



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBiotec**

NAYLLA VERAS DE MORAES OLIVEIRA

EFEITO PROTETOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) NA COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

PARNAÍBA, PI
2018

NAYLLA VERAS DE MORAES OLIVEIRA

EFEITO PROTETOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1970) NA COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

PARNAÍBA, PI
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

O482e Oliveira, Naylla Veras de Moraes.

Efeito protetor de proteínas de látex *Plumeria pudica* (JACQ., 1970) na colite induzida por ácido acético [manuscrito] / Naylla Veras de Moraes Oliveira. – 2018.

66 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

NAYLLA VERAS DE MORAES OLIVEIRA

EFEITO PROTETOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) NA COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 01/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira – UFPI
(Presidente)

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa – UFPI
(Examinador Interno ao Programa)

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras – UFPI
(Examinador Externo ao Programa)

PARNAÍBA, PI
2018

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Francisco Moraes e Socorro Moraes, por serem meus maiores incentivadores e por nunca perderem a fé em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar o dom da vida. Por sempre me mostrar o caminho certo a seguir e por me dar forças e mostrar que sou capaz. Por nunca me abandonar e desamparar mesmo quando erro.

Agradeço também aos meus pais, Francisco Moraes e Socorro Moraes, por terem me apoiado durante toda essa jornada, acreditando no meu potencial. Por nunca medirem esforços para me ofertar o melhor.

Agradeço ao meu esposo, Natalino Oliveira, por confiar em mim e estar sempre ao meu lado.

Agradeço ao meu irmão, Ray Moraes, por sempre acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu não acredito. A minha cunhada, Ana Gabrielly, que é mais como uma irmã, estando sempre disposta a me ouvir e me dar forças. A minha bebezinha, sobrinha que tanto amo, Maria Sophya, por sempre ser minha tábua de salvação e a razão do meu melhor sorriso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira, que dedicou seu tempo e atenção em me ajudar, orientar, compreender e sempre buscou oferecer o seu melhor.

Ao prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira, que se disponibilizou em participar da minha banca de qualificação fazendo considerações que muito me ajudaram a escrever essa dissertação.

Ao prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras, por ter aceitado participar da minha banca de qualificação, e de defesa. E pelas orientações de extrema relevância.

Ao professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa, que acompanhou a realização desse trabalho, por ter sido por vezes compreensivo, e por ter se disponibilizado a me ajudar com seus conhecimentos.

O meu muito obrigada, aos meu pudinzinhos, Bruna Souza, Lucas Arruda e Lucas Eduardo, que foram não apenas peças fundamentais na realização desse experimento, mas também amigos como nunca encontrei igual.

Agradeço a todos os colegas de laboratório Felipe, Mayck, Ana Clara, Gabriella, Jhoana e Dayane, que me ajudaram na realização desses experimentos, muito obrigada.

Agradeço também a Diva Magalhães, Jalles Arruda, Stefany Guimarães e Beatriz Melo, sem vocês a realização dessa pesquisa não teria sido possível.

Ao prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, e aos seus alunos Felipe Rodolfo e Luiz Felipe, por terem se disponibilizado para ajudar nas análises histológicas.

Ao laboratório de Fisiologia Farmacologia Gastrointestinal (LEFFAG), em especial ao Álvaro Xavier e Carlos Eduardo Monteiro, por terem ajudado na realização de algumas dosagens.

Aos colegas de turma do mestrado, pelos momentos, experiências e conhecimentos compartilhados.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, por ter ofertado essa oportunidade no meu crescimento profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro que me permitiu concluir mais essa etapa na minha jornada.

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Título: EFEITO PROTETOR DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) NA COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Introdução: Estudos recentes demonstraram que uma fração proteica obtida a partir de látex de *P. pudica* (PLPp) possui efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos e antidiarreicos. A colite ulcerativa é uma doença de origem inflamatória que afeta a mucosa e a submucosa do cólon e do reto, caracterizada por úlceras na mucosa intestinal. Assim, com base em propriedades farmacológicas detectadas em PLPp, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito protetor desta fração proteica na colite induzida por ácido acético em camundongos. **Métodos:** Camundongos machos (*Mus musculus*, 25-30g) foram divididos em 5 grupos: grupo ácido acético (AA), grupo salina (SAL) e grupos PLPp 10, 20 e 40 mg/kg, cada um com 5-7 animais. Em seguida, foram deixados em jejum por 16h antes do experimento. Ao final das 16hs, os animais dos grupos AA, PLPp 10, 20 e 40mg/kg, receberam via transretal 200 µl de solução de ácido acético a 6%, para a indução da colite, e o grupo SAL, recebeu 200µl de solução salina 0,9%. Os animais foram tratados com PLPp (10, 20 ou 40 mg/kg i.p.) 1 hora antes e 17 horas após a injeção de ácido acético. Uma hora depois do segundo tratamento com PLPp, os animais foram eutanasiados e a porção do cólon distal foi retirada para avaliação de escores macroscópicos e microscópicos de lesão, análise de peso úmido, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de glutathiona (GSH), concentração de malonaldeído (MDA) e níveis de IL-1 β . **Resultados:** O tratamento dos animais com PLPp 40mg/kg diminuiu de forma significativa o peso úmido do cólon dos animais quando comparado ao grupo AA, no entanto, PLPp 10 e 20mg/kg não foram capazes. Apenas PLPp 40 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os escores macroscópicos e de lesão quando comparados com os animais que receberam apenas AA. Na análise microscópica, PLPp 40mg/kg reduziu de forma significativa os escores totais de lesão, quando comparado com o grupo AA. Além disso, as diferentes doses de PLPp também foram capazes de reduzir significativamente a atividade MPO em comparação com o grupo AA. Entre as doses de PLPp, apenas a dose de 40mg/kg foi capaz de promover uma redução significativa nos níveis de MDA e evitar o consumo de GSH de modo significativo, quando comparado ao grupo não tratado. Também foi observado que PLPp 40mg/kg reduziu os níveis da citocina IL-1 β no cólon dos animais. **Conclusões:** Estes resultados sugerem que PLPp apresentou efeito protetor contra danos intestinais induzidos pelo ácido acético, uma vez que houve redução da lesão macroscópica e microscópica e do peso úmido. PLPp também demonstrou potencial anti-inflamatório observado pela redução da atividade de MPO e da concentração de IL-1 β , e antioxidante, pela redução dos níveis de MDA e consumo de GSH.

Palavras-chave: Proteína laticíferas. Inflamação. Colite ulcerativa. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Title: PROTECTIVE EFFECT OF LATEX PROTEINS FROM *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) IN COLITE INDUCED BY ACETIC ACID

Introduction: Recent studies have shown that a protein fraction obtained from *P. pudica* latex (LPPp) has anti-inflammatory, antinociceptive and antidiarrheal effects. Ulcerative colitis is an inflammatory disease that affects the mucosa and submucosa of the colon and rectum, characterized by ulcers in the intestinal mucosa. Thus, based on pharmacological properties detected in LPPp, this study aims to evaluate the protective effect of this protein fraction on acetic acid-induced colitis in mice. **Methods:** Male mice (*Mus musculus*, 25-30g) were divided into 5 groups: acetic acid group (AA), saline group (SAL) and LPPp groups 10, 20 and 40 mg/kg, each with 5-7 animals. Then, they were fasted during 16 hours prior to the experiment. At the end of 16h, the animals of groups AA, LPPp 10, 20 and 40mg/kg received 200 μ l of 6% acetic acid solution for the induction of colitis and the SAL group received 200 μ l of saline solution 0.9%. Animals were treated with LPPp (10, 20 or 40 mg/kg i.p.) 1 hour before and 17hours after acetic acid injection. One hour after second LPPp treatment, animals were euthanized and the distal portion of colon was excised for assessment of macroscopic and microscopic scores of lesion, wet weight analysis, myeloperoxidase (MPO) measurement, glutathione (GSH) levels, malonyldialdehyde (MDA) concentration and IL-1 β levels. **Results:** The treatment of animals with LPPp 40 mg/kg significantly decreased the wet weight of the colon of the animals when compared to the AA group, however LPPp 10 and 20 mg/kg were not able. Only LPPp 40 mg/kg was able to significantly reduce macroscopic and lesion scores when compared to animals receiving only AA. In the microscopic analysis, LPPp 40mg/kg significantly reduce total lesion scores., when compared to the AA group. In addition, the different doses of LPPp were also able to significantly reduce MPO activity compared to the AA group. Among LPPp doses, only the 40mg/kg dose was able to promote a significant reduction in MDA levels and avoid GSH consumption significantly, when compared to the untreated group. It was also observed that LPPp 40mg/kg decreased levels of the cytokine IL-1 β in the animals colon. **Conclusions:** These results suggest that LPPp presented a protective effect against intestinal damage induced by acetic acid, since macroscopic, microscopic and wet weight lesions were reduced. LPPp also demonstrated anti-inflammatory potential observed by the reduction of MPO activity and the concentration of IL-1 β , and antioxidant, by the reduction of MDA levels and GSH consumption.

Keywords: Laticifer proteins. Inflammation. Ulcerative Colitis. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta <i>Plumeria pudica</i> e seu aspecto geral	23
Figura 2. Classificação da colite ulcerativa de acordo com a extensão anatômica de envolvimento do cólon	27
Figura 3. Fotografia do tecido colônico representando o efeito das diferentes doses de PLPp sobre os danos macroscópicos de lesão na colite ulcerativa induzida por ácido acético	44
Figura 4. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre os escores macroscópicos de lesão dos cólons de camundongos com colite induzida por ácido acético	44
Figura 5. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre o peso úmido dos cólons de camundongos com colite induzida por ácido acético	45
Figura 6. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre os danos microscópicos de lesão intestinal na colite ulcerativa experimental induzida por ácido acético	47
Figura 7. Efeito de proteína do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre a concentração da citocina IL-1 β na colite induzida por ácido acético em camundongos	49
Figura 8. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em tecido intestinal de camundongos com colite induzida por ácido acético	50
Figura 9. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre as concentrações de malonaldeído (MDA) em tecido intestinal de camundongos com colite induzida por ácido acético.....	51
Figura 10. Efeito de proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i> (PLPp) sobre os níveis colônicos de glutatona (GSH) na colite induzida por ácido acético em camundongos	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Critérios para avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por ácido acético**38**
- Tabela 2.** Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético**39**
- Tabela 3.** Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre os escores microscópicos de lesão na colite induzida por ácido acético em camundongos**48**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA – 5-aminosalicilatos

AA – Grupo Ácido acético;

COX – Ciclooxigenase

CU – Colite ulcerativa

DC – Doença de Crohn

DII – Doenças inflamatória intestinais

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoíco);

EDTA – Ácido etilenoimino-tetracético;

ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática);

GSH – Glutathiona;

HE – Hematoxilina e eosina

HTAB – Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio;

IL – Interleucina

INF- γ – Interferon gama

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MDA – Ácido malonaldeído;

MPO – Mieloperoxidase;

OPD – O-fenilenediamina diidrocloreto;

PBS – Tampão salina fosfato;

PLPp – Proteínas do látex de *Plumeria pudica*;

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

SAL – Solução salina;

TCA – Ácido tricloroacético.

Th1 – T helper 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPÍGRAFE.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. LÁTEX.....	18
2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX.....	19
2.3. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE FLUIDOS LATICÍFEROS	20
2.4. O GÊNERO <i>Plumeria</i> E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	21
2.4.1. Aspectos gerais, composição química e propriedades farmacológicas da <i>Plumeria pudica</i>	22
2.5. COLITE ULCERATIVA.....	25
2.5.1. Epidemiologia da Colite Ulcerativa	27
2.5.2. Fisiopatologia da Colite Ulcerativa.....	28
2.5.3. Fatores de risco para Colite Ulcerativa	32
2.5.4. Tratamento para Colite Ulcerativa	33
2.5.5. Modelo experimental de Colite Ulcerativa	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. ANIMAIS	36
4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	36

4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO LÁTEX	36
4.4. MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	37
4.5. AVALIAÇÃO DOS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO.....	38
4.6. AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO DO CÓLON DOS ANIMAIS	38
4.7. AVALIAÇÃO DOS ESCORES MICROSCÓPICOS DE LESÃO	38
4.8. ANÁLISE DOS NÍVEIS COLÔNICOS DE MIELOPEROXIDASE	39
4.9. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MALONIALDEÍDO NA MUCOSA INTESTINAL	40
4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA NA MUCOSA INTESTINAL	40
4.11. DOSAGEM DE IL1- β	41
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1. EFEITO DE PLP _p SOBRE OS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO NO CÓLON DOS ANIMAIS	43
5.2. EFEITO DE PLP _p SOBRE O PESO ÚMIDO DE TECIDOS DOS CÓLONS DOS ANIMAIS	45
5.3. EFEITO DE PLP _p SOBRE OS ESCORES MICROSCÓPICOS DE LESÃO NO CÓLON DOS ANIMAIS	46
5.4. EFEITO DE PLP _p SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-1 β NO CÓLON DOS ANIMAIS COM COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	49
5.5. EFEITO DE PLP _p SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO COLÔNICO DOS CAMUNDONGOS.....	50
5.6. EFEITO DE PLP _p SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALONIALDEÍDO NO CÓLON DOS ANIMAIS COM COLITE	51
5.7. EFEITO DE PLP _p SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE GLUTATIONA NO TECIDO COLÔNICO DOS CAMUNDONGOS COM COLITE	52
6. DISCUSSÃO	53

7. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO

Os laticíferos são células especializadas que secretam látex após ferimento mecânico ou herbivoria de insetos. Estão presentes em mais de 40 famílias de angiospermas, correspondendo a cerca de 20 mil espécies. O látex contém várias classes de metabolitos secundários e proteínas. Dentre as proteínas mais estudadas no látex estão as peptidases, inibidores de peptidase, quitinases e enzimas antioxidantes (GAI et al., 2017).

Devido a presença de moléculas com potencial biológico no látex, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de verificar suas propriedades farmacológicas em diferentes modelos experimentais. Dentre essas pesquisas, estão aquelas desenvolvidas com o látex de *Calotropis procera*, que por sua vez apresentou atividade anti-inflamatória (ALENCAR et al., 2004), antinociceptiva (SOARES, et al., 2005), antitumoral (OLIVEIRA et al., 2007) e potencial antidiarreico (DAS et al., 2011). Nestes trabalhos os autores demonstraram que a atividades biológicas observadas eram desempenhadas por proteínas.

Resultados semelhantes foram obtidos recentemente em estudos com o látex de *Plumeria pudica*, no qual uma fração proteica, ausente de borracha, denominada de PLPp (proteínas do látex de *P. pudica*) apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva quando avaliada em diferentes modelos experimentais de inflamação e dor (FERNANDES et al., 2015). Os autores demonstraram que a ação de PLPp envolvia vias de inibição da migração celular e inibição/bloqueio da liberação de mediadores inflamatórios e de citocinas pró-inflamatórias. Santana et al. (2018), demonstraram que PLPp era capaz de reduzir as fezes diarreicas induzidas por óleo de rícino evidenciando a ação da fração proteica contra diarreia inflamatória.

A colite ulcerativa (CU) é uma patologia de etiologia desconhecida, caracterizada por períodos de recidivas e remissões que afeta o reto e porção de tamanho variável do cólon, envolvendo a mucosa e a submucosa (RAY; SAGAR, 2017). É uma doença inflamatória crônica que está geralmente associada a morbidade significativa, sendo caracterizada clinicamente por episódios frequentes de diarreia sanguinolenta e patologicamente por inflamação difusa da parede do intestino grosso (ALI et al., 2017). Ainda que a patogênese da CU permaneça desconhecida, uma hipótese amplamente aceita é que desequilíbrios entre citocinas pró-inflamatórias,

como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), interleucinas (IL) 1, 6 e 12, e citocinas anti-inflamatórias, como, IL-4, IL-10, IL-11, desempenham um papel central na modulação da inflamação (GU et al., 2017).

Uma vez que a colite ulcerativa é uma doença inflamatória e que a fração proteica de *P. pudica* (PLPp) apresenta potencial anti-inflamatório, este estudo teve por finalidade verificar o efeito protetor de proteínas do látex de *Plumeria pudica* na colite induzida por ácido acético.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. LÁTEX

Látex é uma palavra que tem origem do latim, geralmente utilizada para descrever o exsudato leitoso de plantas. O vaso que contém o látex é denominado de laticífero, do latim, onde “lac” significa leite. A capacidade de produzir látex é encontrada em diferentes plantas de diversos habitats, no entanto, o látex também pode ser encontrado em fungos e saprófitas (KEKWICK, 2001).

Este fluido está presente em aproximadamente 10% de todas as angiospermas, e é tipicamente liberado quando o tecido da planta é lesado (YANG et al., 2017). Assim, conforme o látex é liberado, ele coagula, selando a ferida. Além de vedar as feridas, a função do látex varia desde a defesa da planta a restauração das propriedades mecânicas da mesma (BAUER et al., 2014). Ele pode se apresentar de várias cores em diferentes espécies de plantas, podendo ser branco leitoso (*Euphorbia*, *Asclepias*), castanho amarelado (*Cannabis*), do amarelo ao laranja (*Chelidonium*) ou incolor (*Morus*) (DGHIM et al., 2015). Sua presença está distribuída em mais de 20.000 espécies dentro de 40 famílias (BAUER et al., 2013) e tanto sua viscosidade como a cor tipicamente branca são devido a partículas de borracha dispersas no fluido (KONNO, 2011).

O látex é uma emulsão ou suspensão aquosa que compreende ao protoplasma de células especializadas presente nas plantas, denominadas de laticíferos (SYTWALA et al., 2015; NAWROT et al., 2017). Esses são distribuídos nas raízes, nas hastes, nos pecíolos e nas folhas das plantas (KONNO, 2011). E estão amplamente distribuídos entre monocotiledôneas, dicotiledôneas, coníferas e ainda em samambaias (LOH et al., 2016).

Os laticíferos podem ser classificados como não articulados e articulados, dependendo do seu desenvolvimento e morfologia. Os não articulados são caracterizados por serem unicelulares, multinucleados, que formam tubos alongados, frequentemente ramificados. Os articulados são compostos por múltiplas células, que podem ser ramificadas ou ligadas lateralmente formando uma rede (SYTWALA et al., 2015).

Os conteúdos de laticíferos têm uma importância tradicional e contemporânea como toxinas ou bioprodutos valiosos. Culturas aborígenes do Sudeste Asiático usaram exsudatos de *Antiaris spp.* contendo glicosídeos cardíacos como veneno para pôr na pontas de flechas. A papoula de ópio (*Papaver somniferum*) deve a sua fama e notoriedade aos opiáceos encontrados no seu látex. Plantas como a árvore de borracha (*Hevea brasiliensis*) e figueira da borracha (*Ficus elastica*) continuam a servir como fonte comercial de borracha natural. Além disso, os laticíferos participam da biossíntese de metabolitos especializados em certas plantas, como na *Catharanthus roseus* (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

Esse material é de grande interesse para as áreas científica e comercial. Embora sua função na natureza ainda não seja completamente compreendida, já que não há evidências de que o látex desempenhe um papel metabólico. No entanto, acredita-se que ele é provavelmente usado pelas plantas em defesa contra herbivoria, onde há o uso de dois mecanismos de defesa, os bioquímicos e os mecânicos. Estudos que investigaram a bioquímica do látex, encontraram uma mistura aquosa complexa de alcaloides, fenólicos, proteases e quitinases. Já a defesa mecânica, compreende principalmente a um componente do látex conhecido como borracha (*cis*-1,4-poliisopreno) (BAUER et al. 2013).

2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX

O látex contém uma variedade de metabólitos secundários, como isoprenóides, alcaloides, fenólicos e proteínas, entre elas, peptídeos, proteases, inibidores de proteases, lectinas, quitinases e oxidases (YANG et al., 2017). Apresenta também uma composição complexa de compostos bioativos, como os glicosídeos cardíacos, taninos, óleos e estruturas terpenóides como a resina, a borracha, os amidos e o açúcar (SYTWALA et al., 2015). A presença desses diferentes compostos bioativos nos laticíferos servem como proteção para a planta dos efeitos citotóxicos de seus próprios venenos e como defesa de certas plantas contra patógenos e herbívoros (NAWROT et al., 2017).

O *cis*-1,4-poliisopreno, mais conhecido como borracha, é um biopolímero exclusivo e desempenha um papel crítico na economia mundial. É um dos componentes do látex que tem recebido atenção especial nos últimos 100 anos,

devido suas propriedades físicas únicas, entre elas, resiliência, elasticidade, resistência a abrasão e ao impacto, eficiente dispersão de calor e maleabilidade de temperaturas. É por isso amplamente usado como matéria-prima, incluindo em dispositivos médicos (BAUER et al. 2013; AOKI et al., 2014; LOH et al., 2016). De 12.500 plantas laticíferas, apenas cerca 2.500 espécies produzem borracha. No entanto, há apenas algumas que sintetizam borracha de alto peso molecular, por exemplo, a *H. brasiliensis*, a *Parthenium argentatum* e a *Taraxacum kok-saghyz*. Entretanto, a *H. brasiliensis* é a única utilizada para a produção de borracha industrial, uma vez que a produção de látex ocorre em todos os órgãos da planta, incluindo folhas, flores, frutos e raízes e principalmente devido as suas qualidades superiores, alto rendimento, fácil colheita e processamento (KEKWICK, 2001; LOH et al., 2016).

As proteínas presentes no látex parecem ter papel importante na defesa das plantas, em particular as proteases, quitinases, e polipeptídios relacionados a patogênese. A presença de proteases em plantas produtoras de látex, por exemplo, foram documentadas em diversas famílias de plantas como Apocynaceae, Asclepiadaceae, Caricaceae, Convolvulacea, Euphorbiaceae, Moraceae (SYTWALA et al., 2015).

2.3. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE FLUIDOS LATICÍFEROS

Diversos estudos com plantas produtoras de látex vem sendo desenvolvidas ao longo dos anos. A maioria das pesquisas envolvendo o látex, está voltado para sua utilização na indústria para o processamento da borracha. Por esta razão, o látex de *Hevea brasiliensis* é um dos mais bem estudados, uma vez que este componente compreende a 40% do peso seco do látex nesta planta (BAUER et al. 2013; BAUER et al., 2014). O látex de *Carica papaya* é rico em endopeptidases de cisteína, tais como papaína, endopeptidase de glicilo, quimopapaina e caricina (BRAIA et al., 2013). A papaína tem sido amplamente utilizada em indústrias alimentares como amaciante de carne e como estabilizante para cerveja, bem como em produtos têxteis e farmacêuticos (ROCHA et al., 2016).

Pesquisas voltadas para as atividades biológicas do látex de plantas também tem sido desenvolvidas e já foi observado que esse material pode apresentar atividade anti-inflamatória (MARINHO et al., 2011), antinoceptiva (SALEEM et al., 2015),

antimicrobiana (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2017), coagulante e anticoagulante (OSONIYI; ONAJOBI, 2003), além de que também apresenta efeito protetor contra gastrite ulcerativa induzida em ratos (BHARTI; WAHANE; KUMAR 2010). Lucetti et al. (2010) ao estudar o látex de *Himatatus drasticus* observaram que ele apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Já Mohamed et al. (2014) observaram que o látex de *Calotropis procera* mostrou-se eficiente para síntese de nanopartículas de prata, apresentando forte atividade antibacteriana e antifúngica. Chandrasekaran et al. (2017), recentemente realizaram um estudo com o látex de *Euphorbia antiquorum* demonstrando que os extratos desse látex foram eficazes em inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estas pesquisas foram desenvolvidos utilizando o látex em sua forma natural, ou a partir do fracionamento desse fluido em solventes orgânicos.

Alencar et al. (2004), realizaram um trabalho com proteínas do látex de *Calotropis procera* em três modelos de inflamação: na peritonite, no edema de pata e na cistite hemorrágica. Eles demonstraram que o látex foi capaz de inibir significativamente a infiltração neutrofílica na peritonite e no edema de pata induzida por carragenina. Além de também ter sido capaz de promover melhora considerável no padrão de peso úmido e de permeabilidade das vesículas na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Em um outro estudo realizado por Mousinho et al. (2011), os autores observaram que proteínas do látex de *H. drasticus* tem efeito antitumoral contra tumores em animais experimentais, sem apresentar toxicidade significativa.

O látex de *Calotropis procera* também apresentou outras atividades biológicas importantes, como atividade antinociceptiva (SOARES et al., 2005); atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais (OLIVEIRA et al., 2007); e ação antitumoral em um modelo *in vivo* usando camundongos transplantados com sarcoma 180, onde observou-se não apenas redução significativa do crescimento tumoral, como também, aumento da sobrevida dos animais (OLIVEIRA et al., 2010).

2.4. O GÊNERO *Plumeria* E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

As *Plumerias* pertencem ao gênero *Plumeria* e à família Apocynaceae, são plantas amplamente cultivadas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Originárias da América tropical são encontradas desde o sul do México até o norte da

América do Sul, sendo também abundantemente encontradas na Índia. São popularmente utilizada como plantas ornamentais e comumente vistas em cemitérios. Além de serem famosas por apresentarem flores perfumadas, no qual os óleos essenciais extraídos a partir destas, são utilizados na perfumaria e aromaterapia (SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014).

As espécies de *Plumeria* apresentam diferentes características, e vários híbridos apareceram durante os anos. Logo, alguns autores reconhecem mais de sessenta espécies, enquanto outros reduzem a apenas sete ou oito alegando que os demais são híbridos e variáveis (CHOUDHARY et al., 2014b).

O gênero *Plumeria* é bem conhecido como árvores ou arbustos que são cultivadas como plantas ornamentais. No entanto, muitas espécies são conhecidas por seus efeitos medicinais, principalmente devido ao látex presente nelas (CHOUDHARY et al., 2014b). Várias delas são usadas para tratar diarreia, gonorreia, sífilis, feridas venerais e hanseníase. Essas plantas são conhecidas por possuir efeito anti-inflamatório, diurético, antitérmico, purgante, além de serem usadas como tônico e expectorante (AKHTAR et al., 2013). Na medicina indiana, as plantas do gênero *Plumeria* são muito utilizadas na úlcera gástrica, no reumatismo, na asma, na gonorreia, em distúrbios sanguíneos e tumores (CHOUDHARY et al., 2014a).

Assim como, o látex de *P. alba* é normalmente utilizado em doenças de pele, como úlceras, herpes, sarna e feridas (TESSOU et al., 2013). Já o látex de *P. rubra* mostrou ter atividade anti-inflamatória em um ensaio de edema de pata induzida por carragenina (CHANDA et al., 2011). Enquanto que o látex de *P. acuminata* é geralmente utilizado para tratar artrite, reumatismo e lesão cutânea pruriginosa. (SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014).

2.4.1. Aspectos gerais, composição química e propriedades farmacológicas da *Plumeria pudica*

A *Plumeria pudica* apresenta folhas não decíduas, perenes, alongadas, lustrosas e sempre verdes (Figura 1A, 1B, 1D). Ela é originária do Panamá, Colômbia e Venezuela (CHOUDHARY et al., 2014b). Popularmente é conhecida como "buquê de noiva" (Figura 1C), e é comumente usada em jardins por suas características ornamentais (SANTANA et al. 2018). Essa planta é amplamente encontrada no

nordeste do Brasil, onde o seu látex é comumente utilizado pela população mais carente para o tratamento de doenças de pele e dor de dente (FERNANDES et al., 2015).

Figura 1. Planta *Plumeria pudica* e seu aspecto geral



A) Aspecto geral da planta *Plumeria pudica*; B) Folhas alongadas e sempre verdes; C) Flores semelhantes a um “buquê de noiva” e D) disposição dos galhos. Fonte: própria.

Fernandes (2014) demonstrou que a fração do látex de *P. pudica* livre de borracha e rica em proteínas solúveis (PLPp) representa apenas 1,38% da massa seca do látex enquanto que os 98,62% restantes é de borracha. A autora também analisou PLPp quanto ao seu perfil proteico através de eletroforese em gel de poliacrilamida, detectando a presença de proteínas com massas moleculares que variavam de 14,0 a 45,0 kDa. Em adição, neste estudo foi confirmada a presença de enzimas proteolíticas (proteases cisteínicas, proteases serínicas, metaloproteases), quitinases e inibidor de proteinase (inibidor de papaína e tripsina) em PLPp.

São poucos e recentes as pesquisas com o látex de *P. pudica*. Fernandes et al. (2015), realizaram um estudo com uma fração rica em proteínas do látex de *P. pudica* (PLPp), para verificar se esta apresentava a capacidade de inibir eventos de inflamação e dor. Os autores observaram que PLPp foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina, prostaglandina E₂ (PGE₂), serotonina e bradicinina. A atividade antiedematogênica de PLPp contra inflamação induzida por carragenina foi acompanhada da redução da atividade de mieloperoxidase nas patas dos animais. Além disso, a fração proteica do látex foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de animais no modelo de peritonite induzida por carragenina. Sendo observado também a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α .

Ainda neste estudo, os autores demonstraram que PLPp apresentou atividade antinociceptiva, com redução significativa das contorções abdominais induzida por ácido acético no modelo de contorção abdominal e do tempo de lambertura da pata na fase inflamatória do teste de formalina. Neste trabalho, sugere-se que proteínas presentes no látex estão envolvidas nos eventos biológicos observados. Esta hipótese foi confirmada uma vez que a atividade anti-inflamatória era perdida quando a fração era submetida a tratamento térmico (100°C, 30 min) antes de ser administrada nos animais. A perda da ação caracteriza a natureza proteica da atividade investigada. Por fim, os autores mostraram que a atividade não envolvia a participação de proteases cisteínicas encontradas no látex, uma vez que o potencial anti-inflamatória foi observado mesmo quando a fração foi coletada na presença de iodoacetamida, um inibidor da atividade de proteases cisteínicas.

Outro estudo verificou a atividade antidiarreica de PLPp em modelo animal induzido pelo óleo de rícino, um agente que causa diarreia por vias de indução da

liberação de PGE₂. Os resultados demonstraram que a fração proteica o látex foi capaz de reduzir a quantidade de fezes totais e diarreicas, o volume do conteúdo intestinal, e o transito gastrointestinal. Os animais tratados com PLPp apresentaram níveis de malonaldeído e glutathiona semelhantes ao dos animais não submetidos à diarreia. Também foi demonstrado que ação está relacionada à natureza proteica da amostra, uma vez que, quando PLPp era submetido a tratamento térmico (100°C, 30 min) antes da administração nos animais a ação antidiarreica de PLPp não era mais observada (SANTANA et al., 2018).

Os dados obtidos para ação anti-inflamatória, antinociceptiva e antidiarreica nos estimula a avançar na investigação dos efeitos farmacológicos de proteínas do látex de *P. pudica* em doenças que envolvem processos inflamatórios.

2.5. COLITE ULCERATIVA

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são distúrbios gastrointestinais crônicos caracterizados por períodos alternados de recidivas e remissões, com etiologia desconhecida. Vários fatores são conhecidos por desempenhar um papel na patogênese de DII, como, ambiental, genético e inerente. Essas constituem um grande grupo de doenças gastrointestinais, incluindo a colite colagenosa, linfocítica, eosinofílica e indeterminada, mas as mais comuns são a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) (SOBCZAK et al., 2014).

A CU e a DC apresentam algumas características clínicas sobrepostas. Por mais que existam características clínicas que as diferencie, em cerca de 10 a 15% dos casos é impossível diferenciar as duas doenças, de modo que os sintomas sejam atribuídos a "colite indeterminada". As principais diferenças entre estas duas formas da doença estão na natureza e localização das lesões. Enquanto a CU se restringe ao intestino grosso e ao ânus, o DC pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, do esôfago ao ânus, embora na maioria dos casos comece no íleo. Muitas vezes na doença de Crohn são vistas lesões de salto, onde regiões discretas de intestino inflamado são separadas por regiões de mucosa não envolvida. A inflamação na CU atinge somente o revestimento epitelial do intestino, a mucosa, enquanto o DC afeta toda a parede intestinal (FERGUSON et al., 2007).

A CU é caracterizada clinicamente por dor abdominal, sangramento retal e diarreia, e afeta principalmente o cólon e o reto (ADEGOKE et al., 2016). Patologicamente apresenta inflamação aguda e crônica dentro da mucosa do intestino, que inclui criptite e abscessos de cripta (LIU; STAPPENBECK, 2016). Os sintomas clínicos servem como ponto de partida para o diagnóstico e, juntamente com a avaliação histológica e endoscópica, servem para diferenciar DC e a CU (ESPAILLAT; KEW; OBEID, 2016).

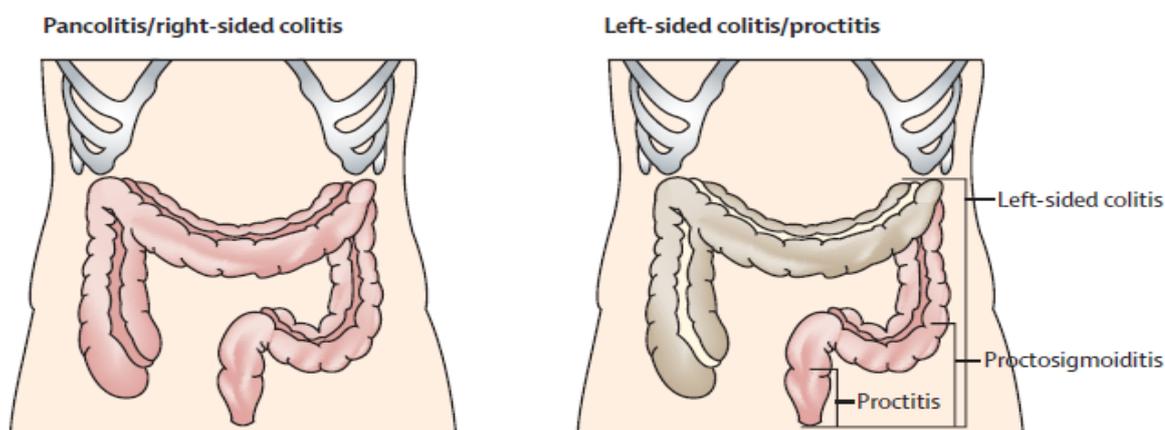
O diagnóstico é baseado em sintomas relatados pelo paciente, combinados com achados objetivos durante a endoscopia, demonstrando danos nas mucosas características e apoiados pela avaliação histológica de biópsias. A aparência histológica clássica é a de lesões contínuas, depleção de células caliciformes, dano epitelial e abscessos nas criptas (MUTHAS et al., 2016)

Na prática clínica, a atividade da doença é geralmente descrita como leve quando há presença de quatro evacuações sangrentas diariamente e sem toxicidade sistêmica; moderadas de quatro a seis evacuações sangrentas diárias e toxicidade mínima ou severas quando há mais de seis evacuações diariamente e sinais de toxicidade, como febre, taquicardia e anemia. Os pacientes com colite ulcerativa fulminante geralmente têm mais de dez evacuações sangrentas diariamente, sangramento contínuo, anemia que requer transfusão de sangue, sensibilidade abdominal e dilatação colônica em radiografias simples abdominais. Embora não exista uma definição formal de colite fulminante, o nome geralmente descreve os pacientes que apresentam colite ulcerativa grave complicada por febres altas, hemorragias extensas, marcadores bioquímicos de inflamação grosseiramente aumentados e perda de peso (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

A colite ulcerativa é classificada de acordo com a extensão anatômica do envolvimento do cólon, e a apresentação clínica pode variar de acordo com a extensão da doença. Pacientes podem ser classificados como tendo proctite, colite do lado esquerdo ou pancolite (Figura 2). Na proctite há predominância de urgência defecatória e tenesmo (sensação de evacuação incompleta), na pancolite, a diarreia sangrenta e dor abdominal podem ser mais proeminentes. Até 10% dos pacientes com proctite ou colite do lado esquerdo podem sofrer constipação paradoxal. Estudos populacionais demonstraram que de 30-60% dos pacientes com colite ulcerativa têm

proctite, 16-45% têm colite do lado esquerdo e 14-35% apresentam pancolite extensa. (UNGARO et al., 2016).

Figura 2. Classificação da colite ulcerativa de acordo com a extensão anatômica de envolvimento do cólon.



Fonte: BAUMGART; SANDBORN, 2007

Em alguns casos pacientes podem desenvolver manifestações extra intestinais relacionadas a DII, como colangite esclerosante primária, lesões cutâneas ou problemas nas articulações (DERIKX; DIELEMAN; HOENTJEN, 2016). As manifestações extraintestinais podem ocorrer em cerca de um terço dos pacientes com colite ulcerativa e até um quarto podem ter manifestações extraintestinais antes do diagnóstico da doença intestinal inflamatória. A artrite periférica parece ser a manifestação extraintestinal mais comum; colangite esclerosante primária e pioderma gangrenoso são mais comuns na colite ulcerativa do que na doença de Crohn. O risco de tromboembolismo venoso em pacientes com doença inflamatória intestinal aumenta de três para quatro vezes e é maior quando o paciente é admitido com um alargamento ou quando está sendo tratados com corticosteroides (UNGARO et al., 2016).

2.5.1. Epidemiologia da Colite Ulcerativa

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a colite ulcerativa tornou-se uma doença global devido ao aumento de sua incidência e prevalência em todo o mundo (ALI et al., 2017). A incidência de CU tem crescido ao longo das últimas

décadas, especialmente nas populações ocidentais onde se tornou uma condição comum, com incidência anual de até 0,02% e uma prevalência de até 0,5%. Os custos atribuíveis a colite ulcerativa nos Estados Unidos sozinhos somam \$ 2,7 bilhões anuais e representam um fardo econômico substancial para os sistemas de saúde (HINDRYCKX; JAIRATH; D'HAENS, 2016).

O norte da Europa (24,3 por 100.000), Canadá (19,2 por 100.000) e Austrália (17,4 por 100.000), são os locais de maior incidência. Enquanto que, as taxas de prevalência são mais elevadas na Europa (505 por 100.000), Canadá (248 por 100 000) e EUA (214 por 100.000) (UNGARO et al., 2016).

Recentemente, a ocorrência de CU aumentou em países em desenvolvimento, como os da América Latina, Ásia e Europa Oriental, afetando aproximadamente 4-64 indivíduos por 100.000 pessoas. No Brasil, a CU representa aproximadamente 40% de todas as doenças inflamatórias intestinais, com aproximadamente 13 casos por 100.000 habitantes (BEZERRA et al., 2016).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que cerca de 20% de todos os pacientes com colite ulcerativa são diagnosticados na infância (≤ 18 anos) com incidência entre 1-4 casos por 100.000/ano. O diagnóstico de CU pediátrica é muitas vezes mais grave e extensa, apresentando-se como pancolite de 60-80% dos pacientes, em comparação com 20-30% do diagnóstico de pacientes adultos. Aproximadamente de 25-35% das crianças com CU exigirão hospitalização por colite ulcerativa grave durante um período de 3 anos após o diagnóstico inicial, aproximadamente o dobro da taxa observada em adultos. A CU diagnosticada na infância apresenta menor resposta aos esteroides (34%) quando comparados com a CU de início adulto, que apresenta maior taxa de refração aos esteroides (29%). Além disso, as taxas de colectomia de 10 anos em pacientes pediátricos é de 30-40% enquanto que em pacientes adultos é 15-25% (SIOW; BHATT, MOLLEN; 2017).

2.5.2. Fisiopatologia da Colite Ulcerativa

Por mais que a fisiopatologia de DII seja idiopática, fortes evidências sugerem que a inflamação resulta de respostas inflamatórias exageradas a um subconjunto de micro-organismos comensais em um hospedeiro geneticamente suscetível expostos a determinados fatores ambientais (dieta, depressão, estresse e influência de radicais

livres). Estudos genéticos, clínicos e em modelos animais tem revelado papéis importantes na fisiopatologia da doença para interações micróbio-hospedeiro, autofagia e vários componentes do sistema imune inato e adaptativo (ISKANDAR; CIORBA, 2012; SOBCZAK et al., 2014).

A natureza genética das DII tem sido demonstrada em várias pesquisas. Aproximadamente 20% das pessoas com uma forma de DII têm um parente de sangue também com DII (embora não necessariamente a mesma forma). Estudos com gêmeos também sugerem uma base genética forte, onde 36% de gêmeos monozigóticos compartilhando a doença, em comparação com apenas 4% de gêmeos dizigóticos (FERGUSON et al., 2007).

Já foram identificados 201 loci de susceptibilidade a DII, dos quais 125 são compartilhados entre a colite ulcerativa e a doença de Crohn e 31 são específicos para a colite ulcerativa. Estes loci genéticos anunciam várias vias celulares críticas envolvidas na patogênese de DII. Na colite ulcerativa, as vias mais importantes parecem estar relacionadas à função da barreira intestinal e à imunidade das células T (HINDRYCKX; JAIRATH; D'HAENS, 2016).

A barreira epitelial intestinal representa uma área superficial vasta e consiste de uma fina camada epitelial conectada por junções apertadas. Está constantemente exposta a diversos componentes alimentares, antígenos, microbiota comensal e patógenos. Normalmente, as células epiteliais estão constantemente respondendo a vários injúrias, e o intestino está em estado contínuo de inflamação controlada. O sistema imunológico é responsável pela manutenção da anergia (perda de resposta contra alguns antígenos ou microbiota comensal que ocorre normalmente) e controle de mecanismos regulatórios locais. A interrupção da homeostase e a ativação prolongada da resposta imune local no intestino levam ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas que ativam a resposta celular ou humoral o que leva a um comprometimento da função barreira do intestino. (FERGUSON et al., 2007; SOBCZAK et al., 2014).

O modelo atual sugere que a perda da homeostase intestinal como resultado da continua ativação do sistema imune na mucosa intestinal causada pela genética do hospedeiro, pressão ambiental e perturbações no microbiota intestinal (disbiose), manifestam um ciclo patológico malicioso. Onde mutações genéticas nos reguladores da barreira imune ou epitelial aumentam a susceptibilidade do hospedeiro de montar

uma resposta imune anormal contra a microbiota intestinal. A resposta inflamatória dirigida contra antígenos luminal da microbiota pode agravar mais danos à barreira epitelial intestinal, resultando em ulceração, depleção de mucina e perda da arquitetura de cripta, sustentando o ciclo de inflamação (ESPAILLAT; KEW; OBEID, 2016).

A microbiota intestinal refere-se a todos os microrganismos que colonizam o intestino, como bactérias, fungos e vírus. Ela se desenvolve após o nascimento, e é relativamente estável ao longo do tempo, diferindo entre os indivíduos. A microbiota contém várias funções críticas que contribuem para a saúde geral do hospedeiro. Dentre elas, absorção de nutrientes e minerais, síntese de vitaminas e aminoácidos, produção de ácidos graxos de cadeia curta, manutenção da integridade estrutural da barreira da mucosa intestinal, imunomodulação e proteção contra patógenos. Para manter a homeostase, tanto os organismos patogênicos como os não patogênicos coabitam os enterócitos em uma relação simbiótica. Alterações na composição microbiana podem resultar em disbiose, o que pode prejudicar a funcionalidade da microbiota resultando em doença (DERIKX et al., 2016).

A microbiota intestinal de pacientes com DII tem uma composição diferente em comparação aos indivíduos saudáveis. Há menor diversidade microbiana, especialmente em regiões de inflamação ativa, embora o número total de bactérias seja aumentado. A disbiose resulta em deficiência de nutrientes epiteliais e respostas imunes alteradas. Além disso, há aumento da permeabilidade da mucosa o que pode levar a uma exposição exagerada de ligantes bacterianos e de antígenos que ativam as respostas imunes patogênicas. A ativação de cascatas de sinalização central envolvendo o sistema imune inato e adaptativo pode induzir inflamação intestinal crônica através da secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Pacientes com DII mostram uma resposta imune exagerada devido a uma infiltração aumentada de linfócitos T CD4+ na mucosa (DERIKX et al., 2016).

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória que afeta a camada mucosa do cólon distal e do reto. As citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) estão envolvidas na imunopatogênese da doença (GHASEMI-PIRBALUTI et al., 2017). Na CU também é observado aumento da produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, o que indica

predominância da ativação da resposta imune do fenótipo Th-2 (RANDHAWA et al., 2014).

Entre as citocinas pro-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α tem sido as mais extensivamente estudadas. A produção excessiva dessas citocinas ativam macrófagos e linfócitos T o que leva a uma maior ativação de macrófagos e linfócitos T, expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular, recrutamento de neutrófilos, resultando em um ciclo vicioso de aumento da inflamação. O efeito coordenado de vários subtipos de células T CD4+ é fundamental na homeostase intestinal e tem ganhado grande atenção (LV et al., 2015).

As citocinas são componentes centrais das vias inflamatórias que ocorrem durante as fases ativa e crônica da colite ulcerativa. A IL-1 β recebe atenção considerável como um mediador potencial da infiltração de células inflamatórias e da ruptura da mucosa que acompanha a inflamação intestinal (GUAZELLI et al., 2013).

Além da ativação descontrolada do sistema imune, o dano ao estresse oxidativo também desempenha papel crucial na fisiopatologia das DII (ZHANG et al., 2017). Sob condições fisiológicas, um estado de equilíbrio é mantido entre os sistemas oxidantes e antioxidantes. No entanto, um processo inflamatório que leva a ativação de neutrófilos, produz radicais livres que torna o sistema antioxidante inadequado nas células epiteliais, o que podem resultar em dano celular e peroxidação lipídica (KRISHNAN et al., 2014).

Em biópsias da mucosa colônica de pacientes com doenças intestinais inflamatórias, é relatado que há um aumento nos radicais livres de oxigênio e estresse oxidativo, concomitantemente a uma diminuição das defesas antioxidantes. Os radicais livres de oxigênio juntamente com o dano oxidativo desencadeiam a criação de radicais de peróxido lipídico. Portanto, a inibição da peroxidização lipídica ou a retenção de radicais livres de oxigênio são importantes para o tratamento terapêutico da CU e para a prevenção da doença. (OZSOY et al., 2017).

A produção sustentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a inflamação pode eliminar o sistema de defesa antioxidante endógeno, tais como o superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona (GSH). Esses antioxidantes são responsáveis por neutralizam os radicais livres e os efeitos prejudiciais do EROs que levam à lesão oxidativa do cólon. Logo, é essencial que equilíbrio entre EROs e antioxidantes sejam mantidos, para proteção do cólon. O nível de EROs é um

parâmetro importante de avaliar o estresse oxidativo, contudo, é difícil medir diretamente em materiais biológicos devido a sua baixa vida biológica. Sendo assim, o nível de SOD, GSH e malonaldeído (MDA) são considerados marcadores úteis para refletir indiretamente o estresse oxidativo (NIU et al., 2015).

2.5.3. Fatores de risco para Colite Ulcerativa

A apresentação de DII ocorre em dois picos, sendo o primeiro ocorrendo nos jovens entre 15 e 30 anos, e um segundo pico menor entre 60 e 80 anos. No entanto, é principalmente uma doença de jovens, com aproximadamente 30% dos pacientes apresentando antes dos 20 anos de idade (FERGUSON et al., 2007).

Os pacientes com risco de comportamento agressivo da doença tipicamente são jovens e não fumantes, não fizeram apendicectomia prévia e apresentam doença extensiva com ulcerações profundas na colonoscopia e altos níveis de biomarcadores inflamatórios (HINDRYCKX; JAIRATH; D'HAENS, 2016).

O tabagismo é um dos fatores de risco mais fortes associados à colite ulcerativa, os fumantes ativos são menos propensos a desenvolver colite ulcerativa e tem o curso da doença mais leve em comparação com o ex-fumantes e não fumantes (UNGARO et al., 2016). Essa menor pré-disposição para a ocorrência de CU em fumantes, está associado a nicotina, que diminui a produção de eicosanóides mucosos e de algumas citocinas pró-inflamatórias (CONES, 2004).

Há indícios de que indivíduos que fizeram cirurgia para a retirada do apêndice apresentam uma proteção contra a colite ulcerativa, com base na hipótese que o apêndice atua como fonte de citocinas de bactérias e de mediadoras inflamatórias da mucosa. No entanto, existem evidências potenciais de modelos animais em que a apendicectomia na CU pode aumentar o risco de neoplasia colorretal (RAY; SAGAR, 2017).

Dado o aumento da incidência e prevalência de obesidade e sintomas metabólicos associados nas últimas décadas, que coincidem com o aumento da incidência da DII, o papel da dieta na patogênese da DII deve ser considerado. Nos seres humanos, a genética representa apenas cerca de 5% do aumento do índice de massa corporal. Modelos pré-clínicos destacaram o impacto diversificado dos nutrientes na regulação da imunidade da mucosa intestinal e na formação da

microbiota, ambos com implicações significativas para a patogênese da DII. Além dos dados humanos, estudos em animais demonstram que dietas, como a dieta ocidental pode induzir a disbiose, presumivelmente por afetar os metabólitos, o que, por sua vez, está associado à disfunção da barreira mucosa do hospedeiro (LIU; STAPPENBECK, 2016).

Pacientes com CU apresentam maior risco de câncer colorretal, mas ao longo do tempo esse risco diminuiu e pode se aproximar da população geral. No entanto, o risco permanece elevado em certas populações, como naqueles com longa duração da doença, com colangite esclerosante primária e com inflamação descontrolada. O risco de cirurgia na colite ulcerativa diminuiu ao longo das últimas décadas, mas ainda é substancial com a chance de necessidade de cirurgia após 5 anos sendo 11,6% e 10 anos sendo 15,6%. Fatores de risco para colectomia foram incorporados em um modelo de predição que inclui idade inferior a 40 anos no diagnóstico, doença extensiva, necessidade de esteroides sistêmicos e marcadores inflamatórios elevados. Os pacientes com colite ulcerativa não parecem ter um aumento da mortalidade em comparação com a população em geral, mas são mais propensos a ter uma inaptidão que os impede de trabalhar (UNGARO et al., 2016).

2.5.4. Tratamento para Colite Ulcerativa

O tratamento para CU baseia-se em fármacos que apresentam atividade antioxidante ou capacidade de inibir a produção de mediadores inflamatórios. A farmacoterapia da CU inclui o uso de aminossalicilatos, antibióticos, esteroides e imunomoduladores. As drogas tradicionalmente utilizadas, são os 5-aminossalicilatos (5-ASA) e os corticosteroides. Os imunomoduladores, como azatioprina e 6-mercaptopurina, e antibióticos estão se tornando importantes no cenário de pacientes resistentes ou dependentes a esteroides (BEZERRA et al., 2016; GU et al., 2017).

No entanto, a eficácia e a segurança dessas drogas têm sido questionadas recentemente devido a muitos efeitos colaterais, tais como, diarreia, câibras, dor abdominal acompanhada por febre, erupção cutânea ou problemas renais. Os corticosteroides também têm sido usados por muitos anos para tratar pacientes com CU grave, e têm efeitos colaterais bem conhecidos, que incluem arredondamento de face, acne, aumento de pelos, diabetes, ganho de peso e pressão alta. Portanto, a

busca de novas moléculas, preferencialmente de origem natural, com alta eficácia e segurança é urgente (GUPTA et al., 2015; GU et al., 2017;).

O objetivo da terapia é induzir e manter a remissão clínica e endoscópica. Os aminossalicilatos são a principal escolha para o tratamento da colite ulcerativa leve a moderada, os esteroides tópicos e sistêmicos podem ser usados para tratar inflamações de colite ulcerativa, enquanto que, são utilizados imunossupressores e drogas biológicas em doença moderada a grave. A colectomia é necessária em até 15% dos pacientes com colite ulcerativa (UNGARO et al., 2016).

As indicações para a cirurgia de retirada do cólon e/ou reto ocorrem nos casos de colite refratária à terapia médica, retardo de crescimento em crianças, displasia da mucosa ou malignidade e ocasionalmente na tentativa de melhorar as manifestações extra intestinais da doença (RAY; SAGAR, 2017).

2.5.5. Modelo experimental de Colite Ulcerativa

Experimentalmente, a colite ulcerativa tem sido induzida em animais utilizando uma variedade de produtos químicos que causam destruição aguda da mucosa do cólon. A colite induzida por ácido acético é comumente empregada e é um modelo facilmente reprodutível. Além de que apresenta a vantagem de se assemelhar à colite ulcerativa humana em termos de patogênese, características histopatológicas e perfil de mediadores inflamatórios. A administração transretal de solução de ácido acético causa inflamação caracterizada por aumento da infiltração de neutrófilos no tecido intestinal, necrose maciça das camadas mucosa e submucosa, dilatação vascular, edema e ulceração submucosa que são características notáveis da colite humana (RANDHAWA et al., 2014; EL-GOWELLI et al., 2015).

A colite induzida pelo ácido acético produz EROs em excesso, o que causam danos reversíveis ou irreversíveis às moléculas biológicas, incluindo DNA, lipídios, proteínas, carboidratos ou qualquer molécula próxima, causando uma cascata de reações em cadeia, resultando em dano celular. De modo que as biomoléculas podem perder suas funções fisiológicas nos tecidos (BITIREN et al, 2010). Além de que a administração transretal de AA aumenta os níveis de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α . IL-6 e IL-1 β (AL-REJAIE et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) na colite induzida por ácido acético em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter uma fração com proteínas do látex de *Plumeria pudica*;
- ✓ Avaliar o efeito de PLPp na colite induzida por ácido acético quanto a parâmetros macroscópicos, microscópicos e de peso úmido no cólon dos animais;
- ✓ Analisar o efeito de PLPp na colite induzida por ácido acético sobre a concentração de MPO no cólon dos animais;
- ✓ Avaliar a capacidade de PLPp em reduzir os níveis de MDA e o consumo de GSH no tecido colônico de camundongos com colite induzida por ácido acético;
- ✓ Verificar a concentração de IL-1 β no cólon de camundongos com colite induzida por ácido acético;

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), Swiss, machos, pesando entre 25-30 g. Os animais foram obtidos através da Universidade Federal do Piauí e foram mantidos em temperatura de 23 +/- 2°C, com ciclo claro/escuro (12/12h), e com água e comida *ad libitum*.

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização do estudo seguiu-se procedimentos e protocolos que foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA-UFPI), conforme o protocolo de número 037/15 (anexo 1). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO LÁTEX

As coletas foram realizadas na cidade de Parnaíba-PI, no período de março de 2016 a março de 2017. O látex foi obtido através de cortes nos caules da planta, onde foram coletados 10 ml de látex em tubos falcon contendo 10 ml de água destilada, sempre mantendo a proporção de 1:1 (v/v). O uso da água minimiza o efeito natural de coagulação do látex. Após a coleta, o material foi levado para o laboratório para o processamento. As amostras foram então, centrifugadas a 3.600 rpm por 15 minutos, o precipitado, rico em borracha, foi descartado e o sobrenadante foi submetido a diálise, contra água destilada por 48 horas, com trocas periódicas da água a cada 6 horas, utilizando membranas com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. As amostras foram mantidas durante a diálise em temperatura de 8°C. Após essa etapa o material foi novamente centrifugado, seguindo os mesmos padrões utilizados anteriormente, e o sobrenadante resultante

foi liofilizado. O material obtido foi denominado de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp).

4.4. MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Para a indução da colite foi utilizado a metodologia descrita por Magalhães (2017). Primeiramente, os camundongos foram divididos em 5 grupos: grupo salina (SAL), controle negativo, ácido acético (AA), controle positivo, e os grupos experimentais que foram tratados com as diferentes doses de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) 10, 20 e 40 mg/kg, cada grupo continha de 5 a 7 animais. Em seguida, os animais foram submetidos a um jejum de 16 horas, com livre acesso a água. Após 15 horas de jejum foi realizado o pré-tratamento dos grupos experimentais (PLPp 10 mg/kg, 20 mg/kg ou 40 mg/kg solubilizada em solução salina a 0,9%). As doses utilizadas foram definidas com base no trabalho de Fernandes et al (2015) onde os autores investigaram os efeitos anti-inflamatórios de PLPp.

Seguida as 16 horas de jejum, os animais foram anestesiados com xilazina (8 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) via intraperitoneal, e a colite foi induzida através da administração de 200 µl via retal de ácido acético 6% (pH de 2,5) para os grupos AA, e PLPp nas diferentes concentrações, enquanto que o grupo salina, recebeu 200 µl de solução salina a 0,9%. Para tanto, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a introdução de uma sonda de polietileno de 3 centímetros de comprimento contendo as soluções. Os animais permaneceram suspensos pela cauda por cerca de 30 segundo a fim de evitar que houvesse retorno das soluções.

Após 17 horas da indução da colite, os camundongos foram novamente tratados com as diferentes doses de PLPp e uma hora depois foram eutanasiados, realizando-se em seguida uma laparotomia, para que houvesse exposição dos intestino dos animais. Assim, retirou-se 5 cm do cólon, que foi utilizado para a avaliação de parâmetros inflamatórios, como peso úmido, lesão macroscópica e microscópica, MPO, MDA e GSH. Ao concluir qual a dose de PLPp apresentou melhores resultados, o ensaio foi repetido somente com a melhor dose, para a avaliação da concentração da citocina IL-1β.

4.5. AVALIAÇÃO DOS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO

Seguida a coleta dos 5 cm do cólon, esse foi aberto, lavado com solução fisiológica e distendido sobre uma superfície plana para a avaliação do escore macroscópico, utilizando a metodologia descrita por Morris (1989), conforme a tabela 1.

Tabela 1. Critérios para avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com colite induzida por ácido acético

Critério	Escore
Aparência Normal	0
Hiperemia local sem úlceras	1
Ulceração sem hiperemia ou espessamento da parede colônica	2
Ulceração com inflamação em um sítio	3
Ulceração com inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do cólon	5
Área de lesão > 2 cm ao longo do comprimento do cólon. A quantificação é aumentada em 1 para cada centímetro adicional	6 – 10

Fonte: Morris et al., 1989. Adaptado.

4.6. AVALIAÇÃO DO PESO ÚMIDO DO CÓLON DOS ANIMAIS

Utilizando uma balança analítica, o cólon obtido de cada camundongo foi pesado, a fim de se obter o peso úmido. Os resultados foram expressos como peso úmido em g/5cm de cólon.

4.7. AVALIAÇÃO DOS ESCORES MICROSCÓPICOS DE LESÃO

Posterior as avaliações de peso úmido e escores macroscópicos uma porção do cólon foi retirada para a avaliação dos escores microscópicos de lesão. As amostras foram fixadas, para isso utilizou-se formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH=7), posteriormente as amostras foram lavadas e seguiu-se para o passo de

desidratação, onde as amostras foram imersas em soluções alcoólicas de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por uma hora em cada. Em seguida, foi realizado a diafanização, no qual os tecidos foram submergidos em xilol I, e em xilol II por 45 min em cada. Por fim, foi feita a inclusão em parafina líquida, onde o tecido é submerso em duas soluções de parafina com temperatura em torno de 80°C. Em seguida, esperou-se o tempo necessário para a solidificação da parafina e seguiu-se para a realização dos cortes utilizando o micrótomo. Depois do material ter sido cortado e colocado em laminas, fez-se a desparafinização, com xilol I por 7 minutos e com xilol II por 3 minutos. Logo após, foi feita a hidratação com álcool 100% por 7 min e com álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e II por dois minutos cada. As laminas foram coradas com Hematoxilina e eosina (HE), onde foram submersas em hematoxilina por 2 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 3,5 minutos, com posterior imersão em eosina por 5 minutos e banho em água corrente. As lâminas secaram em temperatura ambiente, logo após foram montadas e visualizadas em microscópio de luz. Ao final, as lâminas foram avaliadas de acordo com a técnica descrita por Appleyard & Wallace (1995), conforme tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos escores microscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.

Critério	Escore
Perda da arquitetura da mucosa	0 – 3
Infiltração celular	0 – 3
Espessamento da camada muscular	0 – 3
Formação de abscesso em cripta	0 – 1
Ausência de células calciformes	0 – 1

Fonte: Appleyard e Wallace (1995). Adaptado

4.8. ANÁLISE DOS NÍVEIS COLÔNICOS DE MIELOPEROXIDASE

Uma parte do cólon dos animais foi utilizada para a realização do ensaio de MPO, no qual se avalia a infiltração neutrofílica no local da lesão. O protocolo seguido foi estabelecido por Bradley et al. (1982). Para isso, cerca de 50-100 mg do cólon dos

animais foram colocados em solução tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), na proporção de 1:20. Em seguida, o material foi macerado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos em temperatura de 4°C. Posteriormente, foi retirado 100 µl do sobrenadante e colocado em uma placa, em seguida, pipetou-se 200 µl da solução de leitura (27 ml de água + 5 mg de O-dianisina em 3 ml de fosfato de potássio + 15 µl de peróxido de hidrogênio). Por fim, a placa foi inserida em um leitor de ELISA, que realizou a leitura em 450nm. O resultado foi expresso em UMPO/mg de tecido.

4.9. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MALONIALDEÍDO NA MUCOSA INTESTINAL

De acordo com método de Mihara e Uchiyama (1978), realizou-se a determinação da concentração de MDA no cólon do camundongo. Porções do cólon foram colocadas em solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,15 M, na proporção de 1:10. Em seguida, as amostras foram maceradas e retirou-se 250 µl do homogenato, que foi colocado em tubo de vidro contendo 1,5 ml de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% e 0,5 ml de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Logo após, os tubos foram submersos em banho-maria por 45 minutos, com posterior banho em água gelada. Depois disso, adicionou-se 2 ml de n-butanol, e misturou-se em um agitador do tipo “vortex” por um minuto. Posteriormente, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 1200 rpm, retirou-se a fase butanólica que foi lida em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda simultaneamente: 520 e 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA NA MUCOSA INTESTINAL

Para a análise dos níveis de grupos sulfidrílicos não-proteicos na mucosa intestinal, seguiu-se o método descrito do Sedlak e Lindsay (1968). Amostras pesando entre 50-100 mg do cólon foram homogeneizadas em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,02 M, em uma proporção de 1:10. Em seguida, pegou-se 400 µl do homogenato e misturou-se com 320 µl de água destilada e 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% a fim de se promover a precipitação de proteínas. Logo

depois, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Posteriormente, adicionou-se 400 µl do sobrenadante, 800 µl de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20 µl de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M. Ao final, agitou-se a mistura por 3 minutos e as amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em mg de GSH/g de tecido.

4.11. DOSAGEM DE IL1-β

Para a dosagem de IL1-β utilizou-se como referência o protocolo descrito por Tavares-murta et al. (2008). Onde porções do cólon dos animais foram macerados em uma solução tampão inibidora de protease, na proporção de 500 µl de tampão para 100 mg de tecido, com posterior centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e incubado com 2 µg/ml de anticorpo de captura (DuoSet – DY501) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 µl por poço, durante 24 horas a 4°C. Passado esse intervalo, a placa foi lavada com PBS-tween 20 a 0,1%. Logo após, a placa foi bloqueada com 100 µl albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, e ficou em repouso por 2 horas em temperatura ambiente. Depois a placa foi lavada novamente com a mesma solução citada anteriormente. A placa então foi incubada com a curva padrão de IL1-β, diluídas em tampão de lavagem e com as amostras que serão dosadas, 100 µl por poço por 24 horas a 4°C. Após as 24 horas, a placa foi novamente lavada e incubada com o anticorpo de biotinilado diluído de 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro durante uma hora em temperatura ambiente. Foi então realizada outra lavagem e foi adicionado a avidina peroxidase, diluída de 1:5000 em tampão de lavagem, 100 µl por poço por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão, 100 µl por poço, no escuro em temperatura ambiente, por 20 minutos. Por fim, foi adicionado 150 µl por poço de H₂SO₄ 1M para promover a parada da reação e foi lido em espectrofotômetro a 490nm. Os resultados foram expressos como média ± erro da quantidade de IL1-β em pg/ml.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média (\pm EPM) de animais em cada grupo (n=5-7). Os testes estatísticos foram realizados no software Graphpad Prism (versão 5.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de 39 múltiplas comparações de Dunns. Para todos os testes foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

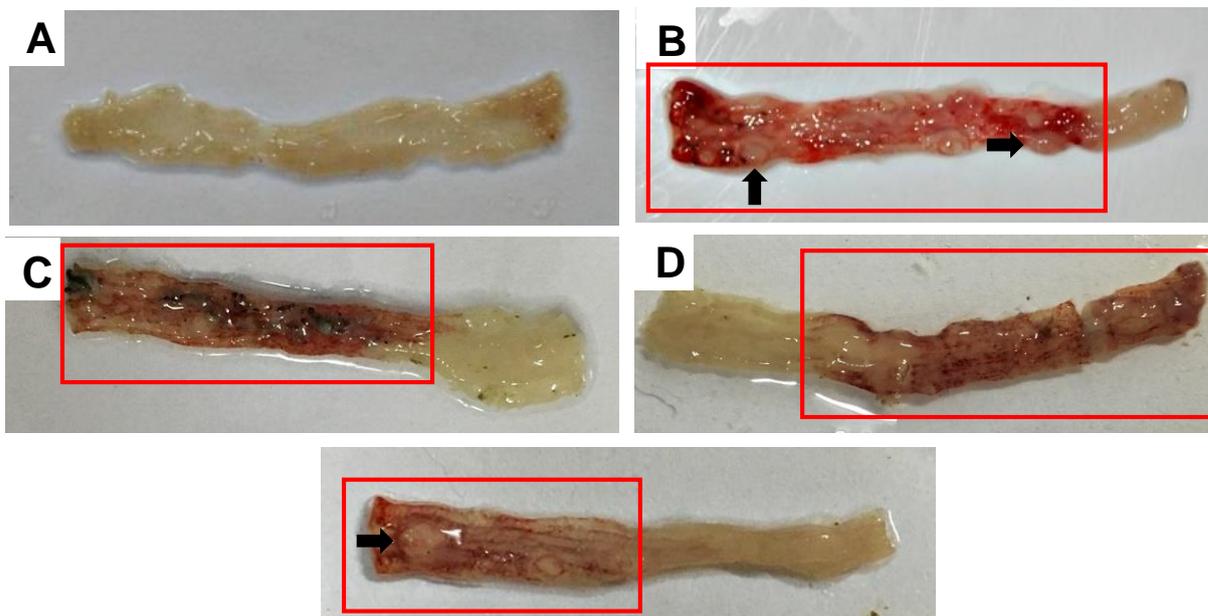
5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DE PLPp SOBRE OS ESCORES MACROSCÓPICOS DE LESÃO NO CÓLON DOS ANIMAIS

Na figura 3, pode-se observar que administração de ácido acético promoveu intensa lesão tecidual ($16,85 \pm 2,19$) quando comparada com ao grupo salina ($0,33 \pm 0,23$). Essa diferença também pode ser observada na figura 4A e 4B, que representam o tecido colônico dos animais que receberam AA e solução salina, respectivamente. Observa-se que o cólon do camundongo que recebeu AA apresenta intensa hiperemia e formação de úlceras ao longo de praticamente todo o tecido retirado para a análise, enquanto que o cólon do animal que recebeu salina não apresenta nenhuma inflamação.

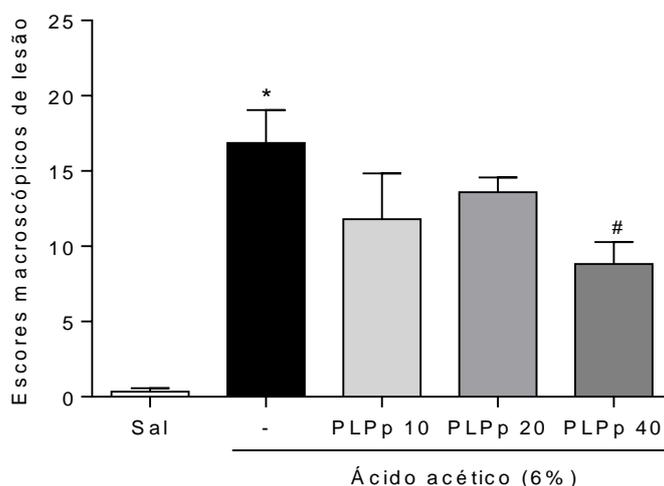
Também é possível observar na figura 3 que todas as doses de PLPp, 10mg/kg ($11,8 \pm 3,40$), 20mg/kg ($13,6 \pm 0,97$) e 40mg/kg ($8,81 \pm 1,47$) apresentaram uma tendência de redução dos escores macroscópicos de lesão, no entanto, somente na dose de 40mg/kg foi observada redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo AA. As figuras 4C, 4D e 4E, representam amostras de tecidos do cólon dos camundongos que receberam as doses de PLPp 10mg/kg, 20mg/kg e 40mg/kg, respectivamente, onde é possível observar diminuição da inflamação, principalmente na dose de 40mg/kg.

Figura 3. Fotografia do tecido colônico representando o efeito das diferentes doses de PLPp sobre os danos macroscópicos de lesão na colite ulcerativa induzida por ácido acético.



Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retirados para avaliação dos escores macroscópicos de lesão. A) grupo SAL; B) grupo AA; C) grupo PLPp 10mg/kg; D) grupo PLPp 20mg/kg; E) grupo PLPp 40mg/kg. Setas pretas – úlceras. Retângulos vermelhos – área inflamada.

Figura 4. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre os escores macroscópicos de lesão dos cólons de camundongos com colite induzida por ácido acético.

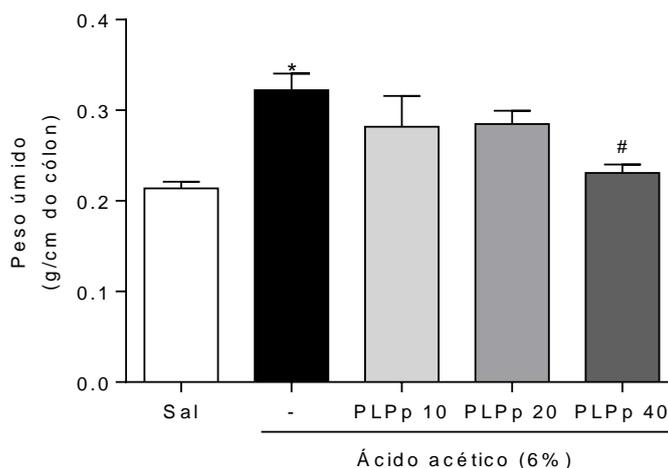


Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retirados para avaliação dos escores macroscópicos de lesão. Os resultados obtidos foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.2. EFEITO DE PLPp SOBRE O PESO ÚMIDO DE TECIDOS DOS CÓLONS DOS ANIMAIS

Os resultados obtidos demonstram que a administração de ácido acético promove aumento significativo do peso úmido do cólon dos animais (AA: $0,30 \pm 0,02$ g/5cm) quando comparado com o grupo salina ($0,21 \pm 0,07$ g/5cm) (Figura 5). Os grupos tratados com PLPp 10 mg/kg ($0,28 \pm 0,03$ g/5cm) e 20 mg/kg ($0,28 \pm 0,01$ g/5cm), não foram eficazes em impedir o aumento do peso úmido do cólon dos animais de modo significativo quando comparado ao grupo AA. Contudo, a dose de PLPp 40 mg/kg ($0,23 \pm 0,009$ g/5cm) foi capaz de diminuir de forma significativa o peso úmido dos cólons dos camundongos.

Figura 5. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre o peso úmido dos cólons de camundongos com colite induzida por ácido acético.

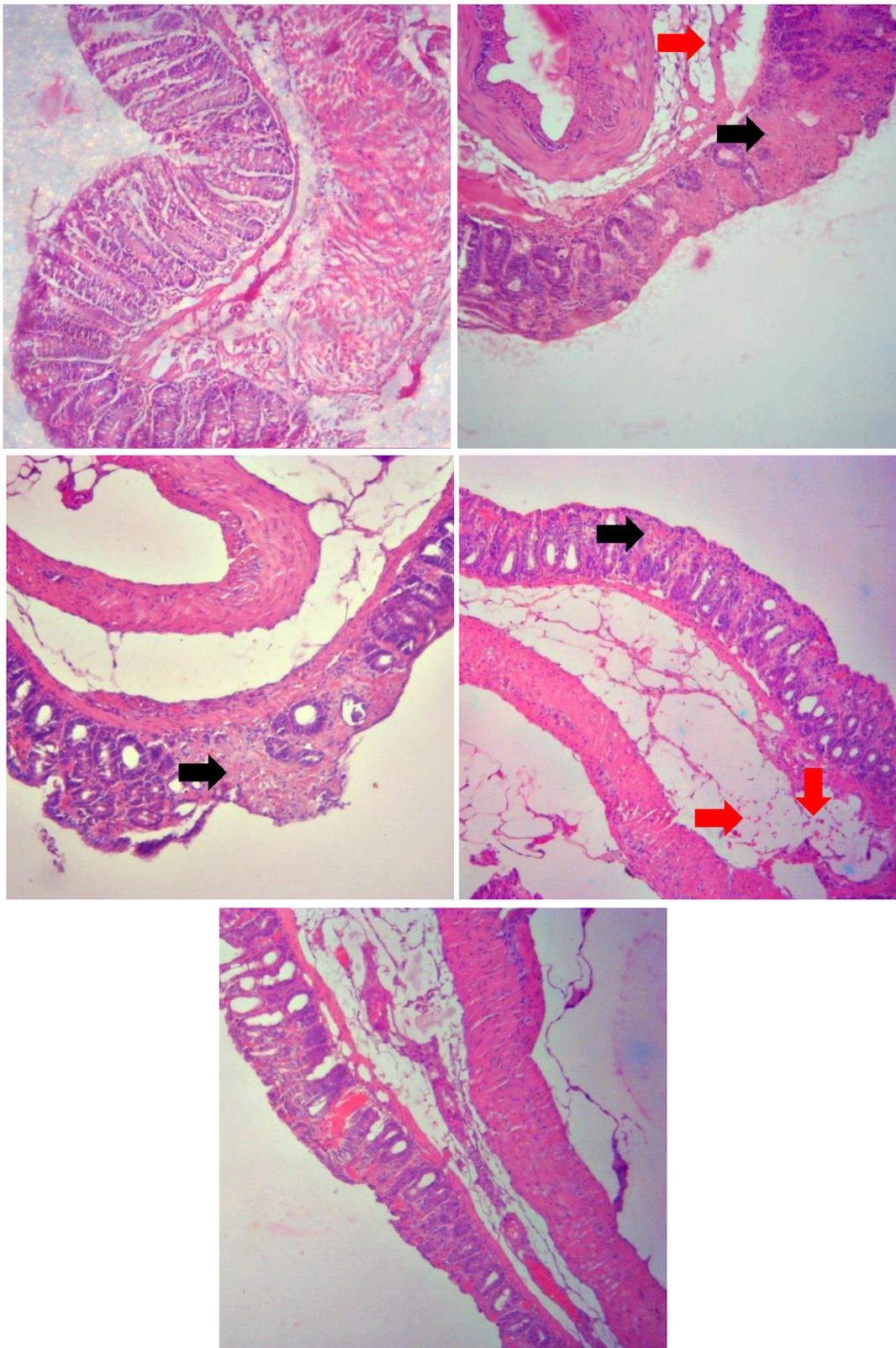


Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retirados e o peso úmido foi avaliado. Os resultados foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.3. EFEITO DE PLPp SOBRE OS ESCORES MICROSCÓPICOS DE LESÃO NO CÓLON DOS ANIMAIS

Amostras teciduais dos cólons dos animais dos grupos controle, ácido acético e tratados com diferentes doses de PLPp foram analisadas por histologia (Figura 6). A partir desta análise, foi construída uma tabela contendo dados de escores microscópico de lesão nestes animais (Tabela 3). Assim, foi possível observar que o grupo salina apresentou escores de lesão mínimo, bem como, o grupo AA apresentou escores de lesão máximo, como era esperado, havendo diferença significativa entre os dois grupos em todos os parâmetros avaliados. O tratamento dos camundongos com PLPp 10mg/kg não apresentou nenhum efeito protetor contra a colite induzida por AA, como é possível observar na tabela 3, em que esse grupo não apresentou diferença significativa em nenhuma das análises realizadas quando comparado ao grupo AA. Já o grupo tratado com PLPp 20mg/kg, apresentou menor dano histológico quando comparado ao grupo AA, no entanto, apenas quanto ao critério de ausência de células caliciformes obteve-se diferença significativa. O grupo PLPp 40mg/kg apresentou escore totais de lesão microscópica significativamente menor que o grupo AA, bem como apresentou diferença significativa em todos os parâmetros avaliados, com exceção do espessamento da camada muscular.

Figura 6. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre os danos microscópicos de lesão intestinal na colite ulcerativa experimental induzida por ácido acético.



Microfotografia na objetiva de 10x, coradas com hematoxilina e eosina. (A) Grupo Salina; (B) Grupo Ácido Acético; (C) Grupo PLPp 10 mg/kg; (D) Grupo PLPp 20 mg/kg; (E) Grupo PLPp 40 mg/kg. Setas pretas representam perda da arquitetura da mucosa e a seta vermelha indicam presença de células inflamatórias.

Tabela 3. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre os escores microscópicos de lesão na colite induzida por ácido acético em camundongos.

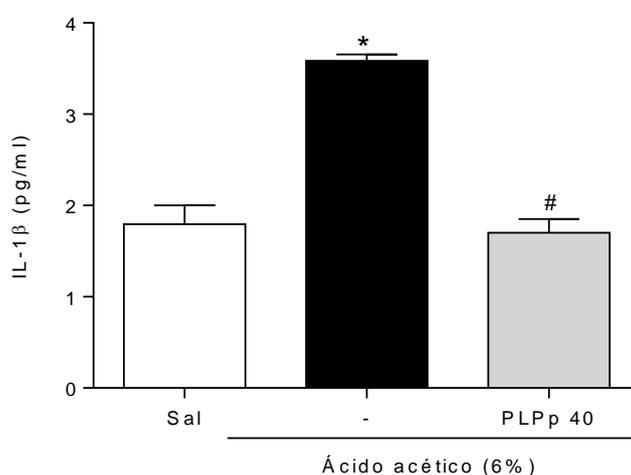
Critério	Média dos Escores				
	Salina	Ácido acético	PLPp 10mg/kg	PLPp 20mg/kg	PLPp 40mg/kg
Perda da arquitetura da mucosa	0(0-0)	3 (3-3)#	3 (2-3)	2 (1-3)	1 (1-2)*
Infiltração celular	0(0-0)	3 (2-3)#	2 (2-3)	1 (1-3)	1 (1-1)*
Espessamento da camada muscular	0(0-0)	3 (3-3)#	3 (2-3)	1 (1-2)	2 (1-2)
Formação de abscesso em cripta	0(0-0)	1 (1-1)#	1 (0-1)	1 (0-1)	1 (0-1)*
Ausência de células caliciformes	0(0-0)	1 (1-1)#	1 (0-1)	1 (0-1)*	0 (0-0)*
Escores totais de danos	0(0-0)	11 (10-11)#	9 (7-10)	6 (4-8)	5 (4-6)*

Escores de lesão histológica foram expressos como média \pm erro ($n=5-6$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. # $p<0.05$ vs grupo salina; * $p<0.05$ vs grupo ácido acético.

5.4. EFEITO DE PLPp SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA IL-1 β NO CÓLON DOS ANIMAIS COM COLITE INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Quando avaliado as concentrações da citocina IL-1 β , foi observado que o grupo AA, apresentou aumento significativo na concentração da citocina ($3,58 \pm 0,07$ pg/ml) quando comparado ao grupo salina ($1,79 \pm 0,20$ pg/ml) (Figura 10). Por outro lado, o grupo que recebeu PLPp 40mg/kg ($1,70 \pm 0,15$ pg/ml), apresentou níveis significativamente menores de IL-1 β quando comparado ao grupo AA.

Figura 7. Efeito de proteína do látex de *Plumeira pudica* (PLPp) sobre a concentração da citocina IL-1 β na colite induzida por ácido acético em camundongos.

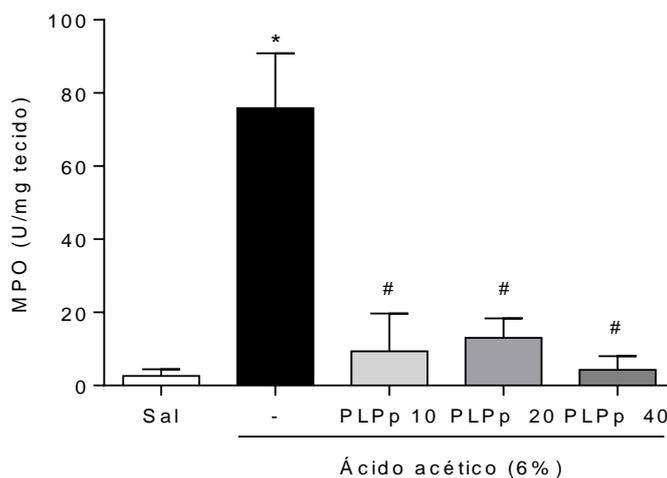


Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecidos do cólon (5cm) foram retirados para a análise das concentrações da citocina IL-1 β na mucosa intestinal. Os resultados foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.5. EFEITO DE PLPp SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO COLÔNICO DOS CAMUNDONGOS

O grupo AA apresentou níveis significativamente maiores da atividade de MPO ($67,93 \pm 9,83$ UMPO/mg de tecido) que o grupo salina ($2,61 \pm 0,75$ UMPO/mg de tecido) (Figura 7). O tratamento dos animais com PLPp nas doses 10mg/kg ($9,35 \pm 3,91$ UMPO/mg de tecido), 20mg/kg ($13,06 \pm 2,01$ UMPO/mg de tecido) e 40mg/kg ($4,29 \pm 1,41$ UMPO/mg de tecido), foram capazes de reduzir os níveis de MPO de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo AA.

Figura 8. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em tecido intestinal de camundongos com colite induzida por ácido acético.

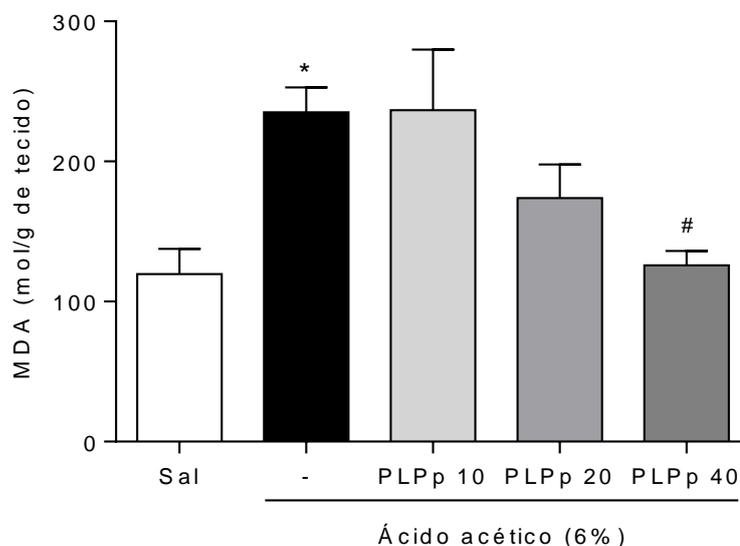


Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retiradas e foi avaliada a atividade da Mieloperoxidase. Os resultados foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.6. EFEITO DE PLPp SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO MALONIALDEÍDO NO CÓLON DOS ANIMAIS COM COLITE

O grupo de animais que recebeu ácido acético a 6%, apresentou maior concentração de MDA ($235,2 \pm 17,57$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo que recebeu solução salina a 0,9% ($119,6 \pm 18,07$ nmol/g de tecido) (Figura 8). O grupo tratado com PLPp 10 mg/kg não foi eficaz em reduzir os níveis de MDA ($236,7 \pm 43,3$ nmol/g de tecido) quando comparado ao grupo AA. Já o grupo tratado com PLPp 20 mg/kg, conseguiu diminuir os níveis de MDA ($173,8 \pm 23,9$ nmol/g de tecido), porém não de forma significativa. Entretanto, a dose de PLPp 40mg/kg, foi capaz de promover uma redução significativa dos níveis de MDA ($125,8 \pm 10,32$ nmol/g de tecido), quando comparadas ao grupo AA.

Figura 9. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre as concentrações de malonaldeído (MDA) em tecido intestinal de camundongos com colite induzida por ácido acético.

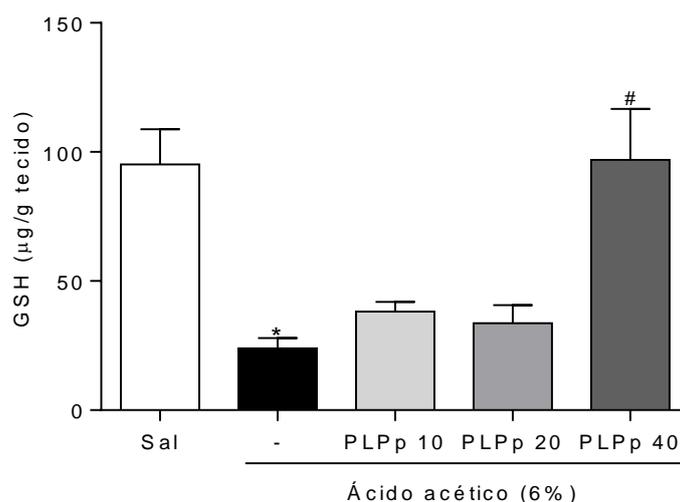


Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retirados e foi avaliada as concentrações de malonaldeído na mucosa intestinal. Os resultados foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

5.7. EFEITO DE PLPp SOBRE OS NÍVEIS COLÔNICOS DE GLUTATIONA NO TECIDO COLÔNICO DOS CAMUNDONGOS COM COLITE

Os resultados obtidos demonstram que os camundongos que receberam SAL, apresentaram níveis de GSH ($95,20 \pm 13,61 \mu\text{g/g}$ de tecido) significativamente maiores do que os que receberam AA ($23,99 \pm 4 \mu\text{g/g}$ de tecido). Os grupos tratados com PLPp 10mg/kg ($38,23 \pm 3,71 \mu\text{g/g}$ de tecido) e PLPp 20 mg/kg ($33,74 \pm 6,95 \mu\text{g/g}$ de tecido) não apresentaram aumento significativo dos níveis de GSH quando comparados ao grupo AA. No entanto, PLPp 40mg/kg foi capaz de evitar de forma significativa o consumo de GSH ($96,95 \pm 19,76 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo de animais que recebeu somente ácido acético a 6% (Figura 9).

Figura 10. Efeito de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PLPp) sobre os níveis colônicos de glutatona (GSH) na colite induzida por ácido acético em camundongos.



Os animais tratados com diferentes doses da fração proteica de *Plumeria pudica* (10, 20 e 40 mg/kg), via intraperitoneal, foram eutanasiados e amostras de tecido do cólon (5cm) foram retirados e foi avaliada as concentrações de glutatona na mucosa intestinal. Os resultados foram expressos como média de 5 ± 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ vs grupo salina; # $P < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls*).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como foco os efeitos de PLPp na colite ulcerativa induzida por ácido acético. Esse modelo experimental tem sido amplamente utilizado em pesquisas na busca de potenciais medicamentos para o tratamento da CU, uma vez que, a colite induzida por AA se assemelha a CU humana em relação à patogênese, características histopatológicas e perfil de mediadores inflamatórios (ALI et al., 2017)

Os resultados desta pesquisa mostraram que proteínas do látex de *Plumeria pudica* apresentaram um efeito protetor na colite induzida por AA. Onde observou-se que a dose de 40mg/kg apresentou redução nos escores microscópicos e macroscópicos de lesão e no peso úmido do cólon dos camundongos. Além de que foi capaz de reduzir a infiltração neutrofílica, observada pela redução da atividade de MPO. O modelo de colite experimental com AA causou estresse oxidativo e peroxidação lipídica, observada pelo consumo elevado de GSH e aumento dos níveis de MDA, no entanto, o tratamento com PLPp 40mg/kg, foi eficaz tanto em impedir o consumo de GSH quanto em aumentar as concentrações de MDA. Também, foi observado a capacidade de inibir a síntese da citocina pro-inflamatória IL-1 β , o que contribuiu para a redução da inflamação no local.

A administração transretal de AA produz uma inflamação colônica aguda e não transmural que é qualificada com elevada infiltração leucocitária no tecido intestinal, superprodução de mediadores inflamatórios, dilatação vascular, edema e extensa necrose das camadas mucosas e submucosas com seguinte ulceração submucosa como observada na CU (KARAKOYUN et al., 2017). O peso úmido do tecido do cólon inflamado é considerado um indicador confiável e sensível da gravidade e extensão da resposta inflamatória (NIU et al., 2013).

Neste trabalho foi observado que PLPp 40mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa as lesões macroscópicas e o peso úmido do cólon dos camundongos. A indução da colite ulcerativa com ácido acético provoca alterações macroscópicas, microscópicas e bioquímicas. As lesões macroscópicas observadas neste experimento, foram desde intensa hiperemia a formação de úlceras com inflamação percorrendo praticamente todo o tecido analisado. E o aumento do peso úmido foi significativamente mais alto do que o grupo controle negativo (SAL). Resultados

semelhantes foram observados nos estudos realizados por Palla et al. (2016) e Magalhães (2017), onde foi utilizando a mesma concentração de AA utilizado neste experimento.

As principais características observadas na CU são descritas como úlceras e feridas abertas no cólon, perda epitelial, perda de células caliciformes e infiltração de células inflamatórias da mucosa colônica (OZSOY et al., 2017). Os estudos histopatológicos confirmaram achados macroscópicos e mostraram que mudanças inflamatórias, incluindo edema, hemorragia, dano de cripta, perda de células epiteliais, infiltração de células inflamatórias e necrose foram observadas nos tecidos colônicos dos camundongos que receberam AA. Palla et al. (2017), observou que a o AA causa lesão epitelial com redução de células caliciformes. Um padrão semelhante de lesão foi evidente nesta pesquisa. Contudo, essa depleção foi significativamente menor no grupo tratado com PLPp 40 mg/kg.

A infiltração de neutrófilos na mucosa inflamada é uma das características histológicas mais proeminentes observadas na CU. A mieloperoxidase é uma enzima peroxidase encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos. O nível de atividade MPO é diretamente proporcional à concentração de neutrófilos no tecido inflamado. Portanto, a medida da atividade MPO foi considerada um ensaio quantitativo e sensível para a inflamação intestinal aguda (NIU et al., 2013; YANG et al., 2016; GU et al., 2017). A alta atividade de MPO mostra infiltração de neutrófilos excessivos e danos nos tecidos (OZSOY et al., 2017).

No presente trabalho, a colite induzida por AA demonstrou aumento significativo da atividade de MPO no cólon dos animais. O tratamento dos camundongos via intraperitoneal com PLPp nas diferentes doses foi eficaz em diminuir de forma significativa a atividade de MPO, demonstrando o potencial anti-inflamatório dessa fração proteica. A capacidade de PLPp em reduzir a atividade de MPO também foi demonstrada por Fernandes et al. (2015), quando os autores realizaram o ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

O estresse oxidativo desempenha um papel crítico na patogênese da colite ulcerativa. A produção de espécies reativas de oxigênio, com subsequente depleção do sistema antioxidante pode representar fatores de susceptibilidade à doença inflamatória intestinais (ZHANG et al., 2017). A diminuição da capacidade antioxidante causa uma maior peroxidação lipídica que induz distúrbios da organização da

membrana, perda funcional e modificação de proteínas e bases de DNA (NIU et al., 2015).

As EROs desempenham um papel importante no dano tecidual durante as reações inflamatórias e atuam como mediadores essenciais da apoptose induzida pelo TNF- α . A CU induzida por AA está associada à geração de EROs, que se apresenta como fator importante no desenvolvimento da CU, já que a sua superprodução esgota a quantidade de GSH. Esse é um importante agente antioxidante de defesa intracelular, que protege os tecidos de radicais livres que surgem após a indução de CU por administração de AA. Por isso, a depleção de conteúdo de GSH indica a progressão do estresse oxidativo (SHALKAMI; HASSAN; BAKR, 2018). Durante a inflamação, o esgotamento da GSH pode resultar em degradação severa do jejuno e da mucosa do cólon, bem como o aumento do MDA (NIU et al., 2015).

A injúria causada pelo AA aumenta os níveis de íons protonados nas células epiteliais do cólon, gerando EROs e metabólitos do ácido araquidônico, resultando em destruição das células do cólon e inflamação. O estresse oxidativo pode ser causado pela peroxidação lipídica induzida por EROs, na qual as EROs atacam os ácidos graxos poli-insaturados (por exemplo, ácido oleico e linolênico), causando a ruptura dos fosfolípidios das membranas celulares. Além disso, as EROs ativam fosfolipases que induzem lise de fosfolípidos e liberação de ácidos graxos insaturados, com consequente ruptura das membranas. A oxidação de lipídios insaturados promove a formação de resíduos químicos, como o MDA, e a degradação de constituintes da matriz extracelular, como proteoglicanos, elastina e colágeno (BEZERRA et al., 2016).

O MDA é o produto final da peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados induzidos por EROs, que mostra o dano celular e intracelular. O MDA aumentado reflete a peroxidação lipídica nos tecidos e é considerado um marcador de tecido danificado, um processo que normalmente ocorre após a liberação de radicais livres em condições inflamatórias (OZSOY et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Em concordância com o que foi exposto anteriormente, estudos como o de Krishnan et al. (2014), Gupta et al. (2015) e Niu et al. (2015) demonstraram que a administração transretal de ácido acético, causou aumento da concentração de malonaldeído e elevado consumo da glutatona no tecido intestinal durante a colite experimental.

O tratamento com PLPp 40mg/kg reduziu de modo significativo o consumo de GSH, e os níveis de MDA, demonstrando o potencial antioxidante dessa fração. Este potencial já havia sido observado em estudos anteriores com PLPp, onde este foi eficaz em reduzir os níveis de MDA e evitar o consumo de GSH intestinal de animais com diarreia induzida pelo óleo de rícino (SANTANA et al., 2018).

As respostas inflamatórias desempenham um papel crítico na patogênese da CU. Estudos clínicos e experimentais mostraram que a redução da regulação das respostas inflamatórias poderia melhorar a doença (ZHANG et al., 2017). Embora a etiologia da colite ulcerativa não seja completamente compreendida, há muitas evidências de que a elevação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , leva a inflamação e danos nos tecidos no progresso da colite ulcerativa. Embora as citocinas sejam essenciais para a defesa normal do hospedeiro, a secreção excessiva pode ser prejudicial (MOTAGHI et al., 2016).

As citocinas são componentes centrais das vias inflamatórias que ocorrem durante as fases aguda e crônica da CU. Os níveis de IL-1 β apresentam-se aumentados na mucosa inflamada, com relevância patogênica no curso da doença. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos macrófagos, monócitos, e células dendríticas. A ligação de IL-1 β com o seu receptor (IL-1R1) nas células endoteliais estimula o aumento da expressão da molécula de adesão, promovendo a adesão e transmigração de leucócitos (GUAZELLI et al., 2013). Logo, o uso de drogas que impedem a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias vem a ser uma estratégia importante para o tratamento de pacientes com doenças inflamatórias, como a colite ulcerativa.

Assim, PLPp 40mg/kg apresentou potencial anti-inflamatório na colite ulcerativa induzida por AA, uma vez que, essa fração foi capaz de reprimir a atividade de MPO, e também de diminuir as concentrações da IL-1 β . Resultados semelhantes foram observados por Fernandes et al. (2015), onde PLPp reduziu os níveis de IL-1 β em um modelo de peritonite induzida por carragenina.

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, pode-se sugerir que proteínas do látex de *Plumeria pudica* apresentam efeito protetor na colite ulcerativa induzida por ácido acético. Uma vez que a fração de PLPp 40mg/kg reduziu a lesão macroscópica, o peso úmido e a lesão microscópica no cólon dos animais. Pode-se concluir também que PLPp apresenta potencial anti-inflamatório, já que essa fração diminuiu a infiltração neutrofílica, observada pela redução da atividade de MPO e os níveis da citocina pró-inflamatória Il-1 β . Também foi observado a capacidade de PLPp em reduzir o estresse oxidativo associado à colite induzida por ácido acético, ao ser capaz de diminuir os níveis de MDA e o consumo de GSH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELFATTAH, A.; HALLEM, E. N. A. A.; KHALEEL, S. A. H.; SALLAM, A. S. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 268-275, 2017.
- ADEGOKE, G. A.; ONASANWO, S. A.; EYAREFE, O. D.; OLALEYE, S. B. Ameliorative effects of *Musa sapientum* peel extract on acetic acid-induced colitis in rats. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 77, p. 49-55, 2016.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AKHTAR, N.; SALEEM, M.; RIAZ, N.; SHAIG ALI, M.; YAGOOB, A.; NASIM, F.; JABBAR, A. Isolation and characterization of the chemical constituents from *Plumeria rubra*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 291-298, 2013.
- ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory Effect of Latex from *Calotropis procera* in Three Different Experimental Models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. **Planta Med**, v. 70, p. 1144-1149, 2004.
- ALI, A. A.; HALEEM, E. N. A. A.; KHALEEL, S. A.; SALLAM, A. S. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 268-275, 2017.
- AL-REJAIE, S. S.; ABUOHASHISH, R. M.; AL-ENAZI, M. M.; AL-ASSAF, A. H.; PARMAR, M. Y.; AHMED, M. M. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 5633-5644, 2013.
- AOKI, Y.; TAKAHASHIA, S.; TAKAYAMAB, D.; OGATAC, Y.; SAKURAIC, N.; SUZUKIC, H.; ASAWATRERATANAKULB, K.; WITITSUWANNAKULE, D.; WITITSUWANNAKULF, R.; SHIBATAC, D.; KOYAMAB, T.; NAKAYAMAA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p. 1–8, 2014.
- BAUER, G.; FRIEDRICH, C.; GILLIG, C.; VOLLRATH, F.; SPECK, T.; HOLLAND, C. Investigating the rheological properties of native plant látex. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1–6, 2013.
- BAUER, G.; GORB, S. N.; KLEIN, M. C.; NELLESEN, A.; TAPAVICZA, M. V.; SPECK, T. Comparative Study on Plant Latex Particles and Latex Coagulation in *Ficus*

benjamina, *Campanula glomerata* and Three *Euphorbia* species. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–8, 2014.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v. 369, p.1641-57, 2007.

BEZERRA, G. B.; SOUZA, L. M.; SANTOS, A. S.; ALMEIDA, G. K. M.; SOUZA, M. T. S.; SANTOS, S. L.; CAMARGO, E. A.; LIMA, B. S.; ARAÚJO, A. A. S.; CARDOSO, J. C.; GOMES, S. V. F.; GOMES, M. Z.; JÚNIOR, R. L. C. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 687-696, 2017.

BHARTI, S.; WAHANE, V. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p. 440-444, 2010.

BITIREN, M.; KARAKILCIK A. Z.; ZERIN, M.; OZARDALI, I.; SELEK, S.; NAZLIGÜL, Y.; OZGONUL, A.; MUSA. D.; UZUNKOY, A. Protective Effects of Selenium and Vitamin E Combination on Experimental Colitis in Blood Plasma and Colon of Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 136, p. 87–95, 2010.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60 n.3, p. 618-622, 1982.

BRAIA, M.; FERRERO, M.; ROCHA, M. V.; LOUREIRO, D.; TUBIO, G.; ROMANINI, D. Bioseparation of papain from *Carica papaya* latex by precipitation of papain–poly (vinyl sulfonate) complexes. **Protein Expression and Purification**, v. 91, p.91-95, 2013.

CHANDA, I.; SARMA, U.; BASU, S. K.; LAHKAR, M.; DUTTA, S. K. A Protease Isolated from the Latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 2: Anti-inflammatory and Wound Healing Activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 755-760, 2011.

CHANDRASEKARAN, R.; GNANASEKAR, S.; SEETHARAMAN, P.; KRISHNAN, M.; SIVAPERUMAL, S. Intrinsic studies of *Euphorbia antiquorum* L. latex extracts against human bacterial pathogens and mosquito vector *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 75-82, 2017.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, V.; GUPTA, P.; SINGH, S. Investigation of Antiarthritic Potential of *Plumeria alba* L. Leaves in Acute and Chronic Models of Arthritis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014a.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, V.; SINGH, S. Phytochemical and Pharmacological activity of *Genus Plumeria*: An updated review. **International Journal of Biomedical And Advance Research**, v. 05 (06), p. 266-271, 2014b.

CONES, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 481–496, 2004

DAS, A.; DUTTA, A. K.; RAZZAQUE, S.; SAHA, B.; GOPE, P. S.; CHOUDHURY, N. Analgesic and Antidiarrheal Properties of the Latex of *Calotropis Procera*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, p. 521–525, 2011.

DERIKX, L. A. A. P.; DIELEMAN, L. A.; HOENTJEN, F. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis, **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, p. 55-71, 2016.

DGHIM, F.; BOUAZIZ, M.; MEZGHANI, I.; BOUKHRIS, M.; NEFFATI, M. Laticifers identification and natural rubber characterization from the latex of *Periploca angustifolia* Labill. (Apocynaceae). **Flora**, v. 217, p. 90-98, 2015.

EL-GOWELLI H. M.; SAAD E. I.; ABDEL-GALIL A. G.; IBRAHIM E. R. Co-administration of α -lipoic acid and cyclosporine aggravates colon ulceration of acetic acid-induced ulcerative colitis via facilitation of NO/COX-2/miR-210 cascade. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, p. 300-312, 2015.

ESPAILLAT, M. P.; KEW, R. R.; OBEID, L. M. Sphingolipids in neutrophil function and inflammatory responses: Mechanisms and implications for intestinal immunity and inflammation in ulcerative colitis. **Advances in Biological Regulation**, v. 63, p. 140-155, 2016.

FERGURSON, L. R.; SHELLING, A. N.; BROWNING, C. H.; PETERMANN, I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutation Research**, v. 622, p. 70–83, 2007.

FERNANDES, H.B.; MACHADO, D. L.; DIAS, J.M.; BRITO, T. V.; BATISTA, J. A.; PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; RAMOS, M. V.; MEDEIROS, J. V. R.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; BARBOSA, A. L. R.; OLIVEIRA, J. S. Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de farmacologia**, v. 25, p. 269-277, 2015.

GAI, Y.; ZHAO, Y.; ZHAO, H.; YUAN, C.; YUAN, S.; ZHU, B.; JI, X. The Latex Protein MLX56 from Mulberry (*Morus multicaulis*) Protects Plants against Insect Pests and Pathogens, **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-11, 2017.

GHASEMI-PIRBALUTI, M.; MOTAGHI, E., NAJAFI, A., HOSSEINI, M. J. The effect of theophylline on acetic acid induced ulcerative colitis in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 153–159, 2017.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131–138, 1982. 2010.

GU, P.; ZHU, L.; LIU, Y.; ZHANG, L.; LIU, J.; SHEN, H. Protective effects of paeoniflorin on TNBS-induced ulcerative colitis through inhibiting NF-kappaB pathway and apoptosis in mice. **International Immunopharmacology**, v. 50, p. 152-160, 2017.

GUAZELLI, C. F. S.; FATTORI, V.; COLOMBO, B. B; GEORGETTI, S. R. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 200–208, 2013.

GUPTA, R. A.; MOTIWALA, M. N.; DUMORE, N. G.; DANAOK, K. R.; GANJARE, A. B. Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 239-46, 2015.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 631-639, 2008.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, A. B.; ALARCON-AGUILAR, F. J.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; NEITO-YAÑEZ, O; OLIVARES-SANCHEZ, J. M.; DURAN-DIAZ, A.; RODRIGUEZ-MOROY, M. A.; CANALES-MARTINEZ, M. M. Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 1-7, 2017.

HINDRYCKX, P.; JAIRATH, V.; D'HAENS, G. Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management. **Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology**, v. 13, n. 11, p. 654-664, 2016.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 313-325, 2012.

KARAKOYUN, B.; ERTAŞ, B.; YÜKSEL, M.; AKAKIN, D.; ÇEVİK, Ö.; ŞENER, G. Ameliorative effects of riboflavin on acetic acid-induced colonic injury in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, p.1440-1681, 2017.

KEKWICK, R.G.O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1-6, 2011.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510–1530, 2011.

KRISHNAN, M.; JAYARAJ, R. L.; MEGALA, J.; ELANGO VAN, N. Antioxidant mediated antiulcer effect of *Eupatorium triplinerve* Vahl against acetic acid induced ulcerative colitis in mice. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, p. 153-160, 2014.

KUIGOUA, M. G.; KOUAM, S. F.; NGADJUI, B. T.; SCHULZ, B.; GREEN, I. R.; CHOUDHARY, M. I., KROHN, K. Minor secondary metabolic products from the steam bark of *Plumeria rubra* Linn. Displaying antimicrobial activities. **Planta Med**, v. 76, p. 620-625, 2010.

LIU, T.; STAPPENBECK, T. S. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annual Review of Pathology**, v. 11, p. 127–148, 2016.

LOH, S. C.; THOTTATHIL, G. P.; OTHMAN, A. S. Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in bark of *Hevea brasiliensis* seedlings associated with secondary laticifer differentiation using gene expression microarray. **Plant Physiology and Biochemistry**, v, 47, p. 45-55, 2016.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. N. H.; SILVA, A; H.; LEAL. L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v.7, p. 1-11, 2010.

LV, Q.; QIAO, S.; XIA, Y.; SHI, C.; XIA, Y.; CHOU, G.; WANG, Z.; DAI, Y.; WEI, Z. Norisoboldine ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of regulatory T cells in colons. **International Immunopharmacology**, v. 29, p. 787-797, 2015.

MAGALHÃES, D. A. **Resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor muscarínico M1 durante a colite induzida por ácido acético**. Parnaíba, 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 530-537, 2011.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86 n.1, p. 271-278, 1978.

MOHAMED, N. H.; ISMAIL, M. A.; ABDEL-MAGEED, W. M.; SHOREIT, A. A. M. Antimicrobial activity of latex silver nanoparticles using *Calotropis procera*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, p. 876-883, 2014.

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

MOTAGHI, E.; HAJHASHEMI, V.; MAHZOUNI, P.; MINAIYAN, M. The effect of memantine on trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 15; p. 28-34, 2016.

MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, J. R. O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. C.; PESSOA, C.; MATOS, M. P. V.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 421-426, 2011.

MUTHAS, D.; REZNICHENKO, A.; BALENDRAN, C. A.; BÖTTCHER, G.; CLAUSEN, I. G.; KÄRRMAN MÅRDH, C.; OTTOSSON, T.; UDDIN, M.; MACDONALD, T.

T.; DANESE, S.; BERNER HANSEN, M. Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 52, p. 125-135, 2017.

NAWROT, R.; LIPPMANN, R.; MATROS, A.; MUSIDLAK, O.; NOWICKI, G.; MOCK, H. Proteomic comparison of *Chelidonium majus* L. latex in different phases of plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p.312-325, 2017.

NIU, X.; FAN, T.; LI, W.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; XING, W. Protective effect of sanguinarine against acetic acid-induced ulcerative colitis in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, p. 256–265, 2013.

NIU, X.; ZHANG, Y.; LI, W.; WANG, Y.; MU, Q.; WANG, X.; HE, Z.; YAO, H. Protective effect of cavidine on acetic acid-induced murine colitis via regulating antioxidant, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 5, p. 34-45, 2015.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T. F.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21 p. 1563-1573.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M. N.; MARINHO FILHO, J. D. B.; FIGUEIREDO, I. G. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P. N. N.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 382, p. 139-149, 2010.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.101-105, 2003.

OZSOY, Z.; OZSOY, S.; GEVREK, F.; DEMIR, E.; BENLI, I.; DALDAL, E.; YENIDOGAN, E. Effect of bevacizumab on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 216, p. 191-200, 2017.

PALLA, A. H.; IQBAL, N. T.; MINHAS, K.; GILANI, A. Flaxseed extract exhibits mucosal protective effect in acetic acid induced colitis in mice by modulating cytokines, antioxidant and antiinflammatory mechanisms, **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 153–166, 2016.

PRASAD, W. W. C.; VIRAJ, M. P. M.; PHILIP, R.; RANI, J.; SWETHA, B. N.; PRASAD, G. Extraction of acetylcholine esterase inhibitors from *Plumeria pudica* and analyzing its activity on zebrafish brain. **World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 5, p. 1781-1791, 2016.

RANDHAWA, P. K.; SINGH, K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, p. 279-288, 2014.

RAY, C.; SAGAR, P. Management of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Surgery**, v. 35, p. 439-442, 2017.

ROCHA, M. V.; DI GIACOMO, M.; BELTRAMINO, S.; LOH, W.; ROMANINI, D.; NERLI, B. N. A sustainable affinity partitioning process to recover papain from *Carica papaya* latex using alginate as macro-ligand. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 168-176, 2016.

SALLEM, U.; AHMAD, B.; AHMAD, M.; HUSSAIN, K.; BUKHARI, N. I. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5(4), p. 322-328, 2015.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, et al. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Lab. Press**, v.2. p. 1-34, 1989.

SANTANA, L. A. B.; ARAGÃO, D. P.; ARAUJO, T. S. L.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; OLIVEIRA, L. E. S.; PEREIRA, A. C. T. C.; FERREIRA, G. P.; OLIVEIRA, N. V. M.; SOUZA, B. S.; SOUSA, F. B. M.; RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; MEDEIROS, J. V. R.; OLIVEIRA, J. S. Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1147–1154, 2018.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 24, p. 1992–2005, 1968.

SHALKAMI, A. S.; HASSAN, M.; BAKR, A. G. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, p. 78-86, 2018.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 217-227, 2014.

SLOW, V. S.; BHATT, R.; MOLLEN, K. P. Management of acute severe ulcerative colitis in children. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 26, p. 367–372, 2017.

SOARES, M. C. A.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, A. C. A.; FREITAS, C. D. T. F.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N. CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 125-129, 2005.

SOBCZAK, M.; FABISIAK, A.; MURAWSKA, N. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**. v. 66, p. 766-775, 2014.

SOUZA, M. M.; BELASCO, A. G. S.; AGUIAR-NASCIMENTO, J. E. Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença inflamatória intestinal do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, p. 324-328, 2008.

SYTWALA, S.; DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Investigation of plant latices of *Asteraceae* and *Campanulaceae* regarding proteolytic activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 117-123, 2015.

TAVARES-MURTA, B. M.; DE RESENDE, A. D.; CUNHA, F. Q.; MURTA, E. F. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 138, p. 93-99, 2008.

TESSOU, K. T.; LAWSON-EVI, P.; METOWOGO, K.; DIALLO, A.; EKLU-GADEGKEKU, K.; AKLIKOKOU, K.; GBEASSOR, M. Acute and Sub-Acute Toxicity Studies of *Plumeria alba* Linn. (Apocynaceae) Hydroalcoholic Extract in Rat. **International journal of Biomedical Science**, v. 9, p. 255-259, 2013.

UNGARO, R.; MEHANDRU, S.; ALLEN, P. B.; PEYRIN-BIROULET, L.; COLOMBEL, J. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, p. 1756-1770, 2017.

YANG, S.; DING, M.; CHEN, F.; XU, Y. Proteomic analysis of latex from *Jatropha curcas* L. steams and comparision of two classic proteomic sample isolations methods: the phenol extraction and TCA/acetone extraction. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 14-24, 2017.

YANG, Y.; HE, J.; SUO, Y.; LV, L.; WANG, J.; HUO, C.; ZHENG, Z.; WANG, Z.; LI, J.; SUN, W.; ZHANG, Y. Anti-inflammatory effect of taurocholate on TNBS-induced ulcerative colitis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.81, p. 424–430, 2016.

ZHANG, Z.; YANG, L.; WANG, B.; ZHANG, L.; ZHANG, Q.; LI, D.; ZHANG, S.; GAO, H.; WANG, X. Protective role of liriiodendrin in mice with dextran sulphate sodiuminduced ulcerative colitis. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 203–210, 2017.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

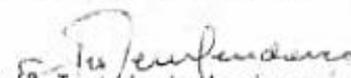


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Bioprospecção de plantas do Estado do Piauí com vistas à identificação e caracterização de proteínas com potencial biotecnológico", protocolo nº 037/15, sob a responsabilidade de JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/08/2015.

Vigência do Projeto	Outubro/ 2015 à Julho/ 2017
Espécie/ linhagem	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	192
Peso/ Idade	20-25 g/ 45 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro de Ciências Agrárias- CCA da Universidade Federal do Piauí.

Teresina, 27 de Agosto de 2015.


 Prof. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal (UFPI)
 Coordenadora