



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

AMANDA MOREIRA FONTENELE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO
COMPOSTO LASSBIO-294 NO MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

**PARNAÍBA – PI
MAIO-2019**

AMANDA MOREIRA FONTENELE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO
COMPOSTO LASSBIO-294 NO MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Desenvolvimento, validação e aplicação de novas biomoléculas e sistemas de veiculação com potencial diagnóstico e terapêutico.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

PARNAÍBA – PI
MAIO-2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

F683 Fontenele, Amanda Moreira

Atividade antioxidante e anti-inflamatória mediada pelo composto lassbio-294 no modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético [recurso eletrônico] / Amanda Moreira Fontenele. – 2019.

70 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

1. Doenças Inflamatórias Intestinas. 2. Derivados de N-acil-Hidrazona. 3. Estresse Oxidativo. 4. Inflamação. I. Título.

CDD: 616.3

AMANDA MOREIRA FONTENELE

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA MEDIADA PELO
COMPOSTO LASSBIO-294 NO MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE
ULCERATIVA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

Universidade Federal do Piauí - UFPI

(Orientador)

Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva

Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

Universidade Federal do Piauí - UFPI

PARNAÍBA – PI
MAIO-2019

Dedico,

Aos meus pais Maria Elizabete e Zacarias, por todo o apoio e incentivo, aos meus irmãos, amigos e namorado, pelo carinho, compreensão e companheirismo e a todos os envolvidos indiretamente e diretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) referem-se a uma condição inflamatória crônica que atinge o trato gastrointestinal, sendo divididas em colite ulcerativa e doença de Crohn, que são doenças crônicas sem etiologia determinada e atualmente ainda não se tem um tratamento eficaz. Como o composto LASSBio-294 vem demonstrando efeitos anti-inflamatórios, gerando vasodilatação, analgesia e inibição da dor, esse trabalho teve como objetivo estudar os efeitos desse composto em um modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético em camundongos. Neste trabalho, foram utilizados 49 camundongos *swiss* machos (25–30g), divididos em 7 grupos de 7 animais. Inicialmente foi realizada a indução da colite por ácido acético a 6% e os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com LASSBio-294 (0,2; 0,5; 1 mg/kg, i.p); ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) 17:30 h após a indução da colite. Após 18 h da indução da colite os animais foram eutanasiados e tiveram uma amostra de 5 cm do cólon retirada para avaliação dos escores macroscópicos, peso úmido, atividade da mieloperoxidase, níveis colônicos de malondialdeído, glutathiona, citocinas pró-inflamatórias e dosagem da expressão da iNOS. Com os resultados, observou-se que com os tratamentos com LASSBio-294 houveram reduções dos escores macroscópicos e diminuição do peso úmido, sendo a dose do LASSBio-294 de 1 mg/kg a que apresentou melhores resultados, sem diferença significativa em relação ao tratamento padrão com dexametasona a 2 mg/kg. Essa foi a dose de escolha para os demais ensaios, onde observamos que o tratamento com LASSBio-294 também foi capaz de diminuir as concentrações de mieloperoxidase, malondialdeído, restaurar os níveis colônicos de glutathiona, juntamente com a diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α , além de reduzir a expressão da iNOS, quando comparado esse grupo ao que recebeu somente ácido acético por via retal. A partir desse resultado prévio, pode-se inferir que o LASSBio-294 diminuiu a resposta inflamatória no modelo de colite induzida experimentalmente por ácido acético, podendo representar uma alternativa terapêutica promissora para pacientes com colite ulcerativa.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais. Derivados de N-acil-hidrazona. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) refers to a chronic gastrointestinal inflammatory condition that affects in the gastrointestinal tract, being divided into ulcerative colitis and Crohn's disease, which are chronic diseases with no determined etiology and currently do not have an effective treatment. Since the LASSbio-294 compound has shown anti-inflammatory effects, generating vasodilatation, analgesia and pain inhibition, this work had the aim to study the effects of this compound in an experimental model of ulcerative colitis induced by acetic acid in swiss mice. In this work, 49 male swiss mice (25-30g) were used, divided into 7 groups of 7 animals. Initially, colitis was induced by 6% acetic acid and the mice were treated intraperitoneally using LASSBio-294 (0.2; 0.5; 1 mg / kg, i.p); or dexamethasone (2 mg / kg, i.p.), 17:30 hour after colitis induction. After 18 hour of colitis induction, the animals were euthanized and had a 5 cm colon sample taken for evaluation of macroscopic scores, wet weight, myeloperoxidase activity, colonic levels of malondialdehyde, glutathione, proinflammatory cytokines and dosage of iNOS expression. From the results, it was observed that with LASSBio-294 treatments there was a reduction of macroscopic scores and decreasing of the wet weight, and that the 1 mg/kg LASSBio-294 dose presented the best results, without significant difference from standard treatment with dexamethasone at 2 mg/kg. This was the chosen dose for the remaining trials, in which we could see that the treatment with LASSBio-294 was also able to decrease the concentration of myeloperoxidase, malondialdehyde, restore colonic levels of glutathione, along with the reduction of pro-inflammatory cytokine IL-1 β e TNF α , in addition to the reduction of iNOS expression, comparing this group to the one that received only acetic acid rectally. From the previous results, it can be inferred that LASSBio-294 decreased the inflammatory response in the colitis model experimentally induced by acetic acid, and may represent a promising therapeutic alternative for patients with ulcerative colitis.

Key words: Inflammatory bowel diseases. N-acylhydrazone derivatives. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-ASA - 5-aminosalicílico

AA – Ácido acético;

AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico;

ANOVA – Análise de variância estatística;

CARD15 – Domínio de recrutamento de caspase 15;

CEUA – Comissão de ética em pesquisa animal;

CI₅₀ - Concentração inibitória media;

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

CU – Colite Ulcerativa;

CXCL1 - Quimiocina ligante 1;

DC – Doença de Crohn;

DEXA – Dexametasona;

DIIs – Doenças Inflamatórias Intestinais;

DTNB – Ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico);

EDTA – Ácido Etilenomino-tetracético;

ELISA – Ensaio Imunoenzimático;

EPM - Erro padrão da média;

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio;

GMP - Via guanilato ciclase;

cGMP - guanilato monofosfato cíclico;

GSH – Glutathiona;

HTAB – Tampão de Hexadeciltrimetilamônio;

IL-10 – Interleucina 10;

IL-1 β – Interleucina 1 Beta;

IL-2 – Interleucina 2;

IL-6 – Interleucina 6;

IL-8 – Interleucina 8

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzível;

M – Molar;

MDA – Ácido Malonildialdeído;

MPO – Mieloperoxidase;

NADPH – Nicotinamida dinucleotídio fosfato;
NAH - N-acil-hidrazona;
NF-κB – Fator de ativação nuclear K;
NO - Óxido nítrico;
NO₂ – Nitrito;
NO₃ – Nitrato;
NOS - Óxido nítrico sintase;
NO_x - Metabólitos de óxido nítrico;
eNOS- Óxido nítrico sintase endotelial;
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal;
PBS – Tampão Fosfato de Sódio;
PDE - Enzima fosfodiesterase
PDE 3- Enzima fosfodiesterase 3;
PDE 5 - Enzima fosfodiesterase 5;
PDE's - Enzimas fosfodiesterase;
PGHS - Prostaglandina endoperóxido sintase;
SSZ – sulfasalazine;
TCA – Ácido Tricloroacético;
Th1 – Células T helper 1;
Th17 – Células T helper 17;
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alpha;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Doenças Inflamatórias Intestinais.	15
Figura 2. Classificação da colite ulcerative de acordo com a área anatômica acometida.	18
Figura 3. Estrutura química do LASSBio-294	23
Figura 4. Desenho do delineamento experimental utilizado para modelo de colite ulcerativa e tratamento.	29
Figura 5. Efeito do LASSBio-294 sobre o aumento do peso úmido em animais com colite por ácido acético	35
Figura 6. Análise da ação do LASSBio-294 nos escores macroscópicos de lesão	37
Figura 7. Fotografia do tecido colônico, demonstrando a ação do LASSBio-294 sob os danos inflamatórios macroscópicos na colite experimental induzida por ácido acético	37
Figura 8. Efeito do LASSBio-294 sobre a atividade da mieloperoxidase em animais com colite induzida por ácido acético	38
Figura 9. Concentração de MDA na colite induzida por ácido acético.	39
Figura 10. Ação do LASSBio-294 sobre os níveis de glutathiona no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético	40
Figura 11. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético	41
Figura 12. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de IL-1 β no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético	42
Figura 13. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de TNF- α no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos animais para cada grupo experimental.	30
Tabela 2. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com e sem colite induzida por ácido acético.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Doenças inflamatórias intestinais	15
2.2 Vias de Proteção intestinal	17
2.3 Anatomia e Fisiopatologia da Colite Ulcerativa.....	18
2.4 Manejo terapêutico das doenças inflamatórias intestinais.....	20
2.5 Modelo experimental de Colite Ulcerativa induzida por ácido acético.....	21
2.6 Desenvolvimento de novos fármacos pertencentes à classe de derivados de N-acil-hidrazona (NAH).	22
2.7 LASSBio-294: protótipo de molécula derivada do NAH como alvo contra fenômenos inflamatórios	23
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos:.....	27
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Considerações éticas.....	28
4.3 Modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético	28
4.4 Delineamento experimental.....	28
4.5 Análise de parâmetros morfológicos.	31
4.5.1 Mensuração do peso úmido do cólon dos animais	31
4.5.2 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão	31
4.6 Análise Bioquímica	32
4.6.1 Ensaio de Mieloperoxidase.....	32
4.6.2 Dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal.....	32
4.6.3 Dosagem dos níveis de Glutathiona (GSH) na mucosa intestinal.....	33
4.6.4 Medição do óxido nítrico (NO ₃ / NO ₂)	33
4.6.5 Mensuração de Citocinas.....	34
4.7 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Efeito do LASSBio-294 sobre o aumento do peso úmido em animais com colite por ácido acético.	35
5.2 Análise da ação do LASSBio-294 nos escores macroscópicos de lesão.....	36
5.3 Efeito do LASSBio-294 sobre a atividade da mieloperoxidase em animais com colite induzida por ácido acético	38
5.4 Concentração de malondialdeído nos animais com e sem colite.....	39

5.5 Ação do LASSBio-294 sobre os níveis de glutathiona no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético	40
5.6 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.	41
5.7 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de IL-1 β no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.	42
5.8 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de TNF- α no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
Anexo	69

1 INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é um termo usado principalmente para descrever duas condições clínicas que se caracterizam por desordens crônicas inflamatórias do trato gastrointestinal, que são a colite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DC). Essas doenças elevam os níveis locais de células inflamatórias, levando a uma inflamação prolongada que resulta em danos no trato gastrointestinal.

Aproximadamente 1,6 milhões de residentes dos Estados Unidos são afetados pelas DII, 785.000 com DC e 910.000 com CU (Aniwan *et al.* 2017). A prevalência dessas doenças são maiores em países ocidentais desenvolvidos, afetando até 2 milhões de pessoas com essas condições na Europa (Ng *et al.* 2018). Curiosamente na virada do século 21 estudos epidemiológicos mais recentes revelaram que a incidência de DII vem aumentando em países em desenvolvimento da América do Sul, Ásia, África e Europa Ocidental (Aniwan *et al.* 2017; Shouval & Rufo, 2017). Apresentando mudanças nos padrões epidemiológicos populacionais nos indivíduos em que as DII não eram comuns, verificando a importância dos fatores ambientais no desenvolvimento dessas desordens crônicas.

Atualmente, não existe uma terapia eficaz para curar as DII, mas o tratamento convencional depende da redução anormal da inflamação na mucosa do cólon e assim aliviar os sintomas da doença. O tratamento é selecionado para cada indivíduo que irá depender da localização, gravidade da doença, das complicações e da resposta ao tratamento anteriormente utilizado. Em casos mais graves, poderá haver necessidade de se recorrer a cirurgia com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do doente (Wright *et al.*, 2015). A maioria dos indivíduos afetados pelas doenças inflamatórias intestinais de leve a moderada, são tratados com corticosteróides para reduzir a inflamação e aliviar os sintomas. Quase 25% dos pacientes com colite ulcerativa, são exigidos terapias com esteróides dependentes por um ano e praticamente todos desenvolvem eventos adversos relacionados a esteróides (Lichtenstei *et al.* 2006).

O Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), através da química medicinal, realizou diversos projetos tendo como ponto de partida os derivados do N-acil-hidrazona (NAH) em busca por novos candidatos a fármacos multialvos, bioativos, úteis no tratamento de doenças multifatoriais e com elevado impacto socioeconômico (Barbosa, 2015). Desenvolvendo moléculas com propriedades físico-químicas e farmacológicas que são hoje alvo de inúmeros estudos químicos, estruturais e farmacológicos.

Já há estudos que comprovam que compostos que contem a subunidade NAH, tem atividades biológicas importantes como atividade antitumoral (Do Amaral *et al*, 2014), antiviral (Gong *et al*, 2011), antibacteriano (Narang *et al*, 2011), anti-inflamatório (Tributino *et al*, 2009), analgésico (Tributino *et al*, 2010), atividade vasodilatadora (Kummerle *et al*, 2009) e antipsicótica (Gage *et al*, 2011).

Com o desenvolvimento de pesquisas com objetivos de achar novos candidatos de analgésicos e anti-inflamatórios de compostos que contem a subunidade NAH, soube-se que o composto LASSBio-294 tem sido descrito como um potente agente inotrópico positivo com modestas atividades vasodilatadoras (Silva *et al*, 2005), analgésicas e anti-inflamatórias (Barreiro, 2002).

Então a descoberta de abordagens terapêuticas eficazes na redução do processo inflamatório através dos derivados do N-acil-hidrazona (LASSBio-294), pode representar uma alternativa promissora. De acordo com o tratamento tradicional e da investigação científica recente, esta substância é apontado como novo candidato a fármaco com propriedades vasodilatadoras e menos efeitos colaterais (Silva, 2005). Desta forma, é justificável a pesquisa devido à necessidade de novas abordagens e terapias eficazes para a gestão das doenças inflamatórias intestinais.

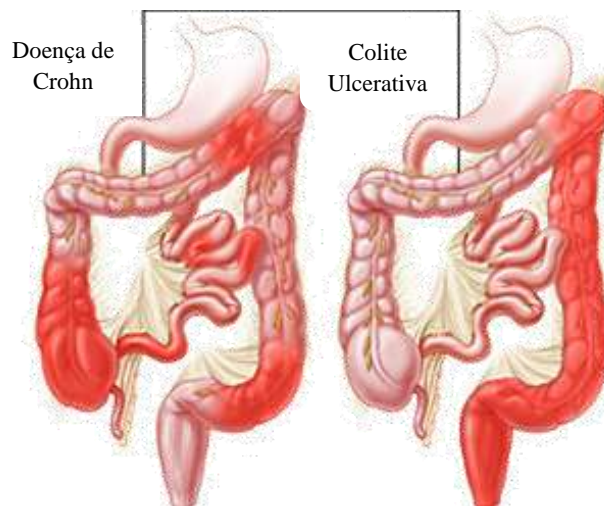
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Doenças inflamatórias intestinais

Embora a etiologia das DIIs ainda seja desconhecida, este grupo de doenças é classificado de acordo com vários fatores: hereditários, ambientais, eficácia da resposta imune do hospedeiro e localização da inflamação no sistema gastrointestinal (Farrel & Lamont, 2002). Na DII, existe um aumento do número de células inflamatórias que são encontrados em áreas do intestino com inflamação crônica, resultando em um excesso de produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias na mediação inflamatória.

As doenças inflamatórias intestinais, são de caráter crônico. A colite ulcerativa é classificada como inflamação de organização não-transmural, recidivante e restrita ao cólon. Já a doença de Crohn é recidivante, com inflamação transmural, atinge a mucosa do trato gastrointestinal que pode afetar por todo o seu percurso da boca ao ânus (Figura 1). Atualmente, o diagnóstico de colite ulcerativa e doença de Crohn e a diferenciação entre ambas são baseados em padrões clínicos e histológicos inespecíficos que são muitas vezes alterados por intercorrência infecciosa, eventos iatrogênicos ou alterados por medicamentos ou cirurgia. (Hanauer & Stephen B, 1996).

Figura 1. Doenças Inflamatórias Intestinais.



Fonte: adaptado de Jum Kim (2017)

A incidência e a prevalência tanto da colite ulcerativa quanto da doença de Crohn estão aumentando em todo o mundo (Lin, 2014), porém essa incidência pode variar entre

regiões diferentes. Tanto a DC como a CU tem uma maior prevalência na Europa, América do Norte e Reino Unido com faixa etária para início da doença variando entre 15 e 30 anos, com pico de prevalência entre 60 e 80 anos. Acometem preferencialmente em indivíduos residentes em áreas urbanas e pertencentes a classes socioeconômicas mais altas (Longo & Fauci, 2013). A incidência anual de Doença de Crohn na América do Norte é de 20,2 por 100.000 pessoas e a incidência anual de colite ulcerativa na Europa é de 24,3 por 100.000 pessoas (Yang, 2014). A incidência da colite ulcerativa aumentou em geral na Europa de 6,0 por 100.000 pessoas/ano e a doença de Crohn de 1,0 por 100.000 pessoas/anos no ano de 1962 para 9,8 por 100.000 pessoas/ano e 6,3 por 100.000 pessoas/ano em 2010 (Burisch, 2015).

No Brasil, pacientes com DC e CU não são necessariamente relatados, resultando na falta de dados epidemiológicos, visto que não é caracterizada como uma doença de cunho compulsório. Essa situação coloca os pacientes em um estado vulnerável, como estudos incipientes e escassos registros de publicações sobre este grupo de doenças, contribuindo assim para o diagnóstico tardio e aumento da morbidade (Barros, *et al*, 2014; Bechara *et al*, 2015; Da Rosa, *et al.*, 2014; Oliveira, *et al*, 2010; Souza, *et al*, 2008; Santos, *et al*, 2017). É difícil determinar os dados epidemiológicos das DII no Brasil e em todos os países em desenvolvimento devido a falta de registros no sistemas de dados dessas doenças e a incapacidade de acessar dados além dos disponíveis no sistema público de saúde. Dada esta realidade, farmácias especializadas e centros de referência para o tratamento do DII são locais favoráveis para a realização de estudos relacionados à DII (Da Rosa, *et al.*, 2014; Oliveira, *et al*, 2010; Souza, *et al*, 2008).

Inúmeros estudos, tais como os de Camelo *et al.* (2012), Puthoor e De Zoeten (2013), sugerem que as DIIs são resultado de uma resposta inflamatória inadequada à microbiota intestinal, onde geralmente são inofensivos porém em um hospedeiro geneticamente susceptível associado a estímulos ambientais parecem ser capazes de desencadear uma reação imune anormal (Mayer, 2010). Alguns dos fatores ambientais que podem estar associados com o desencadeamento inflamatório intestinal são: aumento no consumo de açúcar, dieta pobre em fibras, conservantes alimentares e agentes infecciosos (Sonnenberg, 1986).

Muitos especialistas afirmam que as DIIs surgem da interação de quatro fatores fundamentais: ambiental (tabagismo, dieta, hábitos higiênicos), genético (existe uma ocorrência familiar e alguns genes como CARD15 já que são relacionados com as DIIs), microbiano (uma resposta anormal do sistema imunológico contra a microbiota intestinal); e por fim, o imunológico (a resposta imunológica é a principal responsável pelo

desenvolvimento da inflamação) (Maranhão, 2015; Arantes, *et al*, 2017; Hansen & Sartor, 2015). Segundo Ferrari *et al* (2014) nenhum destes fatores de forma isolada podem provocar a gênese da DII, no entanto a interação entre eles podem desencadear a doença bem como, de acordo como a natureza de cada fator, pode determinar a gravidade da condição inflamatória.

Problemas associados à colite ulcerativa incluem diarreia sanguinolenta, úlceras de cólon, perda de peso, e a longo prazo, aumento do risco de câncer de cólon e patologias desconhecidas. CU afeta principalmente a mucosa de revestimento do cólon e do reto (Xavier & Podolsky, 2007). A infiltração de polimorfonucleados é considerada como a lesão primária e central da colite, a qual é geralmente seguida pela perda do epitélio, perda de células caliciformes e dano da cripta (Pile *et al.*, 2012).

2.2 Vias de Proteção intestinal

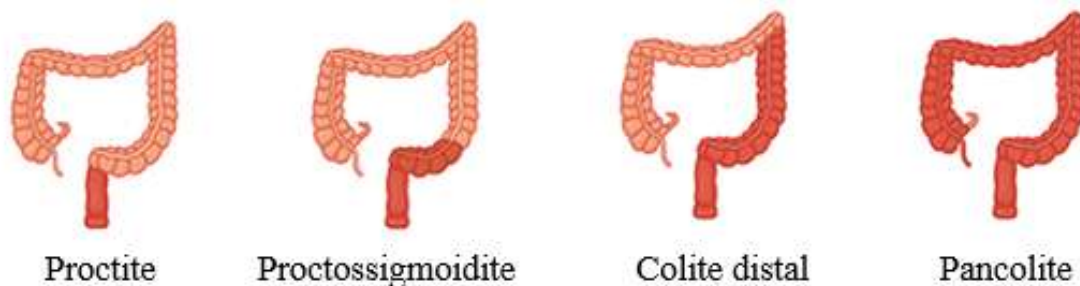
Visto que as doenças inflamatórias intestinais são sugestivas de resposta inadequada para microrganismos. O epitélio intestinal desempenha um papel ímpar na formação da resposta imune da mucosa intestinal. Células epiteliais são uma barreira naturalmente física contra a entrada em massa de bactérias e outros antigênicos a partir do lúmen intestinal para a circulação. Uma barreira mucosa intacta depende de junções intercelulares, que “veda” o espaço entre as células epiteliais vizinhas (espaço paracelular). Nas doenças inflamatórias intestinais, o espaço paracelular aumentou a permeabilidade e a regulação das junções defeituosas (Turner, 2006). Estas anomalias podem ser devido a um defeito primário na função de barreira ou pode ser um resultado da inflamação como relata alguns estudos de Wang em 2006, Musch em 2002, Bruewer em 2003 e Dahan em 2008.

Existem também defesas adicionais contra a invasão bacteriana, são as células epiteliais especializadas, tais como as células caliciformes e células de Paneth. As células caliciformes estão ligadas a regular a produção de muco e fatores que contribuem, para reparação do epitélio e regulação da inflamação (Taupin, 2003; McVay, 2006). Já as Células Paneth secretam peptídeos antimicrobianos, tais como α -defensinas. Muco intestinal recobre o epitélio, limitando assim o contato entre as células epiteliais e bactérias. A Regeneração epitelial e reparação servem para controlar e, finalmente, resolver a resposta inflamatória a uma lesão. Porém na doença inflamatória do intestino, a resposta inflamatória resulta frequentemente uma lesão epitelial contínuo, o que leva a erosões, ulcerações e uma diminuição na produção de defensinas. (Wehkamp, 2005; Simms, 2008). Consequentemente ocorrendo um aumento da exposição a microbiota intestinal e amplificação da resposta inflamatória.

2.3 Anatomia e Fisiopatologia da Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória do cólon intestinal, que se caracteriza por inflamação e ulceração da camada mais superficial do cólon, que é a mucosa, anatomicamente ela pode afetar apenas a parte inferior do cólon, o reto e é então chamada de proctite ulcerativa; quando a região inflamada atinge a região distal do reto até a junção sigmóida é chamada de proctossigmoidite; se a doença afetar apenas o lado esquerdo do cólon, ela é chamada de colite distal ou limitada; se ela envolver todo o cólon, é pancolite, ou colite universal, como demonstrado na Figura 2. (Baumgart & Sandborn, 2007; Sobczak, et al., 2014; Lagan, 2007)

Figura 2. Classificação da colite ulcerativa de acordo com a área anatômica acometida.



Fonte: adaptado de Katvusta (2017).

Na CU, o espaço paracelular perde a continuidade e com isso ocorre o aumento da permeabilidade decorrente das junções agora defeituosas (Turner, 2006). Ocorre uma infiltração acentuada de células imunitárias inatas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer*) e células imunes adaptativas (células B e células T). O aumento do número e ativação das mesmas na mucosa intestinal eleva os níveis locais de fator necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β , interferon- γ , e citocinas da via interleucina-23 e células Th17, tornando uma inflamação mais acentuada (XU *et al.*, 2014).

No cólon saudável, macrófagos intestinais podem ser encontrados na mucosa, próximo à membrana basal da camada epitelial. Na CU, os números dos mesmos estão aumentados, indicando recrutamento para o intestino inflamado, gerando uma contribuição para os danos intestinais, ao liberar citocinas, radicais livres, e outros mediadores inflamatórios, tanto por fagocitar antígenos ou agindo como células apresentadoras de antígenos (Stevceva, 2001). A resposta inflamatória resulta frequentemente em uma lesão epitelial contínua, o que leva a

erosões, ulcerações e uma diminuição na produção das estruturas de defesa. (Wehkamp *et al.*, 2005; Simms *et al.*, 2008).

Devido a constante exposição da mucosa intestinal a microrganismos e xenobióticos, no intestino normal, a IL-10 é a citocina anti-inflamatória responsável por manter o ambiente em equilíbrio por sua atividade supressora sobre as citocinas pró-inflamatórias (Glocker *et al.*, 2009). Além de inibir citocinas do tipo Th1, como IL-2 e interferon- γ (Paul, Khare e Gasche, 2012). Quando esse equilíbrio é quebrado, os linfócitos e macrófagos ativados liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e quimiocina ligante 1 (CXCL1). CXCL1 é um quimiotático de neutrófilos e indutor de inflamação, e sua expressão gênica está aumentada em pacientes com DII (Szalai *et al.*, 2014).

As citocinas pró-inflamatórias promovem reações do tipo hospedeiro em resposta a vários agentes nocivos, incluindo agentes microbianos (Szkaradkiewicz *et al.*, 2009). Os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), são fatores preponderantes na colite ulcerativa, por promover a degradação da matriz de colágeno pelos fibroblastos intestinais, com consequente perda da integridade mucosa e ulceração. A concentração dessas citocinas e a expressão dos RNAm correspondentes estão aumentados na mucosa colônica, fluidos intestinais, baço e em soro de pacientes com CU. Há uma correlação significativa entre a atividade dessas citocinas e a intensidade da colite (Macdonald, Monteleone e Pender, 2000). O TNF- α ativa leucócitos, inibe a apoptose de células inflamatórias e inibe a proliferação de células T ativas. Ele aumenta a permeabilidade vascular. Pode causar inflamação diretamente e indiretamente ao promover a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, pois regulam genes que controlam a expressão de citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas imunorreguladoras e mediadores pró-inflamatórios. O TNF- α e a IL-1 β tem efeitos sinérgicos e parecem induzir um ao outro (Bingham, 2002). O TNF- α também participa da produção de óxido nítrico (NO) e óxido-nítrico sintase induzida (iNOS), que por sua vez promovem mais inflamação que a IL-1 β (Tian *et al.*, 2003). Esse conhecimento permitiu o uso de medicações anti-TNF- α para controle e remissão de formas moderadas e graves de DII (Engel e Neurath, 2010).

As óxido-nítrico sintases neuronal e endotelial (nNOS e eNOS) são enzimas, presentes na mucosa gastrintestinal, que regulam a microvasculatura, a permeabilidade e manutenção da perfusão tecidual. Citocinas podem inibir a expressão de nNOS, aumentar a de iNOS, que exerce atividade inflamatória pelo aumento da liberação de NO. O NO pode ser benéfico ou deletério a depender da sua concentração, duração e sítio de síntese. Na mucosa intestinal, em

concentração aumentada, promove maior lesão tecidual, hipomotilidade e a proliferação bacteriana (Porras *et al.*, 2006; Szalai *et al.*, 2014).

A lesão ativa é representada por congestão e edema de mucosa, focos de necrose do epitélio, abscessos crípticos e úlceras (Rodrigues, 1991). O infiltrado de neutrófilos e linfoplasmocitário é proeminente. Com a resposta terapêutica favorável o processo inflamatório se reduz com desaparecimento das úlceras, reepitilização, com hiperplasia de criptas levando à formação de pseudopólipos. Quando ocorrer remissão clínica, essas criptas podem sofrer atrofia, com adelgaçamento da mucosa, encurtamento e distorção das criptas, cujos fundos ficam distantes da camada muscular da mucosa (Barbieri, 2000).

2.4 Manejo terapêutico das doenças inflamatórias intestinais

O tratamento farmacológico vem sendo extensivamente pesquisado e visa diminuir os sintomas e o processo inflamatório. A escolha da terapia é realizada com base em alguns aspectos da doença, como gravidade, extensão da inflamação, frequência de recidivas e manifestações extra intestinais (Lee, 2012). Na busca da redução da peristalse para promover o descanso do intestino inflamado, são usados antiperistálticos, antidiarréicos e sedativos que são mantidos até o momento em que as fezes do paciente tenham aspectos e frequência normais (Smeltzer, 2002).

Normalmente, o tratamento abrange o uso de imunossupressores que resolvem os episódios agudos, como: corticosteroides, antibióticos, tiopurinas, antagonistas do ácido fólico e aminossalicilatos (Meier & Sturm, 2011). O grau em que se encontra a doença influencia no tratamento escolhido, dessa forma, normalmente para a CU leve ou moderada indica-se o uso de derivados salicílicos oralmente. A sulfasalazina (SSZ) está inclusa neste grupo de aminossalicilatos, foi primeiramente produzida para tratamento de artrite e é hoje um dos medicamentos tradicionais utilizados no tratamento de CU, sendo administradas doses de 2,0 a 4,0 g/dia (Ford *et al.*, 2011). Sabe-se que a SSZ possui sérios efeitos colaterais, os quais dificultam a continuidade no tratamento da CU (Ransford & Lamgman, 2002; Helieh, Chen, Villiers, 2013; Rang *et al.*, 2013).

Os aminossalicilatos possuem boa atividade dos pacientes portadores de DII, principalmente o 5-aminossalicílico (5-ASA), uma vez que são mais tolerados pelos pacientes em função da redução dos efeitos colaterais (Pearson, 2004), sua ação consiste no bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos inibindo a liberação de peptídeos bacterianos que são capazes de induzir a migração de neutrófilos (Podolsky, 2002). Os corticosteróides, especialmente prednisona, hidrocortisona e budenisonide, têm se mostrado eficazes no tratamento das DII, oferecendo rápida e efetiva redução dos sintomas através da inibição da

inflamação. Entretanto, cuidados especiais devem ser tomados no uso prolongado de corticosteróides devido ao aumento da possibilidade de desenvolvimento de hipertensão arterial, diabetes e osteoporose (Pearson, 2004). Quando as terapias citadas anteriormente são ineficazes, existe a possibilidade do uso de terapia imunossupressora. Geralmente, esta é necessária em 20% dos pacientes portadores de DII. Os mais indicados incluem a azatioprina, methotrexate e ciclosporina (Pearson, 2004; Lopes, 2009).

A baixa adesão ao tratamento é um dos principais entraves para a regressão da CU. Em torno de 40% a 60% dos pacientes acometidos apresentam boa aderência ao tratamento, o que é um número baixo (KE *et al.*, 2012). Sales-Campos *et al.*, (2015) realizaram um estudo de revisão e constataram que mesmo com a eficácia de alguns tratamentos, nenhum é capaz de resolver por completo a problemática da CU. É necessário o estudo de terapias alternativas, com menores efeitos colaterais e maior potência, algo que possa talvez curar a doença ou simplesmente permitir uma melhor qualidade de vida por mais tempo. A elucidação de tratamentos alternativos com a utilização de nutrientes, imunomoduladores, produtos microbianos e fitoterápicos é de fundamental importância (Triantafillidis *et al.*, 2011; Kannan & Guruvayoorappan, 2013). Devido a isto é válido a busca por novas terapêuticas de origem natural, que possam melhorar este quadro clínico, causando o mínimo de efeito adverso ao paciente com DII.

2.5 Modelo experimental de Colite Ulcerativa induzida por ácido acético

Modelo experimental consiste na indução da inflamação intestinal por um processo químico. Há diversos mecanismos na causa da CU, mas ainda não se tem um consenso de sua patogênese e a melhor forma de tratamento. Nesse contexto, surgiram os modelos experimentais em animais que contribuem para a elucidação dos possíveis mecanismos de instalação da doença e para a avaliação da ação de novos fármacos. Os modelos em animais frequentemente utilizados são induzidos por enemas de ácidos ou substâncias corrosivas que causam as alterações histológicas similares à colite ulcerativa em humanos (Guazelli *et al.*, 2013).

A injúria colônica induzida por enema de ácido acético em animais de pequeno porte é um método simples e reproduzível, inclusive apresenta similaridades com a CU em humanos por apresentar inflamação aguda e difusa da mucosa, ulcerações superficiais e redução das células caliciformes (Rani *et al.*, 2011). Caracteriza-se pela migração e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α (Luo *et al.*, 2010) e elevada produção de EROs (Tahan *et al.*, 2011).

A administração de solução de ácido acético por via retal causa um edema da submucosa, infiltrado inflamatório, úlceras no cólon, destruição das criptas e depleção das células caliciformes (Tüzün *et al.*, 2002; Varshosaz *et al.*, 2010). Por ser um modelo de características agudas pode se investigar os componentes envolvidos na inflamação e assim, contribuir para a proposição de alternativas terapêuticas promissoras na CU, em especial no que remete ao componente inflamatório desta doença.

2.6 Desenvolvimento de novos fármacos pertencentes à classe de derivados de N-acil-hidrazona (NAH).

A Química Medicinal está sendo um aliado da saúde para desenvolvimento de fármacos, após a identificação do padrão estrutural do protótipo possuidor dos atributos farmacofóricos desejáveis, constrói-se uma série congênita racionalmente planejada munida de estratégias comuns como por exemplo: bioisosterismo, simplificação molecular e hibridação molecular; com objetivos que envolvem otimização do composto protótipo, eliminação de efeitos deletérios, atribuição de novos efeitos, validação de grupamentos farmacofóricos, melhora do perfil farmacocinético, entre outros (Barreiro & Fraga, 2008).

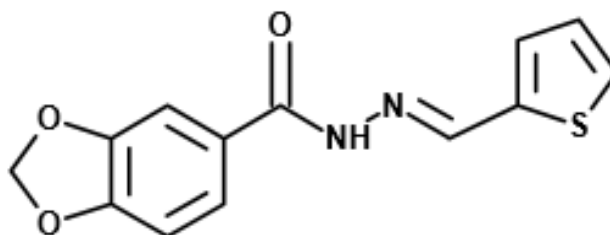
No que envolve a função N-acil-hidrazona (NAH) a denominação de estrutura privilegiada se deve ao extenso trabalho desenvolvido pelo Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) da UFRJ. através da exploração de abordagens da Química Medicinal no desenvolvimento de candidatos a fármacos, onde estes derivados do NAH foram extensamente estudados e reunidos em algumas publicações quanto a suas diversas atividades biológicas importantes como: atividade antitumoral (Do Amaral *et al.*, 2014), antiviral (Gong *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011), antibacteriano (Narang *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2012), anti-inflamatório (Tributino *et al.*, 2009; Bispo Júnior *et al.*, 2011; Duarte, 2006; Bezerra, 2004), analgésico (Tributino *et al.*, 2010), atividade vasodilatadora (Kummerle *et al.*, 2009), antiagregação plaquetária (Barreiro *et al.*, 2002), Leishmanicida (Charret, 2011), antifúngica (Cachiba *et al.*, 2012) e antimalárica (Melnyk *et al.*, 2006) e antipsicótica (Gage *et al.*, 2011).

As moléculas que contém o composto NAH em sua fórmula caracterizam-se por possuir uma diversidade estrutural que é importante na construção de distintas famílias de compostos protótipos e possíveis candidatos a fármacos. Baseando-se nas estratégias de bioisosterismo, algumas séries de NAH foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente, de forma a permitir o estudo das relações entre a estrutura química e suas respectivas atividades biológicas. Hoje já é conhecido que hidrazonas tem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (Silva *et al.*, 2010; Pavan, 2010).

2.7 LASSBio-294: protótipo de molécula derivada do NAH como alvo contra fenômenos inflamatórios

O composto LASSBio-294 tem como estrutura molecular: 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilidrazona, (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do LASSBio-294



Fonte: adaptado por Silva (2012).

LASSBio-294 é um fármaco desenvolvido pelo grupo LASSBio da UFRJ. Este fármaco inovador é fruto de uma técnica que tem tido aplicação crescente na pesquisa científica: a modelagem molecular. Ela consiste em elaborar, com auxílio de programas de computador, novas moléculas, com características estruturais pré-definidas, que lhe garantam a ação farmacológica desejada. Essa técnica de modelagem molecular permite também determinar, com grande precisão, a distância entre átomos e substituir trechos da estrutura molecular. Onde nesse laboratório se cria moléculas com arquiteturas de moléculas capazes de serem reconhecidas por seus alvos terapêuticos.

A arquitetura molecular do composto LASSBio-294, embora seja fruto da modelagem molecular e é um produto sintético, foi baseada em um produto natural que é o substrato de safrol, um composto extraído do óleo de sassafrás, encontrado em plantas como a canela-branca (*Ocotea pretiosa*) (Sudo *et al.*, 2010).

A gênese da molécula do LASSBio-294 fundamentou-se na inclusão de subunidade benzodioxola presente no safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás, na subunidade acila da função NAH. O reconhecimento do caráter ambidente do sistema benzodioxol presente, decorre da propriedade em interagir com possíveis sítios de reconhecimento molecular de receptores biológicos, atuando como acceptor de ligações -H e por interações hidrofóbicas, simultaneamente, o que o credencia como um atraente bióforo. (Barreiro, 2002).

A substituição na subunidade imina da função NAH foi baseada no dantroleno, fármaco descrito em 1986 (Parness & Palnitkar, 1995) indicado no tratamento da hipertermia maligna e esclerose múltipla (Hoffman & Dressman, 2001), cujo mecanismo de ação envolve os canais de Ca^{+2} modulados pelos receptores de rianodina (Zhao *et al.*, 2001). A análise da estrutura deste fármaco evidenciou a presença da função NAH e influenciou a escolha da natureza heterocíclica do padrão estrutural da subunidade imínica da NAH (Barreiro, 2002). A nova série de compostos foi obtida em ótimos rendimentos e foram submetidos aos ensaios farmacológicos relacionados aos efeitos cardiotônicos. O composto tiofênico, LASSBio-294 obteve bons resultados na modulação do Ca^{+2} do retículo endoplasmático (Barreiro, 2002).

Considerando-se o envolvimento do Ca^{+2} sob o efeito cardioprotetor promovido pela modulação do Ca^{+2} citossólico (Ruegg UT & Gillis JM, 1999), direta ou indiretamente mediada por enzimas fosfodiesterase (PDE's), o novo protótipo identificado, LASSBio-294 (Burnouf *et al.*, 1998), foi então bioensaiado quanto às suas propriedades inotrópicas. Os resultados farmacológicos obtidos (Sudo, 2001; Silva, 2002) indicaram que LASSBio-294 (Burnouf *et al.*, 1998) foi capaz de induzir intenso relaxamento, concentração-dependente, em anéis isolados e intactos de aorta de ratos com uma concentração inibitória média da vasodilatação de 74 μM (Silva, 2002). Ademais, este efeito foi abolido pela remoção do endotélio, sendo um composto cardioativo com atividade vasodilatadora totalmente dependente do endotélio vascular e não se alterou pela pré-inibição da N-óxido sintase (NOS), induzida por L-NAME, nem pela pré-inibição da cascata do ácido araquidônico, promovida pelo tratamento com concentração adequada de indometacina, conhecido inibidor da prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) (Silva, 2002). Sendo assim, o efeito de relaxamento observado com LASSBio-294, permaneceu inalterado quando os anéis de aorta isolados de ratos, foram pré-tratados com K^{+} extracelular (Burnouf *et al.*, 1998; Silva, 2002). Estes resultados sugerem, fortemente, que o mecanismo de ação do composto LASSBio-294, quanto aos seus efeitos inotrópicos, não é modulado pelo óxido nítrico (NO), nem pela cascata do ácido araquidônico ou por canais de K^{+} podendo, efetivamente, estar relacionado com a inibição de PDE's.

O LASSBio-294 é descrito como um potente agente inotrópico positivo (Sudo *et al.*, 2001, cuja atividade está relacionada ao aumento da acumulação de Ca^{+2} no retículo endoplasmático, além de também promover vasodilatação na aorta, mediada pela via guanilato ciclase (GMP)/guanilato monofosfato cíclico (cGMP), visto que pode ser abolidos ou revertidos, na presença de inibidor seletivo de cGMP. Estes resultados reforçam seu envolvimento com o Ca^{+2} celular e com isoformas de PDE-c-GMP dependentes, presentes no

músculo cardíaco (Silva, 2002). Cabe ressaltar que, embora a principal isoforma de PDE-c-GMP seletiva, presente no músculo cardíaco seja a PDE5, uma ação sobre a PDE3 não pode ser descartada, visto que essa isoforma reconhece como substrato ambos os nucleotídeos, cAMP e cGMP. De fato, a hipótese de inibição de PDE5 e 3 no mecanismo de ação de LASSBio-294 foi corroborada com a evidência experimental que identificou um perfil de atividade similar entre LASSBio-294 e o zaprinast, conhecido inibidor de PDE5 e PDE3 (Silva, 2002).

Considerando que a subunidade N-acil-hidrazona presente no LASSBio-294 tem uma relação bio-isotérica com o anel de piridazinona partilhado por inibidores de fosfodiesterase, vários análogos sintéticos do composto de chumbo foram investigados e o LASSBio-294 foi apontado como novo candidato a fármaco com propriedades vasodilatadoras e menos efeitos colaterais (Silva, 2005).

Devido a atraente atividade farmacológica, foram ampliados os estudos deste composto onde foram indentificados que o LASSBio-294 também foi capaz de promover aumento da contratilidade da musculatura esquelética tanto de rã (Gonzalez-Serratos *et al.*, 2001) quanto de rato (Zapata-Sudo *et al.*, 2003), aumentou a contratilidade cardíaca promovido pelo maior acúmulo de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, em função da maior captação de Ca por esta organela.

Investigou-se também a atividade antiagregante plaquetária do composto LASSBio-294, os efeitos sobre a agregação plaquetária foram observados através de estudos em coelhos, onde o LASSBio-294 foi capaz de inibir a ação plaquetária, que foi induzida por ácido araquidônico com CI_{50} , com inibição da tromboxana B_2 , evidenciando suas propriedades farmacológicas e apontado a sua potente atividade antiagregante e o potencial antitrombótico de sua molécula (Barreiro, 2002; Miranda 2002).

Os bioensaios realizados com LASSBio-294, indicaram ainda que o protótipo apresenta propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (Pereira *et al.*, 1998; Leite *et al.*, 1999; Figueiredo *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2010), pois em concentrações de 300 μ M/kg administrado via oral, foi capaz de inibir o edema da pata de rato induzido por carragenina em 29,7% (Duarte, 2006), além de apresentar redução na dor em um modelo de nocicepção de contorção abdominal induzida por ácido em camundongos, sem efeitos centrais deletérios (Barreiro, 2002).

Devido aos promissores resultados obtidos para LASSBio-294, fez-se necessário o estudo da estabilidade plasmática e química deste candidato a fármaco. A principal suspeita era de que a função NAH teria um sítio de instabilidade, fundamentada pela labilidade da

função imina presente na estrutura (Costa, 2003). Estes conceitos fomentaram amplos estudos *in silico* e também *in vivo*. Os estudos indicaram uma adequada estabilidade química de LASSBio-294 em pH acima ou igual a 3, ocorrendo produtos de hidrólise em valores de pH menores (Fraga, 2010). Em virtude do promissor perfil farmacológico, realizou-se uma investigação do seu perfil toxicológico, o que não evidenciou nenhuma reação de toxicidade aguda. (Barreiro, 2002).

Todos os resultados apresentados credenciam LASSBio-294 como excelente protótipo para otimização de suas atividades através de metodologias racionais comuns da Química Medicinal. Isto também devido a seu mecanismo de ação de inibição da fosfodiesterase (PDE) e ativação dos receptores de A_{2A} de adenosina, que em suma, a ativação dos receptores A_{2A} irão aumentar o nível de AMPc e apresentam uma ação anti-inflamatória devido a inibição de liberação de TNF- α e IL-1 β para o tecido injuriado (Morovic-Vergles *et al.*, 2008). Tornando os compostos com essas características, alvos das grandes indústrias farmacêuticas para desenvolvimento de fármacos, uma vez que existe grande expectativa em moduladores desta família para o tratamento de diversas doenças, como: câncer, dor neuropática, doenças inflamatórias intestinais, epilepsia, glaucoma, diabetes, Parkinson, entre outras (Jacobson & Gao, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

3.1.1. Estudar o efeito anti-inflamatório e anti-oxidante do LASSBio-294 durante a colite induzida por ácido acético em camundongos.

3.2 Específicos:

3.2.1. Avaliar a atividade do LASSBio-294 sobre os critérios macroscópicos e sobre o peso úmido do cólon de camundongos durante a colite por ácido acético;

3.2.2. Verificar o efeito do LASSBio-294 sobre a concentração de MPO no cólon de camundongos durante a colite por ácido acético;

3.2.3. Analisar a ação do LASSBio-294 sobre os níveis colônicos de MDA e GSH durante a colite por ácido acético;

3.2.4. Avaliar o efeito do LASSBio-294 sobre a concentração colônicas de citocinas e de nitrato/nitrito na colite por ácido acético.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, machos (25–30 g) provenientes da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Para cada experimento foi utilizado um número de 7 animais por grupo (n=7). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlado. Além disso, até o momento da realização dos experimentos os animais permaneceram com ração apropriada e água *ad libitum*. Antes dos experimentos os animais foram submetidos ao jejum de 16 horas, mas com livre acesso ao consumo de água.

4.2 Considerações éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais desse estudo foram previamente submetidos à avaliação da Comissão de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI), no protocolo 315/17 (Anexo 1).

Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

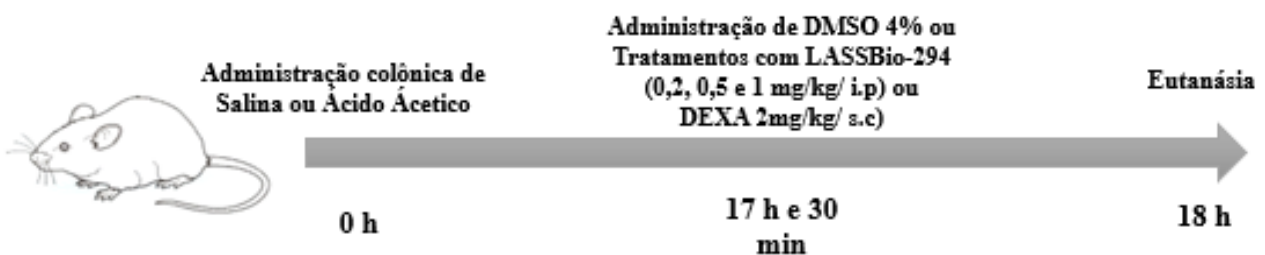
4.3 Modelo experimental de colite ulcerativa induzida por ácido acético

A colite foi induzida por ácido acético de acordo com método descrito por Guazelli *et al.*, (2013) com modificações, seguindo o protocolo descrito por Magalhães, (2017). Os animais foram mantidos em jejum durante 16 horas para a indução da colite e anestesiados com uma associação de xilazina (8 mg/kg) e quetamina (60 mg/kg) via intraperitoneal. Após foi realizado a lavagem do cólon com 100 μL de solução salina e administrado uma única dose intracolônica de solução aquosa de ácido acético a 6% com pH a 2,5 no volume de 200 μL . Os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para ser introduzido por via retal uma sonda de polietileno com 3 centímetros de comprimento para a administração das soluções de ácido acético ou salina. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções.

4.4 Delineamento experimental

A colite foi induzida por ácido acético (200 μ L a 6%), utilizando 49 camundongos, divididos em 7 grupos, todos os grupos contendo 7 animais, descritos a seguir: no grupo I os animais receberam via retal uma solução salina (200 μ L) e foi realizado processo de eutanásia após 18 horas, o grupo II recebeu somente ácido acético a 6% via retal e foi realizado processo de eutanásia após 18 horas da indução da colite, o grupo III recebeu ácido acético a 6% e 17:30 horas após a indução da colite, recebeu via intraperitoneal (i.p) DMSO 4%, substância padrão para solubilizar o composto LASSBio-294 e foi realizado processo de eutanásia às 18 horas após o processo de indução da colite; o grupo IV (grupo tratado com corticoide) é o controle da atividade anti-inflamatória e recebeu ácido acético a 6%, foi tratado com dexametasona via subcutânea (s.c) (2 mg/kg via s.c) 17:30 horas após a indução da colite e sofreram processo de eutanásia às 18 horas após o processo de indução da colite; os grupos V, VI e VII receberam ácido acético a 6% e três doses do LASSBio-294 com concentrações distintas, os grupos foram tratados 17:30 horas após a indução da colite, o grupo V foi tratado com LASSBio-294 na concentração de 0,2 mg/kg, o grupo VI foi tratado com LASSBio-294 na concentração de 0,5 mg/kg e o grupo VII foi tratado com LASSBio-294 na concentração de 1 mg/kg, todas as doses de tratamento foram administradas via intraperitoneal (i.p) e foram solubilizado em DMSO à 4%, foi realizado o processo de eutanásia 18 horas após indução da colite. (Tabela 1) (Figura 4). Todos os Os animais foram eutanasiados pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose anestésica utilizada por Guazelli *et al.*, (2013).

Figura 4. Desenho do delineamento experimental utilizado para modelo de colite ulcerativa e tratamento.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1. Divisão dos animais para cada grupo experimental.

Grupos	Nomenclatura	Amostras	Descrição
I	Grupo Salina (SAL)	7	Sem indução da colite e sem tratamento
II	Grupo Ácido Acético (AA)	7	Submetido a Colite por ácido acético (200 µL a 6% via retal)
III	DMSO	7	Submetido a Colite e administrado 17:30, horas após a colite DMSO 4% por via i.p
IV	Dexametasona (DEXA)	7	Submetido a Colite e tratado 17:30, horas após a colite com dexametasona 2 mg/kg via s.c
V	LASSBio-294 0,2mg/kg	7	Submetido a Colite e tratado com LASSBio-294, 17:30 horas após a colite com dose de 0,2 mg/kg, via i.p; solubilizado com DMSO à 4%
VI	LASSBio-294 0,5mg/kg	7	Submetido a Colite e tratado com LASSBio-294, 17:30 horas após a colite com dose de 0,5 mg/kg, via i.p; solubilizado com DMSO à 4%
VII	LASSBio-294 1mg/kg	7	Submetido a Colite e tratado com LASSBio-294, 17:30 horas após a colite com dose de 1 mg/kg, via i.p; solubilizado com DMSO à 4%

4.5 Análise de parâmetros morfológicos.

Para a análise dos parâmetros morfológicos foram retirados segmento intestinal de aproximadamente 5 cm dos 49 animais com e sem colite e foram coletados para avaliação do peso úmido, parâmetros macroscópicos e análise bioquímica (MPO, MDA, GSH, dosagem de óxido nítrico e citocinas).

4.5.1 Mensuração do peso úmido do cólon dos animais

Os segmentos distais do cólon foram seccionados, medindo 5 centímetros, a fim de determinar o peso úmido do cólon. Posteriormente, foi realizado a pesagem desses fragmentos e os resultados foram expressos como peso úmido de 5 cm de cólon.

4.5.2 Avaliação dos escores macroscópicos de lesão

Após a eutanásia dos animais com a dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg), foram realizadas incisões medianas com abertura da cavidade peritoneal dos animais e feita a identificação dos cólons, que foram isolados em uma extensão de 5 cm do intestino por animal. A peça foi aberta longitudinalmente, lavada com soro fisiológico e distendida sobre uma superfície plana para a avaliação do escore macroscópico seguindo a técnica descrita por Morris (1989), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação dos escores macroscópicos das lesões intestinais de animais com e sem 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 / inflamação em dois ou mais sítios	4
Lesão principal estendendo-se por 1 cm ao longo do colon	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: Adaptado de Morris (1989).

4.6 Análise Bioquímica

4.6.1 Ensaio de Mieloperoxidase

Este ensaio foi realizado para quantificar a infiltração de neutrófilos na mucosa dos cólons intestinais dos animais com ou sem colite induzida por ácido acético, esse ensaio foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por Bradley e seus colaboradores (1982). Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios. Para a análise da concentração dessa enzima, foram retiradas amostras do cólon dos animais, em seguida as amostras foram colocadas num tampão (NaCl 0,1 M + EDTA 0,015 M/L de NaPO₄ 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, foram homogeneizados num Polytron (13000 rpm) e centrifugado a 15 minutos (3000 rpm) em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado nas mesmas condições e no mesmo tampão. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado novamente (Polytron - 13000 rpm) em um outro tampão (HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO₄ 0,05M). A outra etapa foi colocado esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2 vezes). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante será pipetado numa placa (5-10 µl) e serão acrescentados nessa placa 45 µl de NaPO₄ 0,08M junto com a solução de leitura (TMB 25 µ + H₂O₂ 100 µl). A reação foi terminada com o acréscimo de H₂SO₄ 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450 nm. O resultado foi expresso como UMPO/mg de tecido.

4.6.2 Dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal

Os níveis de MDA da mucosa do cólon intestinal foram dosados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa intestinal foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para o preparo de 10% de homogenato. Meio mililitro (0.25ml) desse homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml, sendo acrescentado a esse homogenato 1,5 ml de H₃PO₄ (1%) e 0,5 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0.6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 ml de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto, com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535nm. Os resultados foram expressos em mmol de MDA/g de tecido.

4.6.3 Dosagem dos níveis de Glutathiona (GSH) na mucosa intestinal

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em quase todas células de mamíferos. Ela exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos Meister (1991). Para avaliação dos níveis de GSH foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Em suma, os fragmentos de tecido do cólon foram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos a 4°C. Na sequência, alíquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Este material foi então novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A 400 µL do sobrenadante, adicionado em 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (Reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. Os resultados expressos em µg de NP-GSH/mL de tecido.

4.6.4 Medição do óxido nítrico (NO₃ / NO₂)

Para determinação do óxido nítrico (NO₃ / NO₂), após a indução da colite por ácido acético os animais foram eutanasiados após 18 horas desta indução. O homogenato do tecido do cólon dos animais form incubado em uma microplaca com nitrato redutase durante 12 horas para converter nitrato (NO₃) em nitrito (NO₂). A produção de óxido nítrico foi determinada por medição das concentrações de nitrito no leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Green (1982). Os resultados foram expressos como micromol de nitrito utilizando a curva interna padrão. Para a determinação das concentrações colônicas de nitrato e nitrito traves do método de Griess foi, inicialmente, preparada uma solução contendo 0,5 unidades por ml de nitrato redutase (Sigma) em um tampão KH₂PO₄ contendo NADPH. Para o preparo da reação de Griess foi armazenada separadamente a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz, uma solução contendo Sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e outra solução de NEED a 0,1% em H₃PO₄ a 2,5%. Depois de preparadas as soluções, amostras processadas de tecido colonico dos animais, foram incubadas numa microplaca com nitrato redutase (0,016 L por poço) durante 12 h para a conversão de NO₃ (nitrato) em NO₂ (nitrito). A produção de óxido nítrico foi determinada medindo as concentrações de nitrito em um leitor de placas de ELISA a 540 nm, utilizando o método de Griess (Green *et al.*,1982). Os resultados foram expressos como micromoles (µM) de nitrito.

4.6.5 Mensuração de Citocinas

Para mensuração de Citocinas, após a indução da colite por ácido acético foram retirados os fragmentos do cólon dos animais para dosagem de TNF- α e IL-1 β . Os fragmentos foram adicionados em um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão para cada 100 mg de tecido) e depois processados em um homogenizador de tecido e centrifugado a 3000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2 μ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi lavada com PBS -Tween20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. A placa foi incubada com a curva padrão das citocinas (TNF- α e IL-1 β) diluídas em tampão de lavagem e com as amostras de tecido do estômago a serem dosados, 100 μ L por poço por 24 horas a 4 °C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidinaperoxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada e incubada com o-fenilenediaminadiidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μ L por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que varia de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação foi parada com 150 μ L por poço de H₂SO₄ 1M. A intensidade da coloração será medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média \pm EPM da quantidade de TNF – α e IL - 1 β em pg/ml (Tavares-Murta *et al.*, 2008).

4.7 Análise Estatística

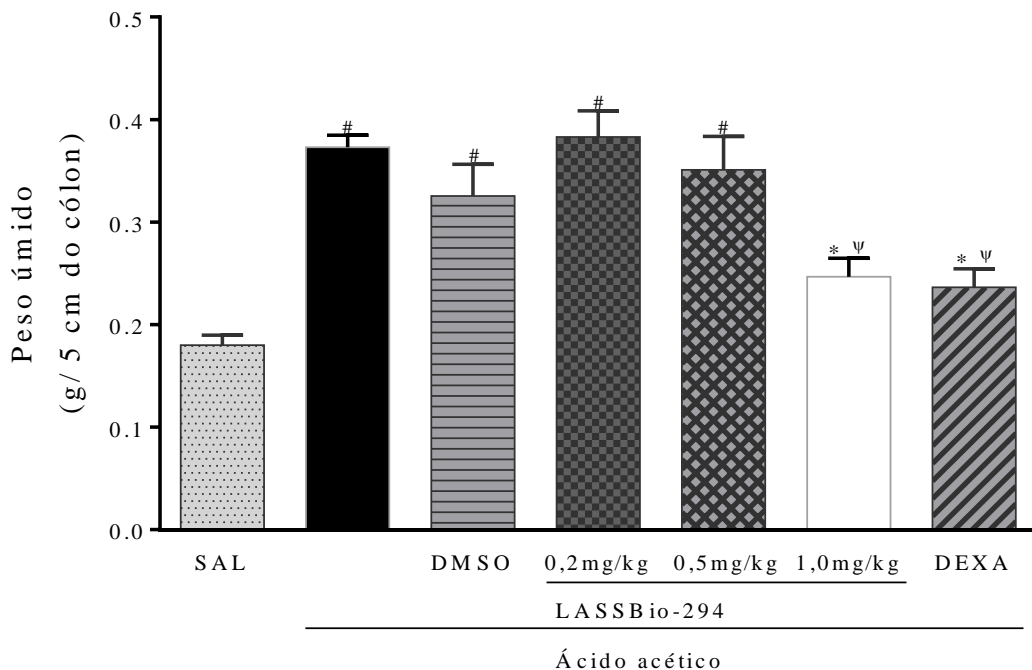
Todos os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média (\pm EPM) de animais em cada grupo (n=7). Os testes estatísticos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 7.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Para todos os testes foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do LASSBio-294 sobre o aumento do peso úmido em animais com colite por ácido acético.

Os animais do grupo ácido acético ($0,373 \pm 0,004$ g) e DMSO ($0,325 \pm 0,0139$ g) tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) do peso úmido das porções dos cólons retirados, em relação ao grupo que recebeu somente salina 0,9% ($0,180 \pm 0,004$ g). O tratamento com LASSBio-294 na dose 0,2 mg/kg ($0,383 \pm 0,010$ g) e na dose de 0,5 mg/kg ($0,351 \pm 0,015$ g), não apresentaram diminuição significativa no peso úmido colônico em relação as outras doses de tratamento. Já o tratamento com LASSBio-294 na dose 1,0 mg/kg diminuiu significativamente o peso úmido da porção intestinal ($0,261 \pm 0,010$ g) comparado aos animais do grupo ácido acético e as demais doses, tendo um efeito semelhante ao grupo dexametasona ($0,243 \pm 0,009$ g). (Figura 5).

Figura 5. Efeito do LASSBio-294 sobre o aumento do peso úmido em animais com colite por ácido acético



Após, a avaliação dos escores macroscópicos de lesão foram recolhidas amostras de tecido intestinal (5 cm) para análise de peso úmido. Os resultados são expressos como média ± erro de 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ vs grupo salina; * $p < 0,05$ vs ácido acético e $\psi p < 0,05$ vs grupo LASSBio-294 0,5mg/kg (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.2 Análise da ação do LASSBio-294 nos escores macroscópicos de lesão.

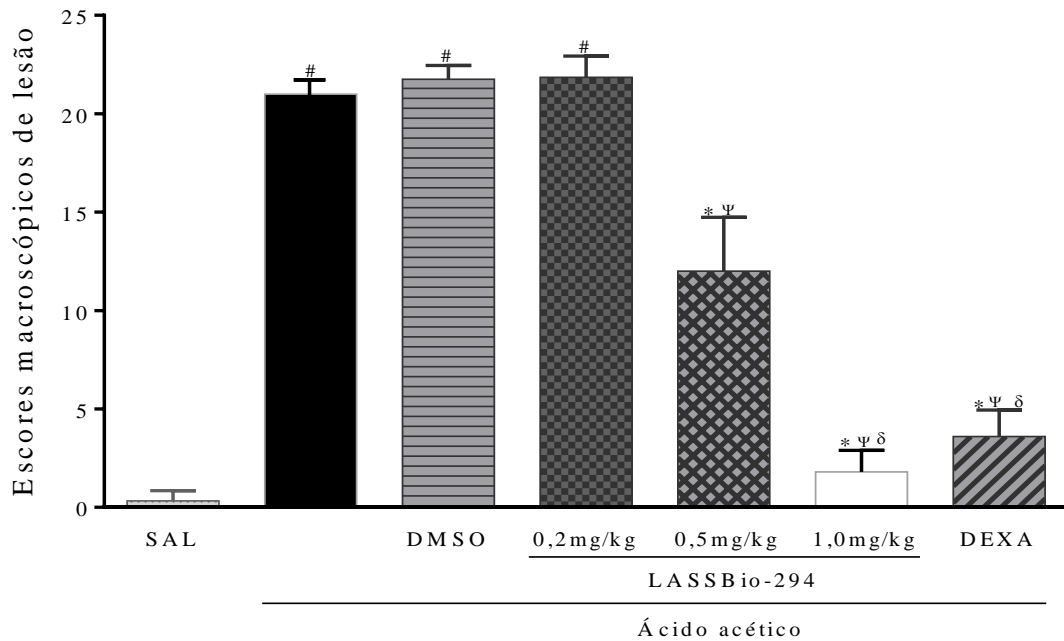
Na figura 6, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) dos escores macroscópicos de lesão dos cólons dos animais 18 horas após a indução da colite por ácido acético ($21,00 \pm 0,00$) e do grupo DMSO ($21,75 \pm 0,25$), quando comparado com o grupo que recebeu somente salina 0,9% ($0,33 \pm 0,21$). Podemos visualizar também essa diferença de escores nos cólons dos animais na figura 7, onde a figura 7A representa o grupo que recebeu somente salina, figura 7B representa o grupo que sofreu a colite por ácido acético e figura 7C o grupo que sofreu a colite por ácido acético e recebeu o DMSO 4%.

Observamos na figura 7A o cólon do animal que recebeu salina, este possui uma aparência normal, sem sinais de inflamação, sem hiperemia ou presença de ulcerações, ao contrário do cólon do animal que sofreu a colite por ácido acético, onde analisamos um cólon com uma extensa ulceração, presença de hiperemia e inflamação (Figura 7B). Observamos também que o DMSO 4%, que é o composto utilizado para dissolver o LASSBio-294, não apresentou capacidade de reverter a inflamação do cólon causada pelo ácido acético, o qual apresentou, também, extensa ulceração e presença de hiperemia (Figura 7C).

O tratamento com LASSBio-294 na dose 0,2 mg/kg ($21,75 \pm 0,25$) não apresentou diminuição dos escores macroscópicos de lesão de forma significativa em relação ao grupo tratado com a medicação padrão dexametasona (Figura 5). Já os tratamentos com o LASSBio-294 nas doses 0,5 mg/kg ($12,00 \pm 1,22$) e 1,0 mg/kg ($1,80 \pm 0,48$), diminuíram os escores macroscópicos de lesão e a dose que apresentou melhor diferença significativa em relação ao grupo que sofreu a colite por ácido acético foi de 1,0 mg/kg, o que pode ser constatado na figura 7. As figuras 7D, 7E e 7F, representam cólons dos animais que foram tratados com LASSBio-294 nas doses de 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg e 1,0 mg/kg, respectivamente. Na figura 7F, observamos uma leve hiperemia no tecido, não apresentando foco de ulceração e uma aparência menos inflamada em relação ao cólon do animal com colite (figura 7B).

Podemos analisar, também na figura 7, o grupo tratado com o fármaco de referência dexametasona 2mg/kg ($3,60 \pm 0,60$) (figura 7G), onde a redução dos escores macroscópicos de lesão não apresentou diferença de escores significativas em relação ao grupo tratado com o LASSBio-294 na dose de 1,0mg/kg.

Figura 6. Análise da ação do LASSBio-294 nos escores macroscópicos de lesão



Após 18h da indução da colite, os animais foram eutanasiados para retirada de segmentos intestinais com e sem colite. A avaliação macroscópica foi realizada pela técnica descrita por Morris et al., 1989. Cada barra representa a média ± EPM do somatório dos escores obtidos a partir dos critérios estabelecidos por Morris. # $p < 0,05$ vs o grupo salina, * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético, ^ψ $p < 0,05$ vs grupo LASSBio-294 0,2 mg/kg, δ $p < 0,05$ vs grupo LASSBio-294 0,5mg/kg (ANOVA seguido por Newman-Keuls post-hoc).

Figura 7. Fotografia do tecido colônico, demonstrando a ação do LASSBio-294 sob os danos inflamatórios macroscópicos na colite experimental induzida por ácido acético

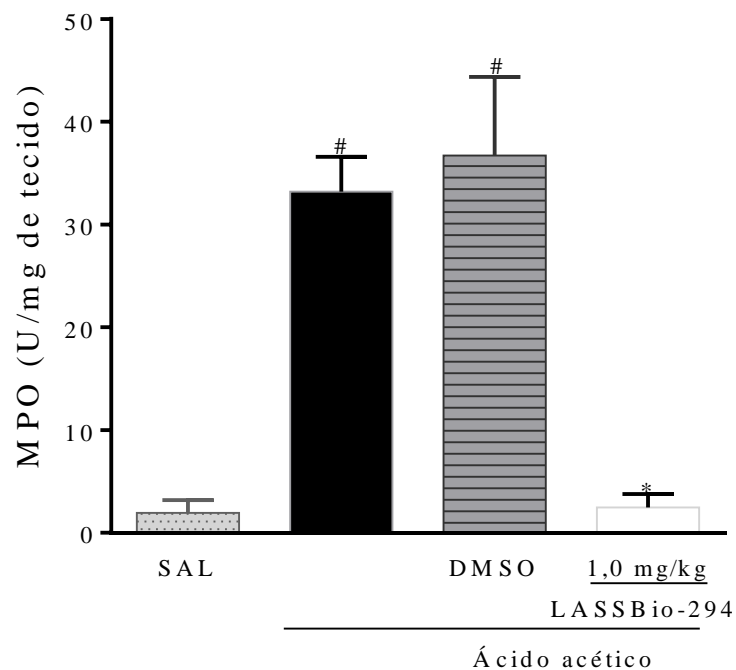


Segmentos colônico de 5 cm dos animais após 18h da indução da colite. (A) Cólon de animal que recebeu apenas solução Salina 0,9% intracólon, controle negativo; (B) Cólon de animal com colite induzida por ácido acético 6% intracólon, controle positivo (C); Cólon de animal com colite e administrado DMSO 4%; (D) Cólon de animal com colite e tratado com LASSBio-294 na dose de 0,2 mg/kg, i.p.; (E) Cólon de animal com colite e tratado com LASSBio-294 na dose de 0,5 mg/kg, i.p.; (F) Cólon de animal com colite e tratado com LASSBio-294 na dose de 1,0 mg/kg, i.p ; e (G) Cólon de animal com colite e tratado com Dexametasona 2 mg/kg s.c.

5.3 Efeito do LASSBio-294 sobre a atividade da mieloperoxidase em animais com colite induzida por ácido acético

Na avaliação da atividade da enzima MPO nos cólons dos animais com ou sem colite, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade desta enzima no intestino dos animais do grupo ácido acético ($33,20 \pm 1,51$ UMPO/mg de tecido) e DMSO ($36,70 \pm 3,41$ UMPO/mg de tecido) em relação ao grupo salina ($1,94 \pm 0,43$ UMPO/mg de tecido). O grupo tratado com LASSBio-294 na dose de 1 mg/kg ($2,48 \pm 1,38$ UMPO/mg de tecido), que foi escolhida como melhor dose, obteve uma diminuição significativa na atividade enzimática quando comparado ao grupo ácido acético (Figura 8).

Figura 8. Efeito do LASSBio-294 sobre a atividade da mieloperoxidase em animais com colite induzida por ácido acético

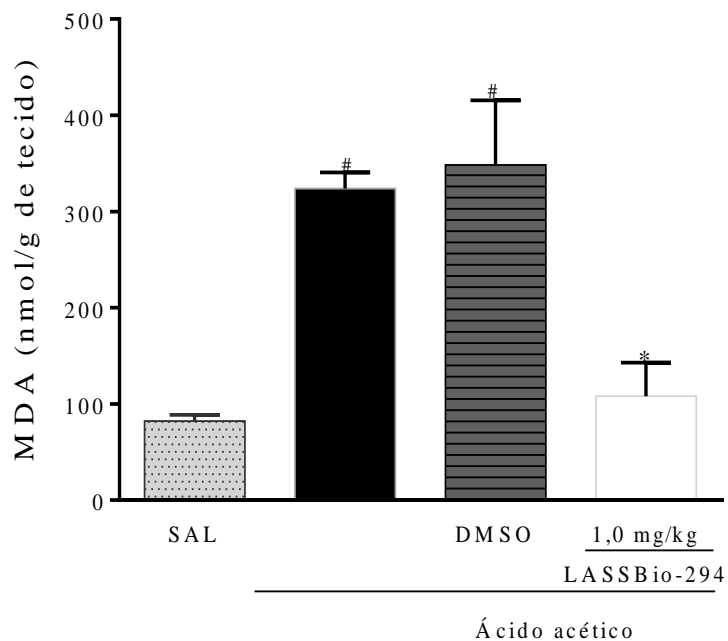


Os animais foram tratados LASSBio-294 de 1mg/kg uma única vez após a indução da colite. Depois de 18h, os camundongos foram eutanasiados, a amostra do cólon foi recolhida e realizada a análise da atividade de MPO. Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ vs o grupo salina; * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido por Newman-Keuls post-hoc).

5.4 Concentração de malondialdeído nos animais com e sem colite

Na figura 9, observa-se que houve um aumento significativo da concentração de MDA no cólon dos animais do grupo ácido acético ($323,70 \pm 9,75$ nmol/g de tecido) e do grupo DMSO ($348,70 \pm 33,58$ nmol/g de tecido) quando comparado com o grupo salina ($82,23 \pm 2,86$ nmol/g de tecido). O grupo tratado com LASSBio-294 na dose 1,0 mg/kg, foi capaz de inibir o aumento de MDA ($108,00 \pm 14,33$ nmol/g de tecido) no tecido colônico inflamado.

Figura 9. Concentração de MDA na colite induzida por ácido acético.

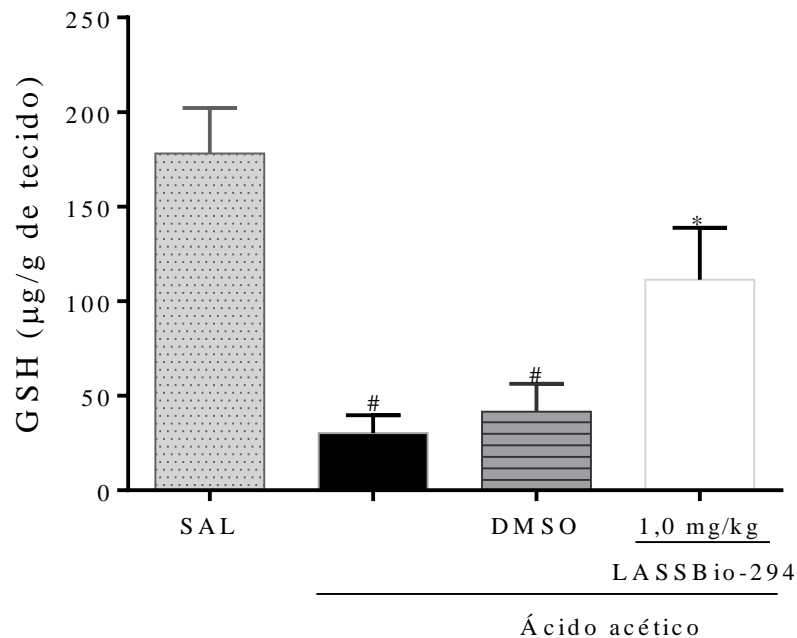


Os animais foram tratados com a melhor dose do LASSBio-294, que foi a dose de 1mg/kg. Após 18 h da indução da colite os animais foram eutanasiados e as amostras de cólon foram colhidas para avaliar o nível de malondialdeído. Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ vs o grupo salina; * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético. (ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.5 Ação do LASSBio-294 sobre os níveis de glutathiona no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético

Na Figura 10, observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de GSH no grupo ácido acético ($30,27 \pm 3,823 \mu\text{g/g}$ de tecido) e DMSO ($41,52 \pm 6,66 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo salina ($178,00 \pm 10,82 \mu\text{g/g}$ de tecido). O grupo tratado com LASSBio-294, na dose de 1mg/kg ($111,30 \pm 13,74 \mu\text{g/g}$ de tecido) apresentou maiores níveis de GSH que o grupo dos animais que sofreram a colite por ácido acético com diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 10. Ação do LASSBio-294 sobre os níveis de glutathiona no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético

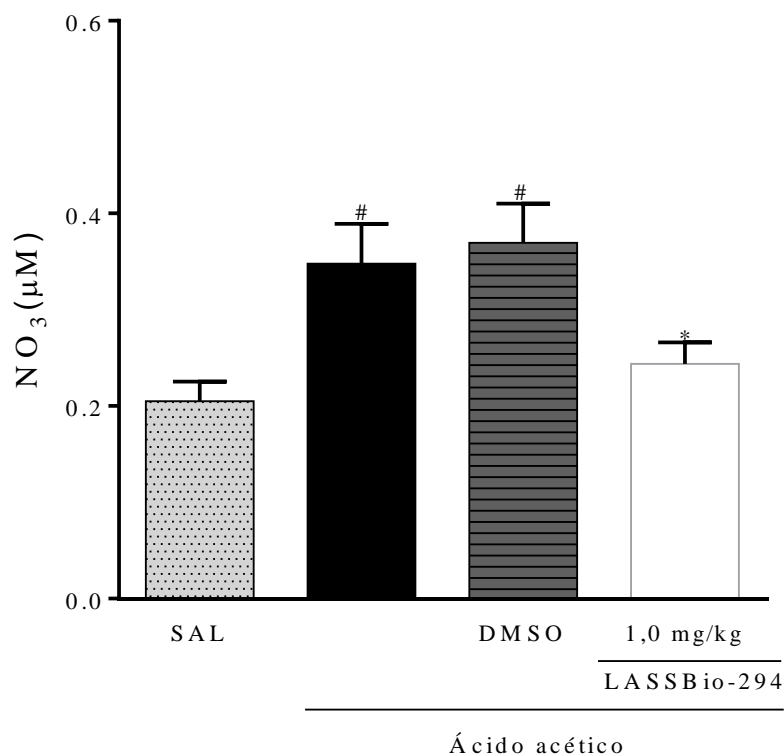


Os segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de GSH. Obteve-se uma diminuição nos níveis de GSH nos animais do grupo ácido acético em relação ao grupo controle (salina). O LASSBio-294 na dose de 1mg/kg aumentou os níveis de GSH no cólon. Os valores foram apresentados como média + EPM dos níveis de GSH expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls post-hoc. # $p < 0,05$ vs o grupo salina; * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético (ANOVA seguido por Newman-Keuls post-hoc).

5.6 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.

Os níveis de óxido nítrico no intestino geralmente são mensurados indiretamente pela dosagem dos seus metabólitos de nitrito/nitrato. No grupo salina, baixos níveis de nitrito/nitrato foram detectados nos cólons ($0,20 \pm 0,02$). Comparado a este grupo, os grupo ácido acético ($0,34 \pm 0,04$) e DMSO ($0,36 \pm 0,04$) aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de nitrito/nitrato no trato gastrointestinal afetado. Ao passo que o grupo de camundongos que foram submetidos a colite induzida por ácido acético e tratados com LASSBio-294 na dose de 1,0 mg/kg ($0,24 \pm 0,02$), tiveram os seus metabólitos de nitrito/nitrato nos cólons reduzidos significativamente ($p < 0,05$), comparado com o grupo ácido acético (figura 11).

Figura 11. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de nitrito/nitrato no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético

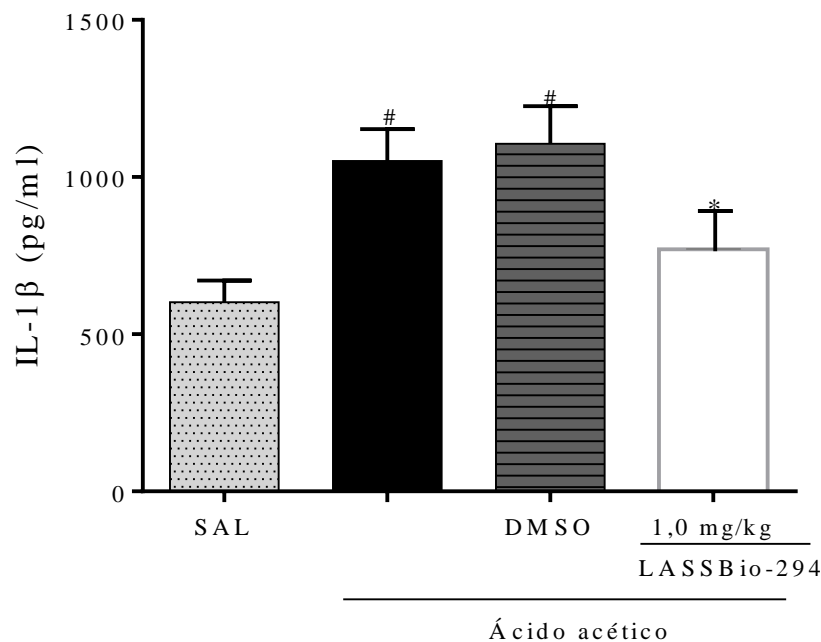


Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de NO_x . Observa-se que o ácido acético aumenta os níveis de nitrito e nitrato no cólon quando comparado ao grupo salina. O LASSBio-294 na dose de 1,0 mg/kg reduz os níveis de NO_x no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético. Os valores foram apresentados como média \pm EPM dos níveis de nitrito/nitrato expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls post-hoc, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético.

5.7 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de IL-1 β no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.

Conforme observado na figura 12, o ácido acético ($1051,0 \pm 101,7$) e DMSO ($1106,0 \pm 119,0$) aumentaram ($p < 0,05$) os níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo que foi administrado somente salina ($601,7 \pm 69,7$). O grupo tratado com o composto LASSBio-294, na dose de 1,0 mg/kg, diminuiu de forma estatisticamente significativa os níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético ($770,5 \pm 0,8$).

Figura 12. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de IL-1 β no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético

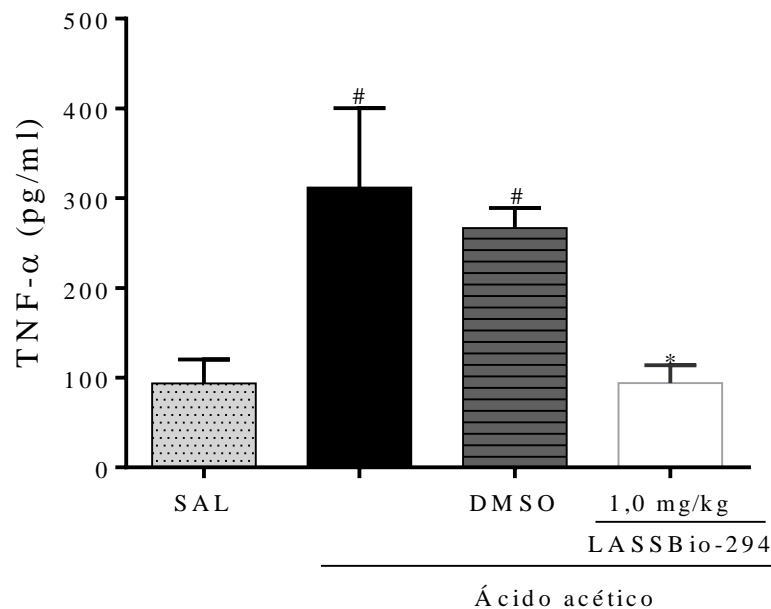


Segmentos do cólon foram coletados para mensurar os níveis de IL-1 β , citocina pró-inflamatória, por ELISA. Observa-se que o ácido acético aumenta os níveis de IL-1 β no cólon quando comparado ao grupo salina. O composto LASSBio-294 reduziu os níveis dessa citocina pró-inflamatória no colon de camundongos com cólite induzida pelo ácido acético. Os valores foram apresentados como média+ EPM dos níveis de IL-1 β expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls post-hoc, onde # $p < 0,05$ vs salina e * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético.

5.8 Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de TNF- α no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético.

Observamos na figura 13, que os grupos ácido acético e DMSO aumentaram ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α no cólon ($311,7 \pm 88,5$) e ($266,7 \pm 22,3$) respectivamente, quando comparado ao grupo salina ($93,6 \pm 26,6$) e quando tratado com o LASSBio- 294 na melhor dose, houve uma diminuição estatística significativa dos níveis dessa citocina pró-inflamatória na colite induzida por ácido acético ($94,1 \pm 19,7$).

Figura 13. Efeito do LASSBio-294 nos níveis teciduais de TNF- α no cólon de animais submetidos à colite induzida por ácido acético



Para a mensuração dos níveis da TNF- α nos colons através de ELISA. Observa-se que o ácido acético aumentou os níveis de TNF- α no cólon quando comparado ao grupo salina e o grupo tratado com o LASSBio-294 reduziu nesses animais os níveis dessa citocina pró-inflamatória no cólon. Os valores foram apresentados como média+ EPM dos níveis de IL-1 β expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls post-hoc, onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e * $p < 0,05$ vs grupo ácido acético.

6 DISCUSSÃO

O composto LASSBio-294, substância testada neste trabalho, foi sintetizada pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ) e apresentou resultados prévios como mecanismos de ação: a inibição de enzimas fosfodiesterase (PDE's), supressão da liberação de TNF- α e agonista de receptor de adenosina A_{2A}. Onde a adenosina tem efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular e efeito anti-inflamatório em alguns tecidos (Rajasundaram S, 2018; Mills JH *et al.*, 2012). A ativação dos receptores A_{2A} em células do músculo liso da coronária, células endoteliais e monócitos/macrófagos resulta em vasodilatação, neo-angiogênese e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Qi-hui Li *et al.*, 2015; Belardinelli *et al.*, 1998; Gessi *et al.*, 2000).

Esse receptor quando ativado promove no meio intracelular a liberação do ATP como segundo mensageiro, conseqüentemente há ativação da proteína quinase PKA, a qual inibe a formação e liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β (Varani *et al.*, 2010); e inibe ativação do fator NF- κ B (Montesinos *et al.*, 2003). Logo a via de sinalização associada a ativação de receptores A_{2A} poderia resultar em um efeito anti-inflamatório, por reduzir a produção de marcadores biológicos do processo inflamatório como demonstrado pelo LASSBio-294. Sabendo do potencial anti-inflamatorio desse derivado de N-acil-hidrazona, nosso grupo de pesquisa despertou interesse em delinear um estudo experimental da ação dessa substância em animais com colite induzida por agente químico.

Inicialmente para reproduzir a colite experimental, foi usado ácido acético via retal, para induzir a colite ulcerativa. Esse modelo já é extensamente utilizado em pesquisas com animais e reproduz uma inflamação aguda semelhante a colite ulcerativa em humanos, onde é caracterizado por um intenso processo inflamatório no cólon com formações de abscessos crípticos, edemas de submucosa, ulcerações em mucosa e infiltrado leucocitário (Akgun *et al.*, 2005; Mahgoub *et al.*, 2005; Magalhães, 2017). O ácido acético permite, rapidamente, um estudo do processo inflamatório, pois em apenas 12 horas após a indução já é possível que sejam observadas as alterações inflamatórias, atingido seu pico de inflamação após 18 horas da indução da colite (Magalhães, 2017).

Após a indução do modelo experimental de colite ulcerativa, o primeiro parâmetro inflamatório avaliado foi o peso úmido, que é um indicador da gravidade e de extensão da resposta inflamatória, refletindo a magnitude do edema e do infiltrado celular no tecido estudado (Busserolles *et al.*, 2005). O aumento do peso do tecido inflamado por causa da colite em relação aos tecidos que não sofreram a colite ou foram tratados, se dá pelo aumento da permeabilidade vascular, aumento da quantidade de células inflamatórias no local e

formação de edemas, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, onde observamos que houve uma diminuição significativa nos pesos úmidos do cólon nas amostras teciduais dos animais que foram tratados com o LASSBio-294, tendo uma maior significância a dose de 1,0 mg/kg, comparado ao grupo ácido acético que apresentou um aumento de peso úmido ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina.

Outro parâmetro avaliado, no intuito de reforçar nossa hipótese de que o LASSBio-294 possui atividade anti-inflamatória, foram as avaliações dos escores macroscópicos de lesão, esses revelaram que o grupo ácido acético teve um aumento significativo dos escores macroscópicos de lesão quando comparados aos animais que receberam somente salina via retal nas 18 após a indução da colite experimental. Obtendo assim resultados semelhante ao mostrado por Magalhães (2017) e Lima (2018) onde o grupo de animais não tratados tiveram também um aumento significativo do peso úmido e escores macroscópicos de seus cólons quando comparados com os animais que receberam somente salina, após a indução das colites experimentais. Já o LASSBio-294 foi capaz de diminuir significativamente os escores macroscópicos de lesão no cólon, com uma maior significância na dose de 1,0 mg/kg.

A partir desses resultados iniciais foi possível verificar uma eficácia do LASSBio-294, como atividade anti-inflamatória no modelo experimental de colite induzida por ácido acético. De acordo com os resultados apresentados, concluiu-se que a melhor dose em reduzir os parâmetros macroscópicos e o peso úmido foi a dose de 1,0 mg/kg, sendo a dose de escolha para a avaliação dos possíveis mecanismos de ação do LASSBio-294, nesse modelo experimental.

Na colite um dos seus principais eventos inflamatórios é a infiltração leucocitária, que leva ao aumento de células inflamatórias no intestino inflamado, por meio de um aumento da expressão das moléculas de adesão nos vasos do cólon submetido à colite. Tais moléculas são responsáveis pela migração leucocitária para a área inflamada, especialmente os neutrófilos, onde podemos quantificar a intensidade da migração dos neutrófilos no tecido analisado, por meio da quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO), que é a enzima que está presente em grânulos primários de neutrófilos polimorfonucleares e é encontrada em pequena quantidade em monócitos e macrófagos. Alterações dos seus níveis são apontadas como parâmetro para analisar a gravidade de inflamações em vários tecidos, inclusive no intestino. (Yin *et al.*, 2011). Essa enzima é muito utilizada para mensurar de forma qualitativa a infiltração de neutrófilos para tecido colônico inflamado (Patil *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014). Sob condições fisiológicas normais, a MPO é liberada a partir de grânulos de azurófilos, quando ocorre um processo inflamatório há o aumento da produção desta enzima (Tahan *et al.*, 2011).

Os neutrófilos, são algumas das células inflamatórias responsáveis pela produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja ação bactericida pode provocar danos às células. A fonte predominante de EROs é da família de enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), que produz o ânion superóxido (O_2^-). Esse radical livre altamente reativo interage com outras moléculas para produzir radicais livres com ação oxidante, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO) e o radical hidroxila (OH^-). Quando as EROs superam as defesas antioxidantes da célula como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e a glutatona (GSH), os danos aos tecidos ocorrem. Com isso, a diminuição do MPO representa não só a diminuição do influxo de neutrófilos como também uma redução do estresse oxidativo. (Moret-Tatay *et al.*, 2016). Inclusive a redução do estresse oxidativo sob estas condições pode ser um potencial alvo terapêutico para as doenças inflamatórias do intestino (Hou *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos nesse estudo e em outros (Magalhães, 2017; Guazelli *et al.*, 2013) observamos que o ácido acético produziu um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase. Este aumento foi reduzido pelo tratamento com o LASSBio-294, sugerindo também uma ação anti-inflamatória que envolva inibição da migração de leucócitos e inibição da infiltração de neutrófilos.

Como citado anteriormente a inflamação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos nas estruturas celulares do cólon, possibilitando a peroxidação lipídica, inativação enzimática, alteração do estado redox intracelular e danos ao DNA. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre a cadeia de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios (Llesuy, 2002).

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lípidos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular, tem uma cadeia curta e é um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. O aumento dos níveis de malondialdeído indicam que houve aumento nos danos celulares e teciduais (Benzie, 1996; Lima e Abdalla, 2001; Sadar *et al.*, 2016).

A injúria tóxica causada pelo ácido acético no cólon, é reconhecida por aumentar os níveis de lipoperoxidação (Magalhães, 2017; Witaicenis *et al.* 2014; Harputluoglu *et al.*, 2006, Kandhare *et al.*, 2012 e Kuznietsova *et al.*, 2016). Foi observado pelo nosso estudo também o aumento dos níveis de malondialdeído no grupo que foi induzida a colite pelo ácido acético, indicando que houve um aumento do estresse oxidativo na mucosa colônica e o LASSBio-294 apresentou uma ação antioxidante por diminuir os níveis do MDA durante a colite induzida por ácido acético.

As células possuem mecanismos de defesa antioxidantes, essenciais para a manutenção da integridade e função intestinal, que inibe a produção de radicais livres ou sequestram os que já foram produzidos, sendo a glutatona peroxidase (GPx) responsável por neutralizar 91% do peróxido de hidrogênio em conjunto com um tripeptídeo antioxidante glutatona (GSH). O GSH inibe lesões oxidativas e as EROs diretamente através de seu grupo sulfidril e indiretamente como um co-fator ou como uma coenzima no processo de desintoxicação enzimática (Sivaprasad *et al.*, 2004). O GSH desempenha um papel importante no transporte de aminoácidos e na síntese do DNA (Raygude *et al.*, 2012). A presença de estresse oxidativo na mucosa colônica durante o processo inflamatório intestinal leva a depleção nos níveis de glutatona. Estudos demonstram o envolvimento direto da GPx com a colite em ratos com *knockout* da GPx, que desenvolveram colite espontaneamente (Pravda, 2005). Também diversos estudos demonstram que em animais que são submetidos a colite experimental apresentam baixos níveis de glutatona em relação ao grupo controle (Ardite *et al.*, 2000; Tahan *et al.*, 2011; Kandhare *et al.*, 2012; Karp e Koch, 2006; Sido *et al.*, 1998).

Considerando-se que a administração de um bloqueador de radicais sulfidril em ratos promove inflamação colônica (Loguercio *et al.*, 2003) e que a suplementação com GSH melhora o dano colônico em colite experimental (Ardite *et al.*, 2000), novos compostos que impedem a redução dos níveis deste tripeptídeo caracterizam-se como potenciais no tratamento da colite ulcerativa.

Em nosso estudo, observamos que houve uma diminuição significativa nos níveis de GSH no tecido colônico do grupo que foi induzido a colite com ácido acético quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina. Já o grupo que foi tratado com o LASSBio-294 foi capaz de preservar significativamente os níveis de GSH, quando comparado ao grupo salina. Significando que o LASSBio-294 atua sobre o sistema antioxidante, ao passo que interfere na produção de radicais livres por meio da interrupção da peroxidação lipídica, o que demonstra sua capacidade em reduzir a ação inflamatória do ácido acético no colon.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso formado da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte a L-Arginina e oxigênio molecular (O₂), em NO e L-Citrulina. No tecido colônico, o NO pode auxiliar na manutenção do suprimento sanguíneo da mucosa gastrintestinal durante o período de exposição a um dano na mucosa, o que é vital para a recuperação do tecido. Além da melhora no fluxo sanguíneo, as ações protetoras do NO podem envolver uma ação microbicida direta, diminuição da aderência de leucócitos ao endotélio, inibição da ativação de mastócitos e a produção de citocinas da via Th1 (Ribeiro *et al.*, 2016).

Apesar do extenso conflito de dados acerca da atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatória do NO, sabe-se que a produção excessiva e prolongada de NO pode ser uma das causas da disfunção intestinal comum a DII. Um grande número de evidências revelaram que o aumento do estresse oxidativo juntamente com o aumento da atividade da iNOS resulta em uma cascata de produção de radicais livres, prejudicando a estrutura e função do tecido (Fukumura *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2015).

Zingarelli, Szabó e Salzman (1999) propuseram que o aumento da produção de NO pela enzima iNOS parece ser responsável pelo surgimento de lesões no tecido colônico em vários modelos experimentais de colite. Em pacientes com colite ulcerativa, onde a atividade da iNOS é elevada, há aumento da concentração de nitrito detectada em lavado retal e em amostras de biópsia (Zingarelli, Szabó e Salzman, 1999) (Fillmann *et al.*, 2007).

Devido ao papel importante desenvolvido pelo óxido nítrico na colite ulcerativa, foi avaliado nesse estudo os seus produtos de degradação por meio da técnica de nitrito/nitrato (NO₂ /NO₃) observando um aumento significativo de NO do grupo ácido acético comparado ao grupo salina, este dado corrobora com Érces *et al.*, 2012, Blázovics *et al.*, 2004 e Alkim *et al.*, 2012. E o grupo tratado com LASSBio-294 apresentou redução na concentração de nitrato e nitrito na mucosa intestinal de camundongos com colite induzida por ácido acético. Assim, pode-se inferir que esse composto tem ação anti-inflamatória contra a lesão intestinal, diminuindo a formação de radicais livres.

Nas doenças inflamatórias intestinais sabemos que há um rompimento da barreira epitelial que aumenta o contato com os produtos bacterianos. Este contato também pode estimular as células dendríticas e macrófagos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e quimiocinas. IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias potentes que tem múltiplos efeitos, incluindo a ativação de células inflamatórias, a indução de diversas proteínas inflamatórias, citotoxicidade, formação de edema, e a migração de neutrófilos (Rosenbaum & Boney, 1991).

A liberação de citocinas é um constituinte importante da resposta inflamatória desencadeada durante a infecção ou danos aos tecidos. No entanto, a superprodução de IL-1 β , TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e diversas células imunológicas de forma sistêmica pode ser deletéria e associada ao desenvolvimento de distúrbios inflamatórios (Tracey, 2002; Coccia, 2012).

Além disso, a citocina IL-1 β aumenta a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes e em células endoteliais (Yang, 2014). Na colite ulcerativa a citocina pró-inflamatória IL-1 β apresenta sua concentração aumentada (Bamias *et al.*, 2011; Magalhães, 2017). Ela está envolvida em fases iniciais da resposta inflamatória, desempenhando um importante papel na patogênese da DC, CU e colite infecciosa (Bertevello *et al.*, 2005). Sendo atualmente um importante alvo terapêutico para as doenças inflamatórias, os medicamentos que consigam inibir a formação excessiva de citocinas pró-inflamatórias.

Em nosso estudo com modelo de colite induzida com ácido acético a 6 %, foi capaz de estimular um aumento significativo da liberação de citocina IL-1 β e TNF- α , quando comparado ao grupo que foi administrado salina por via retal. Já o grupo que foi induzido a colite e tratado com LASSBio-294 na dose de 1,0mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a produção dessas citocinas quando comparado ao grupo que foi somente induzido a colite por ácido acético.

Assim, com base nos resultados que sugerem que o efeito anti-inflamatório do LASSBio-294 é dependente pelo menos em parte, da inibição da liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β e TNF- α , que funcionam como mediadores responsáveis por muitas características da inflamação como o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares, pela regulação positiva de moléculas de adesão de células endoteliais vasculares, na mucosa intestinal (Fiocchi *et al.*, 1989). E com um possível mecanismo que pode envolver a regulação negativa da resposta inflamatória através da inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos o composto LASSBio-294 na dosagem de 1,0mg/kg, foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios em um modelo experimental de colite induzida por ácido acético, como peso úmido e escores macroscópicos nos cólons analisados, foi eficaz também na diminuição dos níveis de mieloperoxidase e malondialdeído, sugerindo que este composto atua por reduzir a infiltração de neutrófilos para o tecido colônico.

Preservou a concentração dos os níveis de glutathione, possuindo também uma ação antioxidante. Observou-se também a redução da produção de radicais livres derivados do óxido nítrico durante o tratamento com o LASSBio-294, reduzindo, também, o estresse oxidativo nos tecidos tratados e diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α).

Concluindo que esse composto possui uma ação protetora intraluminal, por apresentar propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Porém ressaltamos que precisamos de estudos mais aprofundados sobre o efeito e mecanismo de ação do LASSBio-294 na colite e que essa medicação possa futuramente ser inserida como tratamento alternativo e com menos efeitos colaterais para pacientes portadores de colite ulcerative ou doença de Chron.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKGUN E, CALISKAN C, CELIK HA, OZUTEMIZ AO, TUNCYUREK M, AYDIN HH. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. **J Int Med Res**. 2005

ALKIM C, SAKIZ D, ALKIM H, LIVAOGLU A, KENDIR T, DEMORSOY H, et al. Thrombospondin-1 and VEGF in inflammatory bowel disease. **Libyan J Med**. 2012.

ANIWAN S, PARK SH, LOFTUS EV JR. Epidemiology, natural history, and risk stratification of Crohn's disease. **Gastroenterol Clin North Am**. 2017.

ARANTES, J.A.V, SANTOS, C.H.M, DELFINO, B.M, SILVA, B.A, SOUZA, T.M.M, CRUZ, A.B.G. Epidemiological profile and clinical characteristics of patients with intestinal inflammatory disease. **J coloproctol**. 2017.

ARDITE, E. et al. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 735-44, 2000.

BAMIAS, G.; KAL TSA, G.; LADAS, S. D. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Discovery Medicine**, v. 60, p. 459-467, 2011.

BARBOSA, M. L. C. Doenças Multifatoriais e os Desafios no Planejamento de Fármacos Multialvos: A Contribuição do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio®. **Rev. Virtual Quim**. 2015.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardioativo. **Quim. Nova** 2002.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nova** 2002.

BARROS PAC, SILVA AMR, NETO MAFL. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **J Coloproctol** (Rio J). 2014.

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

BECHARA CDS, LACERDA FILHO A, FERRARI MDLA, ANDRADE DAR, LUZ MMPD, SILVA RGD. Montreal classification of patient operated for Crohn's disease and identification of surgical recurrence predictors. **Rev Col Bras Cirurg**. 2015.

BELARDINELLI, L.; SHRYOCK, J. C.; SNOWDY, S. et al. The A_{2A} adenosine receptor mediates coronary vasodilation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, p.1066–1073, 1998.

BENZIE, I.F.F. Lipidperoxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.47,p.233-261, 1996.

BERTEVELLO, P. L. et al. Immunohistochemical assessment of mucosal cytokine profile in acetic acid experimental colitis. **Clinics** (Sao Paulo). 2005.

BEZERRA NETTO, H.J.C. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-n-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, sintetizados a partir do safrol. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

BINGHAM CO 3rd. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **J Rheumatol Suppl**. 2002;65:3–9.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-466),

Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes. **Molecules**. 2011.

BLÁZOVICS A, HAGYMÁSI K, PRÓNAI L. Cytokines, prostaglandins, nutritive and non-nutritive factors in inflammatory bowel diseases. **Orv Hetil**. 2004 Review. Hungarian.

BRUEWER M, LUEGERING A, KUCHARZIK T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. **J Immunol**. 2003;171:6164–72

BURISCH, J.; MUNKHOLM, P.; The epidemiology of inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**. v. 50, n. 8, p. 942-951, 2015.

BURNOUF C., PRUNIAUX M.-P., SZILAGYI C.M., JAMES A.B. Phosphodiesterases 4 inhibitors. **Annu Rep Med Chem**;33:91– 109, 1998.

BUSSEROLLES, J.; PAYÁ, M.; D'AURIA, M. V.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J. Protection against 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n.10, p. 1433–40, 2005.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. **Química Nova**. 2012

CAMELO, A. *et al.* Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. **Journal of gastroenterology**. v. 47, p. 1198–211, 2012.

CHARRET, K.S. Efeitos dos compostos acilhidrazonas pirazólicas sobre as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e na infecção experimental em camundongos isogênicos CBA. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

COCCIA, M. et. al. IL-1 β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. **JEM.** vol. 209 no. 9 1595-1609, 2012.

COSTA, P. R. R. P., R.; PIMHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. Substâncias carboniladas e derivados. São Paulo. 2003.

DA ROSA JR, DA SILVA JÚNIOR JF, DA ROSA MI. Perfil epidemiológico de portadores de doença inflamatória intestinal. **Arq Catarin Med.** 2014;43:53–8.

DAHAN S, RODA G, PINN D, *et al.* Epithelial: lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation. **Gastroenterology.** 2008;134:192–203.

DO AMARAL, D.N.; CAVALCANTI, B.C.; BEZERRA, D.P.; FERREIRA, P.M.P.; CASTRO, R.P.; SABINO, J.R.; MACHADO, C.M.L.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C.M.R.; *et al.* Docking, synthesis and antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. **PLoS One** 2014, 9, e85380.

DUARTE, C. M. Novos derivados acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

ÉRCES, D. *et al.* N-methyl-D-aspartate receptor antagonist therapy suppresses colon motility and inflammatory activation six days after the onset of experimental colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 691, n. 1-3, p. 225-34, 2012.

ENGEL MA, NEURATH MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. **J Gastroenterol.** 2010 Jun;45(6):571-83. doi: 10.1007/s00535-010-0219-3. Epub 2010 Mar 9.

FARREL, R J.; LAMONT, J.T. **Microbial factors in inflammatory bowel disease.** **Gastroenterol. Clín. North. Am.**, v.31, p 41-62, 2002.

FERRARI, M. L. A. et al. Isolamento e caracterização de *Escherichia coli* aderente-invasivas (AIECs) e perfil microbiano de lesões intestinais de pacientes com doença de Crohn, e efeito do tratamento com *Saccharomyces boulardii* em infecções experimentais por AIEC. Congresso Nacional de Saúde 72 da faculdade de Medicina da UFMG - Cenários da Saúde na Contemporaneidade, 2014.

FIGUEIREDO J.M., CAMARA C.A., AMARANTE E.G., MIRANDA A.L.P., SANTOS F.M., RODRIGUES C.R., FRAGA C.A.M., BARREIRO E.J. Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: methyl-imidazolyl N-acylarylhydrazones derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** 2000;8:2243–2248.

FORD, A. C. et. al. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. **Am J Gastroenterol**, v. 106, p. 601-616, mar. 2011.

FILLMANN, H.F. O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético [Tese – Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

FIOCCHI, C. et al. Intestinal immune reactivity to interleukin 2 differs among crohn's disease, ulcerative colitis, and controls. **Gastroenterology**. v.97, p.1-9. 1989.

FRAGA, A. G. M. Avaliação do perfil metabólico in silico// in vitro de novo protótipo acilidrazônico cardioativo. 2010. (Doutorado). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, UFRJ, Rio de Janeiro 2010.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521-34, 2006.

GAGE, J.L.; ONRUST, R.; JOHNSTON, D.; OSNOWSKI, A.; MACDONALD, W.; MITCHELL, L.; UROGDI, L.; ROHDE, A.; HARBOL, K.; GRAGEROV, S.; et al. **N-Acylhydrazones as inhibitors of PDE10A**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 4155–4159.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; ONGINI, E.; BOREA, P. A. A_{2A} adenosine receptors in human peripheral blood cells. **British Journal of Pharmacology**. v. 129, p. 2–11, 2000

GLOCKER E-O, KOTLARZ D, BOZTUG K, GERTZ EM, SCHÄFFER AA, NOYAN F, *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **The New England Journal of Medicine**. 2009;361:2033.

GONG, Q.; MENON, L.; ILINA, T.; MILLER, L.G.; AHN, J.; PARNIAK, M.A.; ISHIMA, R. Interaction of HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H with an acylhydrazone inhibitor. **Chem. Biol. Drug Des.** 2011, 77, 39–4.

GONZALEZ-SERRATOS, H. *et al.* A novel thienylhydrazone, (2thienylidene)3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine, increases inotropism and decreases fatigue of skeletal muscle. **J. Pharmac. Exper. Therap.**, v. 299, n° 2, p. 558-566, 2001.

GREEN, L.C.; WAGNER D. A.; GLOGOWSKI J.; SKIPPER P. L.; WISHNOK J. S.; TANNENBAUM S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131-138, 1982. 2010.

GU. W.; WU, R.; QI, S.; GU, C.; SI, F.; . Synthesis and antibacterial evaluation of **Molecules**. New N-acylhydrazone derivatives from dehydroabiatic acid. v. 17, n. 4, p. 4634-4650. 2012.

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 Natara Products**, v. 76, p. 200–208, 2013.

HANAUER, STEPHEN B. Treatment of perianal Crohn's disease: A medical approach. **Inflammatory Bowel Diseases**, 1996, Vol.2(1), pp.64-66.

HANSEN JJ, SARTOR RB. Therapeutic manipulation of the microbiome in IBD: current results and future approaches. **Curr Treat Options Gastroenterol**. 2015;13(1):105–120.

HARPUTLUOGLU, M.M. *et. al.* The effects of Gingko biloba extract on acetic acid-induced colitis in rats. **Turk J Gastroenterol.** v.17 p. 177-182, 2006.

HELIEH, O. S.; CHEN, T.; VILLIERS, W. J. S. Green tea polyphenols and sulfasalazine have parallel anti-inflammatory properties in colitis models. **Frontiers in Immunology.** v. 4, n. 132, p. 132, maio. 2013.

HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacol Sci,** v. 22, n. 9, p. 465-70, 2001.

HOU, J., K., ABRAHAM, B., E EL-SERAG, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *American Journal Gastroenterology*, 106, pp. 563-573. 2011

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov,** v. 5, n. 3, p. 247-64, 2006.

KANDHARE, A. D.; RAYGUDE, K. S.; GHOSH, P.; GHULE, A. E.; GOSAVI, T. P.; BADOLE, S. L.; BODHANKAR, S. L. Effect of hydroalcoholic extract of Hibiscus rosa sinensis Linn. leaves in experimental colitis in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,** v. 5, p. 337-344, 2012.

KANNAN, N.; GURUVAYOORAPPAN, C. Protective effect of Bauhinia tomentosa on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. **International Immunopharmacology,** v. 16, p. 57-66, maio. 2013.

KARP, S.M.; KOCH, T.R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. **Dis Mon,** v. 52, n. 5, p. 199-207, 2006.

KE, F.; YADAV, P. K.; JU, L. Z. Herbal Medicine in the Treatment of Ulcerative Colitis. **Saudi J Gastroenterol,** v. 18, p. 3-10, jan. 2012.

KUMAR, V. S.; RAJMANE, A. R.; ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Naringin ameliorates acetic acid induced colitis through modulation of

endogenous oxido-nitrosative balance and DNA damage in rats. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 2, p. 132-145, 2014.

KUMMERLE, A.E.; RAIMUNDO, J.M.; LEAL, C.M.; DA SILVA, G.S.; BALLIANO, T.L.; PEREIRA, M.A.; DE SIMONE, C.A.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G.; FRAGA, C.A.; et al. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** 2009, 44, 4004–4009.

KUMMERLE, A. E. et al. Design, synthesis and analgesic properties of novel conformationally-restricted n-acylhydrazones (nah). **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 17, p. 4963-6, 2009b.

KUZNIETSOVA, H. M.; YENA, M. S.; KOTLYAR, I. P.; OGLOBLYA, O. V.; RYBALCHENKO, V. K. Anti-Inflammatory Effects of Protein Kinase Inhibitor Pyrrol Derivate. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

LEE, J. C. Predicting the course of IBD: light at the end of the tunnel?. **Dig Dis**, v. 30, p. 95-99, 2012.

LEITE, L. F. et al. Synthesis and analgesic profile of novel n-containing heterocycle derivatives: Arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohydrazide. **Farmaco**, v. 54, n. 11-12, p. 747-57, 1999.

LICHTENSTEIN GR, ABREU MT, COHEN R, TREMAINE W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** 2006; 130(3):940-987.

LIMA, É.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**: Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.37, 2001.

LIMA, J. V. N. ; PEREIRA, C. M. C. ; MAGALHÃES, D. A. ; Sousa, G. S ; BRITO, T. V. ; BATISTA, J. A. ; BARBOSA, A. L. R. . Gabapentina Reverte Parâmetros Inflamatórios na

Colite Induzida por Ácido Acético em Camundongos. **Alicerces da saúde pública no Brasil** 2. 2ed.Ponta Grossa - PR: Atena, 2018, v. 2, p. 168-.

LIN JF, CHEN JM, ZUO JH, YU A, XIAO ZJ, DENG FH, et al. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. **Inflamm Bowel Dis** 2014;1407–15.

LLESUY, S.F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: Marroni NP, organizadora. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: ULBRA; 2002. p. 21-32

LOGUERCIO, C. et al. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. **Dig Liver Dis**, v. 35, n. 9, p. 635-41, 2003.

LOPES, H., CURADO, A. Terapêutica farmacológica da Colite Ulcerosa. **J Port Gastrenterol**. v.16 n.4 Lisboa ago. 2009.

LUO, J.; CAO, J.; JIANG, X.; CUI, H. Effect of low molecular weight heparin rectal suppository on experimental ulcerative colitis in mice. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, n. 7, p. 441-445, 2010.

MACDONALD, T.T., MONTELEONE, G. AND PENDER, S.L.F. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. **Scand. J. Immunol.** 51, 2-9, 2000

MARANHÃO DDA, VIEIRA A, CAMPOS T. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **J Bras Med**. 2015;103:9–15.

MAGALHÃES, D. A. ; SOUSA, G. S ; BARBOSA, A. L. R. . Ação anti-inflamatória mediada pelo receptor Muscarínico M1 na colite.. 1. ed. Rio de Janeiro: **Novas Edições Acadêmicas**, 2017. v. 1. 92p .

MAHGOUB A, EL-MEDANY A, MUSTAFA A, ARAFAH M, MOURSI M. Azithromycin and erythromycin ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2005; 205: 43-52.

MAYER, L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. **Journal of gastroenterology**. v. 45, p. 9–16, 2010.

MCVAY LD, KEILBAUGH SA, WONG TM, KIERSTEIN S, SHIN ME, LEHRKE M, LEFTEROVA MI, SHIFFLETT DE, BARNES SL, COMINELLI F, COHN SM, HECHT G, LAZAR MA, HACZKU A, WU GD. (2006). Absence of bacterially induced RELM β reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. **J Clin Invest** 116, 2914-23.

MEIER, J.; STURM, A. Current treatment of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 27, p. 3204-3212, jul. 2011.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorg Med Chem Lett**. v.16, p.31-35. 2006.

MILLS JH, KIM DG, KRENZ A, CHEN JF, BYNOE MS. A_{2A} adenosine receptor signaling in lymphocytes and the central nervous system regulates inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**. 2012.

MIRANDA, A. L. P. L., P. C. ;TRIBUTINO, J. L. M.; MELO, P. A.; FERNANDES, P. D.; CINTRA, W. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **Abstractus du 6^{ème} congrès annuel de la société française de pharmacologie** P296 p. 2002.

MONTESINOS, M. C. *et al.* Adenosine A_{2A} or A₃ receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. **Arthritis Rheumatology**, v. 48, p. 240-247, 2003

MORET-TATAY, I.; IBORRA, M.; CERRILLO, E.; TORTOSA, L.; NOS, P.; BELTRAN, B. Possible biomarkers in blood for Crohn's disease: Oxidative stress and microRNAs-current evidences and further aspects to unravel. **Oxid. Med. Cell Longev**

MOROVIC-VERGLES, J.; CULO, M. I.; GAMULIN, S.; CULO, F. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. **Rheumatology International**, v. 29, p. 167-171, 2008.

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.

MUSCH MW, CLARKE LL, MAMAH D, *et al.* T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. **J Clin Invest**. 2002;110:1739–47.

NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S.; SRIRAM, D.; YOGESHWARI, P.; CLERCQ, E.D.; PANNECOUQUE, C.; BALZARINI, J. Nicotinic acid benzylidene/phenylethylidene hydrazides: synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies. **Lett. Drug Des. Discov**. 2011, 8, 733–749.

NG SC, SHI HY, HAMIDI N, ET AL. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**. 2018; 390(10114):2769-2778.

OLIVEIRA FM, EMERICK APC, SOARES EG. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciênc Saúde Coletiva**. 2010;15(Suppl 1).

PATIL, M. V. K.; KANDHARE, A. D.; BHISE, S. D. Anti-inflammatory effect of *Daucus carota* root on experimental colitis in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.4, p. 337-343, 2012.

PARRA, R. S. et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. **Med Gas Res**, v. 5, p. 6, 2015.

PARNES, J.; PALNITKAR, S. S. Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, v. 270, n. 31, p. 18465-72, 1995.

PAUL G, KHARE V, GASCHÉ C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **Eur J Clin Invest**. 2012 Jan;42(1):95-109. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02552.x. Epub 2012 Jun 1.

PEARSON C. Inflammatory bowel disease. *Clinical Advanced NT* 2004; 100(9):86-90.

PEREIRA, N. P. et al. Synthesis and analgesic properties of new 5-thioaryl pyrazole derivatives. **Boll Chim Farm**, v. 137, n. 3, p. 82-6, 1998.

PILE, J. E. et al. Interventional Effects of Plumbagin on Experimental Ulcerative Colitis in Mice. **Journal of Natural Products**. v. 76(6), p. 1001-1006, 2012.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory Bowel Disease. The **New England Journal of Medicine**. v. 347, p.417-429, 2002.

PORRAS M; MARTÍN M T; PING-CHANG YANG; JURY J; MARY H. PERDUE; VERGARA P. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*. 12(9):843–852, SEP 2006.

PRAVDA J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**. 2005;11:2371-84

PUTHOOR, P. R.; ZOETEN, E. F. Pediatric Ulcerative Colitis: The Therapeutic Road to Infliximab. **Biol Ther**. v. 3, n. 1, p. 1-14, 2013.

QI-HUI LI, WEN-XIA XIE, XIAO-PEI LI, KA-TE HUANG, ZHONG-HENG DU, WEN-JIE CONG, LONG-HUA ZHOU, TIAN-SHEN YE, AND JIANG-FAN CHEN. Adenosine A_{2A} Receptors Mediate Anti-Inflammatory Effects of Electroacupuncture on Synovitis in Mice with Collagen-Induced Arthritis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2015, Article ID 809560, 11 pages

RAJASUNDARAM S. Adenosine A_{2A} Receptor Signaling in the Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Front. Immunol**. 06 March 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00402

RANI, R.; SMULIAN, A. G.; GREAVES, D. R.; HOGAN, S. P.; HERBERT, D. R. TGF β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 7, p. 2000-2009, 2011.

RANG, H. et al. Farmacologia. 5^a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013. 624 p.

RANSFORD, R. A. J.; LANGMAN, M. J. S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, v. 51, n. 4, p. 536-539, jan. 2002.

RAYGUDE, K. S.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; GHULE, A. E.; BODHANKAR, S. L. Evaluation of ameliorative effect of quercetin in experimental model of alcoholic neuropathy in rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 331-341, 2012.

RIBEIRO, R. A; LIMA, R.C.P; SOUZA, M. H.L; LEITE, C. A. V; Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica: Bases da Resposta Inflamatória do Trato Gastrointestinal. In: Oriá, R. B & Brito, G.A.C. (Orgs). São Paulo: Blucher, 2016. P 763-807.

ROSENBAUM, J.T.; BONEY, R.S. Use of a soluble interleukin-1 receptor to inhibit ocular inflammation. **Curr Eye Res.** v.10, p.1137-1139. 1991.

RUEGG UT, GILLIS JM: Calcium homeostasis in dystrophic muscle. **Trends Pharmacol Sci** 1999; 20: 351-352.

SADAR, S. S.; VYAWAHARE, N. S.; BODHANKAR, S. L. Ferulic acid ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis through modulation of cytokines, oxidative stress, inos, cox-2, and apoptosis in laboratory rats. **Excli Journal**, v. 15, p. 482-499, 2016.

SALES-CAMPOS, H. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 96-107, fev. 2015.

SANTOS, R.M.; CARVALHO, A.T.P.; SILVA, K.S.; SÁ S.P.C.; SANTOS, A.H.; SANDINHA, M.R. Inflammatory bowel disease: outpatient treatment profile. **Arq Gastroenterol**, v017. v. 54 n° 2 Abr/Jun.2017.

SHOUVAL DS, RUFO PA. The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: a review. **JAMA Pediatr**. 2017;171(10):999-1005.

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

SILVA, A.G.; ZAPATA-SUDO, G.; KUMMERLE, A.E.; FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J.; SUDO, R.T. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorg. Med. Chem**. 2005, 13, 3431–3437.

SILVA, C. L.; NOEL, F.; BARREIRO, E. J. Cyclic gmp-dependent vasodilatory properties of lassbio 294 in rat aorta. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 1, p. 293-8, 2002.

SIMMS LA, et al. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. **Gut**. 2008 Jul;57(7):903-10. doi: 10.1136/gut.2007.142588. Epub 2008 Feb 27.

SIVAPRASAD, R.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 18-23, 2004.

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 MM, BELASCO AGS, AGUILAR-NASCIMENTO JE. Perfil Epidemiológico dos Pacientes Portadores de Doença Inflamatória Intestinal do Estado de Mato Grosso. **Rev Bras Coloproct**. 2008;28:324–8.

SONNENBERG A. Geographic variation in the incidence of and mortality from inflammatory bowel disease. **Dis Colon Rectum**. 1986 Dec;29(12):854-61.

SMELTZER SC, Bare BG. *Tratado de enfermagem médico-cirúrgica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

STEVCEVA, L.; PAVLI, P.; HUSBAND, A. J.; DOE, W. F. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. **BMC Clin Pathol**, v. 1, n. 3, 2001.

SUDO, R T; SUDO, G Z; BARREIRO, E J. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. **Br J Pharmacol**. 2001 Oct; 134(3): 603–613

SUDO, G. Z.; PEREIRA, S. L.; BEIRAL, H. J. V.; KUMMERLE, A. E.; RAIMUNDO, J. M.; ANTUNES, F.; SUDO, R. T.; BARREIRA, E. J.; FRAGA, C. A. M. Pharmacological characterization of (3-Thienylidene)- 3,4- Methylenedioxybenzoylhydrazide: a novel muscarinic agonist with antihypertensive profile. **American Journal of Hipertension**, Louisville, v.23, n.1, p.135-141, 2010.

SZALAI, Z; SZÁSZ, A; NAGY, I; PUSKÁS, LG; KUPAI, K; KIRÁLY, A; BERKÓ, AM; PÓSA, A; STRIFLER, G; BARÁTH NAGY, LI; SZABÓ, R; PÁVÓ, I; MURLASITS, Z; GYÖNGYÖSI, M; VARGA, C. Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in 83 TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 925981, doi:10.1155/2014/925981, 2014.

SZKARADKIEWICZ A, MARCINIAK R, CHUDZICKA-STRUGAŁA I, WASILEWSKA A, DREWS M, MAJEWSKI P, KARPIŃSKI T, ZWOŹDZIAK B. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 2009 Jul-Aug;57(4):291-4. doi: 10.1007/s00005-009-0031-z. Epub 2009 Jul 4.

TAHAN, G.; GRAMIGNOLI , R.; MARONGIU, F.; AKTOLGA, S.; CETINKAYA A.; TAHAN, V.; DORKO, K. .Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant

activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 3, p. 715-720, 2011.

TAHAN, G.; AYTAC, E.; AYTEKIN, H.; GUNDUZ, F.; DOGUSOY, G.; AYDIN, S.; TAHAN, V.; UZUN, H. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **Canadian Journal of Surgery**, v. 11, n. 54:p. 333–8, 2011.

TAUPIN D, PODOLSKY DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4: 721–734, 2003.

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.

TIAN, L. Downregulation of electroacupuncture at ST36 on TNF-alpha in rats with ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology: WJG**. v. 9(5), p. 1028– 1033, 2003.

TIAN, B.; HE, M.; TAN, Z. et al. Synthesis and antiviral evaluation of New NAcyhydrazones Containing Glycine Residue. **Chemical biology & drug design**. v.77, p.189- 198. 2011.

TRACEY, K. J. The Inflammatory Reflex. **Nature**. p. 420, p. 853-859, 2002.

TRIANAFILLIDIS, J.; EMMANUEL, M.; FILIPPOS, G. Current and Emerging Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 185–210, abr. 2011.

TRIBUTINO, J.L.; DUARTE, C.D.; CORREA, R.S.; DORIGUETTO, A.C.; ELLENA, J.; ROMEIRO, N.C.; CASTRO, N.G.; MIRANDA, A.L.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A. Novel 6-methanesulfonamide-3,4methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg. Med. Chem**. 2009, 17, 1125–1131.

TRIBUTINO, J.L.; SANTOS, M.L.; MESQUITA, C.M.; LIMA, C.K.; SILVA, L.L.; MAIA, R.C.; DUARTE, C.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.; CASTRO, N.G.; et al. LASSBio-881: An N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.** 2010, 159, 1716–1723.

TURNER JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. **Am J Pathol.** 2006;169:1901–9.

TÜZÜN, A.; ERDİL, A.; INAL, V.; AYDIN, A.; BAĞCI, S.; YEŞİLOVA, Z.; SAYAL, A.; KARAEREN, N.; DAĞALP, K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 569-572, 2002.

VARANI, K.; VINCENZI, F.; TOSI, A.; TARGA, M.; MASIERI, F. F.; *et al.* Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 101–115, 2010

VARSHOSAZ, J.; EMAMI, J.; FASSIHI, A.; TAVAKOLI, N.; MINAIYAN, M.; AHMADI, F.; MAHZOUNI, P.; DORKOOSH, F. Effectiveness of budesonidesuccinatedextran conjugate as a novel prodrug of budesonide against acetic acidinduced colitis in rats. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 25, p. 1159-1165, 2010.

WANG F, SCHWARZ BT, GRAHAM WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. **Gastroenterology.** 2006;131:1153–63.

WEHKAMP J, et al. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. **Proc Natl cad Sci U S A.** v.102, n. 50, p. 18129-18134, 2005.

WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plantderived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240-6, 2014.

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427-434, 2007.

XU, X. R. et al. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.** v. 20(12), p. 3255-3264, 2014.

YANG ZP, HONG L, WU Q, WU KC, FAN DM. Preoperative infliximab use and postoperative complications in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. **Int J Surg** 2014;12:224– 30.

YIN, B. et al. Blocking TNF- α by combination of TNF- α - and TNFR-binding cyclic peptide ameliorates the severity of TNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 656, n. 1-3, p. 119-24, 2011

ZAPATA-SUDO, G. et al. 3,4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone (LASSBio-294) increases contractility in mammalian skeletal muscle through sarcoplasmic reticulum calcium release. **Eur. J. Pharmacol.** v. 470, p. 79-85, 2003.

ZHAO, F. et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. **J Biol Chem**, v. 276, n. 17, p. 13810-6, 2001.

ZINGARELLI, B.; SZABÓ, C.; SALZMAN, A L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 199–209, 1999.

Anexo

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrólio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (89) 3215-5734, e-mail: ceapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Avaliação da ação antioxidante e anti-inflamatória do composto LASSBio 294 na colite ulcerativa induzida por ácido acético*", registrada nº 315/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA do Campus Ministro Reis Veloso-Parnaíba/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de 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 **30/06/2017**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Julho/ 2017 à Março/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Swiss
Nº de Animais	161
Peso/ Idade	25-30g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI

Teresina, 30 de Junho de 2017.


Prof^o. Zvetel L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFPI
Coordenadora