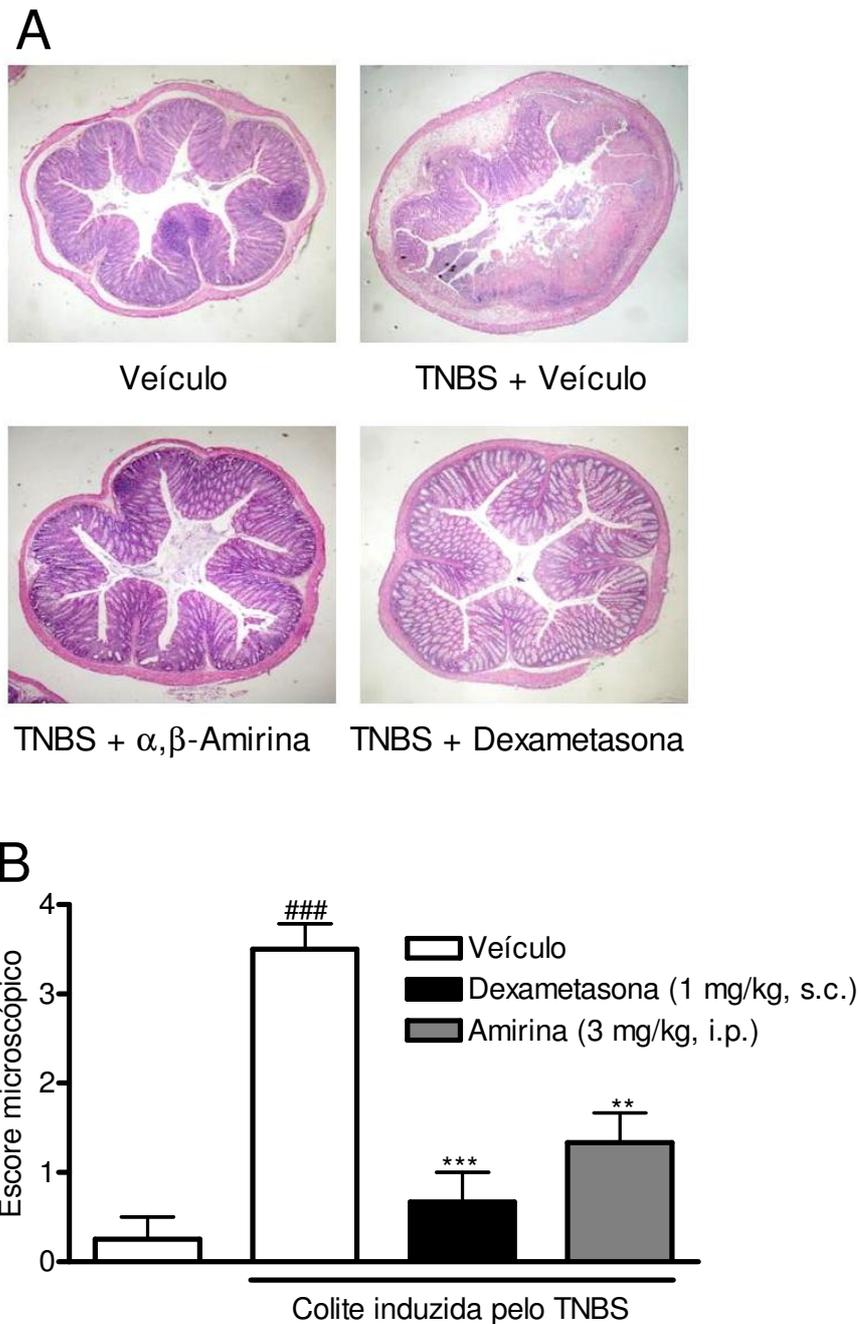
Baseado na eficácia da  $\alpha,\beta$ -amirina em melhorar o dano macroscópico e a atividade da MPO no tecido do cólon,  $\alpha,\beta$ -amirina foi administrada na dose de 3 mg/kg nos próximos experimentos com o objetivo de investigar alguns dos mecanismos que medeiam seu efeito antiinflamatório.

### **3. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano microscópico**

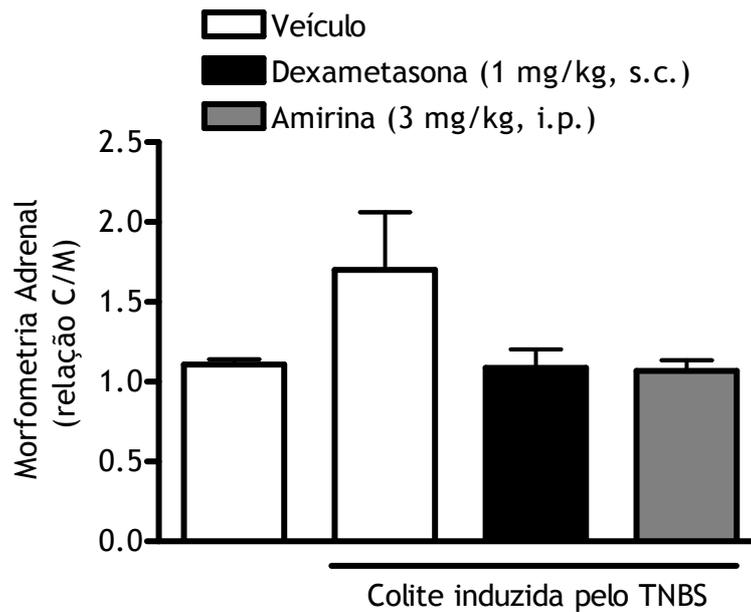
Como pode ser observado na figura 5A, imagens histológicas de animais controle, não mostraram, ou mostram de maneira muito discreta, sinais de infiltração de células polimorfonucleares para o tecido do cólon. Em contraste, após a administração de TNBS toda a parede do cólon se tornou espessa e com sinais de distorção das criptas, perda de células goblet e infiltração de mono e polimorfonucleares. A administração de  $\alpha,\beta$ -amirina na dose de 3 mg/kg (i.p., 2x/dia) demonstrou grande eficácia, reestabelecendo quase aos níveis normais o dano histológico. A porcentagem de inibição foi de  $61,9 \pm 9,52\%$ . O tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) também foi eficaz em reduzir o dano microscópico do cólon com porcentagem de inibição de  $80,95 \pm 9,52\%$  (figura 5B).

### **4. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfometria da glândula adrenal**

A análise morfológica da glândula adrenal 72 h após a indução de colite mostrou discreta hipervascularização e hiperplasia cortical, o que se traduz pelo aumento da relação córtex/medula corticosterona (figura 6). Estas características foram revertidas pelo tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina e com dexametasona.



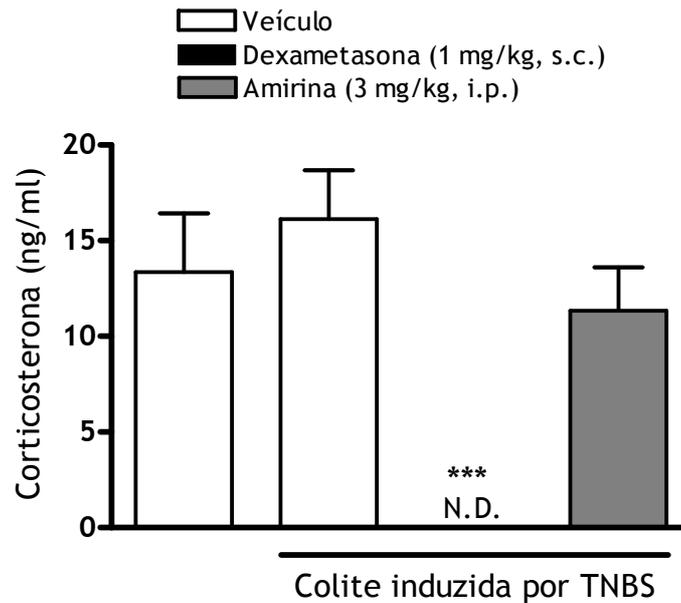
**Figura 5.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano microscópico do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. (A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido do cólon fixados em H & E (aumento de 100 X). (B) Escore microscópico. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. ###  $p < 0.001$  comparado ao grupo salina + TNBS (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn).



**Figura 6.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfologia da glândula adrenal de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina; \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

## 5. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis plasmáticos de corticosterona

Os níveis séricos de corticosterona, o principal glicocorticoide produzido pelo córtex adrenal de camundongos, foram completamente abolidos pelo tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) como esperado. Interessantemente, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) não afetou de modo significativo a liberação de corticosterona (figura 7).



**Figura 7.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de corticosterona no plasma de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

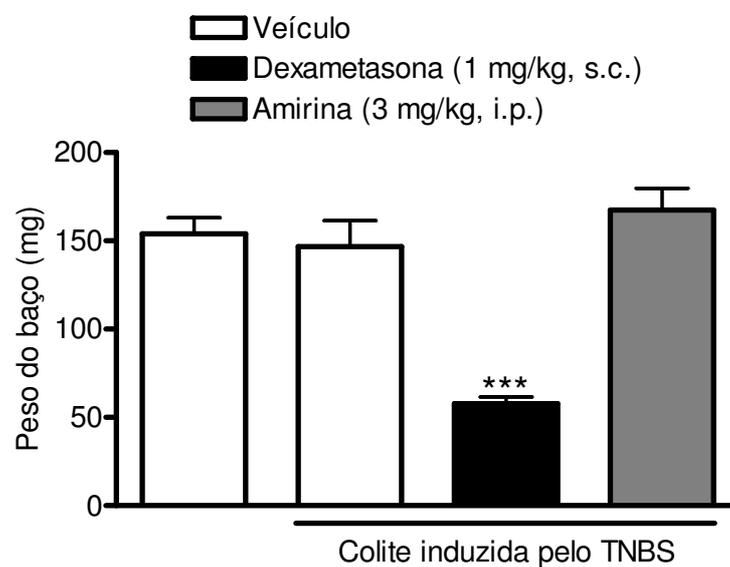
## 6. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o peso do baço

O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) não afetou o peso do baço, no entanto, o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) reduziu o peso do baço em  $62,51 \pm 2,56$  % em comparação com animais controle.

## 7. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a morfologia do timo

Observamos uma alteração muito mais pronunciada na morfologia do timo em relação ao baço. Animais com colite experimental induzida pelo TNBS

apresentaram depleção de timócitos no córtex do timo, característica esta que foi completamente prevenida pelo tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia). Nos animais tratados com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia), os limites entre o córtex e a medula estavam pouco nítidos, com evidência de celularidade medular reduzida em relação ao timo dos animais com colite, com parcial recuperação dos timócitos no córtex (figura 10).

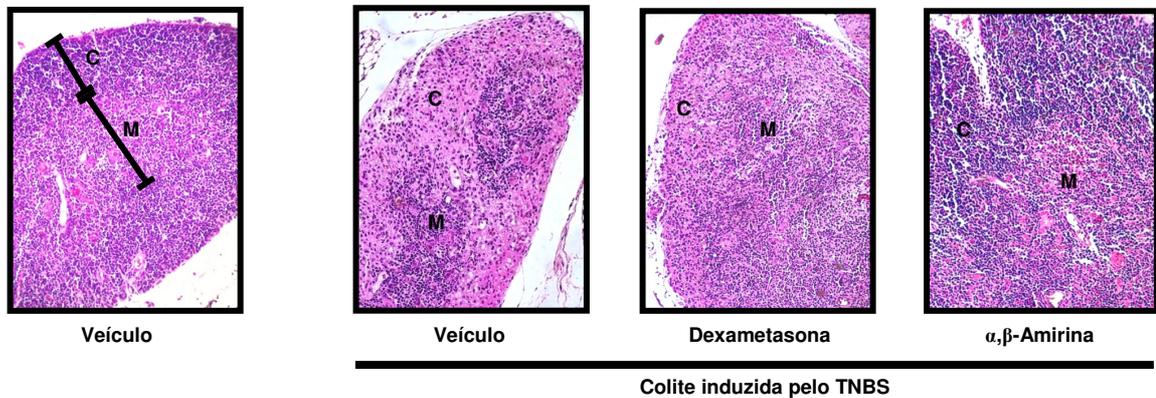


**Figura 8.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o peso do baço de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 6 - 8 animais e as barras verticais o erro padrão da média. \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao grupo salina (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

## 8. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis teciduais de IL-1 $\beta$

Nos animais com colite experimental induzida pelo TNBS o nível dessa citocina demonstrou estar aumentada em cerca de 2 vezes. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) reduziu em  $85,98 \pm 34,36$  % os níveis dessa

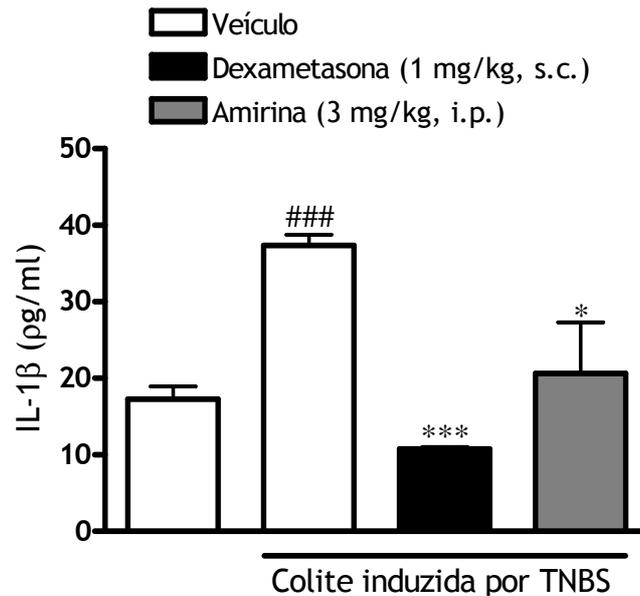
citocina. A dexametasona reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  abaixo dos níveis basais. (figura 11).



*Figura 10. Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a estrutura do timo de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido do cólon fixados em H & E (aumento de 100 X).*

### 9. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis teciduais de IL-10

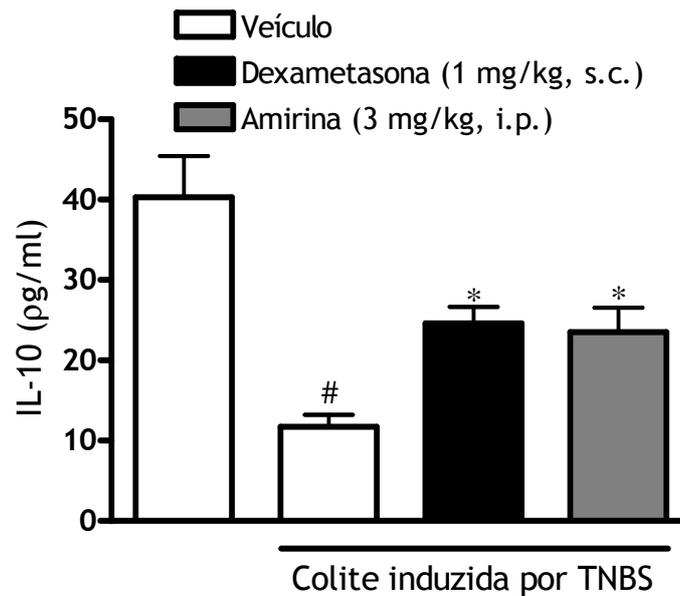
Em animais com colite experimental induzida pelo TNBS a expressão dessa citocina foi suprimida em 2,7 vezes. Tanto o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) quanto o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) foram capazes de recuperar os níveis de IL-10. A porcentagem de recuperação da produção dessa citocina para a  $\alpha,\beta$ -amirina foi de  $64,01 \pm 9,96 \%$  e para a dexametasona foi de  $58,52 \pm 15,23 \%$  (Figura 12).



**Figura 10.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de IL-1 $\beta$  no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. ###  $p<0.001$  comparado ao grupo salina; \*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

#### 10. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico em camundongos IL-10 $^{-/-}$

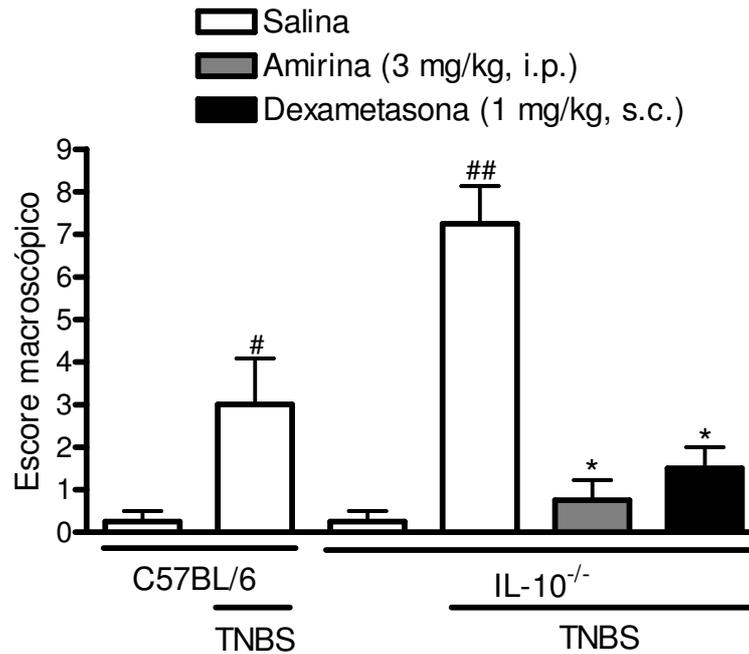
Na figura 13 observamos que a administração de TNBS em camundongos IL-10 $^{-/-}$  causa um dano macroscópico 2,5 vezes maior do que em animais C57BL/6 que servem como controle para os animais IL-10 $^{-/-}$ . O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) assim como o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) foram capazes de reduzir o dano macroscópico induzido pelo TNBS. As porcentagens de inibição foram  $92,85 \pm 6,84$  para a  $\alpha,\beta$ -amirina e  $82,14 \pm 7,14$  % para a dexametasona.



**Figura 11.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre os níveis de IL-10 no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina; \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

## 11. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão de VEGF

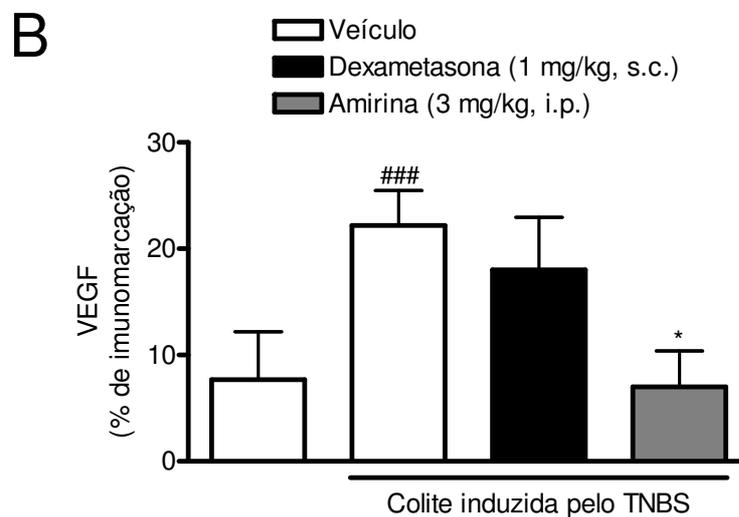
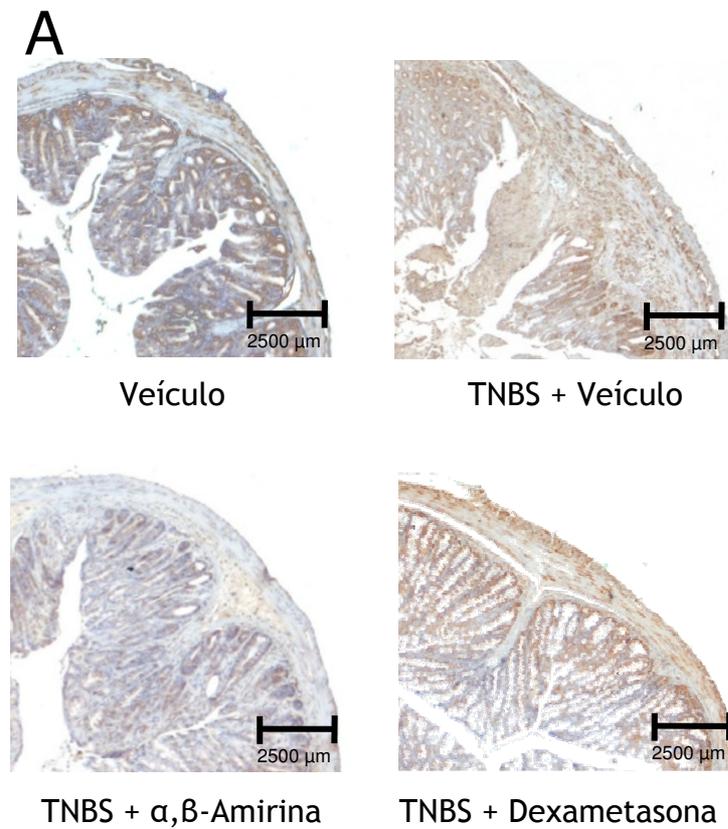
A expressão de VEGF foi mais de 2 vezes maior em animais com colite induzida pelo TNBS do que em animais controle. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia), mas não o tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) reduziu de modo significativo a expressão de VEGF aos níveis basais como demonstrado na figura 14.



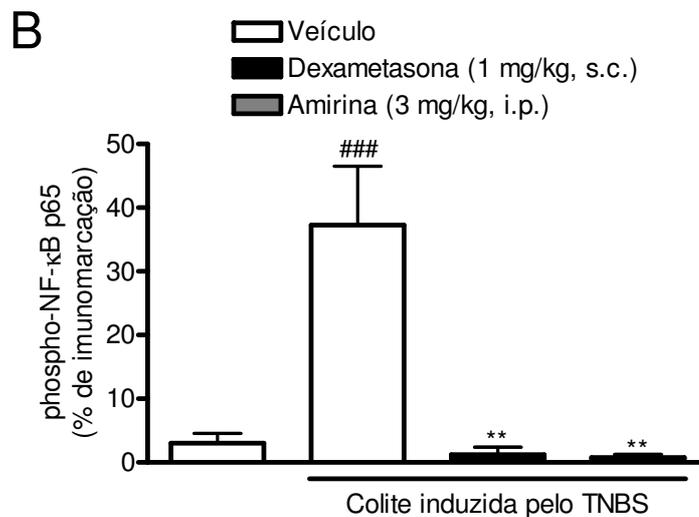
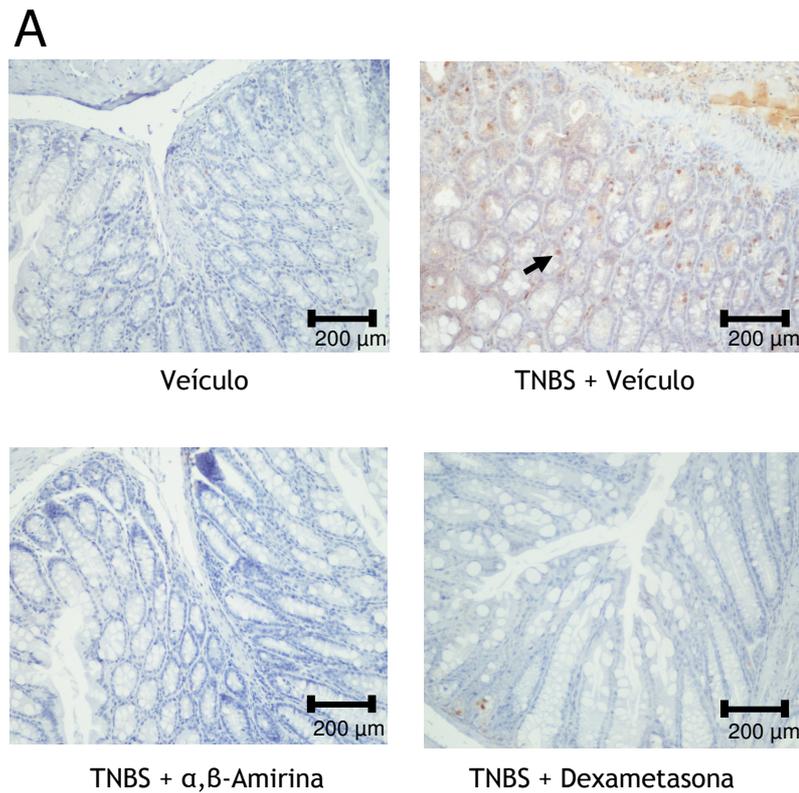
**Figura 12.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o dano macroscópico do cólon de animais IL-10<sup>-/-</sup> com colite experimental induzida pelo TNBS. Dano macroscópico. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$  comparado ao grupo salina + TNBS (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn); \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post Newman-Keuls).

## 12. Efeito do tratamento curativo com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão da forma fosforilada da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B

Na figura 15 demonstramos uma expressiva ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. Efeito este pôde ser constatado através da análise imunoistoquímica da forma fosforilada do NF- $\kappa$ B p65. A expressão de fosfo-NF- $\kappa$ B p65 no cólon de animais com colite foi cerca de 12 vezes maior do que em animais controle. Ambos os tratamentos com  $\alpha,\beta$ -amirina (3 mg/kg, i.p., 2x/dia) ou dexametasona (1 mg/kg, s.c., 2x/dia) aboliram completamente tal ativação.



**Figura 13.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão de VEGF no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina; \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).



**Figura 14.** Efeito do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão da forma fosforilada do NF- $\kappa$ B no tecido do cólon de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. As colunas representam a média de 4 - 6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. A seta indica a marcação nuclear mais intensa (cor marrom). #  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina; \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina + TNBS (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls).

# **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

IBD é uma doença auto-imune caracterizada por inflamação crônica e destruição tecidual que pode afetar o intestino delgado distal e a mucosa colônica. As duas principais formas conhecidas são a UC e a CD. Ambas causam severos sintomas que acabam por prejudicar a qualidade de vida dos pacientes e sua prevalência é extremamente alta em países industrializados (Hanauer, 2006). A incidência de UC na América do Norte varia de 2,2 a 14,3 casos a cada 100.000 habitantes dependendo da região. Já para a CD a incidência varia de 3,1 a 14,6 casos a cada 100.000 habitantes. Já na Europa, a UC pode afetar cerca de 1,5 a 20,3 pessoas a cada 100.000 habitantes, e os casos de CD podem variar de 0,7 a 9,8 a cada 100.000 habitantes, também dependendo da região. Curiosamente, na América Latina, a incidência tanto de UC quanto de CD é extremamente baixa quando comparada com América do Norte e Europa. Para UC, a ocorrência fica entre 1,2 e 2,2 casos a cada 100.000 habitantes e para CD os índices são ainda menores, de 0 a 0,003 casos a cada 100.000 habitantes. Ambas as doenças são comumente diagnosticadas em indivíduos jovens ou que estão no início da fase adulta. Há uma ligeira predominância de CD entre mulheres enquanto que os homens são mais predominantes na UC (Loftus, 2004).

Embora a etiologia dessa classe de doenças permaneça incerta, recentes evidências sugerem que as IBD estejam associadas a um desequilíbrio entre mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios, especialmente as citocinas (Sartor, 1996; Sartor e Hoentjen, 2005); e a uma ativação desregulada de algumas vias intracelulares, principalmente a via do NF- $\kappa$ B (Sartor, 2006). O modelo de colite experimental induzido pelo TNBS reproduz

muito das características fisiopatológicas das IBD observadas em humanos. No entanto, é um modelo misto, que exhibe tanto o perfil de CD quanto de UC (Strober *et al.*, 2002).

As terapias disponíveis atualmente para o tratamento dessas doenças não são totalmente adequadas, uma vez que seu uso está associado a importantes efeitos colaterais ou possuem um custo muito elevado. Embora efetivos durante a fase aguda da doença, esses agentes falham em prolongar a remissão da doença. Além do mais, alguns pacientes são resistentes a essas drogas, e em muitos casos, a intervenção cirúrgica se faz necessária (Isaacs *et al.*, 2005; Jakobovits e Travis, 2005).

A classe de medicamentos mais utilizada para o tratamento de IBD é a dos glicocorticóides. Essa classe de drogas possui um amplo mecanismo de ação. Os glicocorticóides influenciam o tráfico de leucócitos e inibem muitas de suas funções (Chrousos, 1992; Chrousos e Gold, 1992; Boumpas *et al.*, 1993; Chrousos *et al.*, 1993). Além disso, suprimem a ativação de células do sistema imune, inibem a produção de citocinas e outros mediadores da inflamação. Essas drogas suprimem a função das células T<sub>H1</sub> e estimulam a apoptose de eosinófilos e células T. Os glicocorticóides inibem também a expressão de moléculas de adesão e de seus receptores (Cronstein *et al.*, 1992). A supressão dos genes que codificam as enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), ciclooxigenase 2 (COX-2) e da isoforma induzida da sintase do óxido nítrico (iNOS), diminui a produção de mediadores lipídicos, prostanóides e do óxido nítrico (Rhen e Cidlowski, 2005). Essa variedade de efeitos antiinflamatórios e imunossupressores os tornam, muitas vezes, uma terapia inviável para inúmeras doenças devido ao enorme número de efeitos colaterais (Boumpas *et*

*al.*, 1993). Neste contexto, o desenvolvimento de uma nova terapia para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e em especial para o tratamento de IBD se faz necessário.

A eficácia do uso de produtos naturais para o tratamento de IBD tem sido amplamente demonstrada na literatura (Wendel *et al.*, 1999; Sugimoto *et al.*, 2002; Ukil *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006). Além do mais, diversos trabalhos têm mostrado a grande eficácia dos triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina sobre diversos modelos de inflamação (Oliveira, Chaves *et al.*, 2005; Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2007). Baseado nessas evidências, o presente trabalho avaliou o efeito do tratamento sistêmico com  $\alpha,\beta$ -amirina, em comparação com o tratamento com a dexametasona, sobre o modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos. Os resultados mostrados no presente trabalho demonstram que o tratamento curativo com  $\alpha,\beta$ -amirina foi tão eficaz quanto o tratamento com dexametasona na redução dos parâmetros inflamatórios causados pela administração intra-retal de TNBS.

De maneira interessante, Otuki *et al.* (2005) demonstraram que a  $\alpha,\beta$ -amirina isolada das resinas da planta *Protium kleinii* não possui afinidade pelo receptor de glicocorticóide, descartando assim, a hipótese de que os efeitos observados pelo seu tratamento seja devido a ativação do GR. Uma de nossas hipóteses era a de que o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina estaria interferindo diretamente com a liberação de corticóide endógeno pela glândula adrenal ou indiretamente através da indução de outras moléculas uma vez que diversos trabalhos demonstram que vários mediadores podem interferir com a atividade do eixo HPA, aumentando ou diminuindo a secreção de hormônios e

corticóides (Bernardini *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1990; Vankelecom *et al.*, 1990; Imura *et al.*, 1991; Mastorakos *et al.*, 1993). O eixo adrenocorticotrófico está intimamente relacionado à imunomodulação, constituindo um sistema chave para a homeostase do sistema imune, denominado sistema neuro-imuno-endócrino. Em condições fisiológicas, o hormônio hipofisário ACTH estimula a secreção adrenal basal de corticoesteróides, e esta por sua vez exerce um retro-controle hipotálamo-hipofisário (Krieger e Mellinger, 1971). A secreção de corticosterona atua sobre a resposta imune inata e sobre a resposta imune específica mediada por células T, inibindo a migração de linfócitos e reduzindo a produção de anticorpos (Michael e Chapman, 1990). Nossos resultados demonstram, no entanto, que o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina não alterou os níveis séricos de corticosterona e nem causou alteração na morfologia da glândula adrenal quando comparado com grupo controle. Em contraste, o tratamento com dexametasona reduziu para níveis indetectáveis a corticosterona no soro dos animais.

Outra ação indesejável no efeito imunossupressor exercido pelos glicocorticóides é a indução de apoptose de populações de células T especialmente no timo, onde as células T provenientes da medula óssea sofrem o processo de maturação, e no baço, órgão linfóide secundário, onde as APCs encontram um ambiente favorável para apresentar antígenos para as células T maduras (Cidlowski *et al.*, 1996; Rhen e Cidlowski, 2005). Com base nesses dados foi analisado se o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina poderia interferir com a morfometria do baço e do timo de animais com colite experimental induzida pelo TNBS. Surpreendentemente, e de maneira contrária a

dexametasona, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina não alterou a relação córtex-medula em relação a celularidade e também não interferiu com o peso do baço dos animais. A ausência desses efeitos imunossupressores após o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina parece ser o grande diferencial dessa molécula.

Diversos fatores, sendo eles bioquímicos, genéticos ou ambientais, estão relacionados com o desenvolvimento de IBD. Dentre esses fatores, o desequilíbrio entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias vem ganhando destaque nos últimos anos (Radford-Smith e Jewell, 1996; Sartor, 1996; Sartor e Hoentjen, 2005). O aumento da permeabilidade do epitélio intestinal a antígenos e bactérias é um dos fatores que determinam o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Em meados da década passada Hilsden *et al.* (1996) demonstraram que parentes de primeiro grau sadios de pacientes com doença de Crohn possuíam a permeabilidade do epitélio intestinal exageradamente aumentada. Em situações em que a flora normal cruza o epitélio intestinal em grandes quantidades pode haver o desenvolvimento de uma inflamação crônica mediada por células T. Recentes dados sugerem que a liberação de  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{TNF}\alpha$  sejam os responsáveis pela ruptura da barreira epitelial. No entanto, os mecanismos pelos quais isso ocorreria não estão completamente elucidados (Wang *et al.*, 2006). Nossos resultados confirmam os dados da literatura, uma vez que observamos um aumento expressivo dos níveis da citocina  $\text{IL-1}\beta$  e uma também expressiva diminuição dos níveis da citocina  $\text{IL-10}$  em animais com colite experimental induzida pelo TNBS. Em nosso modelo não conseguimos detectar o aumento da citocina  $\text{TNF}\alpha$  72 h após a indução de colite. Embora esta seja considerada

uma das citocinas mais importantes na patogênese das IBD, nem todos os pesquisadores conseguem detectar seu aumento (Youngman *et al.*, 1993)

As células apresentadoras de antígeno (APC) são as responsáveis por reconhecer os antígenos, através de receptores de reconhecimento padrão (PRR). Os PRR's reconhecem estruturas conservadas de vírus e bactérias (PAMP) e geralmente ativam vias pró-inflamatórias alertando o hospedeiro quanto a infecção (Philpott e Girardin, 2004). Neste processo, duas classes desses receptores estão envolvidas: os receptores toll-like (TLR) e as moléculas com domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD). Os TLR's estão usualmente presentes nas membranas celulares e possuem um domínio de reconhecimento externo rico em leucina e um domínio de sinalização interno (Takeda e Akira, 2004). Já os CARD's estão presentes no citosol de células epiteliais e células imunes. Essas proteínas também possuem um domínio C-terminal rico em leucina. O domínio de ativação e recrutamento de caspases está presente no domínio N-terminal (Inohara *et al.*, 2003).

O reconhecimento dos PAMP's pelos PRR's induz a expressão de moléculas co-estimulatórias, como a CD80 e a CD86, e do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHCII) na superfície das células apresentadoras de antígenos. Uma vez reconhecidos, os antígenos sofrem o processo de endocitose onde são fagocitados e apresentados às células T pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) do tipo II (Janeway e Medzhitov, 2002; Steinman, 2003). A citocina IL-10 reduz drasticamente a expressão das moléculas MHCII, o que por sua vez reduz a capacidade de apresentação de antígenos diminuindo a proliferação das

células T (De Waal Malefyt *et al.*, 1991). Outro mecanismo importante na ação anti-inflamatória da IL-10 é a inibição da atividade do NF- $\kappa$ B. Essa inibição acontece por inibição da atividade da IKK, a enzima que fosforila as moléculas de I $\kappa$ B, e por inibição do NF- $\kappa$ B que já se encontra no núcleo da célula (Driessler *et al.*, 2004). O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina recuperou os níveis de IL-10, o que nos permite sugerir que este é um dos mecanismos pela qual ela exerce seus efeitos. No entanto, esse não parece ser o único mecanismo, uma vez que ela foi capaz de reduzir o dano macroscópico do cólon de animais IL-10<sup>-/-</sup> com colite experimental com a mesma eficácia que em animais Swiss.

A ativação do NF- $\kappa$ B também tem sido demonstrada como o fator chave para o desenvolvimento da inflamação crônica e perpetuação da resposta inflamatória local durante as IBD (Rogler *et al.*, 1998; Sartor, 2006). O NF- $\kappa$ B, quando ativado, promove a expressão de vários mediadores inflamatórios, dentre eles as citocinas pró-inflamatórias (Kopp e Ghosh, 1995). A ativação do NF- $\kappa$ B promove também a expressão de VEGF, o que por sua vez estimula a angiogênese (Stifter, 2006). A importância desta molécula para as IBD foi demonstrada em dois estudos clínicos, onde foi observado que pacientes com IBD possuíam um aumento nos níveis séricos (Griga *et al.*, 1998) e na mucosa colônica (Griga *et al.*, 2002) da mesma. Em nosso trabalho foi possível observar um aumento expressivo na expressão de VEGF na mucosa colônica, confirmando os dados da literatura. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina reduziu a expressão de VEGF e praticamente aboliu a ativação do NF- $\kappa$ B. Esses resultados nos permitem sugerir, então, que a diminuição dos níveis da citocina IL-1 $\beta$  associado a recuperação dos níveis de IL-10 estaria modulando

negativamente a ativação do NF- $\kappa$ B, o que por sua vez estaria diminuindo a expressão de VEGF e até mesmo da própria citocina IL-1 $\beta$ .

A migração celular é um dos passos mais importantes do processo inflamatório. Células efectoras e regulatórias chegam ao intestino através de um mecanismo altamente seletivo que envolve a interação com o endotélio vascular, diapedese através da parede do vaso e migração para a lamina própria (Williams, 2004). Citocinas inflamatórias, tais como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais que promoverão a adesão de neutrófilos e monócitos circulantes ao endotélio inflamado (Smythies *et al.*, 2005). Diversos tipos de células, inclusive aquelas que migram para o tecido, são capazes de produzir e secretar IL-1 $\beta$ . Dentre essas células estão os monócitos/macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. A função da IL-1 $\beta$  é ativar células imunes e inflamatórias (Dinarello, 1994). Diversos trabalhos têm demonstrado que os níveis desta citocina encontram-se elevados em lesões inflamatórias de pacientes com IBD (Mahida *et al.*, 1989; Ligumsky *et al.*, 1990; Isaacs *et al.*, 1992; Youngman *et al.*, 1993; Casini-Raggi *et al.*, 1995; Radford-Smith e Jewell, 1996; Reimund *et al.*, 1996; Andus *et al.*, 1997).

O tratamento com  $\alpha$ , $\beta$ -amirina praticamente aboliu o influxo de células polimorfonucleares para o tecido. Essa drástica diminuição pode ser explicada pela diminuição da expressão do VEGF que estaria diminuindo a angiogênese. A abolição da ativação do NF- $\kappa$ B, por sua vez, estaria diminuindo a expressão de moléculas de adesão, tão importantes para a migração celular, um mecanismo que ainda precisa ser avaliado. Por sua vez, a diminuição do

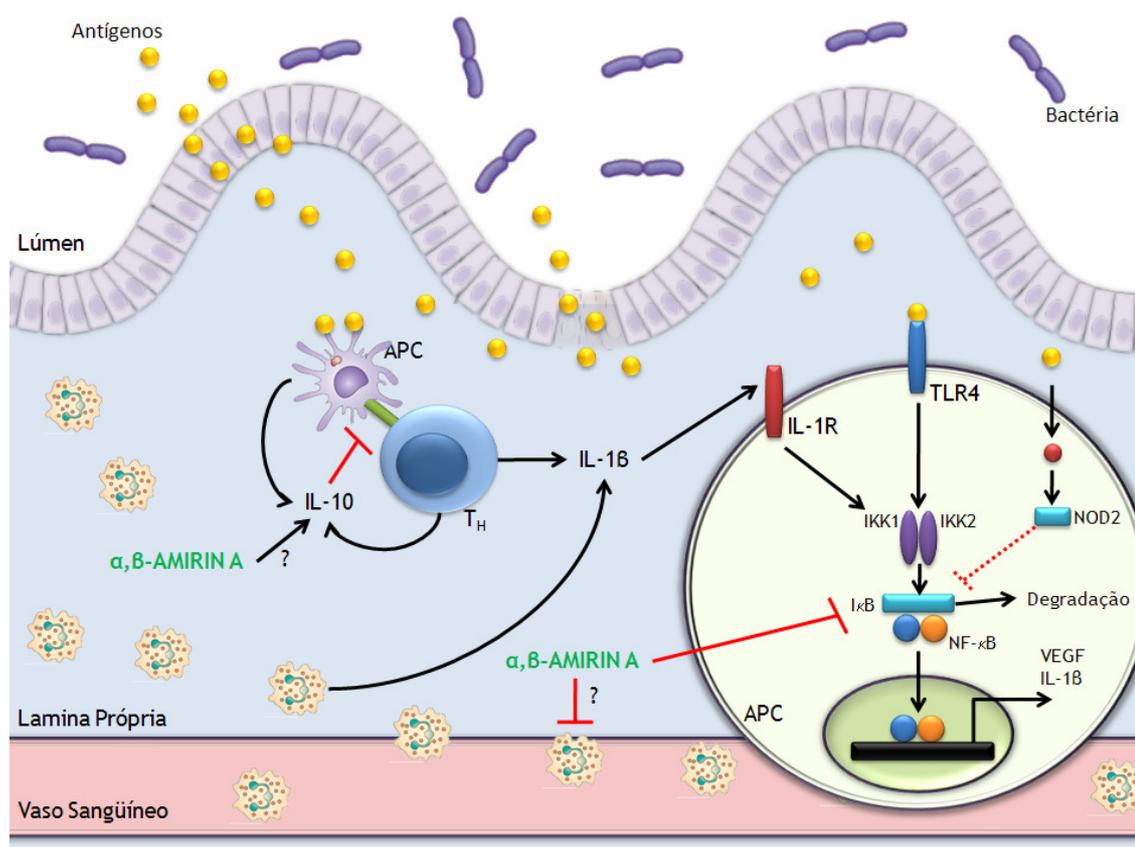
influxo de células inflamatórias para o tecido estaria contribuindo para a diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias, como a IL-1B.

Nos últimos anos diversas linhas de pesquisa têm direcionado esforços em novas terapias para IBD. Uma das estratégias inclui os receptores PPAR $\gamma$ . O PPAR $\gamma$  é um receptor nuclear inicialmente identificado pelo seu papel na regulação de genes envolvidos no metabolismo e na diferenciação de adipócitos (Schoonjans *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* mostram que a ativação desse receptor é capaz de suprimir a resposta inflamatória por inibir a produção de citocinas e quimiocinas secretadas por células epiteliais e mielóides. No entanto, os mecanismos moleculares dessa supressão permanecem desconhecidos (Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 1999). Alguns trabalhos recentemente publicados mostram que agonistas PPAR $\gamma$  são capazes de atenuar a colite em modelos animais e por esse motivo têm recebido atenção especial (Su *et al.*, 1999; Desreumaux *et al.*, 2001). Este pode ser mais um possível alvo na ação anti-inflamatória da  $\alpha,\beta$ -amirina e sua interação com este receptor merece ser investigado.

Em conclusão, este trabalho avaliou a ação anti-inflamatória sistêmica do triterpeno pentacíclico  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a colite experimental induzida pelo TNBS. Nossos resultados demonstraram que a  $\alpha,\beta$ -amirina foi tão eficaz quanto a dexametasona em reverter os danos macro e microscópicos e nos permitem sugerir que através da diminuição dos níveis da citocina IL-1 $\beta$ , o que por sua vez reduziu a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Em consequência disso, a expressão do VEGF e o influxo de células inflamatórias também foi reduzido. Quanto a citocina IL-10, a recuperação de seus níveis sugere que a expressão das moléculas MHC-II esteja diminuída, reduzindo a

eficiência das APCs em apresentar antígenos. De forma relevante, observamos que o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina, em contraste com a dexametasona, não exibiu nenhum efeito imunossupressor.

Com base nesses resultados, sugerimos que a  $\alpha,\beta$ -amirina pode ser de grande potencial terapêutico para o tratamento de IBD uma vez que foi capaz de inibir algumas vias importantes para o desenvolvimento dessa patologia. O grande diferencial dessa molécula é a ausência de efeitos imunossupressores sobre a liberação de corticosterona, a relação de celularidade córtex-medula no timo e o peso do baço.



**Figura 15.** Possível mecanismo de ação da  $\alpha,\beta$ -amirina na colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos. O epitélio intestinal possui células com características especiais chamadas células M. Essas células constantemente transportam antígenos do lúmen para as placas de Peyer onde são reconhecidos por células dendríticas (APC). Quando uma grande quantidade de antígenos cruza a barreira epitelial uma ativação maciça de células T

*auxiliares ( $T_H$ ) pode ocorrer. As APC, através de PRRs, reconhecem esses antígenos que são englobados através de um processo chamado endocitose. A ativação de um PRR leva à ativação do NF- $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B requer a fosforilação da proteína inibitória I $\kappa$ B e sua conseqüente degradação proteolítica, liberando assim o NF- $\kappa$ B para migrar para o núcleo onde promoverá a transcrição gênica de mais de 200 genes, dentre eles citocinas inflamatórias, como o VEGF, quimiocinas e moléculas de adesão. Uma vez que os antígenos são processados, seus fragmentos são apresentados às células  $T_H$  que sofrem um processo de ativação e conseqüente liberação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-18. Ao se ligar ao seu receptor na superfície de diversos tipos celulares, cascatas intracelulares são desencadeadas culminando, também, na ativação do NF- $\kappa$ B. As quimiocinas são fatores quimiotáticos que induzirão a migração celular para o tecido inflamado. O VEGF promoverá a angiogênese, ou seja, o crescimento de novos vasos, auxiliando no processo de migração celular. As células que migrarem para o tecido secretarão mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que alimentam o processo inflamatório, o tornando crônico. Ao recuperar os níveis de IL-10, a  $\alpha$ , $\beta$ -amirina diminuiu a ativação de células T. Com a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, a síntese e expressão de mediadores inflamatórios também sofrerão redução.*

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, B. B. e R. K. Puri. **Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy**. Boston: Blackwell. 2004

Andus, T.; R. Daig; D. Vogl; E. Aschenbrenner; G. Lock; S. Hollerbach; M. Kollinger; J. Scholmerich e V. Gross. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa--association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2. **Gut**, v.41, n.5, Nov, p.651-7. 1997.

Andus, T.; S. R. Targan; R. Deem e H. Toyoda. Measurement of tumor necrosis factor alpha mRNA in small numbers of cells by quantitative polymerase chain reaction. **Reg Immunol**, v.5, n.1, Jan-Feb, p.11-7. 1993.

Aragao, G. F.; L. M. Carneiro; A. P. Junior; L. C. Vieira; P. N. Bandeira; T. L. Lemos e G. S. Viana. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol Biochem Behav**, v.85, n.4, Dec, p.827-34. 2006.

Baldwin, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol**, v.14, p.649-83. 1996.

Barnes, P. J. e M. Karin. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v.336, n.15, Apr 10, p.1066-71. 1997.

Bernardini, R.; T. C. Kamilaris; A. E. Calogero; E. O. Johnson; M. T. Gomez; P. W. Gold e G. P. Chrousos. Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. **Endocrinology**, v.126, n.6, Jun, p.2876-81. 1990.

Besedovsky, H. O. e A. Del Rey. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr Rev**, v.17, n.1, Feb, p.64-102. 1996.

Bouhnik, Y.; M. Lemann; J. Y. Mary; G. Scemama; R. Tai; C. Matuchansky; R. Modigliani e J. C. Rambaud. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. **Lancet**, v.347, n.8996, Jan 27, p.215-9. 1996.

Boumpas, D. T.; G. P. Chrousos; R. L. Wilder; T. R. Cupps e J. E. Balow. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann Intern Med**, v.119, n.12, Dec 15, p.1198-208. 1993.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Braegger, C. P.; S. Nicholls; S. H. Murch; S. Stephens e T. T. Macdonald. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, v.339, n.8785, Jan 11, p.89-91. 1992.

Cario, E.; G. Gerken e D. K. Podolsky. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. **Gastroenterology**, v.127, n.1, Jul, p.224-38. 2004.

Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v.9, n.6, Jun, p.653-60. 2003.

Casini-Raggi, V.; L. Kam; Y. J. Chong; C. Fiocchi; T. T. Pizarro e F. Cominelli. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **J Immunol**, v.154, n.5, Mar 1, p.2434-40. 1995.

Chen, Z. J.; L. Parent e T. Maniatis. Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, v.84, n.6, Mar 22, p.853-62. 1996.

Cheng, H.; B. Xia; L. Zhang; F. Zhou; Y. X. Zhang; M. Ye; Z. G. Hu; J. Li; J. Li; Z. L. Wang; C. Li e Q. S. Guo. Matrine improves 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Pharmacol Res*, v.53, n.3, Mar, p.202-8. 2006.

Chrousos, G. P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*, v.21, n.4, Dec, p.833-58. 1992.

Chrousos, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*, v.332, n.20, May 18, p.1351-62. 1995.

Chrousos, G. P.; S. D. Detera-Wadleigh e M. Karl. Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann Intern Med*, v.119, n.11, Dec 1, p.1113-24. 1993.

Chrousos, G. P. e P. W. Gold. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, v.267, n.9, Mar 4, p.1244-52. 1992.

Cidlowski, J. A.; K. L. King; R. B. Evans-Storms; J. W. Montague; C. D. Bortner e F. M. Hughes, Jr. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog Horm Res*, v.51, p.457-90; discussion 490-1. 1996.

Clauss, M.; M. Gerlach; H. Gerlach; J. Brett; F. Wang; P. C. Familletti; Y. C. Pan; J. V. Olander; D. T. Connolly e D. Stern. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*, v.172, n.6, Dec 1, p.1535-45. 1990.

Corrêa, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1. 1984. 82 p. (Imprensa Nacional)

Cottone, M.; F. Mocciaro e I. Modesto. Infliximab and ulcerative colitis. **Expert Opin Biol Ther**, v.6, n.4, Apr, p.401-8. 2006.

Cronstein, B. N.; S. C. Kimmel; R. I. Levin; F. Martiniuk e G. Weissmann. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.21, Nov 1, p.9991-5. 1992.

Davidson, N. J.; M. M. Fort; W. Muller; M. W. Leach e D. M. Rennick. Chronic colitis in IL-10<sup>-/-</sup> mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. **Int Rev Immunol**, v.19, n.1, p.91-121. 2000.

De Waal Malefyt, R.; J. Haanen; H. Spits; M. G. Roncarolo; A. Te Velde; C. Figdor; K. Johnson; R. Kastelein; H. Yssel e J. E. De Vries. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med**, v.174, n.4, Oct 1, p.915-24. 1991.

Desreumaux, P.; L. Dubuquoy; S. Nutten; M. Peuchmaur; W. Englaro; K. Schoonjans; B. Derijard; B. Desvergne; W. Wahli; P. Chambon; M. D. Leibowitz; J. F. Colombel e J. Auwerx. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. **J Exp Med**, v.193, n.7, Apr 2, p.827-38. 2001.

Didonato, J.; F. Mercurio; C. Rosette; J. Wu-Li; H. Suyang; S. Ghosh e M. Karin. Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its

ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, v.16, n.4, Apr, p.1295-304. 1996.

Dinarello, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J*, v.8, n.15, Dec, p.1314-25. 1994.

Dinarello, C. A. e R. C. Thompson. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*, v.12, n.11, Nov, p.404-10. 1991.

Driessler, F.; K. Venstrom; R. Sabat; K. Asadullah e A. J. Schottelius. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol*, v.135, n.1, Jan, p.64-73. 2004.

Dvorak, H. F.; L. F. Brown; M. Detmar e A. M. Dvorak. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, v.146, n.5, May, p.1029-39. 1995.

Feagan, B. G.; R. N. Fedorak; E. J. Irvine; G. Wild; L. Sutherland; A. H. Steinhart; G. R. Greenberg; J. Koval; C. J. Wong; M. Hopkins; S. B. Hanauer e J. W. McDonald. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med*, v.342, n.22, Jun 1, p.1627-32. 2000.

Feagan, B. G.; J. Rochon; R. N. Fedorak; E. J. Irvine; G. Wild; L. Sutherland; A. H. Steinhart; G. R. Greenberg; R. Gillies; M. Hopkins e Et Al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med*, v.332, n.5, Feb 2, p.292-7. 1995.

Fiorentino, D. F.; A. Zlotnik; T. R. Mosmann; M. Howard e A. O'garra. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, v.147, n.11, Dec 1, p.3815-22. 1991.

- Firestein, G. S. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, v.103, n.1, Jan, p.3-4. 1999.
- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, v.285, n.21, Nov 18, p.1182-6. 1971.
- Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, v.1, n.1, Jan, p.27-31. 1995.
- Folkman, J. e Y. Shing. Angiogenesis. *J Biol Chem*, v.267, n.16, Jun 5, p.10931-4. 1992.
- Francischi, J. N.; C. M. Yokoro; S. Poole; W. L. Tafuri; F. Q. Cunha e M. M. Teixeira. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur J Pharmacol*, v.399, n.2-3, Jul 7, p.243-9. 2000.
- Fuss, I. J.; F. Heller; M. Boirivant; F. Leon; M. Yoshida; S. Fichtner-Feigl; Z. Yang; M. Exley; A. Kitani; R. S. Blumberg; P. Mannon e W. Strober. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, v.113, n.10, May, p.1490-7. 2004.
- Gaillard, R. C.; D. Turnill; P. Sappino e A. F. Muller. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology*, v.127, n.1, Jul, p.101-6. 1990.
- Gould, V. E. e B. M. Wagner. Angiogenesis: an expanding universe. *Hum Pathol*, v.33, n.11, Nov, p.1061-3. 2002.
- Griga, T.; B. May; O. Pfisterer; K. M. Muller e F. Brasch. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of

patients with inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.49, n.43, Jan-Feb, p.116-23. 2002.

Griga, T.; A. Tromm; J. Spranger e B. May. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, v.33, n.5, May, p.504-8. 1998.

Guyton, A. C. e J. E. Hall. Gastrintestinal physiology. In: (Ed.). **Textbook of medical physiology**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Gastrintestinal physiology, p.665-676

Haanen, C. e I. Vermes. Apoptosis and inflammation. **Mediators of inflammation**, v.4, n.1, p.5-15. 1995.

Hanauer, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis**, v.12 Suppl 1, Jan, p.S3-9. 2006.

Hara, D. B.; E. S. Fernandes; M. M. Campos e J. B. Calixto. Pharmacological and biochemical characterization of bradykinin B(2) receptors in the mouse colon: Influence of the TNBS-induced colitis. **Regul Pept**, v.141, n.1-3, Jun 7, p.25-34. 2007.

Harries, A. D.; A. Baird e J. Rhodes. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v.284, n.6317, Mar 6, p.706. 1982.

Hilsden, R. J.; J. B. Meddings e L. R. Sutherland. Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.110, n.5, May, p.1395-403. 1996.

Hugot, J. P.; M. Chamaillard; H. Zouali; S. Lesage; J. P. Cezard; J. Belaiche; S. Almer; C. Tysk; C. A. O'morain; M. Gassull; V. Binder; Y. Finkel; A. Cortot; R. Modigliani; P. Laurent-Puig; C. Gower-Rousseau; J. Macry; J. F. Colombel;

M. Sahbatou e G. Thomas. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, n.6837, May 31, p.599-603. 2001.

Imura, H.; J. Fukata e T. Mori. Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.35, n.2, Aug, p.107-15. 1991.

Inohara, N.; Y. Ogura; A. Fontalba; O. Gutierrez; F. Pons; J. Crespo; K. Fukase; S. Inamura; S. Kusumoto; M. Hashimoto; S. J. Foster; A. P. Moran; J. L. Fernandez-Luna e G. Nunez. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. **J Biol Chem**, v.278, n.8, Feb 21, p.5509-12. 2003.

Isaacs, K. L.; J. D. Lewis; W. J. Sandborn; B. E. Sands e S. R. Targan. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. **Inflamm Bowel Dis**, v.11 Suppl 1, Nov, p.S3-12. 2005.

Isaacs, K. L.; R. B. Sartor e S. Haskill. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. **Gastroenterology**, v.103, n.5, Nov, p.1587-95. 1992.

Ito, K.; K. F. Chung e I. M. Adcock. Update on glucocorticoid action and resistance. **J Allergy Clin Immunol**, v.117, n.3, Mar, p.522-43. 2006.

Jakobovits, S. L. e S. P. Travis. Management of acute severe colitis. **Br Med Bull**, v.75-76, p.131-44. 2005.

Janeway, C. A., Jr. e R. Medzhitov. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.197-216. 2002.

Jiang, C.; A. T. Ting e B. Seed. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v.391, n.6662, Jan 1, p.82-6. 1998.

Keating, G. M. e C. M. Perry. Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. **BioDrugs**, v.16, n.2, p.111-48. 2002.

Kojima, K.; M. W. Musch; H. Ren; D. L. Boone; B. A. Hendrickson; A. Ma e E. B. Chang. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v.124, n.5, May, p.1395-407. 2003.

Kopp, E. B. e S. Ghosh. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. **Adv Immunol**, v.58, p.1-27. 1995.

Krieger, I. e R. C. Mellinger. Pituitary function in the deprivation syndrome. **J Pediatr**, v.79, n.2, Aug, p.216-25. 1971.

Lamhonwah, A. M.; J. Skaug; S. W. Scherer e I. Tein. A third human carnitine/organic cation transporter (OCTN3) as a candidate for the 5q31 Crohn's disease locus (IBD5). **Biochem Biophys Res Commun**, v.301, n.1, Jan 31, p.98-101. 2003.

Lapidus, A.; O. Bernell; G. Hellers e R. Lofberg. Clinical course of colorectal Crohn's disease: a 35-year follow-up study of 507 patients. **Gastroenterology**, v.114, n.6, Jun, p.1151-60. 1998.

Lefebvre, M.; B. Paulweber; L. Fajas; J. Woods; C. Mccrary; J. F. Colombel; J. Najib; J. C. Fruchart; C. Datz; H. Vidal; P. Desreumaux e J. Auwerx. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. **J Endocrinol**, v.162, n.3, Sep, p.331-40. 1999.

Leung, D. W.; G. Cachianes; W. J. Kuang; D. V. Goeddel e N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v.246, n.4935, Dec 8, p.1306-9. 1989.

Levy, J. H. The human inflammatory response. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.27 Suppl 1, p.S31-7. 1996.

Lewis, J. D.; J. S. Schwartz e G. R. Lichtenstein. Azathioprine for maintenance of remission in Crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma. **Gastroenterology**, v.118, n.6, Jun, p.1018-24. 2000.

Ligumsky, M.; P. L. Simon; F. Karmeli e D. Rachmilewitz. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease. **Gut**, v.31, n.6, Jun, p.686-9. 1990.

Lima-Junior, R. C.; F. A. Oliveira; L. A. Gurgel; I. J. Cavalcante; K. A. Santos; D. A. Campos; C. A. Vale; R. M. Silva; M. H. Chaves; V. S. Rao e F. A. Santos. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med**, v.72, n.1, Jan, p.34-9. 2006.

Loetscher, P.; G. Pratt e M. Rechsteiner. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis. **J Biol Chem**, v.266, n.17, Jun 15, p.11213-20. 1991.

Loftus, E. V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, n.6, May, p.1504-17. 2004.

Macdonald, T. T. e G. Monteleone. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v.307, n.5717, Mar 25, p.1920-5. 2005.

Madsen, K.; A. Cornish; P. Soper; C. Mckaigney; H. Jijon; C. Yachimec; J. Doyle; L. Jewell e C. De Simone. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v.121, n.3, Sep, p.580-91. 2001.

Maeda, M.; N. Watanabe; H. Neda; N. Yamauchi; T. Okamoto; H. Sasaki; Y. Tsuji; S. Akiyama; N. Tsuji e Y. Niitsu. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.14, n.3, p.451-61. 1992.

Mahida, Y. R.; K. Wu e D. P. Jewell. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. **Gut**, v.30, n.6, Jun, p.835-8. 1989.

Mastorakos, G.; G. P. Chrousos e J. S. Weber. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, n.6, Dec, p.1690-4. 1993.

Mccafferty, D. M.; M. Miampamba; E. Sihota; K. A. Sharkey e P. Kubes. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut**, v.45, n.6, Dec, p.864-73. 1999.

Mcleod, R. S. Surgery for inflammatory bowel diseases. **Dig Dis**, v.21, n.2, p.168-79. 2003.

Medeiros, R.; M. F. Otuki; M. C. Avellar e J. B. Calixto. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol**, v.559, n.2-3, Mar 22, p.227-35. 2007.

Michael, S. D. e J. C. Chapman. The influence of the endocrine on the immune system. In: N. Gleicher (Ed.). **Immunology and Allergy Clinics of**

**North America - Reproductive Immunology:** W.B. Saunders Co., 1990. The influence of the endocrine on the immune system, p.215-233

Mosmann, T. R. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res*, v.10, n.3-4, p.183-8. 1991.

Neurath, M. F.; I. Fuss; B. L. Kelsall; E. Stuber e W. Strober. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*, v.182, n.5, Nov 1, p.1281-90. 1995.

Neutra, M. R.; N. J. Mantis e J. P. Kraehenbuhl. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*, v.2, n.11, Nov, p.1004-9. 2001.

Ogura, Y.; D. K. Bonen; N. Inohara; D. L. Nicolae; F. F. Chen; R. Ramos; H. Britton; T. Moran; R. Karaliuskas; R. H. Duerr; J. P. Achkar; S. R. Brant; T. M. Bayless; B. S. Kirschner; S. B. Hanauer; G. Nunez e J. H. Cho. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v.411, n.6837, May 31, p.603-6. 2001.

Oliveira, F. A.; M. H. Chaves; F. R. Almeida; R. C. Lima, Jr.; R. M. Silva; J. L. Maia; G. A. Brito; F. A. Santos e V. S. Rao. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Ethnopharmacol*, v.98, n.1-2, Apr 8, p.103-8. 2005.

Oliveira, F. A.; C. L. Costa; M. H. Chaves; F. R. Almeida; I. J. Cavalcante; A. F. Lima; R. C. Lima, Jr.; R. M. Silva; A. R. Campos; F. A. Santos e V. S. Rao. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sci*, v.77, n.23, Oct 21, p.2942-52. 2005.

Oren, R.; N. Arber; S. Odes; M. Moshkowitz; D. Keter; I. Pomeranz; Y. Ron; I. Reisfeld; E. Broide; A. Lavy; A. Fich; R. Eliakim; J. Patz; E. Bardan; Y. Villa e T. Gilat. Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. **Gastroenterology**, v.110, n.5, May, p.1416-21. 1996.

Otuki, M. F.; J. Ferreira; F. V. Lima; C. Meyre-Silva; A. Malheiros; L. A. Muller; G. S. Cani; A. R. Santos; R. A. Yunes e J. B. Calixto. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v.313, n.1, Apr, p.310-8. 2005.

Otuki, M. F.; F. Vieira-Lima; A. Malheiros; R. A. Yunes e J. B. Calixto. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol**, v.507, n.1-3, Jan 10, p.253-9. 2005.

Philpott, D. J. e S. E. Girardin. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. **Mol Immunol**, v.41, n.11, Nov, p.1099-108. 2004.

Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease (1). **N Engl J Med**, v.325, n.13, Sep 26, p.928-37. 1991a.

Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease (2). **N Engl J Med**, v.325, n.14, Oct 3, p.1008-16. 1991b.

Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v.347, n.6, Aug 8, p.417-29. 2002.

Present, D. H.; B. I. Korelitz; N. Wisch; J. L. Glass; D. B. Sachar e B. S. Pasternack. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-

term, randomized, double-blind study. **N Engl J Med**, v.302, n.18, May 1, p.981-7. 1980.

Pullan, R. D.; J. Rhodes; S. Ganesh; V. Mani; J. S. Morris; G. T. Williams; R. G. Newcombe; M. A. Russell; C. Feyerabend; G. A. Thomas e Et Al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. **N Engl J Med**, v.330, n.12, Mar 24, p.811-5. 1994.

Radford-Smith, G. e D. P. Jewell. Cytokines and inflammatory bowel disease. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v.10, n.1, Mar, p.151-64. 1996.

Rakoff-Nahoum, S.; J. Paglino; F. Eslami-Varzaneh; S. Edberg e R. Medzhitov. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v.118, n.2, Jul 23, p.229-41. 2004.

Recio, M. C.; R. M. Giner; S. Manez e J. L. Rios. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Med**, v.61, n.2, Apr, p.182-5. 1995.

Reif, S.; I. Klein; N. Arber e T. Gilat. Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. **Gastroenterology**, v.108, n.6, Jun, p.1683-7. 1995.

Reimund, J. M.; C. Wittersheim; S. Dumont; C. D. Muller; R. Baumann; P. Poindron e B. Duclos. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **J Clin Immunol**, v.16, n.3, May, p.144-50. 1996.

Rescigno, M.; M. Urbano; B. Valzasina; M. Francolini; G. Rotta; R. Bonasio; F. Granucci; J. P. Kraehenbuhl e P. Ricciardi-Castagnoli. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v.2, n.4, Apr, p.361-7. 2001.

Rhen, T. e J. A. Cidlowski. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, v.353, n.16, Oct 20, p.1711-23. 2005.

Ricote, M.; A. C. Li; T. M. Willson; C. J. Kelly e C. K. Glass. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, v.391, n.6662, Jan 1, p.79-82. 1998.

Rizzello, F.; P. Gionchetti; A. Venturi; C. Morselli e M. Campieri. Review article: the management of refractory Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, v.16 Suppl 4, Jul, p.40-7. 2002.

Rogler, G. e T. Andus. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg*, v.22, n.4, Apr, p.382-9. 1998.

Rogler, G.; K. Brand; D. Vogl; S. Page; R. Hofmeister; T. Andus; R. Knuechel; P. A. Baeuerle; J. Scholmerich e V. Gross. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, v.115, n.2, Aug, p.357-69. 1998.

Sartor, R. B. Cytokine regulation of experimental intestinal inflammation in genetically engineered and T-lymphocyte reconstituted rodents. *Aliment Pharmacol Ther*, v.10 Suppl 2, p.36-42; discussion 43-4. 1996.

Sartor, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, v.3, n.7, Jul, p.390-407. 2006.

Sartor, R. B. e F. Hoentjen. **Proinflammatory cytokines and signalling pathways in intestinal innate immune cells**. Philadelphia: Elsevier. 2005. 681-701 p. (Mucosal Immunology)

Schoonjans, K.; G. Martin; B. Staels e J. Auwerx. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. **Curr Opin Lipidol**, v.8, n.3, Jun, p.159-66. 1997.

Seckinger, P.; S. Isaaz e J. M. Dayer. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. **J Biol Chem**, v.264, n.20, Jul 15, p.11966-73. 1989.

Sen, R. e D. Baltimore. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v.46, n.5, Aug 29, p.705-16. 1986.

Sharma, J. N. e W. W. Buchanan. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. **Exp Toxicol Pathol**, v.46, n.6, Dec, p.421-33. 1994.

Shibolet, O.; R. Alper; Y. Ilan e J. Weidenfeld. Regulatory role of the pituitary-adrenal axis in experimental colitis: effect of adrenalectomy on the clinical course and the TH1/TH2 immune profile. **Inflamm Bowel Dis**, v.11, n.12, Dec, p.1053-9. 2005.

Smythies, L. E.; M. Sellers; R. H. Clements; M. Mosteller-Barnum; G. Meng; W. H. Benjamin; J. M. Orenstein e P. D. Smith. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **J Clin Invest**, v.115, n.1, Jan, p.66-75. 2005.

Somerville, K. W.; R. F. Logan; M. Edmond e M. J. Langman. Smoking and Crohn's disease. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v.289, n.6450, Oct 13, p.954-6. 1984.

Steinman, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. **Apmis**, v.111, n.7-8, Jul-Aug, p.675-97. 2003.

Stifter, S. The role of nuclear factor kappaB on angiogenesis regulation through monocyte chemotactic protein-1 in myeloma. **Med Hypotheses**, v.66, n.2, p.384-6. 2006.

Strober, W.; I. Fuss e P. Mannon. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v.117, n.3, Mar, p.514-21. 2007.

Strober, W.; I. J. Fuss e R. S. Blumberg. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.495-549. 2002.

Su, C. G.; X. Wen; S. T. Bailey; W. Jiang; S. M. Rangwala; S. A. Keilbaugh; A. Flanigan; S. Murthy; M. A. Lazar e G. D. Wu. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. **J Clin Invest**, v.104, n.4, Aug, p.383-9. 1999.

Sugimoto, K.; H. Hanai; K. Tozawa; T. Aoshi; M. Uchijima; T. Nagata e Y. Koide. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, v.123, n.6, Dec, p.1912-22. 2002.

Szekanecz, Z. e A. E. Koch. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. **Rheum Dis Clin North Am**, v.30, n.1, Feb, p.97-114. 2004.

Takeda, K. e S. Akira. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v.16, n.1, Feb, p.3-9. 2004.

Ukil, A.; S. Maity; S. Karmakar; N. Datta; J. R. Vedasiromoni e P. K. Das. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **Br J Pharmacol**, v.139, n.2, May, p.209-18. 2003.

Vankelecom, H.; P. Carmeliet; H. Heremans; J. Van Damme; R. Dijkmans; A. Billiau e C. Deneef. Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin,

prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. **Endocrinology**, v.126, n.6, Jun, p.2919-26. 1990.

Wallace, J. L.; W. K. Macnaughton; G. P. Morris e P. L. Beck. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.96, n.1, Jan, p.29-36. 1989.

Wang, F.; B. T. Schwarz; W. V. Graham; Y. Wang; L. Su; D. R. Clayburgh; C. Abraham e J. R. Turner. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. **Gastroenterology**, v.131, n.4, Oct, p.1153-63. 2006.

Weiss, U. Inflammation. **Nature**, v.420, n.6917, p.845-845. 2002.

Wendel, G. H.; A. O. Maria; F. Mohamed; S. Dominguez; L. Scardapane; O. S. Giordano; E. Guerreiro e J. A. Guzman. Effect of dehydroleucodine in experimental colitis in rats and mice. **Pharmacol Res**, v.40, n.4, Oct, p.339-44. 1999.

Wilckens, T. e R. De Rijk. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. **Immunol Today**, v.18, n.9, Sep, p.418-24. 1997.

Williams, I. R. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. **Immunol Res**, v.29, n.1-3, p.283-92. 2004.

Yeo, K. T.; H. H. Wang; J. A. Nagy; T. M. Sioussat; S. R. Ledbetter; A. J. Hoogewerf; Y. Zhou; E. M. Masse; D. R. Senger; H. F. Dvorak e Et Al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. **Cancer Res**, v.53, n.12, Jun 15, p.2912-8. 1993.

Youngman, K. R.; P. L. Simon; G. A. West; F. Cominelli; D. Rachmilewitz; J. S. Klein e C. Fiocchi. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, v.104, n.3, Mar, p.749-58. 1993.

Zhang, G. e S. Ghosh. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J Clin Invest**, v.107, n.1, Jan, p.13-9. 2001.

Zhou, Y. H.; J. P. Yu; Y. F. Liu; X. J. Teng; M. Ming; P. Lv; P. An; S. Q. Liu e H. G. Yu. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. **Mediators Inflamm**, v.2006, n.5, p.92642. 2006.

**ANEXOS**

Parte dos resultados da presente dissertação foi submetida para publicação:

VITOR, C.E.; HARA, D.B.; FIGUEIREDO, C.P.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO, J.B. Treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin ameliorates colonic inflammation and tissue damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. Manuscript subbimeted.

